



HAL
open science

Méthylation de H3K27 : régulation et rôle dans le cartilage articulaire

Lyess Allas

► **To cite this version:**

Lyess Allas. Méthylation de H3K27 : régulation et rôle dans le cartilage articulaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC426 . tel-03427467

HAL Id: tel-03427467

<https://theses.hal.science/tel-03427467v1>

Submitted on 14 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Méthylation de H3K27 : régulation et rôle dans le cartilage articulaire

**Présentée et soutenue par
Lyess ALLAS**

**Thèse soutenue publiquement le 13/11/2019
devant le jury composé de**

Mme MAGALI CUCCHUIARINI	Professeur, Université des Saarlandes	Rapporteur du jury
M. FRANCK VERRECCHIA	Directeur de recherche à l'INSERM, Université de Nantes	Rapporteur du jury
M. KARIM BOUMEDIENE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. ERIC MAUBERT	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme DANIELE NOEL	Directeur de recherche à l'INSERM, Université de Montpellier	Membre du jury
Mme CATHERINE BAUGE	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CATHERINE BAUGE, Biologie des tissus conjonctifs et cutanés



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



EA7451 BioConnect

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer mes remerciements à Catherine Baugé qui a été ma directrice de thèse. Je lui suis reconnaissant de m'avoir confié mon projet de thèse et de m'avoir conseillé et suivi au cours de ces trois ans. Je la remercie également avec Karim Boumediene pour avoir obtenu des financements, qui ont permis l'achat de nouveaux appareils et le bon fonctionnement du laboratoire. Je remercie chaleureusement tous les autres membres du laboratoire Bioconnect avec qui j'ai pu travailler et échanger.

J'adresse également mes sincères remerciements Vincent Richard, Julie Le Mestre Daniele Noel Mohamed Ouzzine pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse durant ces trois.

Je souhaite remercier Eric Maubert pour m'avoir formé à l'immunohistochimie ainsi que Veronique Agin et Cléo Dujarier pour leurs précieux conseils en comportement.

Merci aux organisateurs du forum Biotechno 2017 et en particulier à Sarah Enouz pour m'avoir invité à leur événement. Cet événement a été déterminant sur mon après-thèse.

Enfin je remercie l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), la Région Normandie et le Fonds européen de développement régional (Ferder) pour avoir financé mon projet de thèse.

Abréviations

3D	Trois dimensions
5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidine
5caC	5 carboxylcytosine
5fC	5 formylcytosine
5hmC	5 hydroxymethylcytosine
5mC	5-methylcytosine
ACAN	Aggrecan
ACI	Autologous chondrocyte implantation
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEBP2	Adipocyte Enhancer-Binding Protein
AIRB3b	AT-rich interactive domain 5b
Airn	Antisense of Igf2r non-coding RNA
Akt	Protein kinase B
ALK	Activin-like kinase
AlphaMEM	alphaMinimum Essential Medium
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AR	Récepteur aux androgènes
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASH2L	Absent, small or homeotic-2 like
BACE1	Beta-site APP-cleaving enzyme 1
BER	Base excision repair
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
BRM	BRAHMA
BSA	Bovin serum albumin
CamK	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin dependent kinase
CEBPA	CCAAT-enhancer binding protein alpha
c-Ets-1	Erythroblastosis virus E26 oncogene
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
ChIP-seq	ChIP-sequencing
CKm	Creatine Kinase, M-Type
CO₂	Dioxyde de carbone
COL10A1	Collagen, type X, alpha 1
COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1
COL2A1	Collagen, type II, alpha 1
COL9A1	Collagen, type IX, alpha 1
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CoRest	Complete information for RCOR1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CSC	Cellules souches cancéreuses
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
CTBP	C-terminal-binding protein

DAB	Diaminobenzidine
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal [or critical] region 8
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMM	Destabilization of the medial meniscus
DNMT	DNA methyltransferase
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
DOT1L	DOT1-like)/KMT4
DZNep	3-Déazanepianocine A
EC	Embryonic carcinoma cell
EED	Embryonic ectoderm development
EIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELK1	ETS Transcription Factor ELK1
EMA	Agence Européenne du Médicament
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ESC	Embryonic stem cell
ESET	ERG-associated protein with SET domain
EZH2	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2
GAS5	growth arrest specific 5
GCN5	General control of amino-acid synthesis, yeast, homolog
GSK-J4	GlaxoSmithKline J4
H3K27me3	Lysine 27 de l'histone H3 triméthylée
H3K4me3	Lysine 4 de l'histone H3 triméthylée
HA	acide hyaluronique
HAC	Human articular chondrocyte
HAT	Histone acétyl-transferase
HDAC	Histone déacétylase
HDACi	Inhibiteurs de HDAC
HIF	Facteur de transcription induit par l'hypoxie
HIF-1a	Hypoxia-induced
HMT	Histone méthyltransférase
HNF4alpha1	Homolog 1 hepatocyte nuclear factor 4alpha1
HOX	Homeobox
HP1	Heterochromatin protein 1
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
hSNFH2	Sucrose nonfermenting protein 2 homolog
HZ	Zone hypertrophique
ICR1	Ichthyosis Congenita I
Igf2r	Insulin-like growth factor 2 receptor
IL	Interleukine
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
JARID1	Jumonji AT-rich interactive domain-1
JHDM2	Jumonji domaincontaining histone demethylase-2
JmjC	Jumonji C
JMJD3	Jumonji Domain Containing 3
KO	Knockout
KRAS	K-ras or Ki-ras
LBD	Light-dark box
LINCMD1	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA, Muscle Differentiation 1
lncRNA-CIR	Cartilage Injury-related lncRNAs

LSD1	Lys-specific demethylase 1
MAC1	Matrix-induced autologous chondrocyte implantation
Mash1	Mammalian achaete scute homolog-1
MBP	Methyl binding protein
MCPIP1	Monocyte chemo-attractant protein1-induced protein 1
MEC	Matrice extracellulaire
MeF2	Myocyte enhancer factor 2
MIA	Monosodium iodoacetate
miRNA	MicroRNA
MLL	Mixed lineage leukaemia
MMP	Matrix metalloproteinase
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
MTI	Médicaments de thérapie innovante
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAT	Natural antisense transcripts
N-ChIP	Native-ChIP
NCOR2	Nuclear receptor co-repressor 2
ncRNA	Non-coding RNA
ND	Non déterminé
NFIL3	Nuclear factor, interleukin 3 regulated
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NKT	Natural killer T
Nkx2-5	NF-kappaB, NK2 Homeobox
NO	Nitric oxide
NRON	Non-coding repressor of NFAT
NSAID	Inflammatoire non stéroïdiens
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylase
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
Olf	Olf Early B Cell Factor
OMS	Organisation mondiale de la santé
p38 MAPK	Mitogen-activated protein kinase p38
PAG	Substance grise périaqueducule
Pax1	Paired box protein
PBS	Phosphate buffered saline
PcG	Polycomb
PCL	Polycomblike
PGE2	Prostaglandin E2
PHD	Plant homeodomain
PHF	PHD finger
PHF2	PHD Finger Protein 2
PHF20	Plant homeodomain factor 20
PKD	Protein kinase D
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
pRB-E2F	Retinoblastoma protein- E2 factor
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PRDM	PRDI-BF1 and RIZ homology domain
pre-miRNA	MiRNA précurseur
PTM	Post-translational modification
PVDF	Polyvinylidene fluoride

PWR1	Promoting Watson RNA
PZ	Zone proliférative
RbBP5	Retinoblastoma binding protein 5
RBP	RNA-binding proteins
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RISC	RNA-induced silencing complex
RPL13a	Ribosomal protein L13a
rRNA	ARN ribosomiques
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SANT	Swi3, Ada2, N-Cor, and TFIIIB
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SET	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax
SET-1A	Su(var)3-9 and Enhancer of zeste, Trithorax 1A
SFR	Société française de rhumatologie
SMAD	Sma and mad
Sox	Sex-determining Region of Y chromosome box
Spz1	Spermatogenic Leucine Zipper 1
SUV39H1,2	Suppressor of variegation 3-9, drosophila homolog of 1 and 2
SUZ12	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEB	Triton Extraction Buffer
TET	Ten-eleven Translocation
TGF-β	Transforming growth factor β
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR	Toll like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
Tp	Tetratricopeptide repeat
TRIM26	Tripartite motif (family) 26
tRNA	ARN de transfert
UTX	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WDR5	WD repeat domain 5
Wnt	Wingless and the name Int-1
WST1	Water-soluble Tetrazolium salts 1
YY1	Yin Yang 1
γH2AX	Phosphorylated histone H2AX

Table des matières

1	Introduction.....	17
1.1	Le cartilage : développement et arthrose.....	17
1.1.1	Physiologie du cartilage hyalin.....	17
1.1.2	Structure du cartilage.....	18
1.1.3	Composition du cartilage.....	20
1.1.4	Ossification enchondrale.....	24
1.1.5	Les cellules souches mésenchymateuses adultes.....	25
1.1.6	Arthrose.....	29
1.2	Epigénétique.....	45
1.2.1	Méthylation de l'ADN.....	46
1.2.2	Les ARN non codants (ncRNA).....	48
1.2.3	Modification des histones.....	55
1.2.4	Méthylation de H3K27.....	60
1.2.5	Les déméthylases JMJD3 et UTX.....	64
1.2.6	Modifications épigénétiques au cours de la chondrogenèse.....	69
1.2.7	Dérégulation épigénétique au cours de l'arthrose.....	75
2	Objectif.....	77
3	Résultats.....	79
3.1	Rôle d'EZH2 dans l'hypertrophie, catabolisme et l'inflammation.....	79
3.1.1	L'inhibition d'EZH2 atténue l'inflammation et la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose.....	79
3.1.2	L'inhibition d'EZH2 inhibe l'hypertrophie des chondrocytes.....	101
3.1.3	Le GSK-J4 n'a pas d'effet sur l'inflammation, le catabolisme et l'hypertrophie des chondrocytes.....	111
3.2	JMJD3 et UTX favorisent la chondrogenèse, intérêt en ingénierie tissulaire du cartilage..	115
4	Discussion générale et perspectives.....	139
5	Références bibliographiques.....	151
6	Annexes.....	177

Table des figures

Figure 1 : Rôle du cartilage dans l'absorption des chocs lors de la marche.	17
Figure 2 : Schéma du cartilage.....	18
Figure 3 : Ultrastructure du cartilage.	19
Figure 4 : Formes des chondrocytes en fonction des zones dans lesquelles ils se trouvent.....	20
Figure 5 : Les principaux composants matriciels du cartilage.	21
Figure 6 : La synthèse du collagène.....	22
Figure 7 : Limb bud.	24
Figure 8 : Ossification enchondrale.....	25
Figure 9 : Les cellules souches de l'articulation.	26
Figure 10 : Distribution cellulaire dans le cartilage.	27
Figure 11 : Réparation du cartilage par les MSC.....	28
Figure 12 : Les principaux facteurs de risque de l'arthrose.....	29
Figure 13 : Imagerie antéro-postérieure par ray X d'un genou de patient arthrosique.....	31
Figure 14 : Les processus physiopathologiques de l'arthrose.....	32
Figure 15 : La douleur référée.	35
Figure 16 : Remplacement total de l'articulation par une prothèse.....	39
Figure 17 : Ingénierie tissulaire du cartilage.....	40
Figure 18 : Effet du TGF- β 3 et de l'hypoxie sur la chondrogenèse.	43
Figure 19 : Le paysage de Waddington.	45
Figure 20 : Réaction de méthylation de la cytosine catalysée par les DNMT.....	46
Figure 21 : Méthylation de l'ADN et répression génique.....	46
Figure 22 : Déméthylation active de l'ADN.....	48
Figure 23 : Biogenèse des miRNA.....	50
Figure 24: Mécanismes d'inhibition génique post-transcriptionnels par les miRNA.	51

Figure 25 : Les lncRNA régulent la transcription à travers plusieurs mécanismes.	53
Figure 26 : Régulation post-transcriptionnelle des lncRNA.	54
Figure 27 : La famille des histones désacétylases (HDAC), structure, phénotype et survenue de léthalité après invalidation chez la souris.	56
Figure 28 : Le complexe PRC2.	60
Figure 29 : Réaction de méthylation par EZH2 en utilisant SAM comme cofacteur.	61
Figure 30 : Répression génique induite par PRC2/EZH2.	62
Figure 31 : Les déméthylases de H3K27me3.	65
Figure 32 : Méthylation et déméthylation de la lysine 27 de l’histone H3 (H3K27).	65
Figure 33 : JMJD3 et UTX ne sont pas seulement des déméthylases.	66
Figure 34 : Rôle de UTX dans la différenciation des ESCs.	67
Figure 35 : Rôle de JMJD3 dans les processus inflammatoires.	68
Figure 36 : Anomalies génétiques d’UTX dans les cancers.	68
Figure 37 : EZH2 stimule la prolifération et l’hypertrophie des chondrocytes.	73
Figure 38 : JMJD3 stimule la prolifération et l’hypertrophie des chondrocytes.	75
Figure 39 : Effet du GSK-J4 sur les chondrocytes traités par IL-1β.	112
Figure 40 : Le GSK-J4 n’a pas d’impact sur les gènes matriciels et sur l’induction des marqueurs de l’hypertrophie et de l’anabolisme par le TGF-β.	113
Figure 41 : L’inhibition d’EZH2 par siRNA ne réduit pas l’expression de MMPs.	140
Figure 42 : Le modèle méniscectomie induit plus de dommages que le modèle MIA.	141
Figure 43 : Tests d’évaluation de la douleur.	143

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales matrices en ingénierie tissulaire du cartilage.....41

Résumé

L'arthrose est la maladie rhumatologique la plus répandue et une des causes majeures de douleur et de handicap. Au cours de ce travail nous avons étudié le rôle et la régulation de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) dans l'arthrose et la chondrogenèse.

Dans une première partie, nous avons montré que l'inhibition de la méthylase EZH2 par l'EPZ-6438 atténue l'inflammation et la libération de métalloprotéases par les chondrocytes traités à l'IL-1 β . L'inhibition d'EZH2 réduit également l'hypertrophie des chondrocytes induite par le TGF- β 1. L'EPZ-6438 atténue aussi la dégradation du cartilage in vivo dans un modèle d'arthrose murin. De plus, l'inhibition d'EZH2 diminue le handicap locomoteur chez la souris et réduit l'expression du NGF dans les chondrocytes.

Dans une deuxième partie, nous avons mis en évidence que les déméthylases JMJD3 et UTX favorisent la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses. D'autre part, la surexpression de JMJD3 et UTX favorise la formation de cartilage et la production de collagène de type II des cellules souches mésenchymateuses après différenciation et implantation in vivo.

Notre étude a montré l'importance de la marque H3K27me3 dans le cartilage. Alors qu'EZH2 est impliquée dans l'inflammation, l'hypertrophie des chondrocytes et la destruction du cartilage, JMJD3 et UTX favorisent la chondrogenèse, la formation du cartilage et la production de collagène.

1 Introduction

1.1 Le cartilage : développement et arthrose

1.1.1 Physiologie du cartilage hyalin

Le cartilage hyalin est un tissu conjonctif blanc nacré, principalement présent à la surface des articulations. Il est également retrouvé dans la cage thoracique, le nez, le larynx et la trachée. Mise à part le cartilage articulaire, le cartilage hyalin est recouvert d'une membrane fibreuse nommée périchondre. Le périchondre contient des vaisseaux sanguins permettant d'apporter les nutriments jusqu'au cartilage. Le cartilage articulaire est renfermé dans une capsule dont les parois sont formées de la membrane synoviale. Cette membrane produit le liquide synovial, permettant l'apport de nutriments et l'hydratation du cartilage. Le cartilage a un rôle fondamental dans le déplacement des êtres vivants (figure 1). L'aspect lisse du cartilage permet les mouvements de flexion et d'extension des membres. Ses propriétés souples, permettent l'amortissement des chocs lors des déplacements. A titre d'exemple, lors de la marche le cartilage permet l'extension et la flexion des chevilles, des genoux, des épaules et des coudes. De plus, les impacts provoqués par la marche sont absorbés dans un premier temps par le cartilage des chevilles et des genoux, puis par le cartilage des hanches et des disques intervertébraux (Zelik and Kuo, 2010). Le cartilage articulaire est avasculaire, de ce fait il possède de faibles capacités de régénération et de cicatrisation. A cet effet, la préservation du cartilage est primordiale à l'homéostasie de l'articulation.

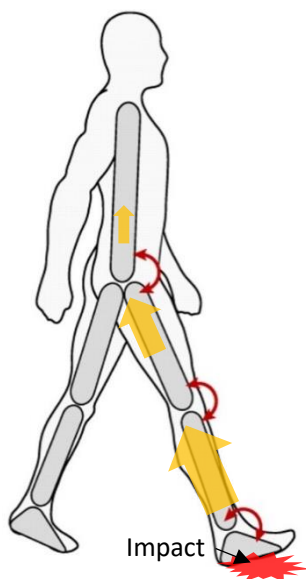


Figure 1 : Rôle du cartilage dans l'absorption des chocs lors de la marche.

Lors de la marche, le choc provoqué par le contact entre le talon et le sol est absorbé dans un premier temps par le cartilage des chevilles, puis par celui des genoux et des hanches pour enfin être complètement atténué par le cartilage des disques intervertébraux. Les flèches rouges représentent les mouvements articulaires, les flèches jaunes représentent la force et la direction de l'impact (modifié de Zelik and Kuo, 2010).

1.1.2 Structure du cartilage

1.1.2.1 Les zones

Le cartilage articulaire est composé d'une matrice extracellulaire dense et de chondrocytes distribués de manière clairsemée (figure 2). La matrice extracellulaire est essentiellement composée d'eau, de collagènes et de protéoglycanes et dans une moindre mesure de protéines non-collagéniques et de glycoprotéines (Buckwalter and Mankin, 1998). Tous ces composants permettent de retenir l'eau dans la matrice, qui est un élément nécessaire aux propriétés mécaniques du cartilage. L'organisation des chondrocytes et des fibres de collagène structurent le cartilage articulaire en différentes zones : superficielle, moyenne, profonde et calcifiée. Chacune de ces zones est divisée en 3 régions : région péri-cellulaire, région territoriale et région interterritoriale (Buckwalter et al., 1994).

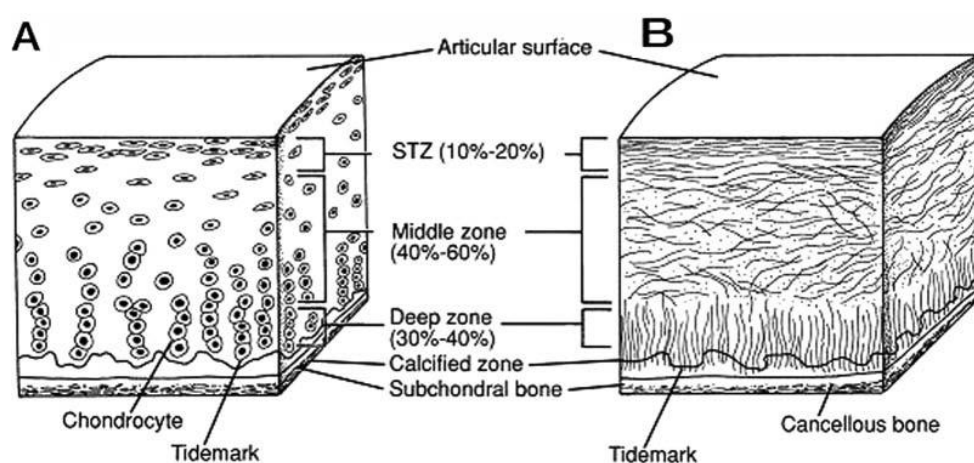


Figure 2 : Schéma du cartilage.

(A) organisation cellulaire. (B) organisation des fibres de collagène. STZ : superficial tangential zone. (Buckwalter et al., 1994)

La zone superficielle protège les zones plus profondes des stress mécaniques et représente environ 10 à 20 % de l'épaisseur du cartilage. La densité cellulaire y est importante et les fibres de collagène (principalement de type II et IX) sont fermement empaquetées et alignées de manière parallèle à la surface de l'articulation. Cette zone est en contact avec le liquide synovial et confère une résistance aux forces de frottement (Becerra et al., 2010). Immédiatement sous la zone superficielle, se trouve la zone moyenne. Celle-ci constitue un pont anatomique et fonctionnel entre la zone superficielle et profonde. Elle représente 40 à 60 % du cartilage et contient des protéoglycanes et des fibres de collagène. Le collagène est agencé de manière oblique et les chondrocytes sont sphériques et à faible

densité. La zone moyenne est la première ligne de résistance aux forces de compression (Milz et al., 2005). La zone profonde fournit la plus grande résistance aux forces de compression au regard de l'organisation perpendiculaire des fibres de collagène par rapport à la surface articulaire. Cette zone contient les fibrilles de collagène les plus larges en termes de diamètre, est riche en protéoglycanes et faible en eau. Les chondrocytes sont alignés en colonnes parallèles aux fibres de collagène et perpendiculaires à la surface du cartilage. La zone profonde représente 30 à 40% du cartilage. La zone calcifiée fait la transition entre la zone profonde et le tissu osseux, en permettant l'ancrage des fibres de collagène dans l'os sous-chondral. Les chondrocytes sont hypertrophiques et d'une densité rare.

1.1.2.2 Les régions

La matrice extracellulaire varie en fonction de sa proximité avec les chondrocytes (figure 3).

La matrice péri-cellulaire est une fine couche entourant le chondrocyte. Elle contient principalement des protéoglycanes, des glycoprotéines et des protéines non-collagéniques (Daly et al., 2018). La région territoriale entoure la zone péri-cellulaire. Elle est composée principalement de fibres de collagène formant un réseau autour des cellules (Guilak and Mow, 2000). La région interterritoriale est la plus étendue des trois. C'est elle qui contribue principalement aux propriétés biomécaniques du cartilage (Mow and Guo, 2002). Les protéoglycanes sont en abondance dans cette zone.

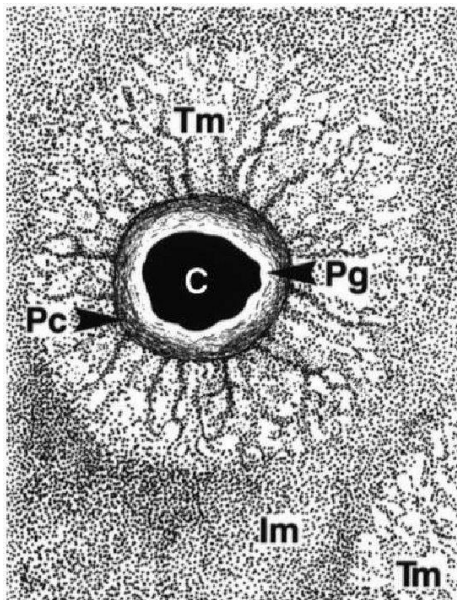


Figure 3 : Ultrastructure du cartilage.
(C) Chondrocyte, (Pg,Pc) région péri-cellulaire, (Tm) région territoriale, (Im) région interterritoriale. (Poole, 1997)

1.1.3 Composition du cartilage

1.1.3.1 Le chondrocyte

Le chondrocyte est le principal type cellulaire résidant le cartilage articulaire. Les chondrocytes sont des cellules très spécialisées, métaboliquement actives et jouent un rôle prépondérant dans le développement, le maintien et la réparation de la MEC (Sacitharan, 2019). Les chondrocytes sont originaires des cellules souches mésenchymateuses et représentent environ 2% du volume tissulaire (Alford and Cole, 2005). Les chondrocytes varient en termes de nombre, taille et forme en fonction de la région dans laquelle ils se trouvent (figure 4) (Daly et al., 2018).



Figure 4 : Formes des chondrocytes en fonction des zones dans lesquelles ils se trouvent.

(Daly et al., 2018)

Chaque chondrocyte établit son propre microenvironnement et est responsable de son *turn-over*. Ce microenvironnement empêche également la migration des chondrocytes dans les régions adjacentes. Il est donc rare que les chondrocytes communiquent directement *via* une interaction cellule-cellule. Cependant, ils répondent à une grande variété de signaux de transduction tels que les facteurs de croissance, les stimuli mécaniques, la pression hydrostatique (Sophia Fox et al., 2009). Les chondrocytes ont par ailleurs un potentiel répliatif limité, ce qui restreint leur capacité de cicatrisation. La survie des chondrocytes dépend d'un environnement chimique et mécanique optimal (Sophia Fox et al., 2009).

1.1.3.2 L'eau

L'eau est le composant le plus abondant du cartilage articulaire, représentant 80% du poids tissulaire (Mow et al., 1992). La part d'eau dans le cartilage est de 80% dans les zones superficielles, alors qu'elle est de 65% dans les zones profondes (Buckwalter and Mankin, 1998). Les ions inorganiques comme le

sodium, calcium, chlore et le potassium, sont présents sous forme dissoute dans l'eau (Linn and Sokoloff, 1965). La circulation de l'eau dans le cartilage permet l'apport de nutriments aux chondrocytes, en plus de contribuer à la lubrification. Les forces de friction entre les molécules d'eau et la matrice sont très fortes, la perméabilité dans le cartilage est donc faible. C'est la combinaison des forces de friction et la forte pressurisation de l'eau dans la matrice, qui permet au cartilage de supporter des charges importantes (Sophia Fox et al., 2009).

1.1.3.3 Les collagènes

Le collagène est la macromolécule la plus abondante dans la matrice, en comptant pour 60% du poids tissulaire sec. Le collagène de type II représente 90 à 95 % du collagène dans le cartilage. Celui-ci forme des fibrilles et des fibres interconnectées avec les protéoglycanes. Les autres collagènes présents sont de type IX et XI, et dans une moindre mesure de type I, IV, V et VI. Ces collagènes ont pour rôle principal de stabiliser les réseaux de collagène de type II (figure 5). Le collagène de type X est retrouvé dans les plaques de croissance et dans la zone calcifiée du cartilage chez l'adulte. Celui-ci facilite l'ossification en servant de plateforme transitoire aux ostéoblastes et aux cellules endothéliales (Coghlan et al., 2017).

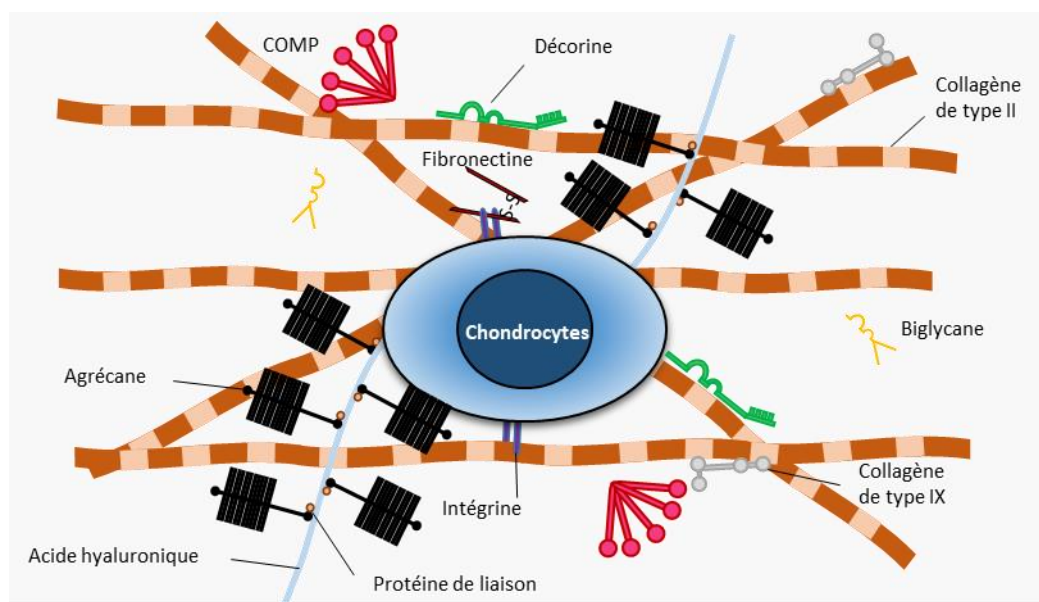


Figure 5 : Les principaux composants matriciels du cartilage.

Trois grandes classes de protéines existent dans le cartilage articulaire : les collagènes (principalement le collagène de type II), les protéoglycanes (principalement l'agrécane), et les protéines non collagéniques (telles que la protéine de liaison, la fibronectine et la cartilage oligomeric matrix protein (COMP)). Il existe aussi d'autres protéoglycanes comme la décorine et le biglycane. Les interactions entre les fibres de collagène II et les protéoglycanes sont responsables de la résistance du cartilage à la tension et à la compression (Allas et al., 2018).

Tous les collagènes forment une triple hélice par l' homo-trimérisation des chaînes alpha (figure 6). Les chaînes sont composées essentiellement de glycines et de prolines, ainsi que d'hydroxyprolines, permettant la stabilisation de la triple hélice *via* des ponts hydrogènes (Guilak et al., 2018).

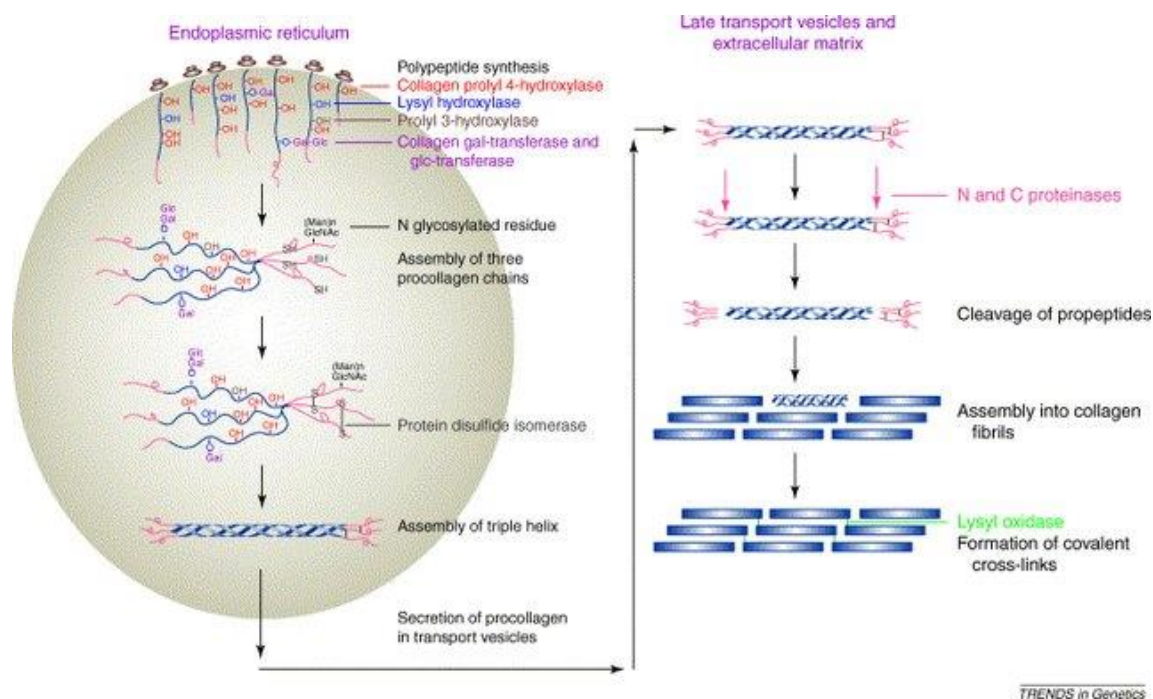


Figure 6 : La synthèse du collagène.

Les chaînes polypeptidiques sont d'abord synthétisées par les ribosomes et secrétées dans le réticulum endoplasmique où elles subissent l'hydroxylation des prolines et la glycosylation des lysines. Les propeptides sont ensuite assemblés en triples hélices et secrétés dans l'espace extracellulaire où ils sont clivés en N et C terminal. S'ensuit un autoassemblage des triples hélices en fibrilles, qui est consolidé par des liaisons covalentes. (Myllyharju and Kivirikko, 2004).

1.1.3.4 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des protéines monomères fortement glycosylées. C'est la classe de macromolécules la plus représentée dans le cartilage après les collagènes (10 à 15% du poids). Les protéoglycanes consistent en un corps protéique sur lequel sont ancrées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes. Les protéoglycanes contenus dans le cartilage sont : l'agrécan, la décorine, le biglycan et la fibromoduline. L'agrécan est le protéoglycane le plus abondant et le plus important en termes de poids moléculaire, avec plus d'une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate et kératane sulfate. L'agrécan est caractérisé par son interaction avec l'acide hyaluronique, afin de former des agrégats *via* la protéine de liaison (Aspberg, 2012). L'agrécan occupe l'espace interfibrillaire dans le cartilage et contribue grandement à la rétention d'eau dans le cartilage. Les autres protéoglycanes

n'ont pas cette propriété d'agrégation. Leur structure protéique est relativement proche mais leur composition en glycosaminoglycane diffère. La décorine et le biglycane possèdent respectivement une et deux chaînes de dermatane sulfate, alors que la fibromoduline possède plusieurs chaînes de kératane sulfate. La décorine et la fibromoduline interagissent avec le collagène de type II et jouent un rôle dans la formation des fibrilles. Le biglycane est retrouvé principalement dans la région péri-cellulaire où il interagit avec le collagène de type VI (Tamer, 2013).

1.1.3.5 *Les glycoprotéines et protéines non-collagéniques*

Il existe plusieurs protéines non-collagéniques dans le cartilage, telles que la fibronectine ou la *Cartilage oligomeric matrix protein* (COMP). Cependant, leur fonction dans le cartilage n'est pas très bien connue. Elles joueraient un rôle dans l'organisation de la MEC mais également dans les interactions cellule-matrice (Sophia Fox et al., 2009).

1.1.3.6 *L'acide hyaluronique*

L'acide hyaluronique est un acide anionique et également un glycosaminoglycane non sulfaté. Il est distribué dans les tissus conjonctifs et les épithéliums. Dans les articulations, celui-ci est produit par la membrane synoviale. Il est responsable des propriétés visqueuses du cartilage. L'acide hyaluronique apporte de la fluidité et la viscosité, nécessaires aux mouvements des articulations et la réduction de frictions (Glyn-Jones et al., 2015a).

1.1.3.7 *Le métabolisme*

Dans le cartilage, l'environnement est en hypoxie et les nutriments proviennent du liquide synovial et pénètrent par diffusion passive. L'accès des molécules dans le cartilage est restreint par leur taille, charge et conformation. En moyenne, les pores donnant l'accès au cartilage sont d'environ 6 nm de diamètre (Mow et al., 1992). Les chondrocytes sont responsables de la synthèse des composants matriciels et de leur *turn-over*. L'activité métabolique peut être altérée par l'environnement chimique et mécanique. Les cytokines pro-inflammatoires par exemple ont un effet anabolique (Sophia Fox et al., 2009). Les chondrocytes sont protégés des dommages biomécaniques par leur matrice environnante. L'homéostasie de la matrice consiste en un équilibre entre synthèse des macromolécules, leur dégradation et leur remplacement. Le *turn-over* des protéoglycane est estimé à 25 ans (Li et al., 2009), alors que la demi-vie du collagène est estimée à plusieurs décennies voire 400 ans (Eyre et al., 2006). Les principales protéases intervenant dans le *turn-over* du cartilage sont les métalloprotéinases ou MMPs (collagénase, gélatinase et stromelysine) et les cathepsines (cathepsine B et D). Les collagénases dégradent les fibrilles de collagène sur un site unique. Les gélatinases

dégradent les collagènes de type II et IV dénaturés, mais aussi la fibronectine et les collagènes de type V, VII, X et XI (Trattnig et al., 2011). Le rôle de la stromelysine est de dégrader le corps protéique de l'agrécan. Les MMPs sont sécrétées sous forme latente et nécessite d'être activées dans le milieu extracellulaire (Sophia Fox et al., 2009). Les mouvements articulaires sont importants au maintien structurel et physiologique du cartilage. L'inactivité articulaire est un facteur favorisant la dégradation du cartilage (Buckwalter and Mankin, 1998).

1.1.4 Ossification enchondrale

L'intégrité squelettique est conférée par le cartilage et l'os. Au cours du développement, les cellules issues d'une même origine embryonnaire forment l'os et le cartilage (Long and Ornitz, 2013). Le mésoderme paraxial donne naissance au sclérotome, qui a pour vocation de devenir les vertèbres et la cage thoracique. A l'inverse, le mésoderme latéral évolue en ébauches appelées *limb buds* (bourgeons de membre) (figure 7), qui deviendront ensuite les os longs des membres (Bandyopadhyay et al., 2006).

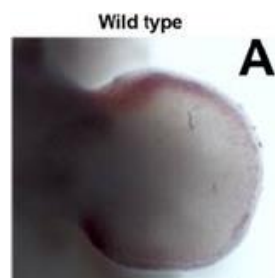


Figure 7 : Limb bud.
Embryon de souris au stade E 11.5 (Bandyopadhyay et al., 2006).

La première étape de l'ossification enchondrale (développement squelettique) est la chondrogenèse. Cette dernière débute dans le *limb bud* par la condensation des cellules mésenchymateuses (figure 8) (Vega et al., 2004a). *Sex Determining Region Y-Box 9* (SOX9) est un facteur crucial pour la mise place de la chondrogenèse. Sous l'influence de SOX9, 5 et 6, les cellules au cœur de la condensation synthétisent des protéines spécifiques du cartilage, *i.e* l'agrécan ainsi que les collagènes II, IX et XI. A la périphérie de la condensation, les cellules maintiennent un phénotype fibroblastique, et se différencient en cellules péri-chondrales (Razidlo et al., 2010). L'extension longitudinale des membres s'effectuent *via* la prolifération intensive des cellules au centre de la condensation (chondrocytes prolifératifs). Après cela, les chondrocytes rentrent dans une phase d'hypertrophie initiée par *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) (Li et al., 2009). Les zones hypertrophiques contiennent des chondrocytes produisant une matrice de collagène X. Cette matrice sert de modèle à partir duquel l'os sera formé. En effet, une fois cette matrice créée, les chondrocytes libèrent la *Matrix Metalloproteinase 13* (MMP13) afin de la dégrader et le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) afin de favoriser l'invasion vasculaire et donc la venue de précurseurs ostéogéniques et hématopoïétiques. La

chondrogenèse se termine finalement par la mort des chondrocytes par apoptose (Bradley et al., 2015).

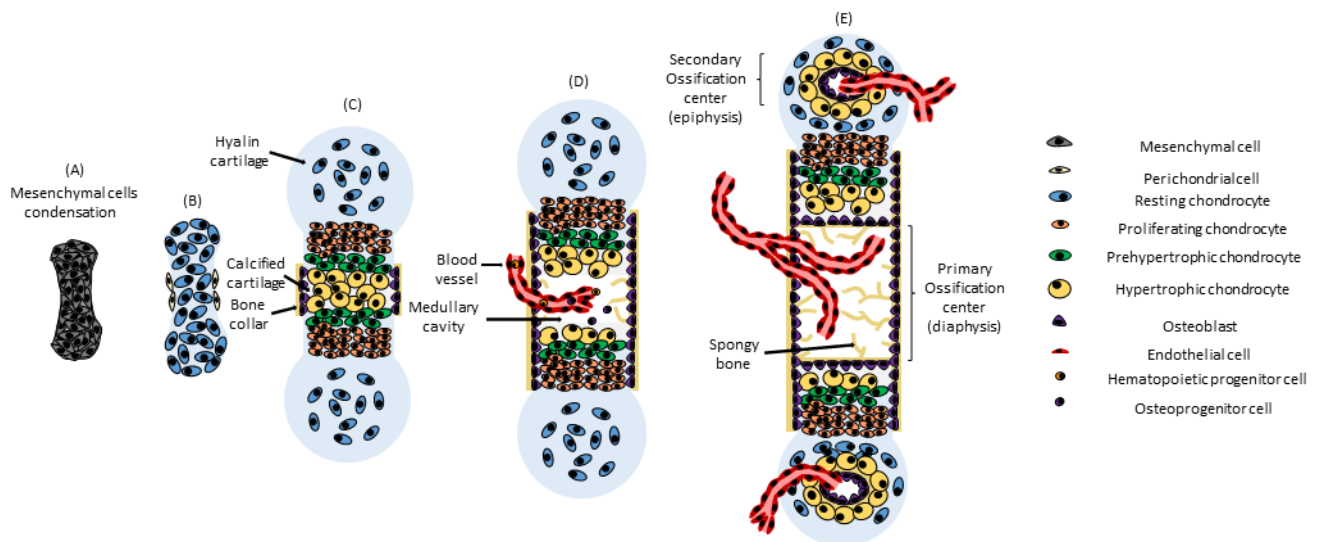


Figure 8 : Ossification enchondrale.

(A) Condensation des cellules mésenchymateuses. (B) Les cellules au centre de la condensation se différencient en chondrocytes, et en cellules péri-chondrales à la périphérie. (C) Au centre de la diaphyse, les chondrocytes continuent de mûrir à travers différents stades successifs i.e prolifératifs, pré-hypertrophiques, hypertrophiques. La croissance en longueur est effectuée via la prolifération et l'hypertrophie des cellules. Les cellules péri-chondrales se différencient en ostéoblastes afin de former le périoste. (D) Les chondrocytes hypertrophiques synthétisent le collagène X. A la fin de la chondrogenèse les chondrocytes induisent l'angiogenèse et détruisent leur matrice avant d'entrer en apoptose. Ceci permet aux cellules hématopoïétiques et ostéogéniques de former respectivement la moelle osseuse et le tissu osseux. (E) Les centres d'ossification secondaire se forment et remplacent progressivement le cartilage, à l'exception des extrémités où il se forme le cartilage articulaire. (Allas et al., 2018).

1.1.5 Les cellules souches mésenchymateuses adultes

La chondrogenèse peut aussi être obtenue *in vitro* en utilisant les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Pers et al., 2016). Les MSC comme les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont multipotentes et résident principalement dans la moelle osseuse, mais peuvent aussi se retrouver dans la circulation générale (figure 9). D'autre part, le phénotype des MSC est beaucoup plus dynamique que celui des HSC (McGonagle et al., 2017). En effet, il est possible d'établir des cultures de MSC à partir de cellules différenciées comme les chondrocytes ou les adipocytes, après dédifférenciation par passages (Barbero et al., 2003). Ceci pourrait expliquer en partie comment les chondrocytes participent à la réparation du cartilage en cas de lésion. Historiquement, l'isolation des MSC était basée sur leurs capacités à adhérer au plastique et à former des colonies (Friedenstein et al., 1970). Aujourd'hui d'autres critères sont également utilisés : les MSC doivent être capables d'effectuer la différenciation chondrogénique, adipogénique, ostéogénique, elles doivent être négatives pour

l'expression des marqueurs hématologiques tels que CD45, CD31 et être positives pour CD90, CD73 ou CD271 (McGonagle et al., 2017).

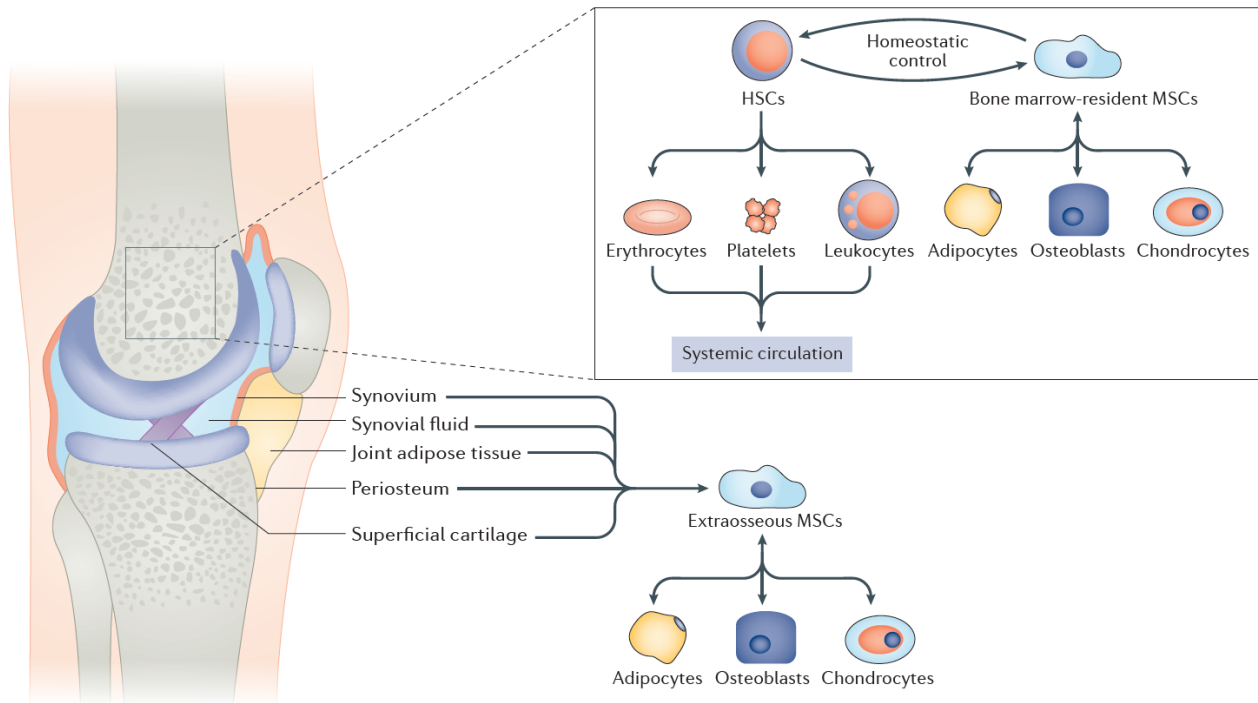


Figure 9 : Les cellules souches de l'articulation.

Les MSC et les HSC sont retrouvées majoritairement dans la moelle osseuse. Néanmoins, les MSC peuvent être retrouvées dans d'autres tissus tels que le périoste, la membrane synoviale, le tissu adipeux. D'autre part, les cellules différenciées comme les chondrocytes ou les adipocytes peuvent se différencier en MSC. Les HSC et MSC exercent un contrôle homéostatique l'une envers l'autre (McGonagle et al., 2017).

1.1.5.1 MSC dans la moelle osseuse

Les cellules souches de la moelle osseuse coexistent avec les HSC. Ces deux types cellulaires exercent un contrôle homéostatique l'une envers l'autre (McGonagle et al., 2017). Dans la moelle osseuse, les MSC contrôlent non seulement le remodelage tissulaire, l'homéostasie du tissu adipeux, la réparation osseuse consécutive à une fracture, mais également la maturation et la circulation des HSC (García-García et al., 2015). Lorsque l'os est fracturé, les MSC déclenchent le processus d'ossification enchondrale, lors duquel la formation du cartilage précède celle de l'os.

1.1.5.2 Les MSC dans le cartilage

La cartographie cellulaire du cartilage chez la souris, en utilisant l'expression de *Proteoglycan 4* (Prg4) comme marqueur de la zone superficielle du cartilage, a montré l'importance de la zone superficielle

dans l'homéostasie et le *turn-over* du cartilage (figure 10). En effet, cette étude a prouvé que des cellules des zones profondes du cartilage et de l'os sous-chondral, dérivait de cellules de la zone superficielle (Kozhemyakina et al., 2015). Une étude a récemment montré l'existence de cellules souches dans la zone superficielle du cartilage humain (Fellows et al., 2017). D'autre part, dans le cartilage des patients atteints d'arthrose, ces cellules présentent de plus faibles capacités prolifératives et un taux de sénescence plus important (Fellows et al., 2017). La sénescence des MSC du cartilage et la perte de leur multipotence, pourraient être des facteurs importants dans le développement de l'arthrose (Jiang and Tuan, 2015).

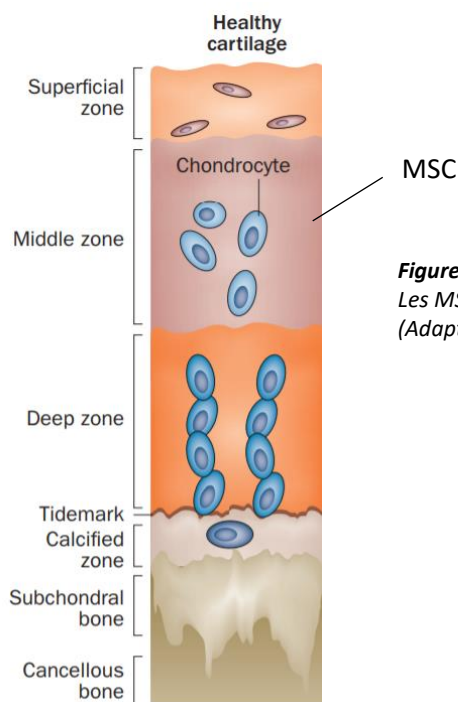


Figure 10 : Distribution cellulaire dans le cartilage.
 Les MSC sont localisées dans la zone superficielle du cartilage.
 (Adaptée de Jiang and Tuan, 2015).

1.1.5.3 Les MSC dans la membrane synoviale

La membrane synoviale est une source non négligeable de MSC, avec une fréquence d'environ 1% des cellules du tissu (Sakaguchi et al., 2005; Mochizuki et al., 2006). Chez le lapin, la membrane synoviale est très proche du cartilage superficiel. Les MSC de celle-ci contribuent donc à la réparation du cartilage (Hunziker and Rosenberg, 1996). Mais étant donnée la longue distance entre la membrane synoviale et le cartilage chez l'homme, la contribution de ce type de MSC doit être faible (McGonagle et al., 2017).

1.1.5.4 Les MSC du liquide synovial

La fréquence des MSC dans le liquide synovial des patients ayant des lésions du cartilage, est retrouvée très augmentée comparée aux sujets sains (figure 11) (Jones et al., 2008). L'injection intra-articulaire de MSC dans le liquide synovial a montré, qu'elles étaient capables de se greffer aux lésions et de contribuer à leur réparation (Baboolal et al., 2016). Ce qui suggère que les MSC du liquide synovial, jouent un rôle dans la réparation du cartilage.

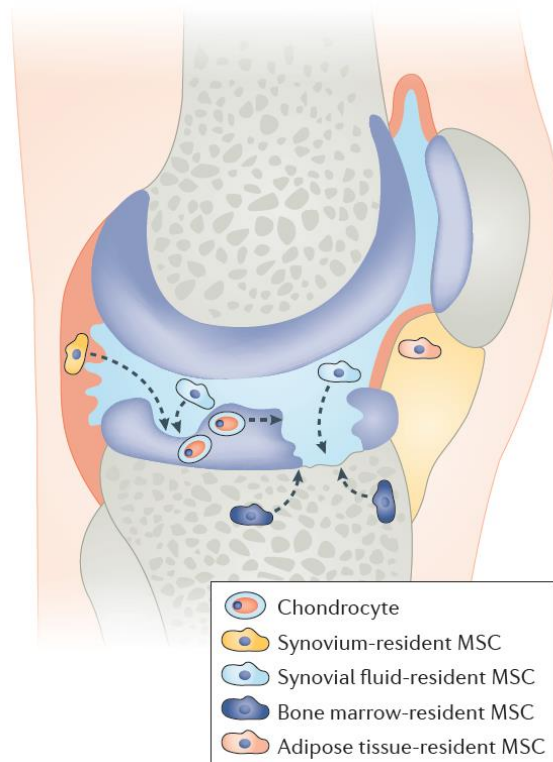


Figure 11 : Réparation du cartilage par les MSC.

La réparation du cartilage superficiel pourrait faire intervenir les MSC du cartilage, ou la migration des MSC de la membrane synoviale à travers le liquide synovial (McGonagle et al., 2017)

Malgré la présence de MSC dans l'articulation, elles semblent inefficaces pour réparer des lésions du cartilage trop importantes. Ceci pourrait être expliqué par le fait que contrairement aux autres tissus, l'absence de vascularisation dans le cartilage ne permet pas le déclenchement des phases d'inflammation, d'angiogenèse et de migration d'un nombre conséquent de MSC (McGonagle et al., 2017). Les lésions du cartilage lorsqu'elles ne sont pas réparées, peuvent conduire au développement de pathologie comme l'arthrose.

1.1.6 Arthrose

L'arthrose est la maladie rhumatologique la plus répandue à l'échelle mondiale, affectant environ 60 % de la population après l'âge de 60 ans (Palazzo et al., 2014). Le handicap provoqué par cette maladie a un impact socio-économique important, coutant entre 1 et 2,5% du produit intérieur brut dans les pays développés (Hilgsmann et al., 2013). Mais plus important encore, les patients voient leur qualité de vie fortement diminuée et souffrent du manque de thérapies efficaces permettant de réparer les lésions du cartilage.

1.1.6.1 Epidémiologie

1.1.6.1.1 Histoire et prévalence

L'arthrose de la hanche possède une prévalence variant de 1,0 à 3,9 % chez les hommes et de 0,8 à 5,1 % chez les femmes. Celle du genou est plus élevée dans le Nord-Est de la France et varie de 2,1 à 10,1 % chez les hommes et de 1,6 à 15,0 % chez les femmes, celle-ci étant élevée chez les femmes de plus de 50 ans. C'est une maladie multifactorielle avec comme plus grand facteur de risque, le vieillissement, suivi par les traumatismes articulaires et l'obésité. Il existe également des formes héréditaires de l'arthrose, ou secondaires à d'autres maladies génétiques telles que l'hémophilie (figure 12) (Glyn-Jones et al., 2015).

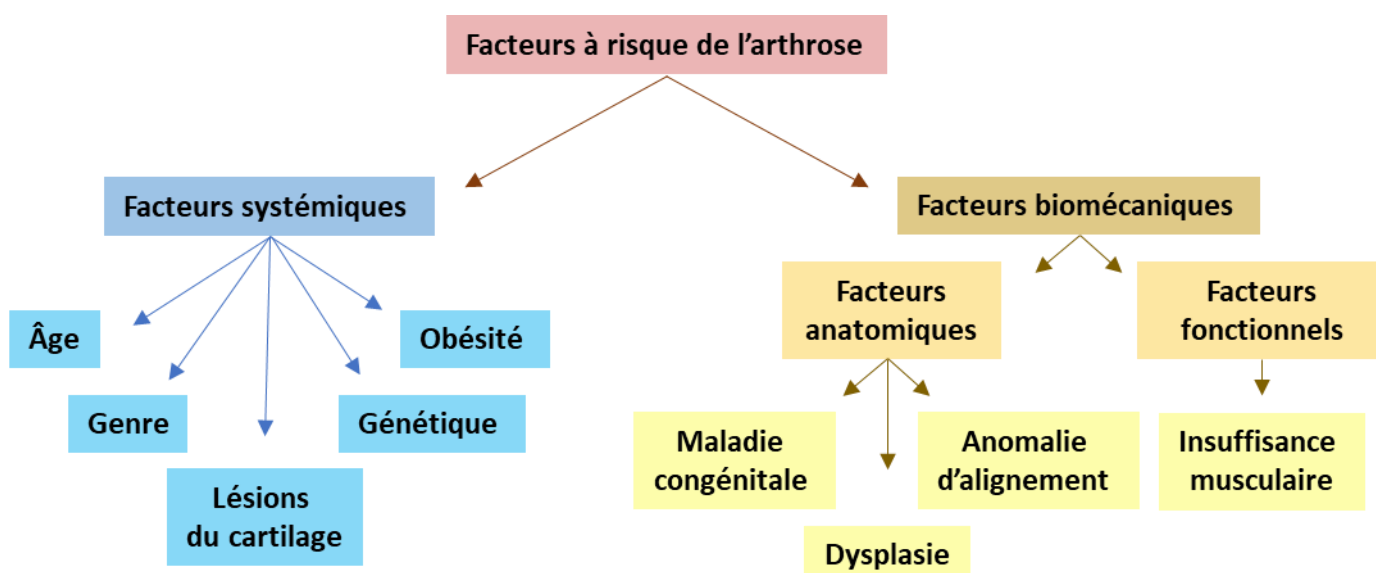


Figure 12 : Les principaux facteurs de risque de l'arthrose.

Les études épidémiologiques ont pu mettre en exergue, le rôle joué par la biomécanique articulaire. La biomécanique articulaire est influencée par des facteurs fonctionnels et anatomiques. La dysplasie de la hanche, qui est une maladie congénitale entraînant une réduction du recouvrement de la tête par l'acetabulum, est un facteur de risque important de l'arthrose (Agricola et al., 2013a). Analogiquement, une anomalie d'alignement ou une inégalité de longueur des membres inférieurs peut augmenter le risque de développer l'arthrose (Sharma et al., 2013). S'agissant des risques fonctionnels, une insuffisance des muscles quadriceps peut augmenter le risque de progression de l'arthrose du genou (Wang et al., 2012b).

Malgré l'existence d'une corrélation entre anomalies biomécaniques et arthrose, la plupart des sujets ne développent pas la maladie (Agricola et al., 2013b). En effet, d'autres facteurs systémiques entrent en considération. L'âge est le facteur de risque le plus important, il est lié à des capacités de régénérations plus restreintes et l'accumulation d'autres facteurs à risque chez les patients (Lawrence et al., 2008).

Par ailleurs, l'arthrose est plus récurrente chez les femmes que chez les hommes. Même si les mécanismes ne sont pas totalement connus, les œstrogènes semblent jouer un rôle important (Watt, 2018). Les blessures ou dommages au niveau des ligaments, du cartilage ou de l'os, peuvent fragiliser l'articulation et augmentent par quatre le risque de développement de l'arthrose (Muthuri et al., 2011). L'obésité est également un facteur important, elle augmente le risque d'arthrose *via* deux mécanismes. D'une part, elle entraîne une surcharge pondérale sur les articulations. D'autre part, elle augmente le risque d'inflammation articulaire sous l'action des adipokines, libérées par le tissu adipeux (Wang and He, 2018). L'obésité augmente par trois le risque d'arthrose (Zhang et al., 2010).

1.1.6.2 Physiopathologie

1.1.6.2.1 Aspects macroscopiques

L'arthrose est caractérisée par la dégradation du cartilage, la formation d'ostéophytes, l'érosion de l'os sous-chondral et l'épaississement de la membrane synoviale (figure 13) (Hunter and Bierma-Zeinstra, 2019). Ces changements affectent l'homéostasie de chaque tissu mais également leur coopération dans l'articulation. Au cours des stades précoces de l'arthrose, avant que les signes cliniques n'apparaissent, la surface initialement lisse du cartilage devient de plus en plus rugueuse, avec de petites irrégularités et fissures. Au fur et à mesure que la maladie progresse, les fissures s'agrandissent et s'étendent jusqu'à la zone moyenne (Salaffi et al., 2014). Lorsqu'il est exposé par la perte de cartilage, l'os sous-chondral se sclérose et s'épaissit. De plus, les ostéophytes qui sont des excroissances osseuses, se développent à la surface de l'os. Ces derniers, altèrent les mouvements de

l'articulation et contribuent à augmenter la douleur. La formation de kystes sous-chondraux (nécroses localisées de l'os) et l'œdème de la moelle osseuse, sont également des caractéristiques de l'arthrose (Felson et al., 2003).

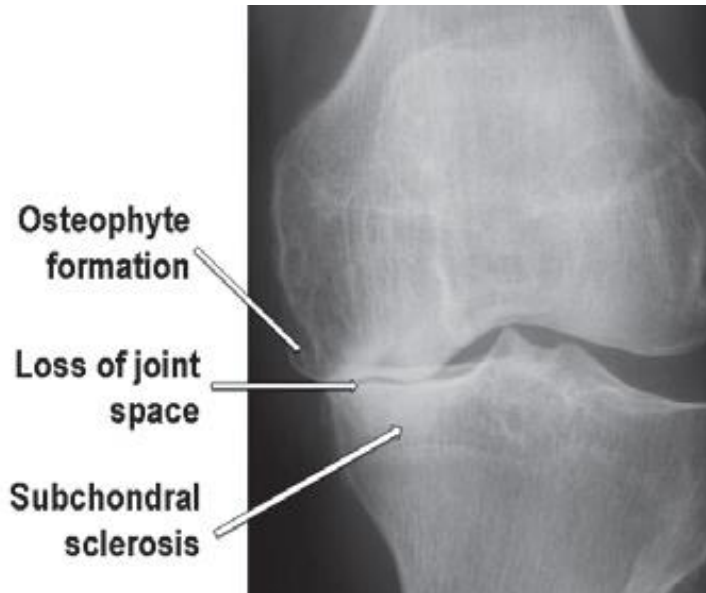


Figure 13 : Imagerie antéro-postérieure par ray X d'un genou de patient arthrosique.

On note un pincement de l'interligne articulaire, la formation d'un ostéophyte et l'érosion de l'os sous-chondral. (Salaffi et al., 2014)

1.1.6.2.2 Aspects cellulaires

Au cours des stades précoces de l'arthrose, la quiescence des chondrocytes est perturbée, permettant aux cellules de s'adapter au stress local. Les chondrocytes en prolifération sont généralement retrouvés sous forme de clusters (figure 14) (Heinegård and Saxne, 2011). Les chondrocytes perdent de plus leur phénotype et deviennent hypertrophiques. Mise à part dans la zone calcifiée, ces cellules ne sont normalement pas retrouvées dans le cartilage adulte. Le chondrocyte hypertrophique représente la différenciation terminale et produit spécifiquement le collagène de type X, le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) and *matrix metalloproteinase 13*. Ce processus altère la composition du cartilage et entraîne à terme la croissance d'ostéophytes. La destruction de la matrice est aussi causée par la libération de cytokines pro-inflammatoires et de Métalloprotéinases (MMPs). Ces changements environnementaux entraînent la mort d'un certain nombre de chondrocytes par apoptose ou nécrose. Le remodelage du tissu osseux est également responsable de la croissance d'ostéophytes. Ce remodelage est caractérisé par une minéralisation diminuée et d'une augmentation d'expression du collagène de type I (Glyn-Jones et al., 2015b).

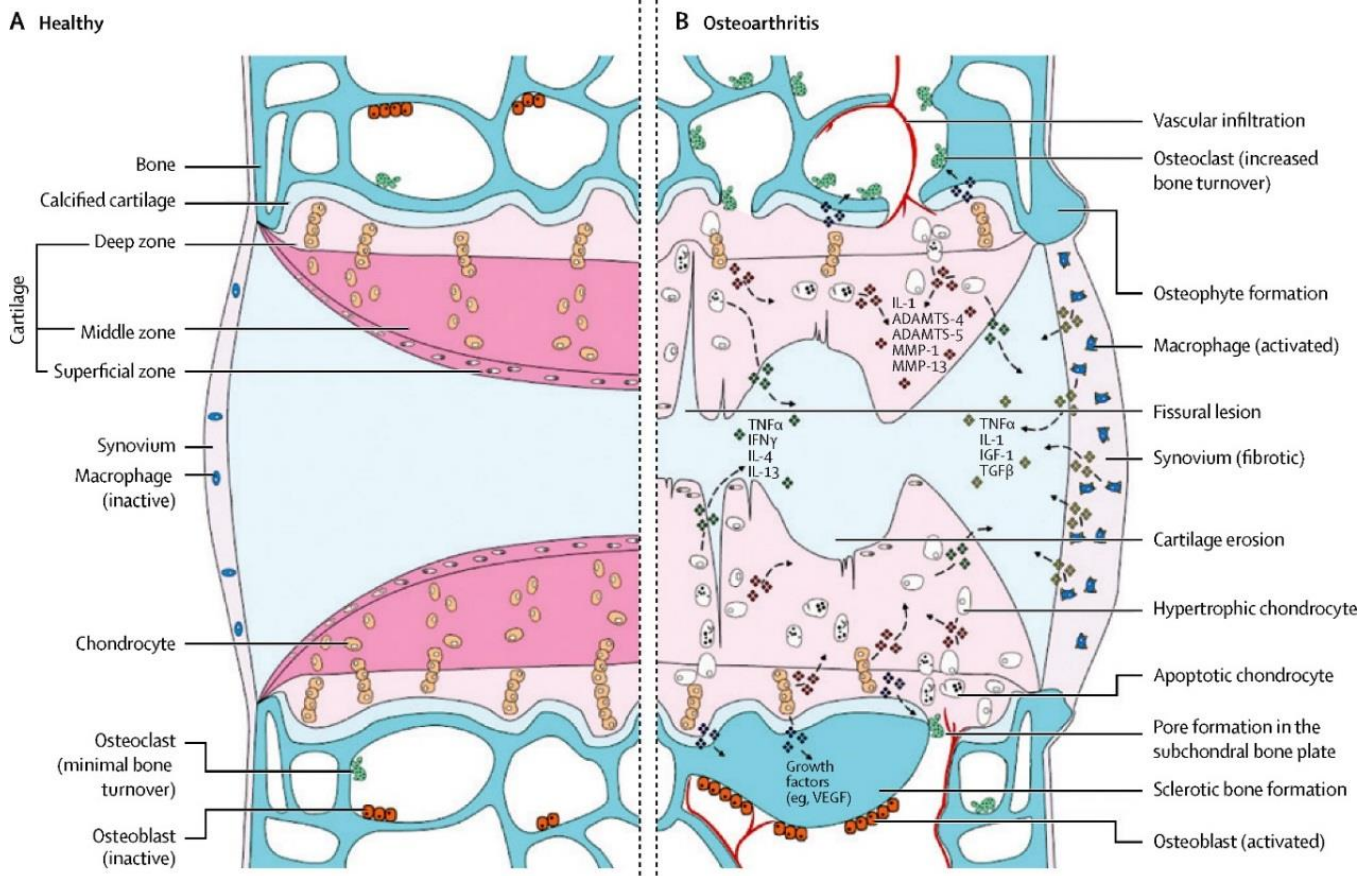


Figure 14 : Les processus physiopathologiques de l'arthrose.

(A) Schéma d'une articulation normale. (B) Schéma d'une articulation arthrosique. L'arthrose entraîne la libération des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α) et des protéases (MMPs et ADAMs) par les chondrocytes, les synoviocytes, les macrophages et ostéoblastes. La réaction du processus d'ossification enchondrale entraîne la formation d'ostéophytes, une angiogenèse anormale dans le cartilage et une hypertrophie des chondrocytes. (Glyn-Jones et al 2015).

1.1.6.2.3 Aspects moléculaires

Dans le cartilage, les chondrocytes voient leur synthèse de MEC diminuer et se modifier qualitativement. Leur métabolisme devient catabolique avec la production accrue de cytokines pro inflammatoires et d'enzymes de destruction du cartilage (Hunter and Bierma-Zeinstra, 2019). Dans l'os, les cellules immunitaires favorisent le remodelage tissulaire et l'angiogenèse. La synovite (inflammation de la membrane synoviale) est aussi causée par les cytokines produites par les cellules immunitaires. Des facteurs systémiques tels que les œstrogènes et les adipokines joueraient un rôle important dans l'inflammation.

Dans les premiers stades pathologiques, la teneur en eau augmente dans le cartilage, entraînant la formation d'un œdème et la fragilisation du réseau de collagène. L'expression du collagène de type II diminue au profit du collagène de type X. Les protéoglycanes voient leur expression baisser et leurs

chaines de glycosaminoglycanes se raccourcir. La perte des protéoglycanes est considérée comme réversible, cependant elle rend le collagène plus susceptible à la dégradation. Les dommages causés sur le collagène sont considérés comme quasi irréversibles et peuvent constituer un point de non-retour lors de la destruction de l'articulation (Nepple et al., 2015).

Le lien entre dégradation du cartilage et protéases (MMP, agrécanases) est clairement établi (Malemud, 2017). Les ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) forment une famille de protéases. Les ADAMTS 4 (agrécane 1) et ADAMTS5 (agrécane 3) jouent un rôle majeur dans le clivage de l'agrécane (Yang et al., 2017). Les MMP sont des endopéptidases zinc-dépendant et appartiennent à la superfamille des metzincines. Les MMPs sont libérées par les chondrocytes, les synoviocytes et les ostéoblastes sous l'action des cytokines et des stress mécaniques. Les chondrocytes arthrosiques libèrent dans le cartilage une grande variété de métalloprotéases telles que MMP1, MMP3, MMP9, MMP13, MMP14 et d'agrécaneases comme ADAMTS4 et 5 (Cawston and Young, 2009). Les MMPs sont activées par des *serine proteases* (*plasminogen activator, plasminogen, plasmin*), des radicaux libres, les cathepsines ou par d'autres MMPs. Leur activité est inhibée par les *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) et par des inhibiteurs des activateurs du plasminogène (Cawston and Young, 2009). Les protéases responsables de la dégradation du collagène de type II sont la MMP1 qui est localisée dans la zone superficielle et la MMP13 dans la zone profonde (Goldring and Goldring, 2010). Les MMP3, 10 et 11 ont pour substrat les protéoglycanes, la fibronectine, la laminine et le collagène de type IX (Okada et al., 1992).

Au cours de l'arthrose, des voies de signalisation impliquées dans le développement ostéo-cartilagineux, comme celles du *transforming growth factor- β* (TGF β), de la *bone morphogenetic proteins* (BMPs) et de *Wingless and the name Int-1* (Wnt) sont activées dans l'articulation touchée. Le TGF β a longtemps été considéré uniquement comme un facteur d'anabolisme dans le cartilage. Mais malgré son rôle primordial en condition physiologique, sa voie de signalisation est dérégulée au cours de l'arthrose (van der Kraan et al., 2012). Le vieillissement entraîne par ailleurs l'augmentation d'expression du récepteur au TGF β *activin-like kinase* (ALK)-1 au détriment de ALK5. Ce processus favorise la différenciation hypertrophique des chondrocytes et la croissance d'ostéophytes. De la même manière, les BMPs ont un effet chondroprotecteur en condition physiologique mais entraînent aussi l'hypertrophie et la croissance d'ostéophytes au cours de l'arthrose (Lories and Luyten, 2011).

La membrane synoviale est un élément important de l'articulation et son altération fait partie des caractéristiques de l'arthrose. Lorsque le cartilage se détériore, les produits de dégradation qui en résultent sont libérés dans le liquide synovial, où ils provoquent l'inflammation de la membrane synoviale (synovite). En retour, les synoviocytes produisent des cytokines pro-inflammatoires et des

MMPs qui exacerbent la dégradation du cartilage, créant ainsi un cercle vicieux (Glyn-Jones et al., 2015b). Contrairement au cartilage, la membrane synoviale est vascularisée, lors de l'inflammation du tissu, des macrophages et des lymphocytes s'y infiltrent. Les cellules immunitaires contribuent alors à la boucle d'inflammation de la membrane synoviale et de dégradation du cartilage (Haseeb and Haqqi, 2013; Li et al., 2017). La question consistant à savoir si la synovite entraîne la dégradation du cartilage, ou si la dégradation du cartilage entraîne la synovite est toujours débattue à l'heure actuelle.

L'IL1 β et le TNF α sont deux cytokines majeures dans le processus catabolique de l'arthrose, en augmentant l'expression des MMP-1, MMP-3, MMP-8 et MMP-13. Par ailleurs, l'IL1 β peut induire ADAMTS4 alors que le TNF α peut augmenter ADAMTS4 et 5. L'IL1 β et le TNF α sont aussi responsables de la libération de médiateurs de l'inflammation, en induisant l'expression de *prostaglandin E2 (PGE2) synthetase-1*, de la cycloxygénase (COX-2) et de la *nitric oxide synthetase (iNOS)*. Elles induisent aussi l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, IL-17 et l'IL-18 et répriment l'expression de gènes chondrogéniques comme ACAN et COL2A1 (Goldring and Otero, 2011).

Les chondrocytes expriment au niveau basal des récepteurs aux œstrogènes, qui lorsque activés, induisent l'expression de facteurs de croissance. Après la ménopause, la concentration d'œstrogène diminue, entraînant une diminution de facteurs de croissance stimulant l'anabolisme (Hussain et al., 2018). L'obésité est un facteur augmentant l'incidence de l'arthrose liée à la surcharge pondérale, mais aussi à d'autres formes de la maladie comme celle de la main. En effet, le tissu adipeux secrète dans la circulation sanguine des adipokines, qui sont des médiateurs de l'inflammation. Arrivées dans l'articulation, les adipokines contribuent avec les cytokines à la boucle inflammation/dégradation du cartilage (M^{ac}Donald et al., 2019).

1.1.6.3 *La psychophysiologie de la douleur*

Les patients souffrant d'arthrose décrivent la douleur comme le symptôme le plus handicapant. La douleur chez les patients peut s'étendre au-delà de la zone lésée. Par exemple, la douleur provoquée par l'arthrose de la hanche s'étend généralement jusqu'aux fessiers et genoux. L'arthrose du genou s'étend vers le bas du fémur et le haut du tibia (Leshner et al., 2008). La douleur diffuse décrite par les patients est appelée douleur référée. Cette douleur référée, reflète la convergence des innervations des nocicepteurs (primaires) de la zone lésée et des tissus environnants vers le neurone (secondaire) de la moelle épinière (figure 15). Chez certains patients, des anomalies sensorielles peuvent être détectées sur la zone de douleur référée comme de l'hyperalgésie (douleur amplifiée) ou l'allodynie (douleur déclenchée par un stimulus normalement indolore). L'hypersensibilité est initiée par des influx nerveux à répétition provenant de la zone affectée vers la moelle épinière, entraînant un

renforcement synaptique entre les neurones secondaires et primaires. Ainsi, une stimulation nerveuse même faible, entrainera l'activation du neurone secondaire qui sera relayée au thalamus comme une stimulation douloureuse. L'hypersensibilité peut aussi être causée par un dysfonctionnement de la substance grise périaqueducule (PAG). En condition physiologique, la PAG régule positivement ou négativement l'activité des neurones de la moelle épinière (Thakur et al., 2014).

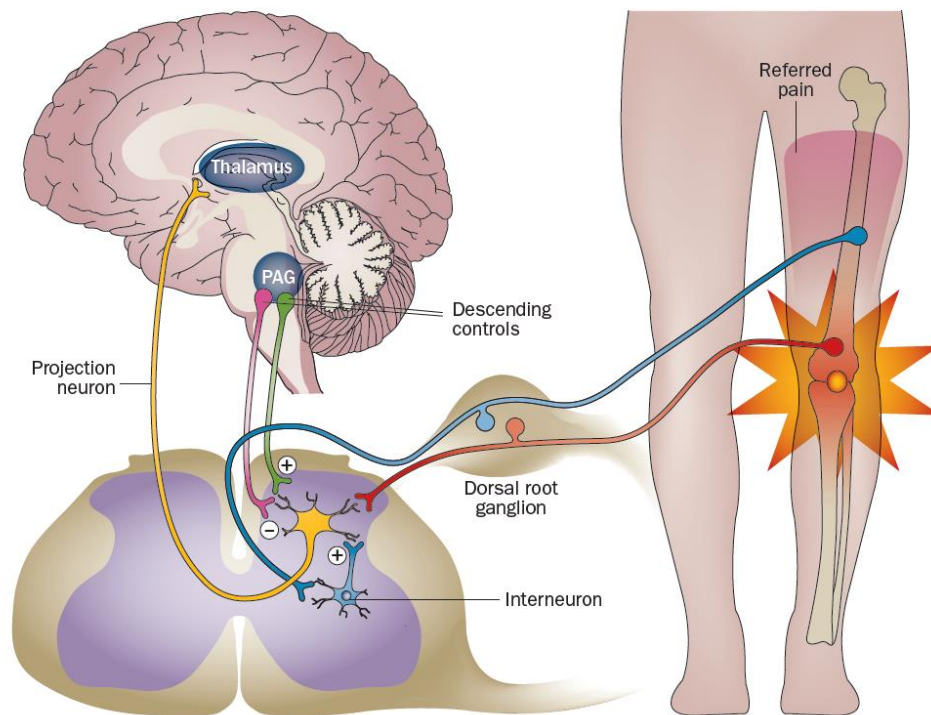


Figure 15 : La douleur référée.

Schéma montrant comment une activation continue d'un nocicepteur provenant d'un cartilage lésé (rouge), peut entrainer l'établissement d'une zone de douleur référée. Celle-ci est causée par les neurones de la moelle épinière (jaune) qui intègrent les signaux des sites lésés et des tissus environnants (bleu). Un dysfonctionnement de la substance grise périaqueducule (PAG) peut aussi être responsable de l'hypersensibilisation (Thakur et al., 2014).

Au cours de cette dernière décennie, une attention particulière a été prêtée au *Nerve growth factor* (NGF), un facteur de croissance nécessaire au développement normal du système nerveux et à la nociception (Lane and Corr, 2017). Le NGF se fixe sur deux récepteurs, le *tyrosine kinase receptor tropomyosin-related kinase A* (TrkA) avec une forte affinité et le récepteur aux neurotrophines p75NTR avec une faible affinité. Lors d'une lésion tissulaire, le NGF est libéré et entraine la transduction du signal de douleur à travers sa liaison sur les nocicepteurs. De plus, le NGF entraine la croissance des neurites, favorisant la sensibilisation des nocicepteurs (Lane and Corr, 2017). Des essais cliniques utilisant le Tanezumab (anticorps anti-NGF), ont montré leur efficacité à soulager la douleur chez les

patients. Cependant, chez certains d'entre eux une accélération du développement arthrosique a été observée (Hochberg et al., 2016).

1.1.6.4 *La prise en charge de l'arthrose*

1.1.6.4.1 Les principes de prise en charge

Il existe un consensus général accepté par les experts en rhumatologie, concernant les principes de prise en charge de l'arthrose. La prise en charge doit être individualisée et centrée sur le patient. Faire, donner et expliquer le diagnostic en terme simple, est un point important de commencement (Porcheret et al., 2014). Plusieurs facteurs influent sur le choix du traitement, comme par exemple le nombre d'articulations impliquées, le degré de dommage structurel et le niveau de douleur. Les facteurs individuels tels que, l'âge, le genre, l'activité physique journalière vont également modifier l'approche choisie. La comorbidité est un facteur très important à considérer en particulier chez les patients âgés. Par exemple, en cas de maladies cardiovasculaires ou rénales, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) comme l'inhibiteur de la COX-2 est contre indiquée. A l'inverse, les traitements de comorbidités telles que l'insomnie ou la dépression, peuvent soulager les symptômes de l'arthrose (Fernandes et al., 2013). Il existe une grande variété de traitements pour l'arthrose. Cependant, mise à part la chirurgie, l'effet de la plupart des traitements reste modeste. Une prise en charge réussie requiert l'utilisation de plusieurs approches pharmacologiques et non-pharmacologiques, plutôt qu'une approche mono-thérapeutique. La prise en charge doit consister également à donner les informations nécessaires à la compréhension des patients, l'exercice physique et une rééducation. Concernant le soulagement de la douleur, l'approche additive plutôt que substitutive est conseillée. En d'autres termes, si la première option analgésique est insuffisante, alors un second agent avec un mode d'action différent est ajouté (un NSAID topique pourrait être ajouté à une prise orale de paracétamol). Si cette stratégie n'est toujours pas efficace, un troisième agent voire un quatrième peuvent être prescrits.

Cette approche permet de tenir compte de la complexité de la douleur et l'effet individuel modeste des agents pharmacologiques. Une fois la prise en charge commencée, le patient doit être réexaminé annuellement afin d'évaluer l'efficacité du traitement et de le modifier si besoin (Finney et al., 2013; Porcheret et al., 2014).

1.1.6.4.2 L'éducation aux règles hygiéno-diététiques

Avec l'augmentation du vieillissement de la population, de la prévalence de l'obésité et la diminution de l'activité physique, l'arthrose pourrait devenir la principale cause de handicap chez les personnes

âgées dans les prochaines décennies (Paskins et al., 2014). L'éducation des patients aux règles hygiéno-diététiques est donc primordiale lors de la prise en charge des patients.

1.1.6.4.2.1 L'accès à l'information

Il est de la responsabilité des praticiens, d'informer les patients sur leur diagnostic et pronostic et de discuter en détails des avantages et désavantages des différents traitements. Ceci permet aux patients de mieux comprendre leur maladie et de lutter contre les *a priori*, comme à titre d'exemple le fait que l'arthrose serait inévitablement progressive et intraitable. Une étude a montré que l'accès des patients à l'information, permet de réduire le handicap ainsi que les sensations de douleur et la fréquence des consultations et donc les coûts socio-économiques (Grime and Dudley, 2014).

1.1.6.4.2.2 L'activité physique

L'articulation est conçue pour se mouvoir, l'intégrité de tous les éléments de l'articulation dépend de son mouvement régulier. D'autre part, si l'articulation est atteinte par l'arthrose, l'activité physique est d'autant plus importante. Deux types d'exercice peuvent réduire la douleur et le handicap sur le long terme : premièrement, l'exercice aérobique (fitness), qui améliore la sensation de bien-être, le sommeil et peut lutter contre les comorbidités récurrentes (obésité, diabète, hypertension, maladie cardiovasculaire) ; deuxièmement, la musculation des quadriceps et des muscles glutéaux (Rausch Osthoff et al., 2018). Ces exercices peuvent améliorer la rigidité musculaire, la proprioception des articulations, rétablir la balance posturale et réduire les chutes (Uthman et al., 2014; Oppong et al., 2015).

1.1.6.4.2.3 Diminution des facteurs mécaniques

L'obésité est la comorbidité la plus répandue et un important facteur de risque de l'arthrose. La perte de poids est conseillée pour plusieurs raisons médicales et s'agissant de l'arthrose, la diminution de l'obésité a un effet clairement préventif. Les programmes d'amaigrissement comprennent : un suivi régulier de l'alimentation et de l'activité physique, une fréquence d'alimentation régulière (uniquement trois fois par jour), une variété d'aliments tout en réduisant les portions, une modification de l'environnement responsable des pulsions alimentaires (Fernandes et al., 2013).

1.1.6.4.3 L'analgésie pour le contrôle de la douleur

1.1.6.4.3.1 Le paracétamol

Le paracétamol est un antipyrétique avec un mécanisme d'action central. Il possède peu d'effets secondaires mais, peut provoquer des saignements gastro-intestinaux lorsqu'il est associé avec des

anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) (Hinz and Brune, 2012). D'autre part, à la dose maximale recommandée, le paracétamol peut provoquer des complications hépatiques mortelles (Jordan et al., 2003).

1.1.6.4.3.2 Les NSAIDs

Les patients adhèrent généralement très bien à l'application topique de médicament. En effet, il leur est plus cohérent d'appliquer une thérapie directement sur le(s) site(s) douloureux. L'application topique des NSAIDs est très recommandée pour traiter la douleur de l'arthrose du genou et de la main (Jordan et al., 2003). Il a été montré que les NSAIDs topiques sont aussi efficaces que la prise orale, mais avec une incidence plus faible d'effets secondaires (Heyneman et al., 2000).

La prise orale de NSAIDs est considérée lorsque les patients ne répondent pas au paracétamol. Les NSAIDs ont clairement montré leur efficacité clinique et leur supériorité comparativement au paracétamol. Cependant, la supériorité d'une molécule NSAID comparée aux autres n'a pas encore été démontrée (Verkleij et al., 2011). La principale préoccupation quant à l'utilisation des NSAIDs, est leur toxicité potentiellement mortelle. En effet, les NSAIDs peuvent causer de graves ulcères, des perforations, obstructions et saignements intestinaux (Maniar et al., 2018).

1.1.6.4.3.3 Les autres agents pharmacologiques

Injection intra-articulaire de glucocorticoïdes

Il existe plusieurs études justifiant de l'utilisation de l'injection intra-articulaire de glucocorticoïdes pour le soulagement de la douleur (McAlindon et al., 2017). Cette intervention a d'autre part l'avantage d'être simple à réaliser et peu invasive. L'injection produit des effets rapides dès les premières heures, cependant ses effets à long terme restent limités (1-4 semaines pour l'arthrose du genou et 8 semaines pour l'arthrose de la hanche) (Hirsch et al., 2013).

Injection intra-articulaire d'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycane de haut poids moléculaire, présent dans la matrice extracellulaire du cartilage et de la synoviale. Les propriétés viscoélastiques de l'HA permettent la lubrification de l'articulation et le maintien de l'hydratation. L'HA est produit par les cellules synoviales. L'injection d'HA permet de corriger sa diminution observée dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrose. L'injection intra-articulaire de HA a un effet moindre que l'injection de glucocorticoïdes sur la douleur. Cependant, son effet perdure plus longtemps, jusqu'à plus de 12 mois post-injection (Charlesworth et al., 2019).

Nutraceuticals

Le terme *nutraceutical* regroupe les composants d'origine naturelle ayant un bénéfice pour la santé. Il existe des *nutraceuticals* ayant possiblement des effets sur la douleur et/ou les dommages articulaires. Ces produits sont à accès libre en pharmacie ou dans les supermarchés. De plus, étant des produits d'allégation de santé et non des médicaments, la publicité et la communication ne sont pas régulées. Malgré que ces produits soient très populaires, il n'existe pas d'évidences scientifiques montrant un intérêt thérapeutique pour l'arthrose (Liu et al., 2018).

1.1.6.4.4 La chirurgie

Pour les patients souffrant d'arthrose sévère, l'arthroplastie totale de la hanche ou du genou est envisagée, afin d'atténuer la douleur, restaurer les fonctions motrices et améliorer la qualité de vie (figure 16) (McGrath et al., 2009; Schotanus et al., 2016).

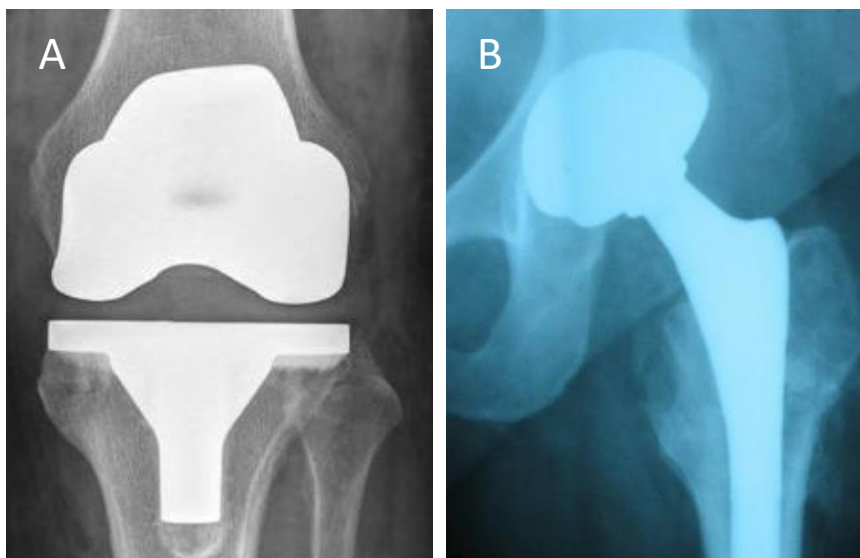


Figure 16 : Remplacement total de l'articulation par une prothèse.

(A) Remplacement total de l'articulation du genou, (B) remplacement total de l'articulation de la hanche (McGrath et al., 2009; Schotanus et al., 2016).

1.1.6.4.5 Thérapie cellulaire et tissulaire

L'ingénierie tissulaire est une alternative aux méthodes chirurgicales classiques. Elle vise à développer des tissus biologiques en utilisant des cellules, des biomatériaux et/ou des molécules actives (facteurs de croissance, inhibiteurs, vitamines, etc) afin de restaurer les fonctions d'un tissu altéré (figure 17). La greffe autologue de chondrocyte ou *Autologous chondrocyte implantation* (ACI) est un des exemples reconnus pour le traitement des petites lésions ostéochondrales. En premier lieu, une biopsie de cartilage est obtenue après une arthroscopie, afin d'amplifier des chondrocytes *in vitro* qui seront ensuite implantés au niveau des lésions. L'ACI a ensuite évoluée en *matrix-induced autologous*

chondrocyte implantation (MACI), par l'introduction des chondrocytes dans une matrice porcine de collagène. La technique de MACI a porté ces fruits dans de nombreuses études précliniques. Cependant, sa supériorité comparée aux méthodes traditionnelles n'a pas encore été démontrée (Basad et al., 2010; DiBartola et al., 2016). L'explication de la faible efficacité de l'ACI et MACI la plus admise, est que les chondrocytes se différencient lors de l'amplification, ce qui entraîne la formation d'un fibrocartilage lors de la greffe (Vinatier and Guicheux, 2016).

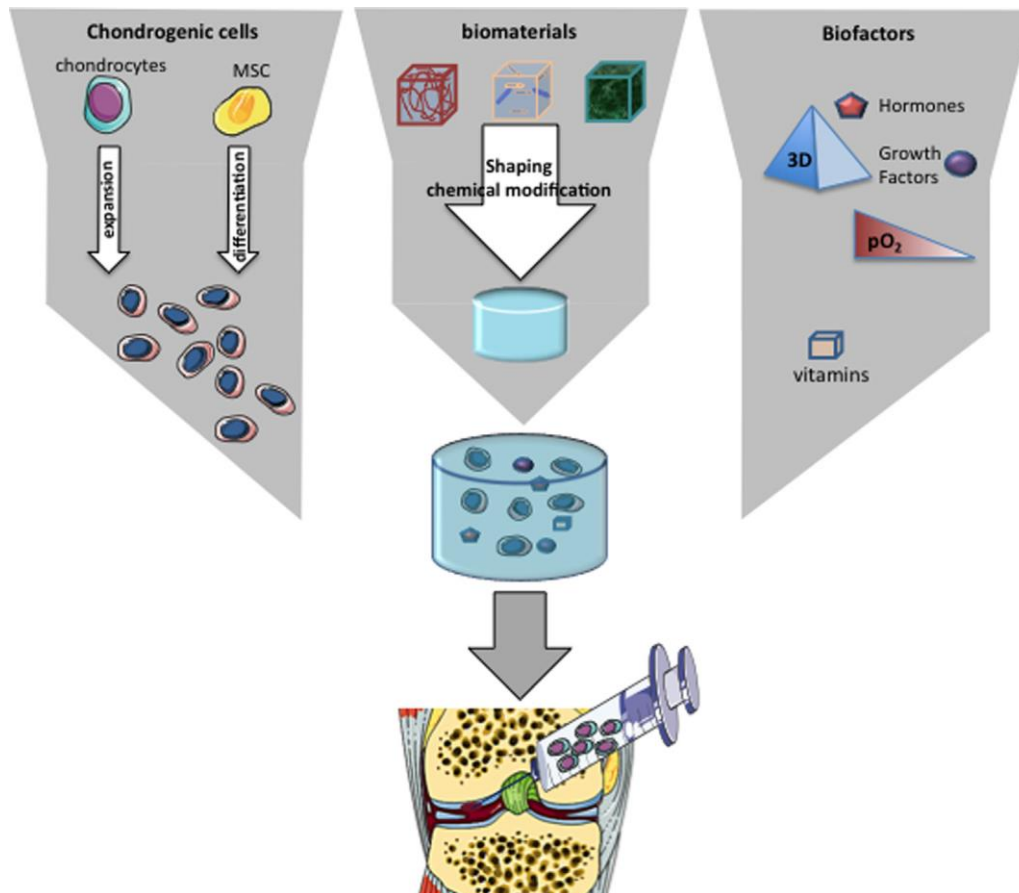


Figure 17 : Ingénierie tissulaire du cartilage.

L'ingénierie tissulaire combine l'utilisation de cellules, de biomatériaux et de molécules actives. (Vinatier and Guicheux, 2016).

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent s'employer soit de manière autologue ou allogénique. L'avantage de la thérapie autologue est de réduire le risque de rejet. Cependant, les capacités de différenciation et de prolifération sont dépendantes de l'âge du donneur. L'arthrose affecte principalement les personnes âgées, les MSC allogéniques semblent donc être plus adaptées, car elles peuvent être amplifiées, caractérisées et testées à l'avance pour une potentielle application.

En plus de leur capacité à se différencier, les MSC possèdent des propriétés anti-inflammatoires. En effet, il a été montré que les MSC ont la capacité de réduire l'inflammation des chondrocytes par la sécrétion d'IGF1 et la diminution de la voie NF-kB (Manferdini et al., 2013). D'autre part, les MSC ont la capacité d'orienter les macrophages synoviaux d'un phénotype pro-inflammatoire (M1) à anti-inflammatoire (M2) (Manferdini et al., 2017). Les données cliniques actuelles (NCT01183728, CMM-ART, NCT02123368 phase I/II) montrent que l'injection intra-articulaire de MSC est sans risque, efficace à réduire l'avancement de l'arthrose et peut dans certain cas éviter arthroplastie totale de l'articulation (Orozco et al., 2014; Turajane et al., 2017; Lamo-Espinosa et al., 2018).

1.1.6.4.6 Les biomatériaux

Généralement, en ingénierie tissulaire, les cellules sontensemencées dans un biomatériau, dans l'objectif de répliquer les caractéristiques du tissu à réparer. En simulant la matrice extracellulaire, le biomatériau fournit un environnement assurant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les biomatériaux peuvent être classifiés en synthétiques et naturels (tableau 1).

Tableau 1 : Principales matrices en ingénierie tissulaire du cartilage.

Adapté de Vinatier and Guicheux, 2016

Matrices		
Type	Component	Commercial product name
Protein	Collagen	MACI [®] , Maix [®] ,
		Atelocollagen [®] , MaioRegen [®]
	Fibrin	Tissucol kit [®]
	Silk	
Polysaccharides	Hyaluronic acid	HYAFF-11 [®]
	Chitosan	BST-CarGel [®]
	Cellulose	
	Alginate	
Synthetic	Poly(lactic-coglycolic-acid)	Bio-Seed-C [®]
	Polylactic acid	
	Polyethylene glycol	

Parmi les biomatériaux naturels, on distingue ceux formés d'une matrice de protéines ou de polysaccharides (Vinatier et al., 2009a). Le biomatériau idéal doit être biocompatible et non immunogène. D'autre part, il doit fournir un environnement 3D favorable à la chondrogenèse et doit pouvoir adhérer aux lésions cartilagineuses. De plus, il doit permettre la diffusion de molécules et facteurs de croissance. Il doit idéalement être biodégradable et injectable pour être le moins invasif possible. Parmi les biomatériaux protéiques, les matrices de collagène I et III ont été utilisées en essai

clinique (Cherubino et al., 2003). La matrice de collagène de type I a été utilisée notamment pour la culture 3D de chondrocyte et de MSC en essai clinique au Japon (Kuroda et al., 2007). S'agissant des biomatériaux basés sur une matrice de polysaccharides, le Hylaograft C[®] consiste à inclure des chondrocytes autologues dans une matrice d'acide hyaluronique (Nehrer et al., 2006). Ce concept a amélioré l'ingénierie tissulaire chez l'homme, mais l'agence européenne de médecine (EMA) l'a retiré pour cause d'un manque d'efficacité et de sécurité sanitaire. BST-CarGel1[®] est un biomatériau composé de chitosan et de glycerophosphate. Ce matériau a été utilisé en MACI, mais il a eu un effet modeste sur la qualité de vie des patients (Steinwachs et al., 2014). Bio-Seed1-C[®] est une matrice poreuse synthétique d'acide polyglycolique (PGA), d'acide polylactique et polydioxane, sur lesquelles des chondrocytes en suspension dans un gel de fibrine sont déposés (Ossendorf et al., 2007). Par ailleurs, des biomatériaux combinant plusieurs matériaux ont été développés, comme notamment le MaioRegen[®], qui est un biomatériau composé de collagène de type I et de hydroxyapatite enrichi en magnésium (Filardo et al., 2013). Malgré un nombre important d'études cliniques et précliniques, aucune des matrices citées ci-dessus n'est injectable. Les études récentes sont dirigées vers des matrices ayant la capacité d'autopolymérisation et pouvant être injectables. Les hydrogels (alginate, chitosane, acide hyaluronique) sont des candidats idéaux de par leurs propriétés physiques (Dhillon et al., 2019). Les hydrogels possèdent d'autre part un niveau d'hydratation proche de celui du cartilage (Foyt et al., 2018).

1.1.6.4.7 Les facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans le développement de la plaque de croissance au cours de l'embryogenèse et ont été identifiés comme pouvant améliorer l'ingénierie du cartilage à partir des MSC (figure 18). Parmi ces facteurs, les membres 1 et 3 de la superfamille des *transforming growth factors* (TGF) β sont les plus couramment employés (Beane and Darling, 2012; Budd et al., 2017). De par sa non-vascularisation, le cartilage est un tissu naturellement hypoxique, le taux d'oxygène varie entre 2 et 7%. L'hypoxie peut amplifier la chondrogenèse grâce au facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF), celui-ci promeut la chondrogenèse en activant les gènes codant pour les protéines de la matrice extracellulaire (Duval et al., 2012).

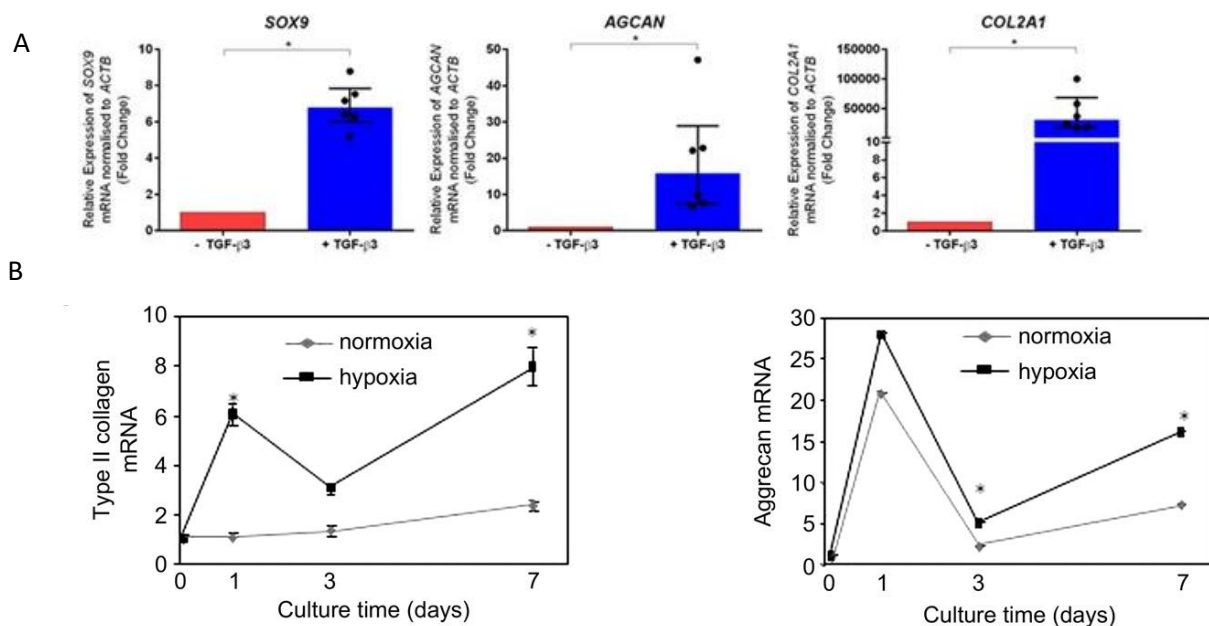


Figure 18 : Effet du TGF- β 3 et de l'hypoxie sur la chondrogenèse.

(A) La chondrogenèse des MSC est amplifiée par le TGF- β 3 (Budd et al., 2017). (B) L'hypoxie promeut la chondrogenèse des MSC (Duval et al., 2012).

1.1.6.4.8 La thérapie génique

La thérapie génique contrairement à l'injection intra-articulaire de molécules, permet la production durable de facteurs thérapeutiques. La thérapie génique vise à augmenter, remplacer, réduire ou remplacer un gène *via* un vecteur directement dans l'hôte (approche *in vivo*) ou par implantation de cellules autologues génétiquement modifiées (approche *ex vivo*) (Cucchiariini and Madry, 2019).

Chez l'animal, des lésions ostéo-cartilagineuses ont été soignées *via* des approches de thérapies géniques *in vivo* ou *ex vivo*. A titre d'exemple, l'administration d'un vecteur adéno-viral contenant les gènes *Interleukin 1 Receptor Antagonist* (IL1RN) et IGF1 a permis la réparation des lésions de cartilage chez le cheval après 16 semaines (Morisset et al., 2007). De la même manière, l'injection d'un virus adéno-associé recombinant (rAAV) portant le gène SOX9 a amélioré la réparation du cartilage après 16 semaines et a retardé la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Cucchiariini et al., 2013). Les stratégies *ex vivo* ont également démontré leur efficacité. Par exemple chez le lapin, l'implantation de chondrocytes surexprimant IGF-1 entraîne la formation d'os sous-chondral après 36 jours (Madry et al., 2005). Des essais cliniques ont été réalisés chez l'homme. L'une des méthodes, appelée TissueGene-C (essai clinique NCT02072070, phase III) consiste à implanter des chondrocytes allogéniques surexprimant le TGF- β 1 et irradiés aux rayons gammas pour empêcher leur prolifération. Les résultats chez les patients montrent une diminution de la douleur et une amélioration de la

fonction motrice (Kim et al., 2018). Un autre essai en cours (le NCT02790723, Sc- rAAV2.5IL-1Ra), consiste à injecter en intra-articulaire un rAAV-IL1RN dans le genou des patients (Evans et al., 2018).

1.1.6.4.9 Les limites aux stratégies actuelles

Les stratégies d'ingénierie tissulaire actuelles sont prometteuses. Cependant aucune n'a prouvé son efficacité en clinique. En effet, les cellules implantées peuvent mourir par apoptose ou nécrose (Steinert et al., 2007). La mort cellulaire est induite par différents facteurs, comme les cytokines pro-inflammatoires, les MMPs, le stress oxydatif ou les forces mécaniques. La mort peut aussi provenir du tissu receveur au niveau des zones de contact, qui ne supporterait pas le corps étranger. C'est pourquoi le biomatériau doit être biocompatible pour son intégration. La mort peut être limitée en injectant des facteurs anti-apoptotiques dans l'articulation (Steinert et al., 2007).

Les cellules implantées ont parfois l'incapacité de s'intégrer au cartilage préexistant. Car elles doivent le pénétrer en le dégradant par libération de MMPs. Elles doivent, de plus, former un tissu ayant la même complexité organisationnelle et devant établir des contacts directs avec l'os sous-chondral (Hunter and Levenston, 2004).

La qualité du cartilage produit par le greffon est un problème majeur. Dans la plupart des cas, le cartilage est de type fibreux, suggérant une dédifférenciation des chondrocytes en cellules de type fibroblastique. De plus, les chondrocytes obtenus à partir de MSC tendent à poursuivre leur différenciation vers le stade hypertrophique, pouvant grandement altérer la matrice extracellulaire (Vinatier et al., 2009a). Les stratégies d'ingénierie tissulaire sont prometteuses, néanmoins il reste encore beaucoup de travail avant de pouvoir obtenir un cartilage hyalin de qualité suffisante et persistante à long terme.

1.2 Epigénétique

Bien avant la connaissance du rôle de l'ADN dans l'hérédité, les scientifiques savaient que même si toutes les cellules d'un organisme partagent les mêmes gènes, leur profil d'expression était très différent d'une cellule à l'autre (Portela and Esteller, 2010). Conrad Waddington a inventé le terme de « paysage épigénétique » (*epigenetic landscape*), désignant les mécanismes moléculaires convertissant l'information génétique en phénotypes observables (figure 19), (Waddington, 2012). Par ailleurs, la plupart des changements épigénétiques persistent à travers les mitoses et méioses (Trerotola et al., 2015). Par conséquent, l'épigénétique est généralement définie comme l'étude des changements d'expression des gènes transmissibles et sans modification de séquence d'ADN (Ferrell, 2012).

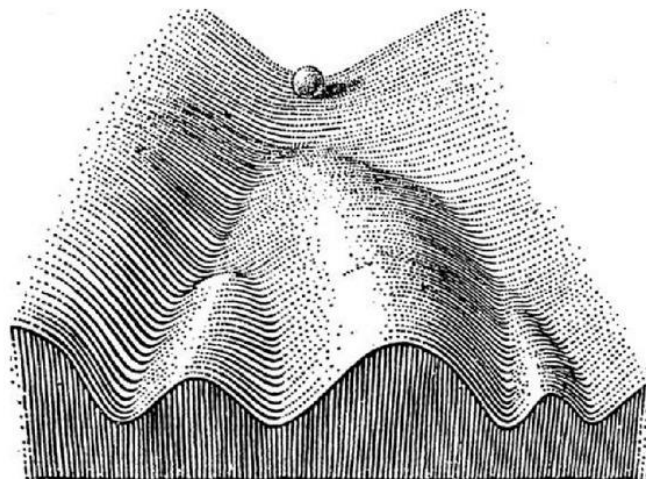


Figure 19 : Le paysage de Waddington.

Une cellule indifférenciée est représentée comme une balle roulant le long d'une colline. Arrivée à chaque branche, la trajectoire de la balle est déviée vers la droite ou vers la gauche, jusqu'à ce qu'elle atteigne le bassin de la colline. Ce bassin correspond à la différenciation terminale de la cellule (Ferrell, 2012).

L'épigénome inclut la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, l'expression d'ARN non-codants et les changements structurels de la chromatine (Perry et al., 2010). Dépendamment de son état de condensation, la chromatine permet ou non l'accès à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle.

1.2.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN chez les mammifères est associée à la répression de l'expression génique (figure 20) (Sulewska et al., 2007). Elle consiste en l'addition d'un groupement méthyle sur les cytosines des îlots CpG, convertissant les cytosines en 5-méthylcytosines (5mC) (Bird, 2002).

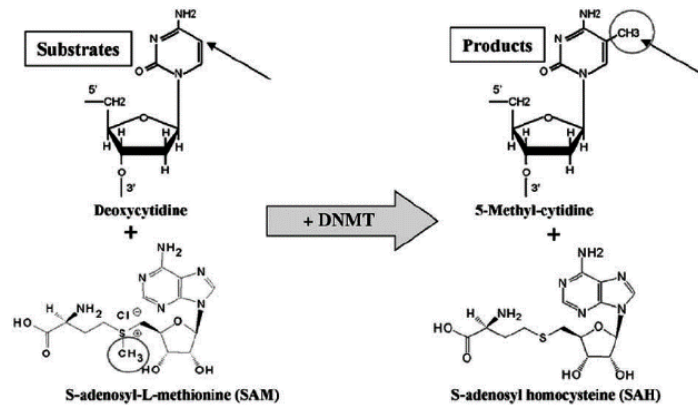


Figure 20 : Réaction de méthylation de la cytosine catalysée par les DNMT. (Sulewska et al., 2007).

1.2.1.1 Les DNMTs

La méthylation de l'ADN est établie et modifiée en réponse au stimuli environnementaux par les DNA methyltransferases (DNMT), nommées DNMT1, DNMT3A et DNMT3B (figure 21).

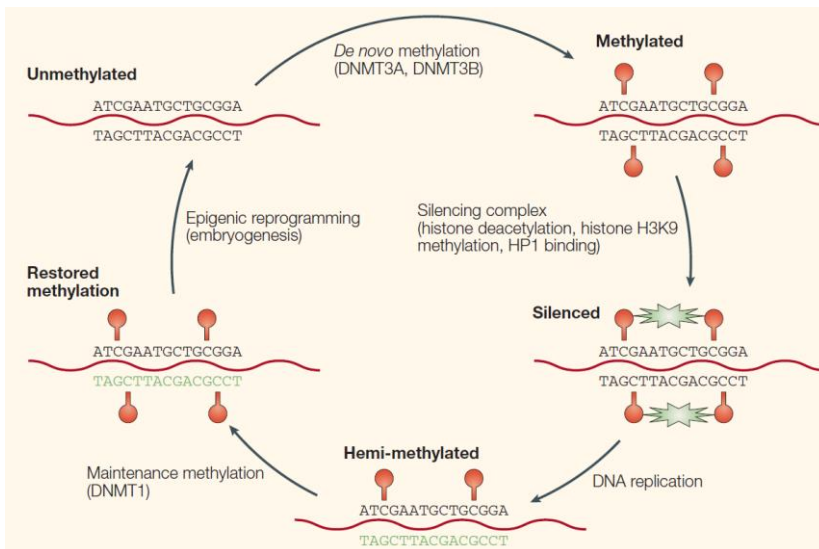


Figure 21 : Méthylation de l'ADN et répression génique. ADN non méthylé (haut gauche). Méthylation de novo commence (cercle rouge), catalysée par les DNMT3A et DNMT3B. La méthylation des îlots CpG entraîne une cascade de répression génique (bas droite). Lors de la réplication de l'ADN, un brin non-méthylé est formé (en vert). La DNMT1 reconnaît les sites hémiméthylés et rajoute des groupements méthyles sur le brin néosynthétisé. (Issa, 2004).

La DNMT1 est une méthyltransférase de maintenance, qui méthyle les sites hemi-méthylés de l'ADN (Jeltsch and Jurkowska, 2016). La méthylation de maintenance est importante pour maintenir les profils de méthylation sur les brins d'ADN néosynthétisés lors de la réplication (figure 21). Les DNMT3A et DNMT3B sont des méthylases *de novo*, qui ont pour rôle de méthyle les cytosines non méthylées (Issa, 2004).

1.2.1.2 Mécanismes d'inhibition de l'expression génique

Contrairement aux plantes chez lesquelles la méthylation est associée à la fois à l'activation et à la répression génique, celle-ci chez les mammifères est clairement associée avec la répression (Zhang et al., 2018a). Deux modèles d'inhibition par méthylation d'ADN existent. Dans le premier, la méthylation de l'ADN peut empêcher sa reconnaissance par la machinerie transcriptionnelle (Watt and Molloy, 1988). Dans le deuxième, les protéines de liaison à l'ADN (*methyl binding proteins*) MBPs reconnaissent l'ADN méthylé et recrutent des co-répresseurs afin d'éteindre l'expression du gène (Drewell et al., 2002). Deux caractéristiques intéressantes de l'ADN méthylé ont été observées. Premièrement, en plus de leur activité catalytique, les DNMTs participeraient de manière physique à la répression génique. En effet, il a par exemple été montré que la DNMT3b peut interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine appelé *Sucrose nonfermenting protein 2 homolog* (hSNFH2) (Geiman et al., 2004). Deuxièmement, la méthylation de l'ADN peut aussi affecter la phase d'élongation de la transcription (Klose and Bird, 2006). Une large proportion de méthylation est retrouvée dans les régions introniques et exoniques (Shayevitch et al., 2018). Par ailleurs, des études utilisant des gènes rapporteurs, ont montré que la méthylation de l'ADN dans le corps du gène entraîne l'inhibition de la transcription (Hsieh, 1997).

1.2.1.3 La déméthylation active de l'ADN

Malgré sa stabilité, la 5-méthylcytosine (5mC) peut être modifiée de plusieurs manières (figure 22). Comme mentionné, la 5mC peut être diluée passivement par les réplifications de l'ADN. De plus, les protéines *Ten-eleven Translocation* (TET) peuvent transformer successivement les 5mC en 5 hydroxyméthylcytosines (5hmC), 5 formylcytosines (5fC) puis en 5 carboxylcytosines (5caC) (figure 22) (Bochtler et al., 2017). Les 5fC et 5caC peuvent ensuite être excisées par la *thymine DNA glycosylase* (TDG) afin de former des sites abasiques. Le site est ensuite remplacé par une cytosine (non méthylée) via le système de réparation *base excision repair* (BER) (Wu and Zhang, 2017).

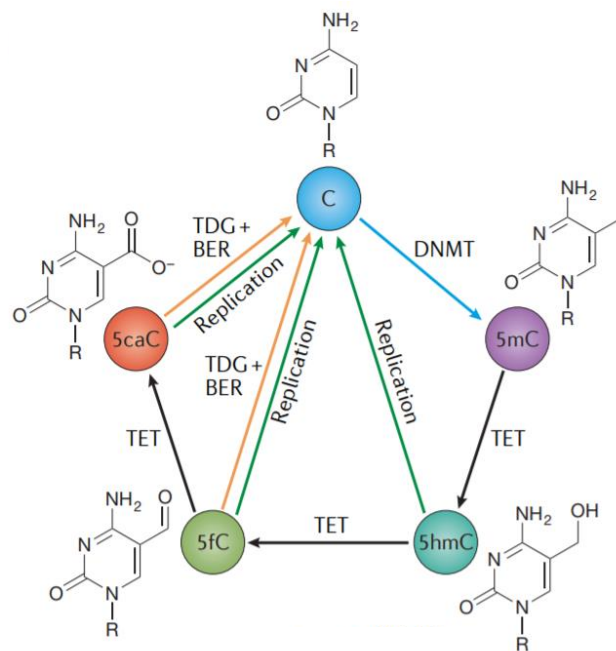


Figure 22 : Déméthylation active de l'ADN.

Les DNMTs convertissent les cytosines en 5mC. Les 5mC peuvent être converties successivement en (5hmC), 5-formylcytosines (5fC) et 5-carboxylcytosines (5caC) par les protéines TET. Les 5fC et 5caC peuvent être excisées par la TDG puis réparées en cytosine par le BER (Wu and Zhang, 2017).

1.2.2 Les ARN non codants (ncRNA)

Un ARN non codant (ncRNA) est une molécule d'ARN non traduit en protéine. Il existe un nombre important de ncRNA aux fonctionnalités multiples : les ARN de transfert (tRNA), les ARN ribosomiques (rRNA) ainsi que les petits ARN miRNA, siRNA, piRNA et les longs ncRNA (lncRNA). Le nombre exact des ncRNA dans le genome humain reste incertain. Cependant des études transcriptomiques et bio-

informatiques suggèrent qu'il en existe des milliers (Cheng et al., 2005; ENCODE Project Consortium et al., 2007; Washietl et al., 2007; van Bakel et al., 2010; Shahrouki and Larsson, 2012).

1.2.2.1 Les micro RNA (miRNA)

Le premier petit ARN non codant appelé lin-4 a été découvert en 1993 après un séquençage génétique chez les nématodes. Par la suite, cet ARN a été reconnu comme faisant partie de la classe des miRNA. Un nombre important de miRNA est impliqué dans divers processus physiologiques tels que la prolifération, la mort cellulaire, le métabolisme, la neurogenèse, l'hématopoïèse, l'immunité et la chondrogenèse (He and Hannon, 2004; Allas et al., 2018).

1.2.2.1.1 Biogenèse des miRNA

La biogenèse des miRNA débute dans le noyau par leur transcription en miRNA primaire (pri-miRNA) (figure 23). Le pri-miRNA est ensuite clivé par un complexe formé de DROSHA et *DiGeorge syndrome chromosomal [or critical] region 8* (DGCR8), afin de produire un miRNA précurseur (pre-miRNA). Le pre-miRNA est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5-RAN-GTP. La maturation se poursuit par un second clivage effectué par la RNase III DICER. Le brin guide du miRNA est chargé ensuite dans le complexe RISC *miRNA induced silencing complex*, contenant les protéines DICER et Argonaute. Ces protéines entraînent la répression génique (Ding et al., 2009).

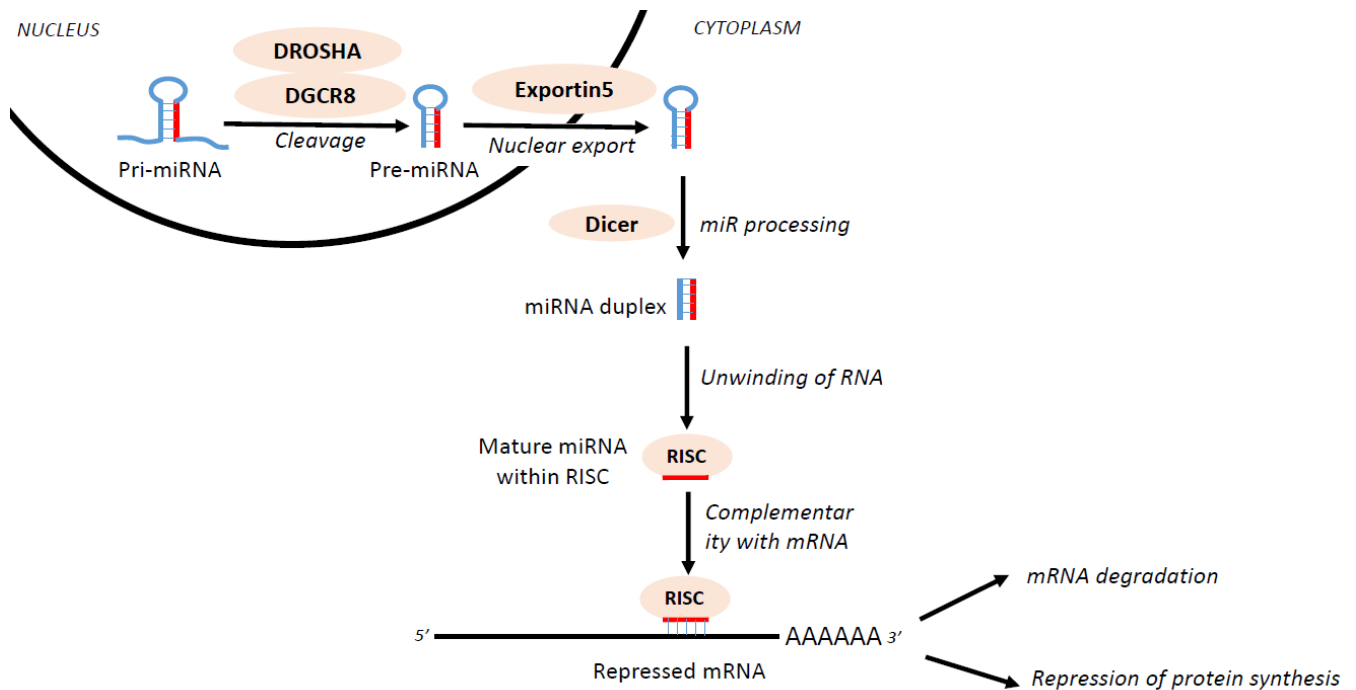


Figure 23 : Biogenèse des miRNA.

Les miRNA sont transcrits par l'ARN polymérase en miRNA primaires (pri-miRNA). Les pri-miRNA sont ensuite clivés en miRNA précurseurs (pre-miRNA) par le complexe microprocesseur formé de la ribonucléase DROSHA et la protéine de fixation à l'ADN DGCR8. Puis, les pre-miRNA sont exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5. Dans le cytoplasme, l'endonucléase de type RNase III clive les pre-miRNA afin de produire un duplexe. Enfin les brins générés par DICER sont chargés dans le RNA-induced silencing complex (RISC) afin d'induire soit l'inhibition de la traduction de l'ARNm cible soit sa dégradation (Allas et al., 2018).

1.2.2.1.2 Mécanismes d'inhibition par les miRNA

Les complexes formés de miRNA et protéines sont appelés les micro-ribonucléoprotéines (miRNP). Ces complexes en se fixant sur la région 3' UTR de l'ARNm cible, peuvent entraîner sa déadenylation (figure 24). Les complexes miRNP peuvent aussi inhiber la traduction en empêchant la reconnaissance de la coiffe 5' par eIF4E ou la liaison de la sous unité 60S du ribosome (Bhattacharyya et al., 2006). Par ailleurs, les ARNm inhibés par les miRNA sont envoyés dans les *P-bodies* (regroupement d'enzymes et d'ARN dans le cytoplasme) où ils sont dégradés ou stockés. Les miRNA peuvent également inhiber l'élongation de la traduction en ralentissant l'action des ribosomes ou en altérant leur liaison à l'ARN (Petersen et al., 2006). Durant élongation les miRNP peuvent aussi recruter des protéases induisant la dégradation du peptide de synthèse (Filipowicz et al., 2008).

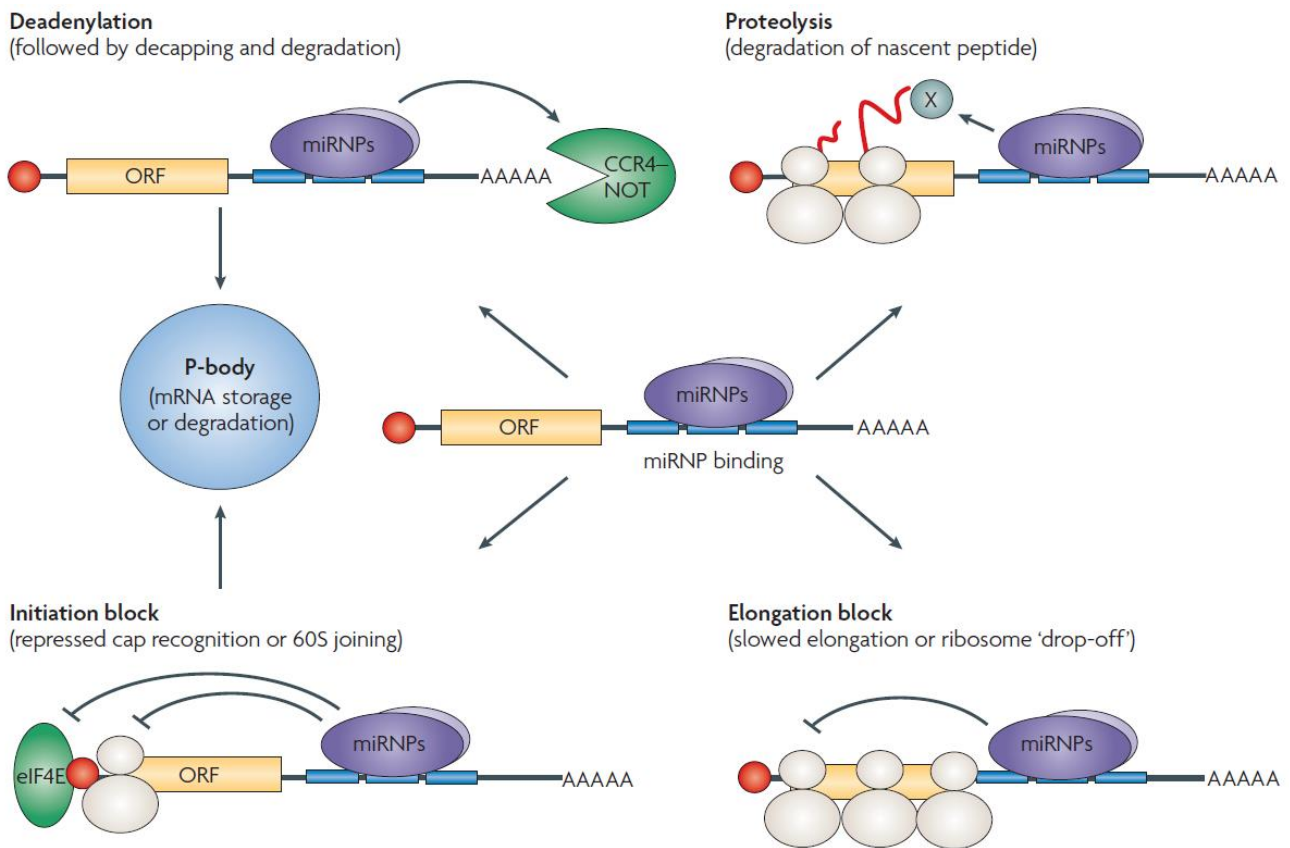


Figure 24: Mécanismes d'inhibition génique post-transcriptionnels par les miRNA.

Les miRNPs inhibent la traduction des ARNm en entraînant leur déadénylation, la protéolyse du peptide naissant, en inhibant la reconnaissance de la coiffe 5' par eIF4E ou la liaison de la sous unité 60S du ribosome. Les miRNPs peuvent également ralentir l'élongation de la traduction par les ribosomes (Filipowicz et al., 2008).

1.2.2.2 Les longs ARN non codants lncRNA

Les progrès de la recherche en bio-informatique et en séquençage ont permis la découverte d'un nombre important de lncRNA (Mercer et al., 2009; Rinn and Chang, 2012). Malgré le fait que ces ARN sont codés par un nombre important de gènes, leur rôle reste pour la plupart inconnu. Les recherches suggèrent que les lncRNA régulent la transcription des gènes par modulation de la chromatine (Han and Chang, 2015). Cependant, de récentes découvertes ont montré que les lncRNA pourraient avoir d'autres fonctions telles que la régulation post-transcriptionnelle, l'organisation de complexes protéiques et la signalisation cellulaire (Chen et al., 2017).

1.2.2.2.1 Régulation transcriptionnelle par les lcnRNA

Plusieurs lncRNA peuvent s'associer avec des protéines catalysant la modification des histones (figure 25). A titre d'exemple, le lncRNA HOTAIR peut s'associer physiquement à PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) et LSD1 (*Lys-specific demethylase 1*). Comme nous le verrons dans la partie consacrée aux modifications des histones, PRC2 et LSD1 favorisent la compaction de la chromatine et donc la répression génique (Khalil et al., 2009; Portoso et al., 2017). Dans certains cas, les lncRNA peuvent agir pendant la transcription de leur cible (Kornienko et al., 2013). Par exemple, lncRNA Airn (*antisense of Igf2r non-coding RNA*) peut interférer avec la transcription de Igf2r (*insulin-like growth factor 2 receptor*) (Latos et al., 2012). Certains lncRNA peuvent agir de manière indirecte en inhibant les *enhancers* de leurs cibles. Par exemple chez la levure, les lncRNA *Ichthyosis Congenita I*, *Erythromatous Lamellar Ichthyosis*, *Ichthyosiform Erythroderma ICR1* et *Promoting Watson RNA (PWR1)* régulent de cette façon l'expression FLO11. En effet, ICR1 réprime l'expression de FLO11 en inhibant le recrutement des facteurs de transcription Flo8 et Slf1 (Bumgarner et al., 2012).

En plus de la modulation de la chromatine, les lncRNA peuvent réguler la transcription en agissant directement sur la machinerie transcriptionnelle. Lors d'un choc thermique, les lncRNA générés des gènes *Alu SINE elements* entraînent la répression de la transcription en interagissant directement avec l'ARN polymérase II (Mariner et al., 2008). Il a également été montré qu'un lncRNA transcrit à partir du locus DHFR (*dihydrofolate reductase*), empêche l'assemblage du complexe de pre-initiation de la transcription. Les lncRNA peuvent également mimer les séquences de fixation des facteurs de transcription en formant des boucles doubles brin. Par exemple, le lncRNA GAS5 (*growth arrest specific 5*) peut mimer la séquence de fixation du récepteur au glucocorticoïdes, ce qui entraîne la répression de la transcription dépendante des glucocorticoïdes (Kino et al., 2010). D'autre part, les lncRNA régulent la transcription en bloquant la translocation nucléaire des facteurs de transcription. Par exemple le facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), pénètre dans le noyau en se liant à l'importine- β . Le lncRNA NRON (*non-coding repressor of NFAT*) est en compétition avec NFAT, car il se lie au même site de fixation à l'importine- β . NRON empêche donc la translocation nucléaire de NFAT et ainsi la transcription de ces gènes cibles en se fixant à l'importine- β (Geisler and Coller, 2013).

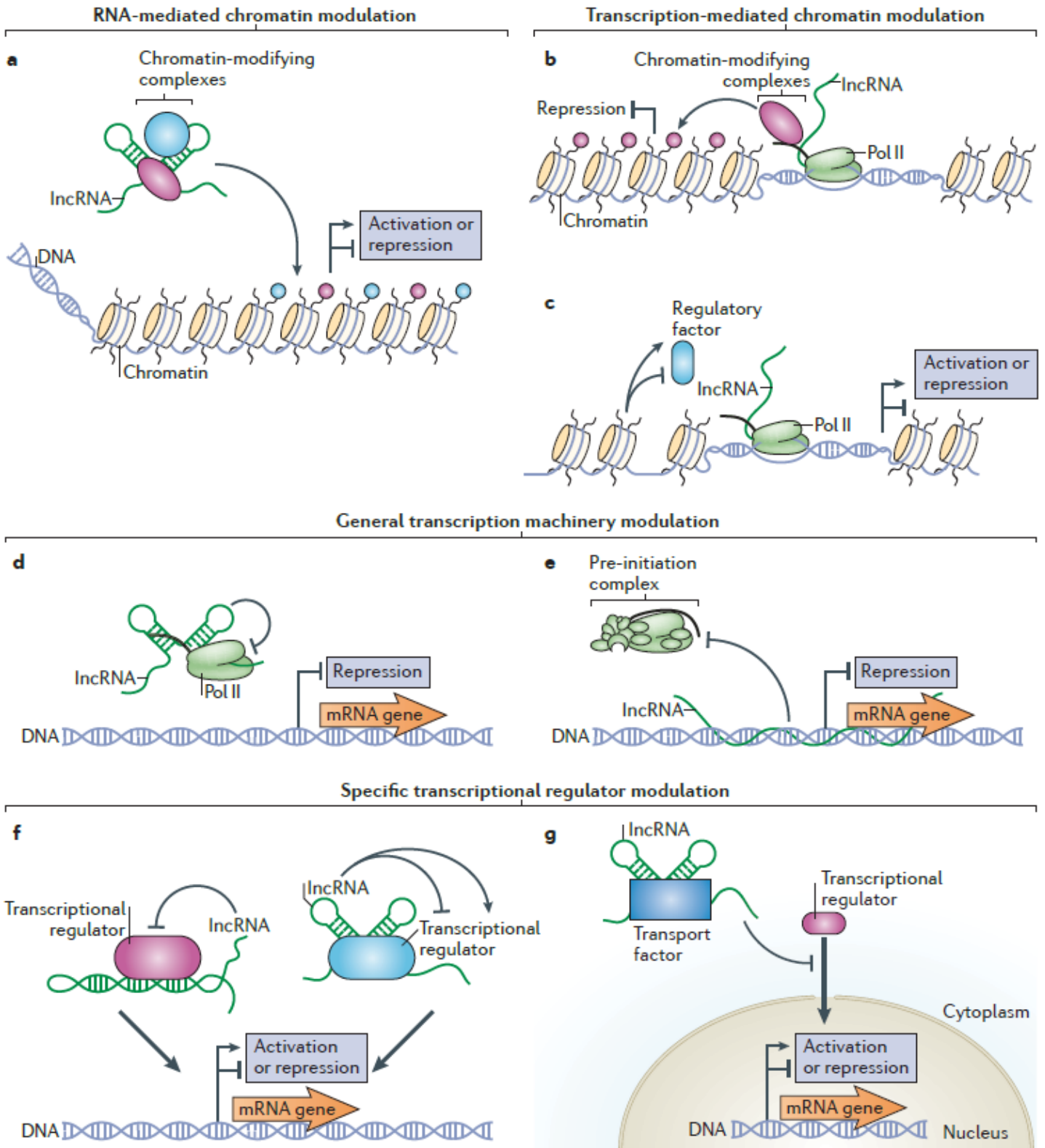


Figure 25 : Les lncRNA régulent la transcription à travers plusieurs mécanismes.

(a-c) Les lncRNA peuvent moduler le niveau de compaction de la chromatine de manière indépendante (a) ou dépendante de la transcription (b-c). (d-g) Les lncRNA peuvent moduler à la fois la machinerie générale de la transcription (d-e) mais également des régulateurs spécifiques (f-g) (Geisler and Coller, 2013).

1.2.2.2 Régulation post-transcriptionnelle

Immédiatement après la transcription des pré-ARNm naissants, l'épissage alternatif augmente le nombre d'isoformes potentiels pour un même gène (figure 26). Dans certain cas les lncRNA qui ont une orientation antisens à un gène codant une protéine (aussis appelés NAT pour *natural antisense transcripts*), peuvent influencer le devenir de l'ARNm sens. A titre d'exemple, le NAT du gène c-MYC forme un duplex avec le pré-ARNm pour moduler l'épissage alternatif (Beltran et al., 2008). En plus de l'épissage, les lncRNA antisens peuvent réguler l'édition des ARNm. L'édition des ARN est importante, car elle peut ensuite influencer la structure, l'épissage et son ciblage par les miRNA (Hundley and Bass, 2010).

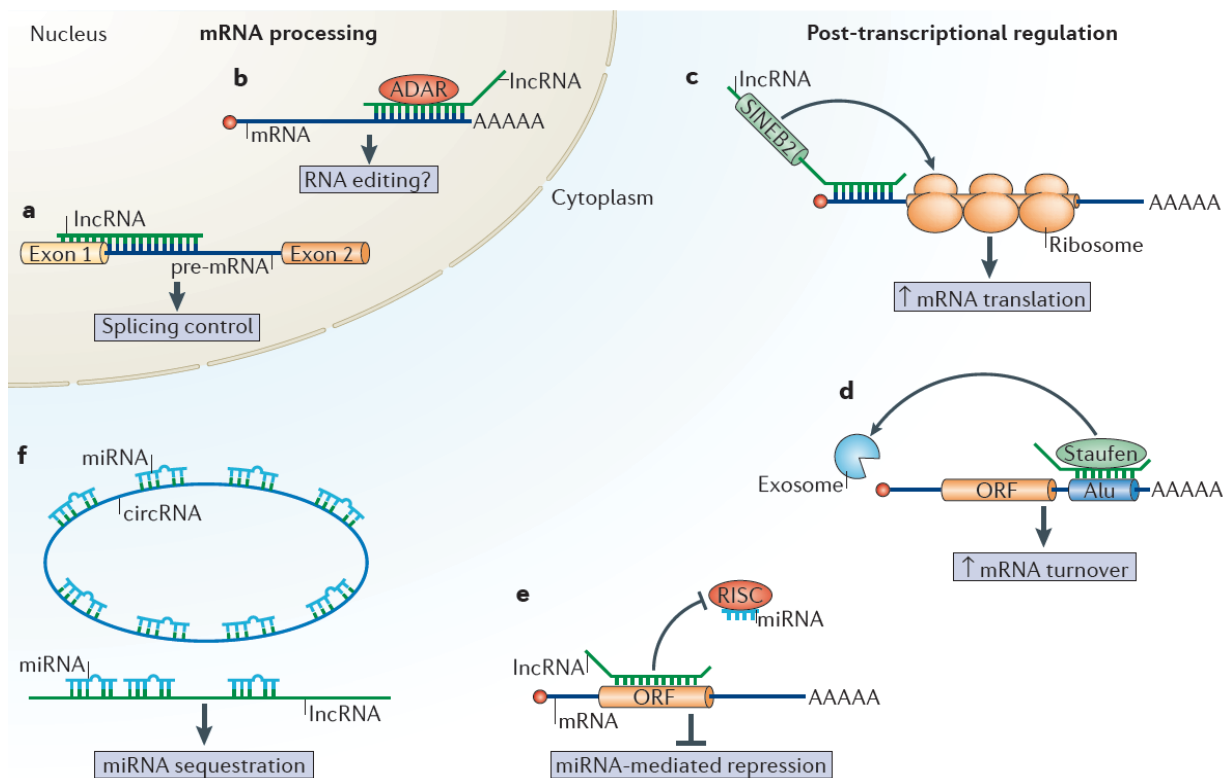


Figure 26 : Régulation post-transcriptionnelle des lncRNA.

L'épissage alternatif peut être influencé par les lncRNA (a). Les lncRNA peuvent diriger l'édition en s'associant avec ADAR (adenosine deaminase acting on RNA), qui convertit les adenosines en inosines (b). La traduction est amplifiée par les lncRNA à région SINEB2 (c). Les lncRNA contenant une région Alu peuvent entraîner la dégradation de leur cible en recrutant Staufen (d). Les lncRNA peuvent protéger les ARNm de la dégradation en masquant les sites de fixation des miRNA (e). Les lncRNA linéaires ou circulaires peuvent séquestrer des miRNA avec des séquences complémentaires (f) (Geisler and Coller, 2013).

La stabilité des ARNm implique également les lncRNA. A titre d'exemple, les lncRNA contenant des régions Alu répétées sont impliqués dans le recrutement de Staufen 1, après fixation sur la région 3'

UTR de son ARNm cible. Staufen 1 entraîne par la suite la dégradation de l'ARNm. A l'inverse le lncRNA BACE1AS augmente la stabilité de son ARNm antisens BACE1 (*beta-site APP-cleaving enzyme 1*). BACE1AS rentre en compétition avec les miRNA pour la région 3' UTR BACE1 (Faghihi et al., 2010).

Les lncRNA peuvent aussi agir comme des leurres en piégeant les miRNA avec des séquences complémentaires. Par exemple, lncRNA LINCMD1 favorise la différenciation musculaire en fixant les miRNA miR-133 et miR-135 (Cesana et al., 2011). Ces derniers, régulent négativement l'ARNm de facteurs de transcription initiateurs du développement musculaire (Geisler and Coller, 2013).

1.2.3 Modification des histones

1.2.3.1 L'acétylation des histones

La première étude concernant l'acétylation des histones est parue en 1964 (Allfrey et al., 1964). Depuis, il a été montré que l'acétylation des lysines est dynamiquement régulée par l'action antagoniste de deux familles d'enzymes, les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC).

1.2.3.1.1 Les HAT

Les HAT utilisent l'acétyl CoA comme cofacteur et catalysent le transfert d'un groupement acétyle sur le groupement ϵ -amino des lysines. Ainsi, elles neutralisent les charges positives des lysines et fragilisent les interactions entre histones et ADN (Bannister and Kouzarides, 2011).

Il existe des HAT de type A et B. Les HAT de type B sont très conservées, principalement cytoplasmiques, acétylant les histones libres et non associées à la chromatine. Les HAT de type B acétylent les lysines K5 et K12 des histones H4 (et accessoirement H3) néosynthétisées. Une fois le nucléosome formé et incorporé dans la chromatine, les groupements acétyls des HAT de type B sont effacés (Parthun, 2007).

Les HAT de type A composent une famille plus diversifiée d'enzymes. Elles peuvent être séparées en 3 groupes en fonction de leur séquence amino-acidique et de la leur conformation : GNAT, MYST et CBP/p300 (Hodawadekar and Marmorstein, 2007). Les enzymes de ces familles sont majoritairement des coactivateurs de la transcription, grâce à leur capacité d'acétyler sur plusieurs sites les queues N-terminales des histones. Cependant, il existe d'autres sites d'acétylation présents sur le corps de l'histone et qui contribuent également à la compaction de la chromatine, comme par exemple, l'acétylation de H3K56 (Tjeertes et al., 2009). Les HAT de type A, comme de nombreuses enzymes de modification des histones, sont retrouvées associées à des complexes multiprotéiques (Yang and Seto,

2007). Ces complexes jouent un rôle important dans la spécificité de l'activité enzymatique. En effet, la HAT *general control of amino-acid synthesis, yeast, homolog* (GCN5) libre, acétyle les histones non associées à la chromatine, alors que la GCN5 associée au complexe multiprotéique SAGA, acétyle uniquement les histones des nucléosomes (Grant et al., 1997).

1.2.3.1.2 Les HDAC

Les HDAC sont des enzymes antagonistes à l'effet des HAT en restaurant les charges positives des lysines (figure 27). Le génome des mammifères code pour 11 protéines avec un domaine désacétylase très conservé. Ces protéines sont divisées en quatre familles (I, IIa, IIb et IV), qui diffèrent en termes de structure, de fonction enzymatique, de localisation cellulaire et de profils d'expression. En plus, de ces HDAC, il existe un autre groupe de désacétylases appelées les sirtuines, dont l'action est dépendante du nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) et qui constituent la classe III.

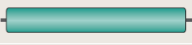

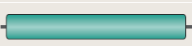

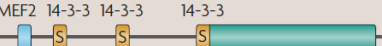
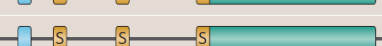
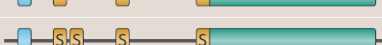
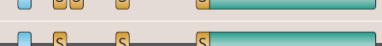

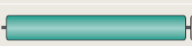

	Protein domains	Time of lethality	Phenotype	References
Class I	HDAC1  482	E10.5	Proliferation defects	12,53
	HDAC2  488	P1	Cardiac malformation	12,61
	HDAC3  428	E9.5	Gastrulation defects	69–71
	HDAC8  377	P1	Craniofacial defects	M.H. and E.O., unpublished observations
Class IIa	HDAC4  1,084	P7–P14	Chondrocyte differentiation defect in growth plate	33
	HDAC5  1,122	Viable	Exacerbated cardiac hypertrophy after stress	32
	HDAC7  912	E11	Endothelial dysfunction	34
	HDAC9  1,069	Viable	Exacerbated cardiac hypertrophy after stress	31
Class IIb	HDAC6  1,215	Viable	Increased tubulin acetylation	43
	HDAC10  669	ND	–	–
Class IV	HDAC11  347	ND	–	–

Figure 27 : La famille des histones désacétylases (HDAC), structure, phénotype et survenue de léthalité après invalidation chez la souris.

Les rectangles verts correspondent à des domaines conservés des HDAC. Les carrés bleus indiquent les sites de liaison à MEF2, les sites de liaison à la chaperonne 14-3-3 sont également montrés. E, jours embryonnaires ; ND, non déterminé, P; jours postnatals, S; site de phosphorylation des sérines; ZnF, zinc finger (Haberland et al., 2009).

La classe I est composée des HDAC 1, 2, 3 et 8, elles sont exprimées de façon ubiquitaire et sont localisées principalement dans le noyau. Elles sont constituées d'un domaine désacétylase conservé avec des extensions amines et carboxyles terminales. Les HDAC1 et 2 sont presque identiques et sont généralement retrouvées dans les complexes répressifs Sin3, NuRD, CoRest et PCR2 (Yang and Seto, 2003). La HDAC3 est retrouvée dans les complexes N-CoR-smRT (Yang and Seto, 2008).

Les HDAC4, 5, 7 et 9 appartiennent à la classe IIa. Ces HDAC ont une large extension N-terminale avec un site de liaison conservé au *factor myocyte enhancer factor 2* (meF2) et à la protéine chaperonne 14-3-3. Lorsque les HDAC sont phosphorylées par la *calcium/calmodulin-dependent protein kinase* (CamK) ou la *protein kinase D* (PKD), elles sont exportées hors du noyau (Vega et al., 2004b). Cette exportation permet aux HAT de se lier à meF2 à la place des HDAC, convertissant ce facteur de transcription répresseur en activateur (Lu et al., 2000). A l'inverse d'autres HDAC de classes II, les HDAC de type IIa ont un profil d'expression assez restreint. Les HDAC 5 et 9 sont très enrichies dans les muscles, le cœur et le cerveau (Zhang et al., 2002a). La HDAC4 est très exprimée dans le cerveau, la plaque de croissance et le squelette (Vega et al., 2004a). La HDAC7 quant à elle, est enrichie dans les cellules endothéliales et le thymus (Chang et al., 2006). La répression génique par les HDAC n'est pas uniquement liée à leur activité désacétylase. En effet, il a été montré que la HDAC9 délétée de son domaine désacétylase était toujours capable d'inhiber les gènes cibles de meF2. Cet effet, peut être expliqué par le fait que les HDAC de classe II peuvent recruter les HDAC de classe I sur leur domaine C-terminal (Zhang et al., 2002b). De plus, les HDAC de classe II peuvent interagir avec d'autres facteurs de répression tels que *heterochromatin protein 1* (HP1) et *C-terminal-binding protein* (CTBP) (Dressel et al., 2001). Les HDAC de classe II, en plus de leur activité enzymatique, fonctionnent comme des adaptateurs de plusieurs régulateurs transcriptionnels.

Les HDAC6 et HDAC10 forment la classe IIb. La HDAC6 est la principale désacétylase cytoplasmique chez les mammifères (Fischer et al., 2002). La HDAC6 se distingue des autres HDAC par ces deux domaines désacétylases et son domaine zinc finger en C-terminal. Parmi ces cibles, nous retrouvons des protéines cytoplasmiques l' α -tubulin et cortactine, transmembranaires comme le récepteur à l'interféron (IFN α R) et des protéines chaperonnes (Haberland et al., 2009).

La classe IV est uniquement composée de la HDAC11, dont l'expression est enrichie dans le cerveau, le cœur, les muscles, les reins ainsi que les testicules (Gao et al., 2002).

1.2.3.2 La méthylation des histones

La méthylation des résidus lysines des histones induite par les histones méthyltransférases (HMT), peut être associée à l'activation ou la répression de l'expression des gènes en fonction de l'acide aminé concerné. Par exemple, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est associée à l'activation transcriptionnelle, alors que la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) est associée à la répression transcriptionnelle (Perry et al., 2010).

1.2.3.2.1 La méthylation de H3K4

La méthylation de H3K4 est une modification très conservée au cours de l'évolution et très enrichie au niveau des promoteurs ou elle favorise la transcription (Shilatifard, 2012). La méthylation de H3K4 est effectuée par les homologues de la famille Set1 (SET1A/KMT2F, SET1B/KMT2G, MLL1 (mixed-lineage leukemia 1) /KMT2A, MLL2/KMT2B, MLL3/KMT2C and MLL4/KMT2D). Les homologues Set1 forment des complexes avec quatre sous-unités différentes communes (WRAD: WDR5 (*WD repeat domain 5*), RbBP5 (*retinoblastoma binding protein 5*), ASH2L (*absent, small or homeotic-2 like*) et DPY30) mais également des sous-unités spécifiques à chaque homologue (Shilatifard, 2012). L'association des WRAD avec les protéines SET1/MLL fournit des propriétés enzymatiques spécifiques. MLL1 isolée possède une faible activité méthyltransférase. Alors qu'elle exhibe une activité mono et di méthyltransférase lorsqu'elle est complexée avec WRAD (Patel et al., 2009). Ainsi, l'assemblage des différents complexes SET1/MLL/WRAD dicte la spécificité de liaison avec les facteurs de transcription et l'activation de gènes spécifiques (Hyun et al., 2017).

Les premières déméthyltransférases de H3K4 découvertes sont les protéines LSD1 (KDM1A) et LSD2 (KDM1B) (Ciccone et al., 2009). Il a été montré que LSD1 est recrutée sur ses gènes cibles par CoREST, BHC80, SFMBT1 et Snail (Lin et al., 2010). De plus, les familles des protéines JARID1 (jumonji AT-rich interactive domain-1) et N066, sont aussi dotées d'une activité H3K4 déméthyltransférase (Højfeldt et al., 2013). N066 est capable de déméthyle les trois états de méthylation de H3K4 en utilisant l' α -cétoglutarate et le Fe(II) comme cofacteurs (Sinha et al., 2010), alors que les protéines JARID1 sont spécifiques de H3K4me2 et H3K4me3 (Christensen et al., 2007).

1.2.3.2.2 La méthylation de H3K9

La méthylation de H3K9 est connue pour réprimer la transcription et favorise la compaction de la chromatine (Barski et al., 2007). Il existe plusieurs types de méthyltransférases de H3K9 chez les mammifères (SUV39H1/KMT1A, SUV39H2/KMT1B, SETDB1/KMT1E, G9a/KMT1C-GLP (G9a-like protein)/KMT1D and PRDM) (Brower-Toland et al., 2009). SUV39H1 et SUV39H2 catalysent la di et la tri méthylation dans les régions constitutives d'hétérochromatine dont les régions péri-centriques (Lachner et al., 2001). Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 and *Glucagon-like peptide 1* (G9a-GLP) est une autre H3K9 méthyltransférase réprimant l'expression génique par mono et di méthylation (Tachibana et al., 2002). Plusieurs PRDM (*PRDI-BF1 and RIZ homology domain*) contribuent à la méthylation de H3K9. Parmi les 17 membres de la famille PRDM, certains possèdent un domaine *Protein arginine PR* similaire à un domaine *Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax*

(SET) avec une activité méthyltransférase. Les autres membres participent à la méthylation de H3K9 en s'associant avec d'autres méthyltransférases telles que G9a (Hohenauer and Moore, 2012).

Il existe trois classes de protéines à activité H3K9 déméthylase JHDM2/KDM3, JHDM3(JMJD2)/KDM4 et PHF8/KDM7. Les JHDM2 (*jumonji domaincontaining histone demethylase-2*) ont la capacité de déméthyliser H3K9me1 et H3K9me2 (Yamane et al., 2006). Les JHDM3 peuvent déméthyliser H3K9me2 and H3K9me3 (Cloos et al., 2006). Les PHF (*PHD finger*) dont l'action est dépendante du Fe(II), déméthylent H3K9me1 et H3K9me2 (Loenarz et al., 2010).

1.2.3.2.3 La méthylation de H3K36

H3K36me3 est retrouvée à l'intérieur du gène, où elle favorise l'élongation de la transcription. Les cellules de mammifères contiennent huit H3K36 méthyltransférases différentes : NSD1/KMT3B, NSD2/KMT3G, NSD3/KMT3F, SETD2/KMT3A, SETD3, SETMAR, SMYD2/KMT3C and ASH1L/KMT2H (Wagner and Carpenter, 2012). Parmi elles, SETD2 contribue majoritairement à la tri-méthylation de H3K36, alors que les sept autres sont restreintes à une activité H3K36 mono et di-méthyltransférase (Edmunds et al., 2008).

Il existe deux familles de H3K36 déméthyltransférases chez les mammifères : JHDM1/KDM2A-B et JHDM3/JMJD2/KDM4A-D. JHDM1 est spécifique de H3K36me1 et H3K36me2, elle contient un domaine PHD permettant la fixation aux histones (Li et al., 2006). JHDM3 est spécifique de H3K36me2 et H3K36me3, mais a la capacité de déméthyliser *in vitro* H3K9me2 et H3K9me3 (Cloos et al., 2006).

1.2.3.2.4 La méthylation de H3K79

Contrairement à la plupart des méthylations de lysine localisées au niveau de la queue des histones et catalysées par le domaine SET des méthyltransférases, la méthylation de H3K79 a lieu au niveau de la région globulaire de l'histone H3 et est réalisée par DOT1L (*DOT1-like*)/KMT4, (Nguyen and Zhang, 2011). Malgré qu'il ait été établi que H3K79me3 soit réversible, aucune déméthylase n'a été identifiée à l'heure actuelle (Hyun et al., 2017).

1.2.3.2.5 La méthylation de H4K20

La méthylation de H4K20 est catalysée principalement par SET8/KMT5A, elle catalyse la mono et la diméthyméthylation de H4K20me1, formant ainsi H4K20me2 et H4K20me3 respectivement (Yang et al., 2008). Il existe plusieurs déméthylases impliquées dans l'effacement de la méthylation de H4K20. PHD8/KDM7B a été la première à avoir été identifiée comme H4K20me1 déméthylase (Liu et al., 2010).

1.2.4 Méthylation de H3K27

1.2.4.1 PRC2/EZH2

La lysine de 27 de l'histone H3 peut être mono-, di- ou tri-méthylée. La formation de H3K27me3 est séquentielle et résulte toujours de la mono-méthylation de H3K27me2 (Zee et al., 2010). Dans les cellules souches embryonnaires la méthylation de H3K27 est très abondante, avec 50% des lysines 27 diméthylées, 15% triméthylées et 15% monométhylées (Peters et al., 2003). La marque H3K27me2 a un double rôle. D'une part elle est le substrat d'EZH2 pour la formation de H3K27me3. D'autre part elle empêche l'acétylation de H3K27 (Tie et al., 2009).

La méthylation de H3K27 est catalysée par le complexe *Polycomb repressive complex 2* (PRC2). Ce dernier est constitué de 7 sous unités AEBP2, PCL, JARID2, SUZ12, EED, RbAp46/48 et *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2* (EZH2), la sous-unité catalytique (figure 28) (Margueron and Reinberg, 2011).

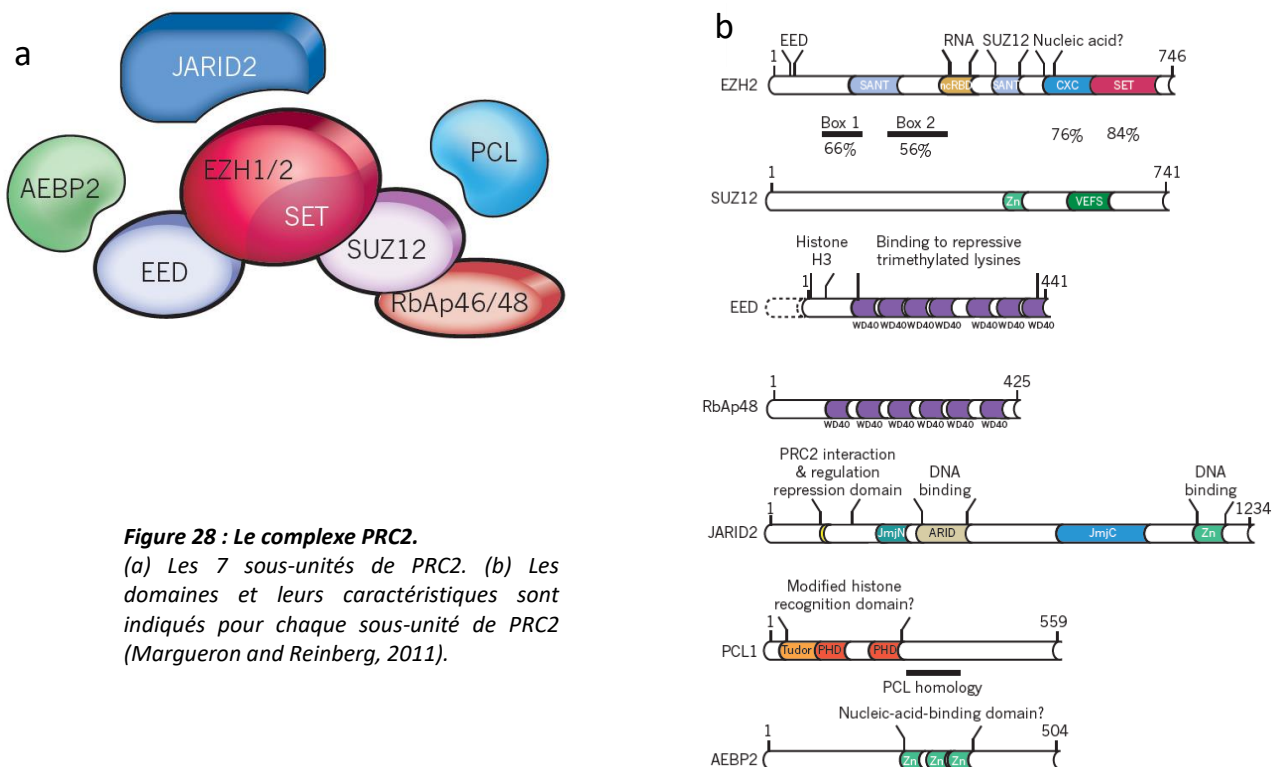


Figure 28 : Le complexe PRC2.
 (a) Les 7 sous-unités de PRC2. (b) Les domaines et leurs caractéristiques sont indiqués pour chaque sous-unité de PRC2 (Margueron and Reinberg, 2011).

Le gène d'EZH2 est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q36.1). Elle est exprimée principalement dans le noyaux mais peut être retrouvée dans le cytoplasme (Bracken et al., 2003a;

Kirmizis et al., 2004). Les souris invalidées pour EZH2 meurent au stade E7.5 du développement embryonnaire (O'Carroll et al., 2001). L'activité méthyltransférase d'EZH2 est conférée par son domaine SET. Cependant, EZH2 seule n'a pas d'activité enzymatique et requiert l'interaction d'autres membres du complexe PRC2, en particulier EED et SUZ12. EZH2 catalyse l'addition d'un groupement méthyle sur H3K27 en utilisant comme cofacteur la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) qui devient S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) après la réaction. SAH est un inhibiteur compétitif de SAM (figure 29) (Völkel et al., 2015).

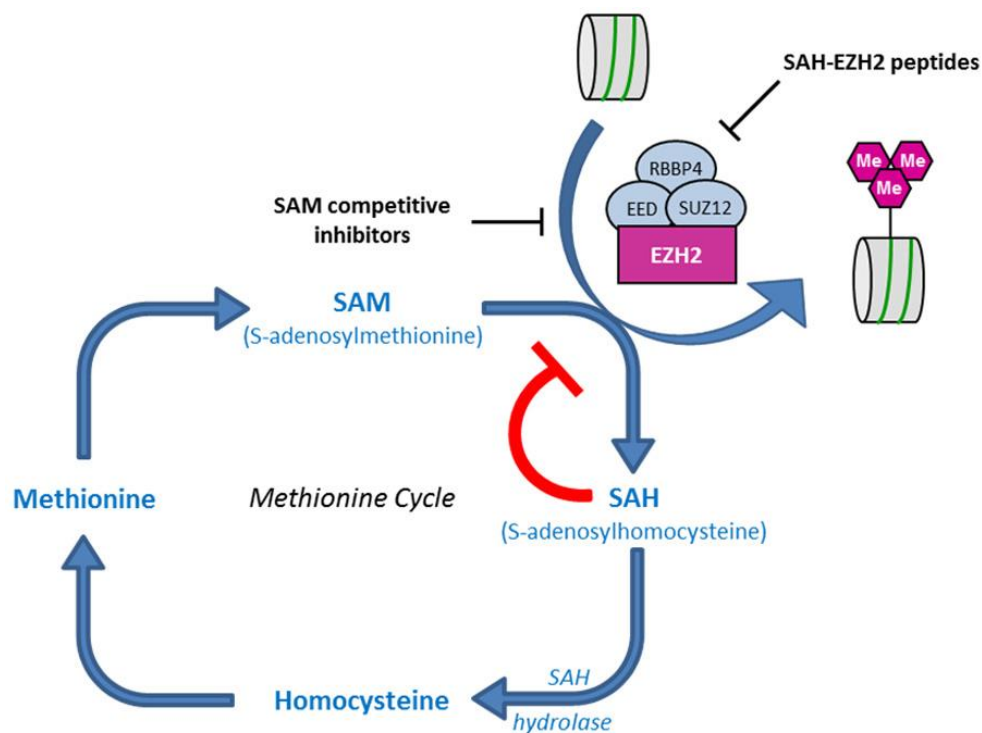


Figure 29 : Réaction de méthylation par EZH2 en utilisant SAM comme cofacteur.

Le donneur de méthyle d'EZH2 est SAM qui devient SAH après réaction. SAH est ensuite transformée en homocystéine par la SAH hydrolase (Völkel et al., 2015).

Le terme Polycomb réfère initialement à un phénotype de drosophile, ayant une segmentation altérée (Kyba and Brock, 1998). Aujourd'hui le groupe polycomb (PcG) définit un ensemble de gènes dont la mutation entraîne un phénotype similaire (Margueron and Reinberg, 2011). *Embryonic ectoderm development* (EED) avec son domaine *Post-translational modification* (PTM) de reconnaissance de H3K27me1, joue un rôle central dans le recrutement de PRC2 sur ces gènes cibles. *Adipocyte Enhancer-Binding Protein* (AEBP2) et *SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit* (SUZ12) possèdent un domaine zinc finger permettant de stabiliser l'interaction de PRC2 avec l'ADN. *Polycomb-like* (PCL) 1

contient un *plant homeodomain* (PHD) ce qui lui permet de fixer la queue N-terminale des histones. *Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2* (JARID2) est un membre de la famille des Jumonjis mais sans activité catalytique. Elle possède un domaine *AT-rich interaction* (ARID) de liaison à l'ADN. RbAp46 et RbAp48 sont des chaperonnes d'histones (Margueron and Reinberg, 2011). EZH1 est un homologue d'EZH2 mais avec une activité enzymatique quasi nulle. EZH1 est généralement retrouvée sur des gènes transcriptionnellement actifs. En effet, EZH1 en prenant la place d'EZH2 pourrait par compétition, réguler négativement la méthylation de H3K27me3 et la répression génique qui en découle (Xu et al., 2015).

La présence de PRC2 sur la chromatine entraîne à travers différents mécanismes la répression génique (Di Croce and Helin, 2013). En effet, PRC2 peut recruter PRC1, qui par son activité E3 ligase, entraîne la compaction de la chromatine (figure 30). L'état compacté de la chromatine réduit l'accès à la machinerie de la transcription ainsi qu'aux complexes de remodelage de la chromatine tels que SWI/SNF (Bantignies and Cavalli, 2011). PRC2/EZH2 régule les gènes impliqués dans le développement, l'inactivation du chromosome X, la régulation du cycle cellulaire, et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (ESCs).

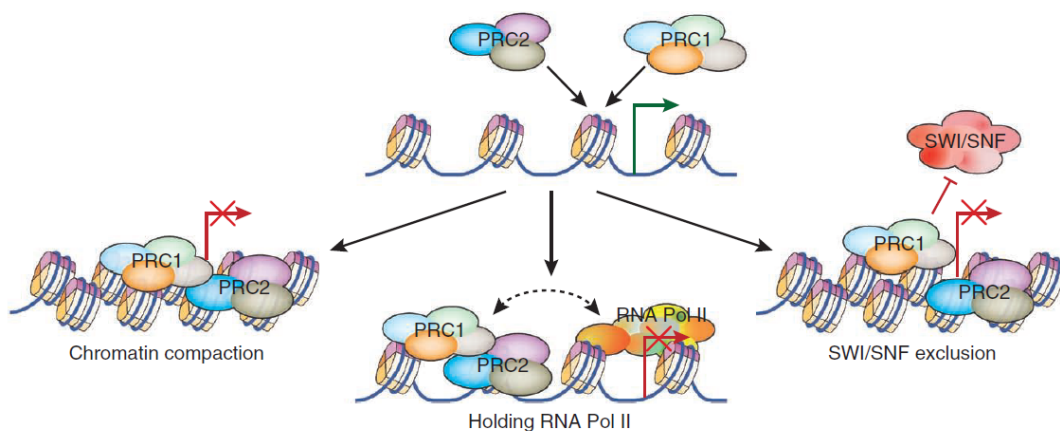


Figure 30 : Répression génique induite par PRC2/EZH2.

En formant H3K27me3, PRC2 entraîne la compaction de la chromatine notamment via le recrutement de PRC1. La compaction de la chromatine empêche par la suite l'accès à l'ARN polymérase II et aux complexes de remodelage de la chromatine à l'ADN (Di Croce and Helin, 2013).

1.2.4.2 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle d'EZH2

La séquence du promoteur d'EZH2 contient plusieurs sites de liaison pour différents facteurs de transcription comme *retinoblastoma protein-E2 factor* (pRB-E2F), *ETS Transcription Factor ELK1* (ELK1), *K-ras or Ki-ras* (KRAS), *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), *Protein kinase B* (Akt), *hypoxia-induced* (HIF-1a) et *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) (Bracken et al., 2003b; Bantignies and Cavalli, 2011; Chang et al., 2011; Fujii et al., 2011). Les miRNA miR-26a et miR-101 sont aussi impliqués dans la régulation d'EZH2 par liaison à sa séquence 3' UTR (Sander et al., 2008; Zhang et al., 2012a). EZH2 est également soumise à la phosphorylation. La phosphorylation d'EZH2 par AKT sur sa Ser21 réprime son activité méthylase. EZH2 sous cette forme phosphorylée, peut servir de cofacteur (*enhancer*) de transcription indépendamment de son activité catalytique (Cha et al., 2005; Latos et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que la phosphorylation d'EZH2 sur sa Thr350 par *cyclin dependent kinase* (CDK) 1 facilite son recrutement sur ces cibles et augmente son activité enzymatique (Chen et al., 2010). A l'inverse, lorsque CDK1 phosphoryle la Thr487 d'EZH2, elle inhibe son activité méthylase et sa liaison sur ces gènes cibles (Yapp et al., 2016).

1.2.4.3 Implication d'EZH2 dans les maladies oncologiques et inflammatoires

EZH2 est connue pour être recrutée sur des loci spécifiques au cours du développement, afin de favoriser une voie de différenciation au détriment d'une autre (Ezhkova et al., 2009). De manière, analogue à son rôle dans les cellules souches normales, EZH2 dans les cellules souches cancéreuses (CSC) du sein, inhibe l'expression des gènes de la différenciation. A cause de leur état quiescent, les CSC sont responsables des récives après chimio ou radiothérapie (Ezhkova et al., 2009; Xu et al., 2012b). EZH2 augmente aussi l'expression de pRb-E2F dans certains cancers. PRb-E2F favorise la prolifération des cellules cancéreuses en augmentant d'une part l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, mais également en stimulant l'expression d'EZH2 (Bracken et al., 2003b). EZH2 est capable de méthyler des protéines non-histones. Par exemple, EZH2 favorise la formation de CSC dans les glioblastomes en méthylant STAT3 et le récepteur aux androgènes (AR) (Kim et al., 2013).

EZH2 est par ailleurs impliquée dans certains processus immunologiques et inflammatoires. Les macrophages oscillent entre deux phénotypes : M1 pro-inflammatoire et M2 anti-inflammatoire. Il a été montré que l'invalidation d'EZH2 dans les macrophages réduit leur différenciation M1 activée par les *toll like receptors* (TLR). De plus, l'invalidation d'EZH2 inhibe l'activité auto-immune des microglies

dans un model murin d'encéphalomyélite (Zhang et al., 2018b). Au cours de la sclérose en plaque, une maladie auto-immune du système nerveux central, EZH2 est surexprimée dans les lymphocytes CD4+ et CD8+ matures présents sur les sites inflammatoires, alors qu'elle est peu exprimée dans les lymphocytes naïfs de la circulation sanguine. Elle favoriserait l'adhésion et la migration des lymphocytes vers le système nerveux central (Malhotra et al., 2018). Dans un modèle expérimental de la maladie de Crohn (inflammation chronique de l'intestin), l'inhibition d'EZH2 par le GSK343, permet de retarder le déclenchement de la pathologie et d'atténuer les symptômes inflammatoires (Zhou et al., 2019a). Des résultats similaires ont été observés dans un modèle de pulpite (inflammation de la pulpe dentaire) chez le rat, où l'inhibition d'EZH2 par siRNA contrecarre l'inflammation en réduisant la libération de cytokines (Hui et al., 2018). Des études suggèrent par ailleurs qu'EZH2 est impliquée dans certains processus anti-inflammatoires. Les cellules NKT (*Natural killer T cells*) expriment le récepteur des cellules T (TCR), leur permettant de reconnaître des antigènes endogènes et environnementaux. Dans un modèle murin d'asthme induit par les cellules NKT, la délétion d'EZH2 augmente l'hyperactivité des voies respiratoires, l'inflammation pulmonaire et la production de mucus (Tumes et al., 2019). De même, il a été montré que l'invalidation d'EZH2 dans les cellules endothéliales, augmente l'inflammation en activant la voie NFκB (Barroso et al., 2016).

1.2.5 Les déméthylases JMJD3 et UTX

H3K27me3 peut revenir à l'état hypométhylé par l'action des *demethylases Jumonji Domain Containing 3* (JMJD3) et *Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome* (UTX).

Les deux demethylases de H3K27me3 *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome protein* (UTX ou KDM6A) et *Jumonji D3* (JMJD3 or KDM6B) ont été découvertes en 2007 (Agger et al., 2007; De Santa et al., 2007; Arcipowski et al., 2016). UTX dont le gène est localisé sur le bras court du chromosome X (Xp11.3), est exprimé de manière ubiquitaire. Son promoteur contient des sites de liaison pour *Activator protein 1* (AP-1), *E2 factor* (E2F) 1-5, *Nuclear factor, interleukin 3 regulated* (NFIL3), *Spermatogenic Leucine Zipper 1* (Spz1) et *Yin Yang 1* (YY1). Le gène JMJD3 est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13.1). Son promoteur possède des séquences de liaison pour *erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1* (c-Ets-1), *hepatocyte nuclear factor 4alpha1* (HNF4alpha1), NF-kappaB, *NK2 Homeobox* (Nkx2-5) et *Olf Early B Cell Factor* (Olf-) 1.

JMJD3 est induite par des stimuli inflammatoires, viraux ou oncogéniques. UTX contient un domaine catalytique JmjC et 6 domaines *tetratricopeptide repeat* (TPR) impliqués dans les interactions protéines-protéines (figure 31). JMJD3 ne contient que le JmjC comme domaine caractéristique. JMJD3 et UTX ont des séquences amino-acidiques similaires à 84%. UTY est un paralogue d'UTX, son gène est

localisé dans le chromosome Y, et peut compenser dans certaines circonstances les activités non-catalytiques d'UTX (Shpargel et al., 2012a). En effet, UTY possède un domaine JmjC non fonctionnel (Shpargel et al., 2012a).

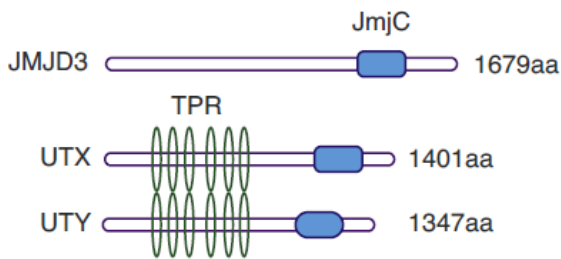


Figure 31 : Les déméthylases de H3K27me3.

JMJD3 et UTX sont les deux H3K27me3 déméthylases ayant une activité enzymatique. UTY est un paralogue d'UTX, il possède une activité quasi indétectable. JmjC: Jumonji C domain, TPR: tetratricopeptide repeats, PHD: plant homeodomain, aa: amino acids (Arcipowski et al., 2016).

L'action de JMJD3 et UTX est associée à l'activation transcriptionnelle. *In vitro*, UTX purifiée est inactive sur les histones, suggérant la nécessité de co-facteurs à son activité (Lan et al., 2007). L'activité de JMJD3 et UTX entraîne l'augmentation de H3K27me1 au niveau de leurs gènes cibles (figure 32). Actuellement, aucune étude n'a montré la capacité de JMJD3, d'UTX ou d'une autre enzyme à effacer la mono-méthylation de H3K27. Néanmoins, contrairement à H3K27me3, H3K27me1 est associée avec l'activation de la transcription (Barski et al., 2007).



Figure 32 : Méthylation et déméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27).

(A) La sous unité EZH2 de PRC2 catalyse la mono, di, et triméthylation de H3K27. UTX et JMJD3 sont des H3K27 di et triméthyl déméthylases. (Swigut and Wysocka, 2007).

Des études ont suggéré que JMJD3 et UTX occupent d'autres fonctions que celle de déméthyliser H3K27me3 (figure 33). Par exemple, elles jouent un rôle de protéines architecturales pour maintenir le complexe de remodelage de la chromatine *switch/sucrose non-fermentable* (Swi/Snf). UTX s'associe par ailleurs avec le complexe de remodelage *BRAHMA* (BRM), afin de faciliter l'acétylation des lysines (Tie et al., 2009). Au cours du développement, UTX occupe les promoteurs des gènes HOX et recrute le complexe *Polycomb repressive complex 1* (PRC1), entraînant l'ubiquitination de l'histone H2A (Agger et al., 2007). UTX stabilise d'autre part le complexe *mixed-lineage leukemia 3/4* (MLL3/4), impliqué dans la méthylation de H3K4 (Issaeva et al., 2007). JMJD3 est aussi impliquée dans l'élongation de la transcription en s'associant aux facteurs SPT6 et SPT16 (Horton et al., 2010).

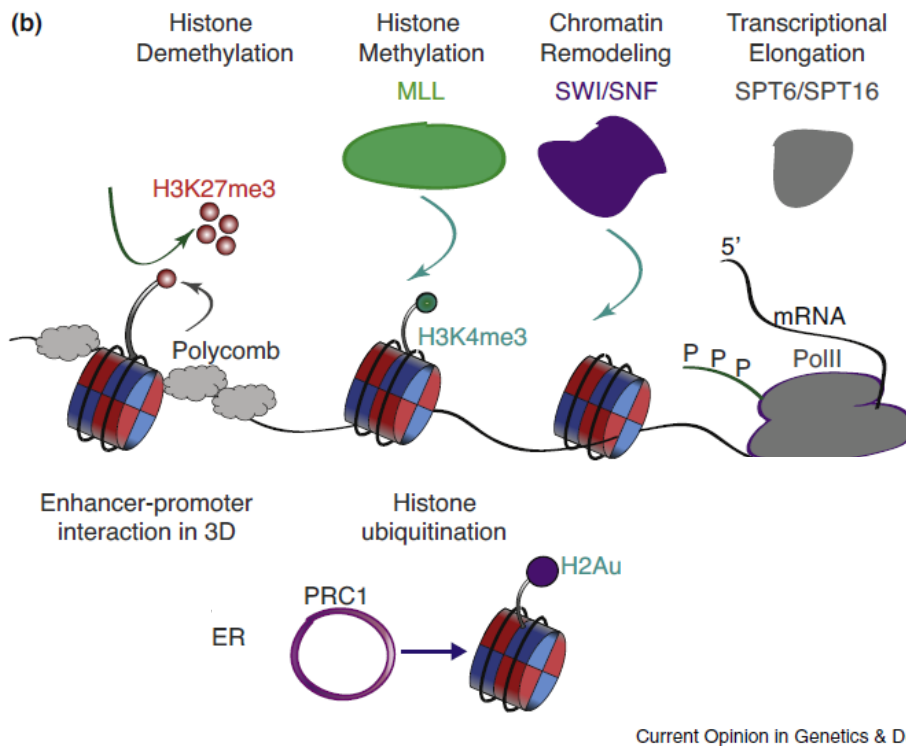


Figure 33 : JMJD3 et UTX ne sont pas seulement des déméthylases.

Les déméthylases ont aussi d'autres activités affectant la méthylation des histones, le remodelage de la chromatine, l'élongation de la transcription et l'ubiquitination. MLL: mixed-lineage leukemia, SWI/SNF: switch/sucrose non-fermentable, AR: androgen receptor, PRC1: Polycomb repressor complex 1, TRIM26: tripartite motif (family) 26, PHF20: plant homeodomain factor 20. (Arcipowski et al., 2016).

1.2.5.1 JMJD3 et UTX sont impliquées dans plusieurs processus de différenciation et de développement

JMJD3 et UTX sont exprimées très précocement pendant l'embryogenèse. En effet, les ESCs ont la particularité de contenir au niveau des promoteurs des gènes du développement (gènes *HOX*), des régions chromatiques appelées « domaines bivalents », contenant à la fois H3K27me3 et H3K4me3. Lors de la différenciation des ESCs, les domaines bivalents perdent l'une des deux marques, selon l'engagement de la cellule vers une voie de différenciation (figure 34). L'élimination de H3K27me3 implique UTX, JMJD3 et la répression de la méthylase EZH2 (Swigut and Wysocka, 2007).

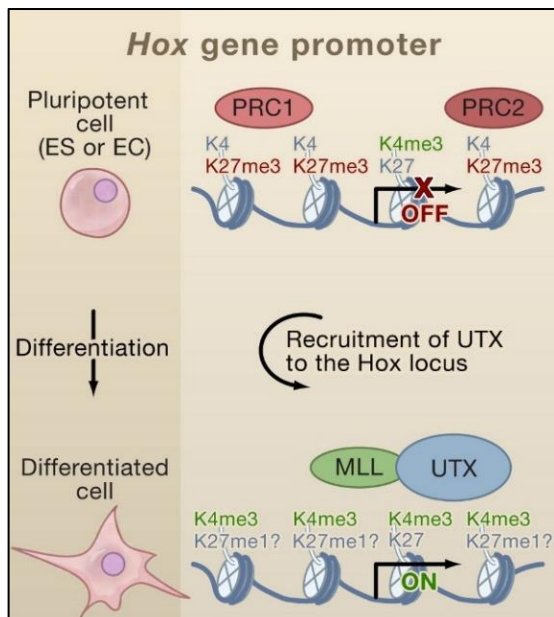


Figure 34 : Rôle de UTX dans la différenciation des ESCs.

UTX déméthyle les promoteurs des gènes HOX lors de la différenciation d'une cellule souche embryonnaire. De plus, UTX s'associe avec MLL qui entraîne la méthylation de H3K4. Abbreviations: ES, embryonic stem cell; EC, embryonic carcinoma cell; MLL, méthyltransferase mixed lineage leukaemia. (Swigut and Wysocka, 2007).

Les souris femelles déficientes en UTX meurent au stade embryonnaire E10-E11.5. Les mâles à l'inverse, naissent mais avec une taille significativement réduite (Shpargel et al., 2012b). Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'UTY chez les mâles, qui compenserait une partie des fonctions d'UTX. Les embryons invalidés pour JMJD3 meurent d'une déficience respiratoire à E18.5 (Shpargel et al., 2014).

Il a été montré que JMJD3 favorise la différenciation neuronale. En effet, l'inactivation de JMJD3 inhibe la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules souches neurales, en réduisant l'expression de facteurs de transcription neurogènes tels que *Paired box protein* (Pax1) et SOX1 (Burgold et al., 2008). *Mammalian achaete scute homolog-1* (Mash1) est un facteur de transcription de type hélice-tour-hélice, jouant un rôle important dans la neurogenèse. Lors de l'induction de la neurogenèse des cellules P19 induite par l'acide rétinoïque, JMJD3 déméthyle le promoteur de Mash1 activant son expression génique (Dai et al., 2010). Il a également été rapporté que l'inactivation de JMJD3, inhibe la différenciation épidermique et inhibe la cicatrisation de peau chez la souris (Shaw and Martin, 2009). UTX favorise la myogenèse des cellules C2C12 (myoblastes murins) en déméthylant les gènes Myogenin et Creatine Kinase, M-Type (CKm) (Seenundun et al., 2010).

Lors de l'activation des macrophages, JMJD3 permet d'activer la transcription du gène *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) en déméthylant H3K27me3 sur son locus (figure 35) (Swigut and Wysocka, 2007). Or, BMP-2 est un gène clé de la différenciation hypertrophique des chondrocytes, ce qui suggère que JMJD3 pourrait réguler également ce processus.

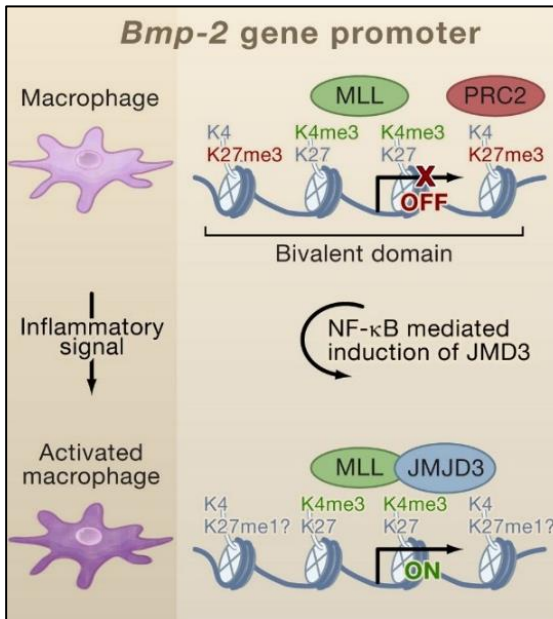


Figure 35 : Rôle de JMJD3 dans les processus inflammatoires.
 JMJD3 est induite lors de l'activation des macrophages par un stimulus inflammatoire via la voie nuclear factor-kappa B (NF-κB). JMJD3 stimule alors l'expression de Bmp-2 en déméthylant H3K27me3. De plus, JMJD3 s'associe avec méthyltransférase mixed lineage leukaemia (MLL) qui entraîne la méthylation de H3K4 (Swigut and Wysocka, 2007).

1.2.5.2 Antagonisme de JMJD3 et UTX dans les cancers

Lors de l'oncogénèse, UTX et JMJD3 pourraient avoir des actions antagonistes. Des études de perte de fonction ont montré qu'UTX agirait comme un gène suppresseur de tumeur dans les cancers solides et les leucémies (figure 36) (Van der Meulen et al., 2014, 2015).

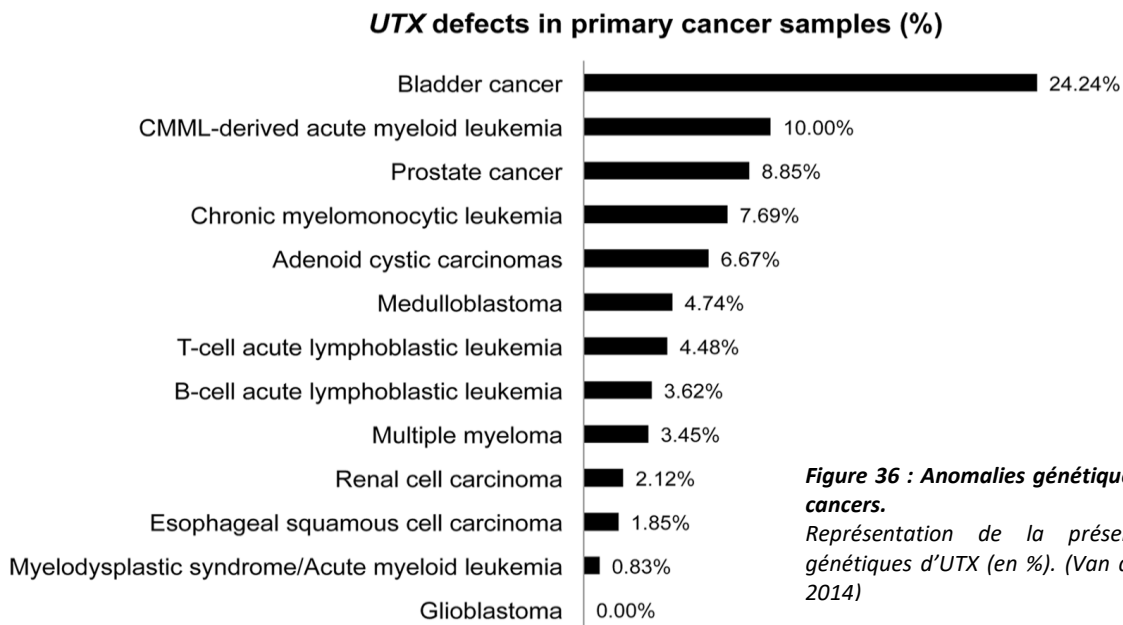


Figure 36 : Anomalies génétiques d'UTX dans les cancers.
 Représentation de la présence d'anomalies génétiques d'UTX (en %). (Van der Meulen et al., 2014)

A l'inverse, JMJD3 est décrite comme un oncogène. Il promeut notamment l'oncogenèse en activant le récepteur Notch1. La partie intracellulaire de Notch1 est transloquée dans le noyau, où elle promeut l'expression des gènes de la prolifération et de la survie cellulaire (Arcipowski et al., 2016). De manière intéressante, dans les leucémies lymphoïdes aiguës de type T, EZH2 agit comme un gène suppresseur de tumeur en inhibant l'expression de Notch1 (Ntziachristos et al., 2012).

1.2.6 Modifications épigénétiques au cours de la chondrogenèse

1.2.6.1 Méthylation de l'ADN au cours de la chondrogenèse

Les sites CpG du promoteur de COL10A1 sont déméthylés au cours de la différenciation chondrogénique des MSC (Zimmermann et al., 2008). Récemment, des études utilisant des souris génétiquement modifiées, ont montré que la DNMT3B était un facteur épigénétique crucial lors de la différenciation chondrogénique, de l'homéostasie du cartilage et de la différenciation hypertrophique (Shen et al., 2017; Wang et al., 2018; Xu et al., 2018). Par ailleurs, le prétraitement des MSC avec le 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), un agent déméthylant, favorise la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans les cultures d'embryons de poussin (Haq, 2016). Concernant la déméthylation, il a été rapporté que le niveau global de 5hmC augmente lors de la chondrogenèse *in vitro* et *in vivo*. La 5hmC a été observée sur les gènes de SOX5, 6 et 9 ainsi que COL2A1 (Taylor et al., 2016). La cinétique d'expression des TET1, 2 et 3 suit un même profil au cours de la chondrogenèse, avec une augmentation lors des stades précoces, suivie par une diminution lors des stades plus tardifs. D'autre part, l'inactivation de TET1 au cours de la chondrogenèse a pour conséquence de diminuer le taux de 5hmC et de perturber la chondrogenèse (Taylor et al., 2016).

1.2.6.2 Les ARN non codants au cours de la chondrogenèse

1.2.6.2.1 Les miRNA

La délétion de DICER au cours de l'embryogenèse inhibe la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance et accélère leur différenciation hypertrophique, entraînant un retard de croissance squelettique sévère (Kobayashi et al., 2008). De plus, *in vitro* le *knockdown* de DICER inhibe la chondrogenèse, montrant un rôle important joué par la machinerie des miRNA lors de la différenciation chondrogénique (Barter et al., 2015). L'analyse des miRNA par microarray a montré que les miR-193b, miR-199a-3p/hsa-miR-199b-3p, miR-455-3p, miR-381, miR-92a, miR-320c, et miR-136 miR-23b, miR-140, miR-181 et miR-210 sont augmentés au cours de la différenciation des MSC en

chondrocytes alors que miR-490-5p, miR-4287, miR-BART8, et miR-US25-1 sont en revanche inhibés (Zhang et al., 2012b; Gabler et al., 2015). Le rôle de la plupart de ces miRNA est méconnu. Cependant plusieurs études ont montré le rôle important de miR-140.

Les souris déficientes pour miR-140 présentent une anomalie de croissance des os longs et une différenciation hypertrophique précoce (Papaioannou et al., 2015). MiR-140 cible p38 de la voie de signalisation des MAPK, ce qui promeut l'activité et l'expression de (MEF2C) *mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide C*, qui est impliqué dans le contrôle de l'hypertrophie et le développement osseux (Papaioannou et al., 2015; Zhou et al., 2015). De plus, il a été montré que miR-140 augmente l'expression de SOX9 et COL2A1 au cours de la différenciation chondrogénique des MSC (Miyaki et al., 2009). MiR-140 favoriserait la chondrogenèse en activant la signalisation WNT (Barter et al., 2015). D'autre part, l'expression de ce miRNA diminue de manière cohérente lors de la dédifférenciation et est rétablie lors de la re-différenciation en culture 3D (Hong and Reddi, 2013). MiR-574-3p, dont le promoteur est régulé par SOX9, est impliqué dans l'orientation des MSC vers la différenciation chondrogénique (Guérit et al., 2013). A l'inverse, d'autres miRNA tels que miR-495 et miR-194 ciblent directement l'ARNm de SOX9 et SOX5, inhibant ainsi la différenciation chondrogénique des MSC (Xu et al., 2012a; Lee et al., 2014). Par ailleurs, la diminution d'expression de miR-221, induit une augmentation des marqueurs chondrogéniques COL2A1 et SOX9 (Lolli et al., 2014). De manière cohérente, l'inhibition de miR-221 favorise la différenciation chondrogénique des MSC *in vitro* ainsi que la réparation du cartilage *in vivo* (Lolli et al., 2016).

1.2.6.2.2 Les LncRNA

Le lncRNA le plus connu pour son rôle dans le développement squelettique est HOTAIR. En effet, les souris invalidées montrent une malformation des os carpes et métacarpes (Li et al., 2013). Le lncRNA-HIT est exprimé dans le mésenchyme au niveau des membres chez l'embryon de souris, juste avant le développement du cartilage (Carlson et al., 2015). Le lncRNA-HIT s'associe aux gènes chondrogéniques et promeut leur expression en recrutant p100 et l'histone acétyltransférase CREB-protéine (CBP)(Carlson et al., 2015). Par ailleurs, le lncRNA DANCR de concert avec SOX4 favorise la différenciation chondrogénique des MSC, en stabilisant SMAD3 et l'ARNm de STAT3 (Barter et al., 2017). Le lncRNA ROCR est induit durant la différenciation chondrogénique et joue un rôle important dans l'induction de l'expression de SOX9 (Barter et al., 2017). De manière similaire, le lncRNA UCA1 favorise la différenciation chondrogénique des MSC (Ishikawa et al., 2018). H19 est un autre lncRNA induisant la chondrogenèse en favorisant l'expression du collagène de type II par l'intermédiaire de miR-675 (Ishikawa et al., 2018) ;

1.2.6.3 Modification des histones

1.2.6.3.1 L'acétylation des histones

Il est difficile de connaître le rôle des HDAC lors des premières étapes de l'ossification enchondrale, car leur invalidation entraîne la mort précoce de l'embryon murin. Néanmoins, les HDAC2/4/5/6/8 et 9 ne semblent pas être impliquées dans la condensation des cellules mésenchymateuses puisque leur invalidation individuelle n'affecte pas le déroulement de l'ossification enchondrale (Chang et al., 2004; Vega et al., 2004a; Trivedi et al., 2007). Toutefois, des phénomènes de redondance et de compensation doivent être pris en considération, comme c'est le cas des HDAC 5 et 9 dans le développement cardiaque (Chang et al., 2004). Le rôle des HDAC dans les étapes qui suivent la condensation des MSC est mieux connu. Lors de l'engagement des MSC vers la lignée chondrogénique, la HDAC1 s'associe avec Nkx3.2, l'un des facteurs de transcription répresseurs le plus important au cours de l'ossification enchondrale (Murtaugh et al., 2001; Zeng et al., 2002). HDAC1 et son homologue HDAC2 régulent ensuite l'expression des gènes spécifiques de la matrice, *i.e* agrécane, les collagène II et IX ainsi que COMP (Bradley et al., 2011). HDAC3 et 4 contrôlent l'hypertrophie des chondrocytes. HDAC3 est très exprimée dans les chondrocytes articulaires et les chondrocytes préhypertrophiques (Bradley et al., 2011). La délétion conditionnelle de HDAC3 dans les progéniteurs des chondrocytes diminue la taille de la plaque de croissance et de la zone de cartilage hypertrophique (Razidlo et al., 2010). Les chondrocytes invalidés pour HDAC3 rentrent en hypertrophie de manière précoce et montrent une expression importante de cytokines et de MMP ainsi qu'une réduction d'expression des gènes de la matrice extracellulaire (Bradley et al., 2013; Carpio and Westendorf, 2016). Les HDAC 3 et 4 contrôlent l'hypertrophie en interagissant avec les deux facteurs de transcription inducteurs de l'hypertrophie, à savoir RUNX2 et MEF2 ainsi que le répresseur ZPF521 (Vega et al., 2004a; Razidlo et al., 2010; Bradley et al., 2013). Cependant, contrairement à HDAC3, l'expression de HDAC4 est maintenue dans les chondrocytes hypertrophiques, et son invalidation chez la souris entraîne une ossification enchondrale prématurée (Vega et al., 2004a). En effet, la délétion de HDAC4 accélère l'hypertrophie des chondrocytes par augmentation d'expression de IHH, RUNX2 et le collagène X dans la plaque de croissance. D'autre part, le phénomène inverse est observé par la surexpression de HDAC4 qui retarde l'ossification enchondrale (Vega et al., 2004a). Il a été montré récemment que *mitogen-activated protein kinase p38* (p38 MAPK) entraîne la dégradation de HDAC4 par l'intermédiaire des caspases, ce qui provoque l'expression de RUNX2 et par conséquent la différenciation hypertrophique (Zhou et al., 2015). Par ailleurs, HDAC7 inhibe la prolifération des chondrocytes par inhibition de la voie WNT durant l'ossification enchondrale (Bradley et al., 2015). Les souris déficientes en SIRT1 ou 7 (*Seven sirtuin 1 ou 7*), une HDAC de classe III, exhibent un retard de croissance et de minéralisation des os, un cartilage

altéré et des malformations crânio-faciales (McBurney et al., 2003). Le cartilage des souris SIRT1 KO est caractérisé par une baisse d'expression de collagène de type II, d'agrécan ainsi que de glycosaminoglycanes (GAG) et à l'inverse une forte expression de MMP-13 (Gabay et al., 2013). De plus, SIRT1 promeut la survie des chondrocytes sous diverses situations de stress, montrant son importance dans le maintien de l'homéostasie du cartilage (Takayama et al., 2009; Gagarina et al., 2010; Dvir-Ginzberg et al., 2011; Oppenheimer et al., 2012; Gabay et al., 2013).

SIRT6, une autre HDAC de classe III, a été montrée comme très fortement exprimée dans les chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques au niveau de la plaque de croissance. Les souris KO pour SIRT6 présentent un retard de croissance à la naissance et une prolifération et hypertrophie des chondrocytes altérées (Piao et al., 2013).

A l'inverse de la désacétylation, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontrées que l'acétylation des histones favorise la différenciation du cartilage. La HAT p300 potentialise l'action de SOX9 sur la transcription en acétylant les gènes chondrogéniques (Allas et al., 2018).

1.2.6.3.2 La méthylation des histones

La méthylation des histones est très régulée durant l'ossification enchondrale, par de multiples méthyltransférases et déméthylases. En effet, la H3K9 méthyltransférases PRDM2 (*PR domain zinc finger protein 2*), SUV39H1,2 (*Suppressor of variegation 3-9, drosophila homolog of 1 and 2*), GLP (*G9a-like protein*) et ESET (*ERG-associated protein with SET domain*) sont exprimées dans les chondrocytes hypertrophiques et pré-hypertrophiques au cours du développement de la plaque de croissance. Ces profils d'expression chevauchent ceux de la méthylation de H3K9, en particulier H3K9me1 et H3K9me3 (Ideno et al., 2013). ESET est une histone méthyltransférase dont l'expression augmente de manière transitoire dans les chondrocytes pré-hypertrophiques. ESET contrôle la différenciation hypertrophique et la formation de la plaque de croissance ainsi que la différenciation chondrogénique (Lawson et al., 2013; Yang et al., 2013). La délétion conditionnelle d'ESET dans les cellules mésenchymateuses entraîne une accélération de l'hypertrophie des chondrocytes, se traduisant par une anomalie de croissance des os longs. Ce phénomène est associé avec une réduction significative d'expression d'IHH dans les chondrocytes pré-hypertrophiques. L'explication de ce phénotype résiderait sur le fait qu'ESET interagit physiquement avec RUNX2 et HDAC4 afin de réprimer l'expression des gènes cibles de RUNX2, par méthylation de H3K9 (Yang et al., 2013). A l'inverse, le facteur de transcription AIRB3b (*AT-rich interactive domain 5b*) facilite la différenciation en chondrocyte et promeut l'expression de gènes chondrogéniques, en recrutant la H3K9me2 déméthylase PHF2 (*PHD Finger Protein 2*) sur les gènes cibles de SOX9 (Hata et al., 2013).

DOT1L, une méthyltransférase agissant sur la lysine 79 de l'histone H3, joue également un rôle dans la chondrogenèse. L'inactivation de DOT1L a montré qu'elle était impliquée dans la différenciation chondrogénique par régulation de la voie WNT (Barter et al., 2015).

1.2.6.4 Rôle de H3K27me3 au cours de la chondrogenèse

La technique de CHIP combinée avec la méthode des puces à ADN (CHIP-on-chip), a révélé qu'au cours de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en chondrocytes, les niveaux de H3K27me3 sur le locus du facteur de transcription *Sox9* et des gènes matriciels *ACAN*, *COL9A2* diminuent, ce qui permet leur transcription (Herlofsen et al., 2013a). Cette étude confirme l'importance de la déméthylation de H3K27 pour le développement des chondrocytes.

La méthylation de H3K27 joue un rôle crucial dans la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes (figure 37). L'inactivation d'EZH2 dans le cartilage induit un sévère retard de croissance chez la souris, caractérisé par l'altération de la prolifération, due à l'augmentation d'expression de CDKN2a, et l'inhibition de l'hypertrophie causée par le blocage de la signalisation de *insulin-like growth factor* (IGF) par *IGF-binding proteins* (IGFBP) (Lui et al., 2016). L'augmentation d'expression de CDKN2a et IGFBP est liée à une diminution de H3K27me3 sur leur promoteur.

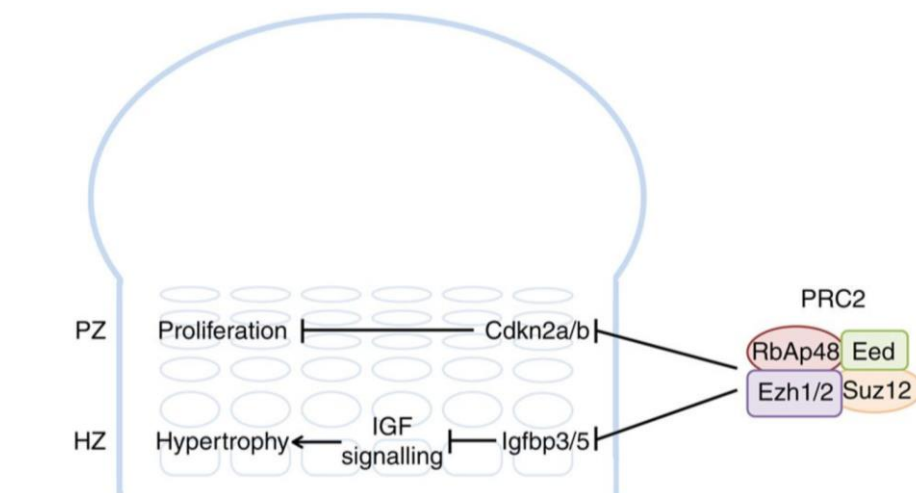


Figure 37 : EZH2 stimule la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes.

Dans la zone proliférative (PZ) EZH2 inhibe l'expression des inhibiteurs des cdk (*cdkn2a/b*), afin de permettre l'activation du cycle cellulaire. Dans la zone hypertrophique (HZ), EZH2 active l'expression d'IGF en inhibant l'expression d'*Igfbp3* et *5*, permettant la différenciation hypertrophique. (Lui et al., 2016).

D'autre part, l'inactivation conditionnelle d'EZH2 dans les chondrocytes dérivés des crêtes neurales (ectoderme), entraîne une malformation du cartilage crâniofacial (Schwarz et al., 2014). Une récente

étude a montré que l'inactivation d'EZH2 chez la souris réduit la densité osseuse et augmente l'expression des gènes ostéogéniques dans les chondrocytes (Camilleri et al., 2018).

Plusieurs études ont souligné l'importance des H3K27 déméthylases dans le développement des trois feuilletts embryonnaires, dont le mésoderme, notamment en favorisant la transcription des facteurs clés de la différenciation (Swigut *and* Wysocka, 2007). Le mésoderme produit une grande partie des tissus conjonctifs (dont le cartilage), des tissus musculaires et les cellules des lignées hématopoïétiques et mésenchymateuses. La délétion d'UTX conduit à une altération du développement mésodermique et à une mort précoce au cours de l'embryogenèse chez la souris (stade E10.5, embryons femelles). Ceci est dû au fait qu'UTX est capable de lier et d'activer le promoteur du gène *Brachyury*, le facteur de transcription initiant la formation du mésoderme (Wang et al., 2012a). D'autre part, l'expression de *Brachyury* n'est pas altérée chez les embryons mâles qui expriment UTY et chez les embryons qui ont subi une simple inactivation de leur site catalytique (Wang et al., 2012a). Ce résultat met en exergue les fonctions non-enzymatiques que possède UTX.

Les souris déficientes en JMJD3 montrent une réduction de prolifération et d'hypertrophie des chondrocytes ainsi qu'un retard de développement de la plaque de croissance. Cette déméthylase est très exprimée dans les chondrocytes pré-hypertrophiques au cours de l'ossification enchondrale. Des analyses génétiques et moléculaires ont montré que JMJD3 coopère avec RUNX2 afin de promouvoir la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes (figure 38). JMJD3 agit comme un coactivateur de RUNX2. Cette coopération a pour effet non seulement d'induire la déméthylation de H3K27 sur le promoteur de RUNX2 mais également de recruter RUNX2 sur le promoteur de JMJD3 (Zhang et al., 2015a). Par ailleurs, l'expression de JMJD3 augmente lors de la différenciation chondrogénique des MSC. De plus, l'incubation des MSC avec le GSK-J4 (inhibiteur d'UTX et JMJD3) pendant la chondrogenèse, inhibe la synthèse de matrice extracellulaire (Yapp et al., 2016).

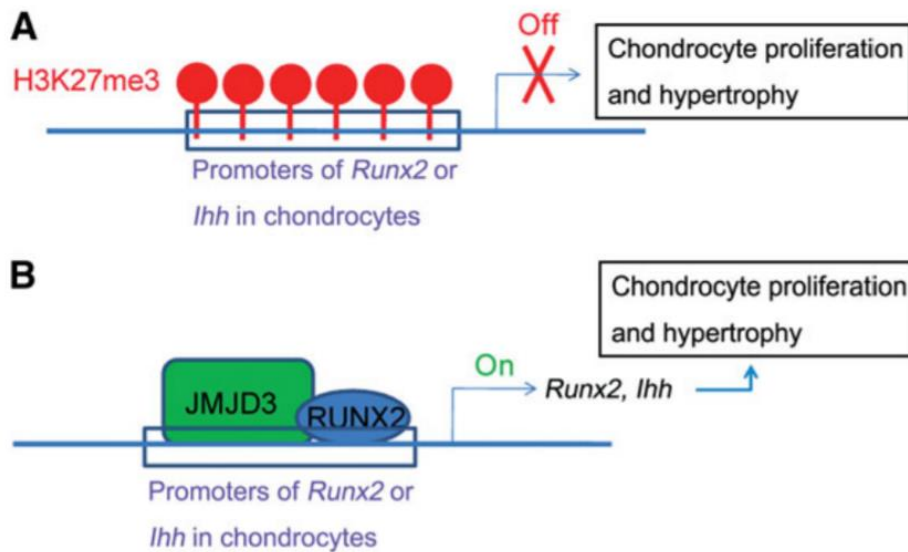


Figure 38 : JMJD3 stimule la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes.

(A) H3K27me3 maintient l'expression de Runx2 inhibée. JMJD3 efface H3K27me3, et facilite l'expression de Runx2 en le recrutant sur son promoteur. (Zhang et al., 2015a).

1.2.7 Dérégulation épigénétique au cours de l'arthrose

L'étude de la méthylation de l'ADN sur le génome humain a montré une hyperméthylation des gènes chondrogéniques et une hypométhylation des gènes pro-inflammatoires dans le cartilage arthrosique (Zhang et al., 2015c). Par ailleurs, des auteurs ont montré par pyroséquençage et *Chromatin ImmunoPrecipitation* (ChIP) que la répression du gène *COL9A1* (marqueur chondrogénique) est associée à une hyperméthylation dans les chondrocytes arthrosiques, qui induit une réduction de l'activité de liaison du facteur de transcription *SRY box 9* (Sox9) sur son promoteur (Roberts et al., 2015). Il a été montré que l'expression de la DNMT3 diminue au cours de l'arthrose temporo-mandibulaire. L'injection intra-articulaire d'un virus contenant la DNMT3 permet de réduire les lésions du cartilage dans un modèle d'arthrose chez le rat (Zhou et al., 2019b).

Le rôle des miRNA dans le maintien de l'homéostasie du cartilage et dans l'arthrose a récemment été suggéré. A titre d'exemple, l'IL-1 β inhibe l'expression des miR-602 et miR-608, entraînant une augmentation de l'expression des gènes hypertrophiques (*MMP13* et *COL10A1*) (figure 6) (Zhang et al., 2015c). En revanche, cette cytokine augmente l'expression de miR-9 ciblant l'ARNm de *monocyte chemo-attractant protein1-induced protein 1* (MCP1P1), un inhibiteur de l'IL-6 (Zhang et al., 2015c). Les

lncRNAs jouent également un rôle important au cours de l'arthrose. En effet, il a été montré que *cartilage injury-related lncRNAs* (lncRNA-CIR) favorise l'expression de MMP13 tout en inhibant l'expression de l'agrécan et du collagène de type II (Zhang et al., 2015c).

Plusieurs études ont mis en exergue, l'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC (HDACi) dans le traitement de l'arthrose. Ainsi, le traitement des synoviocytes arthrosiques avec des HDACi (SAHA et LBH589) augmente l'expression de miR-146a (inhibant l'inflammation) en favorisant l'acétylation de son promoteur (Zhang et al., 2015c). Un autre article a également rapporté que l'injection d'inhibiteurs de HDAC comme le Valproate et le MS-275, empêche la dégradation du cartilage dans un modèle murin d'arthrose (Zhang et al., 2015c).

Plusieurs études suggèrent que la méthylation des histones pourrait également jouer un rôle au cours de l'arthrose. L'un des mécanismes par lequel l'IL-1 β participe à l'établissement de l'inflammation dans l'arthrose est l'induction des enzymes *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) et *cyclooxygenase 2* (COX-2) (Roberts et al., 2015). Ces dernières entraînent la formation de molécules cytotoxiques. Des auteurs ont montré par ChIP que l'IL-1 β augmente la formation de H3K4me3 au niveau des gènes d'*iNOS* et de *COX-2*. De plus, l'inhibition de la H3K4 méthyltransferase *Su(var)3-9 and Enhancer of zeste 1A* (SET-1A) réduit l'expression d'iNOS et de COX-2, ainsi que la formation de H3K4me3 au niveau de leur promoteur respectif (Roberts et al., 2015).

De manière intéressante, la délétion de JMJD3 chez la souris accélère la survenue de l'arthrose et augmente les dommages causés au cartilage (Dai et al., 2017). D'autre part, le traitement des chondrocytes par le 3-Deazaneplanocin A (DZNep), un inhibiteur indirecte d'EZH2, réduit l'inflammation et la libération des MMPs induites par l'IL-1 β (Aury-Landas et al., 2017).

Par ailleurs, il a été décrit que l'expression de JMJD3 diminue au cours du vieillissement et que cela est associé à une inflammation (Tang et al., 2014). Un mécanisme similaire pourrait être mis en jeu au cours de l'arthrose, puisque cette pathologie est liée au vieillissement et à une inflammation aigue.

Une équipe a montré que l'inhibition d'EZH2 chez la souris, atténue la dégradation du cartilage et l'hypertrophie des chondrocytes dans un modèle expérimental d'arthrose (Chen et al., 2016a).

2 Objectif

Les traitements actuels de l'arthrose ont une efficacité modeste sur la réduction de la douleur et des poussées inflammatoires. La chirurgie reste l'option la plus efficace aux stades avancés de la maladie. Cependant cette dernière est invasive pour les patients, très onéreuse (11 960 euros par malade en comptant la chirurgie, l'hospitalisation et la rééducation) et a un risque infectieux. Les stratégies d'ingénierie tissulaire sont prometteuses mais ne permettent toujours pas d'obtenir un cartilage d'une qualité suffisante. Des études suggèrent que la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 pourrait être impliquée dans le cartilage. JMJD3 favorise la chondrogenèse au cours de l'ossification enchondrale, il serait donc pertinent d'étudier son effet *in vitro* et son intérêt en ingénierie tissulaire. Par ailleurs, une étude antérieure du laboratoire a montré que le DZNep (premier inhibiteur décrit d'EZH2), réduit l'inflammation des chondrocytes. Néanmoins, il est important de confirmer ces résultats en utilisant un autre inhibiteur, car le DZNep agit de manière indirecte sur EZH2 et est peu spécifique. De plus, le rôle d'EZH2 doit être évalué par histologie et par études comportementales dans un modèle d'arthrose *in vivo*.

Mes travaux de thèse ont pour objectif principal d'étudier le rôle et la régulation de H3K27me3 au cours de l'arthrose et de la chondrogenèse. Le travail a été divisé en deux parties.

Tout d'abord, j'ai étudié le rôle d'EZH2 dans le processus arthrosique. L'évaluation du rôle d'EZH2 a été effectuée *in vitro*, sur un modèle d'inflammation/catabolisme des chondrocytes (cellules traitées par IL-1 β) et d'hypertrophie (cellules traitées par le TGF- β 1). Les chondrocytes sont établis à partir de têtes fémorales humaines. Le modèle d'hypertrophie a dans un premier temps été mis au point. Dans les deux modèles, l'impact d'EZH2 a été étudiée par inhibition enzymatique en utilisant l'EPZ-6438 (Tazemetostat), par répression génique en utilisant des siRNA et par surexpression. Après les traitements par l'IL-1 β ou le TGF- β 1, les marqueurs de l'inflammation (PGE2, IL-6) et du catabolisme (MMP 1, 3 et 13) ou d'hypertrophie (RUNX2, VEGF, COL10A1 et MMP 13) ont été respectivement évalués. *In vivo*, EZH2 a été étudiée dans un modèle d'arthrose (ménisectomie) chez la souris. L'EPZ-6438 a été injecté trois fois (1 semaine post-op, 2 semaines post-op et 4 semaines post-op). Durant, l'étude les souris ont été passées sur différents appareils d'analyse de douleur et de motricité (Von Frey, incapacitance statique, roue complexe, actimétrie et cat-walk). Après 8 semaines les souris ont été euthanasiées et des analyses immuno-histologiques ont été effectuées sur les articulations.

La deuxième partie du projet été d'étudier le rôle de JMJD3 et UTX au cours de la chondrogenèse. Dans un premier temps, un modèle de chondrogène a été développé *in vitro*, en utilisant des cellules

souches mésenchymateuses (MSC) issues de moelle osseuse, cultivées sept jours dans un milieu chondrogénique en normoxie et en présence de TGF- β 3. Le rôle de JMJD3 et UTX dans ce modèle a été étudié par inhibition par siRNA et en utilisant le GSK-J4 (inhibiteur enzymatique) et par surexpression. Les marqueurs chondrogéniques (SOX5, 6 et 9, COL2A1, ACAN), ont permis d'apprécier l'effet des déméthylases sur la différenciation des MSC. Enfin, l'intérêt des déméthylases en ingénierie du cartilage a été évalué, en implantant après chondrogenèse, des billes d'alginate contenant des cellules surexprimant UTX et JMJD3.

3 Résultats

3.1 Rôle d'EZH2 dans l'hypertrophie, catabolisme et l'inflammation

Dans une première partie de mon travail de thèse, je me suis intéressé à la régulation de H3K27me3 au cours du processus arthrosique.

3.1.1 L'inhibition d'EZH2 atténue l'inflammation et la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose

L'inflammation au cours de l'arthrose est l'un des processus pathologiques les plus destructeurs. C'est également une des cibles privilégiées des traitements actuels et en développement. Nous avons montré dans un précédent article que le DZNep, un inhibiteur de méthylases décrit initialement comme inhibiteur d'EZH2, réduit l'inflammation dans les chondrocytes traités par l'IL-1 β (Aury-Landas et al., 2017). Cependant, du fait de son action indirecte et peu spécifique, l'implication d'EZH2 doit être confortée par des analyses supplémentaires. C'est pourquoi, notre étude vise à étudier le rôle d'EZH2 par différentes stratégies en la surexprimant et en utilisant un autre inhibiteur pharmacologique (EPZ-6438), qui possède une meilleure spécificité contre EZH2 et qui est actuellement utilisé en essai clinique pour le traitement des cancers.

En partenariat avec Quitterie Rochoux (M2R) nous avons étudié l'effet de l'EPZ-6438 dans les chondrocytes *in vitro*, sur les marqueurs d'inflammation en analysant l'expression de PGE2 et de l'IL-6, et sur le catabolisme en étudiant l'expression et la libération des MMP-1,-3 et -13. Par ailleurs, nous avons analysé l'impact de l'EPZ-6438 sur la dégradation du cartilage en culture d'explants. Nous avons également étudié avec l'aide d'Ophélie Grard (M2R que j'ai encadré), l'effet de la surexpression d'EZH2 dans les chondrocytes traités par l'IL-1 β . Enfin, le traitement d'EPZ-6438 a également été évalué sur un modèle d'arthrose de souris (ménisectomie). J'ai été formé à ce modèle dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Hang Korng EA (Inserm Bioscar U1132, Paris). Je me suis chargé d'opérer les souris ainsi que de couper les échantillons et d'analyser les coupes histologiques. Jules Ribet (M2R) s'est chargé d'effectuer les études comportementales en collaboration avec Véronique Agin et Cléo Dujarrier (PhIND - INSERM UMR-S 1237, Caen).

Nos résultats montrent que l'EPZ-6438 atténue l'inflammation en contrecarrant l'expression de l'IL-6 et la libération de PGE2. De plus, nous avons montré que l'EPZ6438 réduit l'expression et la libération des MMP-1, 3, et 13. Il inhibe d'autre part la dégradation d'explants de cartilage induite par l'IL-1 β . EPZ-6438 atténue également la dégradation du cartilage et le handicap locomoteur dans un modèle expérimental d'arthrose chez la souris.

EZH2 inhibition attenuates cartilage degradation and disability during osteoarthritis

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most widespread rheumatological disease worldwide and one of the main causes of pain and disability. We previously demonstrated that EZH2 inhibition by DZNep inhibits inflammation in chondrocytes treated by IL-1 β . However, due to the indirect action of DZNep, further studies are required to confirm the role of EZH2 in OA process. In this study, we aimed to evaluate the impact of EZH2 inhibition on cartilage degradation, inflammation and disability.

Human articular chondrocytes (HAC) and cartilage explants were cultured from femoral head dissection and treated with IL-1 β and/or EPZ-6438, an inhibitor of EZH2, for 48h and 7 days respectively. MMP1, 3 and 13 as well EZH2, NGF, PGE2, and IL-6 expression was evaluated by RT-PCR, western blot and/or ELISA. Cartilage explants were slide and stained with safranin-O. EPZ-6438 was injected in OA-mice model and behavioral studies on motricity as well as knee histology were performed.

We found that EZH2 overexpression enhances IL-1 β -induced catabolism by inducing MMPs release, and inflammation by inducing PGE2 release as well as IL-6 expression, in chondrocytes. We showed consistently that EPZ-6438 reduces HAC inflammation and catabolism, and attenuates IL-1 β -induced matrix degradation in cartilage explants. Finally, we showed that EPZ-6438 intra-articular injections reduce cartilage damages and ameliorates disability by increasing OA mice motricity.

To conclude, EZH2 induces chondrocyte inflammation as well as catabolism and OA-induced disability.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most widespread rheumatological disease worldwide and one of the main causes of pain and disability, impacting both patient's quality of life and healthcare expenses¹. OA physiopathology is complex and may be influenced by multiple factors. It is characterized by

subchondral and cartilage erosion, synovitis and neuropathic pain. During osteoarthritis, abnormal biochemical factors (inflammatory cytokines, oxidative stress) and/or biomechanical factors (joint injuries, overweight) alter chondrocytes metabolism into pro-catabolism cells².

Interleukin-1 beta (IL-1 β) is considered as one of the key cytokines involved in the pathogenesis of OA³. IL-1 β concentration is highly elevated in OA patient synovium². On one hand, it exacerbates inflammation by inducing the release of other cytokines (*e.g.* IL-6), prostaglandin E2 (PGE2) and nitric oxide (NO). On the other hand, IL-1 β alters cartilage integrity by decreasing anabolism and increasing catabolism. Indeed, IL-1 β reduces expression of aggrecan and type II collagen, which are major cartilage components, and induces their degradation by increasing matrix metalloproteinases (MMP) 1, 3 and 13 expression and release^{4,5}. Furthermore, IL-1 β in conjunction with other inflammatory cytokines contributes to pain sensitization (allodynia and hyperalgesia) that subsequently augments chronic pain. For all these reasons, chondrocyte treatment with IL-1 β is routinely used as an *in vitro* model to mimic the inflammation process of OA⁶.

Pain is the most disabling symptom of OA⁷. Nerve growth factor (NGF) is involved in persistent pain states, especially associated with inflammation⁷⁻⁹. NGF is released by cells when tissues are damaged and causes pain by binding to Tropomyosin receptor kinase A (TrkA) on nociceptors and inflammatory cells, leading to transmission of pain signals⁷. Many current standard therapies give modest quality of life improvement and do not address cartilage degradation and other underlying mechanisms, this is why finding a new therapy becomes urgent⁷.

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is the histone methyl transferase that catalyzes the trimethylation of the lysine 27 of the histone H3 (H3K27me3)¹⁰. It has been shown that EZH2 expression is increased in OA-patients cartilage and in IL-1 β treated chondrocytes¹¹. Furthermore, we also demonstrated that DZNep, a histone methylases inhibitor, reduces inflammation and catabolism in chondrocytes⁵. In addition, we and others have shown that EZH2 inhibition reduces chondrocytes hypertrophy, a process responsible for osteophytes formation^{11,12}. EZH2 is therefore a relevant target for OA treatment.

In this study, we aimed to evaluate *in vitro* and *in vivo* the role of EZH2 on chondrocyte metabolism by using EPZ6438 (tazemetostat), a direct inhibitor of EZH2 used on current clinical trials (phase I and II) for cancer treatments¹⁰ and by EZH2 overexpression. Moreover, we investigated the effect of EPZ6438 on pain and cartilage degradation using osteoarthritis mice model. We demonstrated *in vitro* that EZH2 inhibition decreases inflammation and MMP expression in chondrocyte, and that it decreases *in vivo* cartilage degradation and disability in OA-mice.

Material and Methods

Reagents

IL-1 β (Merck, Loiret, France) was resuspended with PBS 1X to reach a concentration of 1 μ g/ml. EPZ-6438 (Selleckchem, Souffelweyersheim, France) was resuspended with DMSO to reach a concentration of 10mM. Oligonucleotides were supplied by Eurogentec.

Cell culture and treatments

Human OA cartilage was obtained from the femoral heads of 13 patients undergoing hip replacement surgery (ages 52–85 years; median 75 years). The experimental protocol was approved by local ethical committee, named “Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III” (agreement #A13-D46-VOL.19). Informed consent was obtained from all participants. They all signed agreement forms before the surgery, according to local legislation. Chondrocytes were obtained as previously described¹². Briefly, cells were released by cartilage digestion with type XIV pronase (2 mg/ml for 30 minutes; Merck) and type II collagenase (2 mg/ml for 15 hours; Thermofisher). The cells were then seeded at 4 x 10⁴ cells/cm² in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM Lonza Levallois-Perret France), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS Lonza), penicillin streptomycin (Lonza), 100 μ g/ml of erythromycin and then incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were treated at confluency.

EZH2 Nucleofection

Chondrocytes were harvested, centrifuged 10 minutes at 1500 RPM and resuspended with P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Solution supplemented with pEZH2 (Addgene #24230) or empty vector¹³. The mixtures of 4 million cells/8 μ g DNA, were added in a 1 cm² transfection cuvettes and were nucleoporated according to the ER-100 predefined program using 4D-Nucleofector™ X Unit. Following the electroporation, the cells were incubated in culture medium.

Prostaglandin E2 and metalloproteinase release assays

PGE2 and MMP 1, 3 and 13 release into conditioned media was quantified using commercially available enzyme immunoassay kit (R&D Biosystems). Absorbance was determined at 450 nm with a wavelength correction set at 540 nm (Multiskan GO spectrophotometer, Thermo Scientific, France).

RNA isolation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA was extracted with NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Hoerdet France) according to manufacturer's protocol. After extraction, RNA underwent a DNase treatment and were reverse transcribed into cDNA as previously described⁵. Briefly, reverse transcription was done in mixture composed of 1µg of RNA, 2.5 µM oligo dT, 500 µM dNTP, 1X First Strand Buffer, 10 U/µL of Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (M-MLV-RT, Invitrogen Courtaboeuf France). The reaction lasts 50 min at 37°C then 15 min at 70°C using a thermocycler (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad Les Ulis France). Amplification of the generated cDNA was performed by real-time PCR using Step One Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems Courtaboeuf France) with the following primers; RPL13A-F: GAGGTATGCTGCCCCACAAA, RPL13A-R: GTGGGATGCCGTCAAACAC; IL6-F: CACACAGACAGCCACTCACC; IL6-R: TTTCACCAGGCAAGTCTCCT; MMP1-F: GAAGCTGCTTACGAATTTGCCG; MMP1-R: CCAAAGGAGCTGTAGATGTCCT; MMP3-F: TAAAGACAGGCACTTTTGGCGC; MMP3-R: TTGGGTATCCAGCTCGTACCTC; MMP13-F: AAGGAGCATGGCGACTTCT; MMP13-R: TGGCCCAGGAGGAAAAGC; EZH2-F: ACGTCAGATGGTGCCAGCAATA; EZH2-R: CCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGA; NGF-F: AGCGCAGCGAGTTTTGG; NGF-R: AGAAAGCTGCTCCCTTGGA. The relative mRNA level was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. RPL13a was used as reference.

Protein extraction and western blotting

Cells were rinsed and then scraped into Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA lysis buffer) supplemented with phosphatase and protease inhibitors. The extracts (30 µg proteins) were subjected to fractionation by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). Western blotting performed as previously described¹². The following antibodies were used: EZH2 (D2C9) from cell signaling, β-actin (sc-47778), goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005) and goat antirabbit IgG-HRP (sc-516087) from Santa Cruz Biotechnology.

Nitric Oxide (NO) assay

Generation of NO was determined by measuring nitrite accumulation in culture supernatants using Griess reagent (1% sulphanilamide and 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride in 5% H₃PO₄, Merck). Samples and Griess reagent were mixed and incubated for 5 min. The absorption was estimated by a plate reader (Multiskan GO spectrophotometer, Thermo Scientific) at 540 nm. Sodium nitrite (NaNO₂, Merck) was used as positive control.

Cartilage explant culture and immunohistochemistry

Human femoral cartilage was collected with a 3 mm biopsy punch, washed with PBS 1X and cultured in DMEM with 10% FBS. After treatment, cartilage explants were embedded into an optimal cutting temperature (OCT) compound (Thermo Fisher) and sections with 10 µm thickness were prepared using a cryostat (CM3050 S, Leica). Sections were incubated 5 min with Fast-green (nonspecific staining) and 5 min Safranin-O to stain cartilage.

Animals

Animal experimental procedures were performed according to local legislation, and were approved by ethics committee (Comité d’Ethique Normandie en Matière d’Expérimentation Animale, agreement #16185) and authorized by the French Ministry of research.

The animals (n=23 mice) were provided by Janvier Labs and kept in the animal facility (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen, France) under controlled temperature and light conditions (temperature $23 \pm 2^\circ \text{C}$, 12 h reversed light-dark cycle). Animals had ad libitum access to food and water. Each animal was humanely handled throughout the experiment in accordance with internationally accepted ethical principles for laboratory animal use and care, and all efforts were made to minimize animal suffering. The experiment was performed on C57/Bl6 mice 10-week-old male (Janvier, France), placed 8/cage.

OA induction and treatment

Animals underwent destabilization of the medial meniscus (DMM) of the right knee as previously described¹⁴. Mice were anesthetized using 2% isoflurane and received a subcutaneous injection of buprenorphine (50µg/kg) 15 min before surgery. Knee skin and joint capsule were incised to exposed the articulation. After that, the medial collateral ligament was sectioned and quadriceps underwent a luxation. The medial meniscus was cut and removed from the tibial plateau. Three hours after surgery, mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (50µg/kg). Mice were then divided into 2 groups: injected with vehicle (n=9) and injected with EPZ-6438 (n=14). Each group received 3 intraarticular injections of 50µl EPZ-6438 or 50µl of vehicle (DMSO), (at week 1, 2 and 4 after surgery). Briefly, a 100µl syringe with a 36g needle was inserted without any resistance in the joint capsule by passing through the patella. 8 weeks after surgery, mice were anesthetized and euthanized using CO₂.

Locomotor activity

For behavioral tests, baseline was measured 3 days before the surgery. After that, measures were taken three days after surgery, treatments, and before euthanasia.

Spontaneous locomotor activity was measured by an automated actimetry system (Imetronic system, Pessac, France). Animals were placed under individual cages (33x21x18cm), and positioned in the actigraph, which registered with infrared beams mice straightening for 2 hours. The number of vertical movements was determined by breaks in movement-sensitive photobeams that were then converted into locomotor activity counts.

Spontaneous activity was also studied by the wheel of simple activity test (Imetronic). Animals were placed under individual cages containing a wheel. This test measures the period during which the mice walk or run in the wheel for 2 hours.

Knee immunohistology

Knees were embedded in OCT and sections with 10 µm thickness were prepared using a cryostat. Sections were incubated 5 min with Fast-green (nonspecific staining) the 5 min Safranin-O to stain cartilage. Mice knees histopathology was evaluated using the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring system. This scoring system was applied blindly to medial femoral condyle and tibial plateau. A score of 0 represents normal cartilage, 0.5 loss of PG with an intact surface, 1 superficial fibrillation without loss of cartilage, 2 vertical clefts and loss of surface lamina, 3 vertical clefts/erosion to the calcified layer lesion for 1–25% of the quadrant width, 4 lesion reaches the calcified cartilage for 25–50% of the quadrant width, 5 lesion reaches the calcified cartilage for 50–75% of the quadrant width and 6 lesion reaches the calcified cartilage for >75% of the quadrant width¹⁵. The cumulative score of tibial plateau and femoral condyle was used to score the entire articulation.

Statistical analysis

Statistical significance was determined by Student's t-test. P-values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

EZH2 enhances IL-1 β -mediated inflammation

We first wanted to evaluate the impact of EZH2 on IL-1 β -induced inflammation mediators by evaluating PGE2 release and IL-6 expression. We first confirmed the efficacy (82%) and viability (87%) of our transfection system and EZH2 plasmid to overexpress EZH2 in chondrocytes (figure 1). After 72 hours of transfection EZH2 expression was increased at both mRNA and protein levels. In addition, EZH2 overexpression enhanced IL-1 β -mediated release of PGE2 and expression of IL-6. These results suggest that EZH2 increases inflammation.

EZH2 enhances IL-1 β mediated MMPs release

We next studied the effect of EZH2 on IL-1 β -induced MMP 1, 3 and 13 expression. We observed that EZH2 overexpression enhanced MMP 1 and 13 mRNA level and protein release in chondrocytes (figure 2). However, we did not observe any significant changes regarding MMP3 expression or release.

EPZ-6438 reduces IL-1 β -induced inflammation

Since EZH2 increases inflammation markers and MMP expression, we hypothesized that its inhibition would decrease these processes in chondrocytes. Thus, we evaluated whether the pharmacological inhibition of EZH2, would have reduced IL-1 β mediated PGE2, IL-6 and NO induction. EPZ-6438 counteracted IL-1 β -induced PGE2, IL-6, and NO (figure 3), which suggests its putative relevance for OA treatment.

EPZ-6438 reduces IL-1 β -induced cartilage degradation

The effect of EPZ-6438 on catabolism was next evaluated on HAC and cartilage explants treated with IL-1 β . We showed that EPZ-6438 counteracted MMP 1, 3 and 13 mRNA expression and MMP13 released in the media (figure 4A, B). Moreover, EPZ-6438 treatment reduced cartilage-specific safranin-O staining and thus IL-1 β -induced cartilage degradation (figure 4C).

EPZ-6438 attenuates cartilage degradation in OA mice

After demonstrating that EPZ-6438 reduces cartilage degradation and inflammation *in vitro*, we investigated its therapeutic potential *in vivo* in OA-mice model (figure 5). EPZ-6438 were injected three times in the articulation after inducing DMM. We found that EPZ-6438 reduced OARSI score 8 weeks after surgery.

EPZ-6438 attenuates locomotor disability in OA mice

Finally, since EPZ-6438 reduced cartilage degradation and chondrocyte inflammation, we hypothesized that EZH2 could be involved in pain-induced disability in OA-mice. Therefore, we aimed to evaluate in DMM-mice, the effect of EPZ-6438 intra-articular injection on spontaneous locomotor activity. EPZ-6438 treated mice performed more straightening on average especially after the first injection compared to vehicle treated mice (figure 6A). Furthermore, EPZ-6438 mice had a longer running period than vehicle treated animals, especially after the second injection (figure 6B). These data showed that EPZ-6438 improves OA-mice locomotor activity.

Since NGF is involved in pain-induced disability in OA patients, we evaluated the role of EZH2 in NGF expression in IL-1 β -treated chondrocytes (figure 6C). We showed that IL-1 β increased NGF expression. We then consistently found that EZH2 expression enhanced IL-1 β -mediated NGF expression, while EPZ-6438 had the exact opposite effect.

Discussion

Herein, we demonstrated that EZH2 inhibition reduces chondrocytes inflammation as well as cartilage degradation and ameliorates OA-induced disability in mice.

During OA, chondrocytes inflammation causes MMPs release and cartilage degradation. The products of this degradation stimulate articular cells, which in return induce more inflammation¹⁶. Thus, it is critical to develop therapeutic strategies that target both inflammation and cartilage degradation in order to stop this vicious circle. We showed that EPZ-6438 reduces IL-1 β -mediated cartilage degradation by counteracting MMP 1, 3 and 13 release and inflammation by inhibiting IL-1 β -induced PGE2 and IL-6. These results are consolidated by EZH2 overexpression experiments. Indeed, EZH2 increases PGE2 and IL-6 expression and release of MMP1 and 13. The lack of effect on MMP3 could be due to the fact that IL-1 β already increased MMP3 to a maximum level. Our results are confirmed by previous data that we obtain with DZNep⁵. DZNep is the first generation of methyltransferase inhibitor

with a nonspecific activity, and in contrast to EPZ-6438, is not currently used in clinical trials. EPZ-6438 is thus a relevant candidate for targeting EZH2 in OA-patients. Coherently with our results, it was found that EZH2 is overexpressed in OA cartilage and in IL-1 β -treated chondrocytes¹¹. Consequently, EZH2 is positively regulated during osteoarthritis and inflammation processes. Our data is further confirmed by a study that found that EZH2 inhibition in chondrocyte by siRNA, reduces catabolism by contracting the expression of ADAMTS4 and 5 as well MMP13¹¹. Collectively, these findings emphasized the implication of EZH2 on catabolism processes in OA.

The mechanism by which EZH2 is involved in OA remain unclear. EZH2 mechanisms can be attributed to its connection with Wnt/ β -catenin pathway. Indeed, it has been demonstrated that EZH2 overexpression activates Wnt/ β -catenin signaling which is involved in inflammation and hypertrophy during OA^{17,11,18}. We recently shown that EZH2 inhibition reduces chondrocyte hypertrophy¹². In synovial fibroblasts obtain from rheumatoid arthritis patients, EZH2 represses the promoter of signaling inhibitor frizzled-related protein 1 (SFRP1), which is an inhibitor of Wnt pathway¹⁹. Hence, targeting EZH2 during OA, might reduce Wnt-mediated inflammation and hypertrophy.

The most efficient therapies for OA are those that improve patient's quality of life. Therefore, focus should also be made on the pain and disability that patients experience. Indeed, pain in OA patients, and especially in elderly people, causes social isolation and depression²⁰. We found for the first time, that chondrocytes treatment with EPZ-6438 reduces NGF expression in IL-1 β -treated chondrocytes, and OA-mice disability.

We found that EPZ-6438 intra-articular injection reduces long term cartilage degradation in DMM mice. Moreover, we demonstrated for the first time that EPZ-6438 reduces disability in OA mice by increasing their locomotor activity. The effect of EPZ-6438 tended to lessen after the three injections in both straightening and cumulative running duration. This suggests that more EPZ-6438 injections might be necessary to perpetuate its effect.

In accordance with our study, a similar result in OA mice cartilage degradation was found using a different EZH2 inhibitor (EPZ005687) and a different OA mouse model (anterior cruciate ligament transection)⁴. Interestingly, the knock-out of Jumonji Domain Containing 3 (JMJD3), a H3K27me3 demethylase in chondrocytes accelerates OA development in mice²¹. The data suggest that H3K27me3 demethylation is critical to cartilage homeostasis in preventing OA pathogenesis.

Pain therapy is complex and can sometimes exacerbates damages to cartilage. Indeed, it has been shown that NGF anti-body (tanezumab) intra-articular injection, reduces pain but also increases cartilage destruction in rat²². Thus, analgesia should be complemented by a cartilage protecting

treatment. EPZ-6438 has the advantage of having a dual effect by reducing both pain-induced disability and cartilage degradation.

In conclusion, we shown that EZH2 increases catabolism by enhancing MMPs induction and inflammation by inducing PGE2 and IL-6 chondrocytes. Treatment by EPZ-6438 *in vitro* and in OA-mice has proved to reduce cartilage degradation and disability. Targeting EZH2 is therefore a promising strategy to attenuates cartilage degradation, inflammation and pain-induced disability in OA patients.

Acknowledgements

This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-15-CE14-0002-01], Région Normandie, European Union [FEDER/FSE 2014-2020 – 16E00779/16P03685].

References

1. Beswick, A. D., Wylde, V., Gooberman-Hill, R., Blom, A. & Dieppe, P. What proportion of patients report long-term pain after total hip or knee replacement for osteoarthritis? A systematic review of prospective studies in unselected patients. *BMJ Open* **2**, e000435 (2012).
2. Glyn-Jones, S. *et al.* Osteoarthritis. *Lancet Lond. Engl.* **386**, 376–387 (2015).
3. Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A. & Szukiewicz, D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation* (2014). doi:10.1155/2014/561459
4. Chen, C. *et al.* Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **47**, 121–129 (2015).
5. Aury-Landas, J. *et al.* Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
6. Baugé, C. *et al.* Interleukin-1beta up-regulation of Smad7 via NF-kappaB activation in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **58**, 221–226 (2008).
7. Lane, N. E. & Corr, M. Osteoarthritis in 2016: Anti-NGF treatments for pain - two steps forward, one step back? *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 76–78 (2017).
8. Yu, X. *et al.* NGF increases FGF2 expression and promotes endothelial cell migration and tube formation through PI3K/Akt and ERK/MAPK pathways in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* (2018). doi:10.1016/j.joca.2018.12.007
9. Huang, J., Zhao, L. & Chen, D. Growth factor signalling in osteoarthritis. *Growth Factors Chur Switz.* 1–9 (2019). doi:10.1080/08977194.2018.1548444
10. Fioravanti, R., Stazi, G., Zwergel, C., Valente, S. & Mai, A. Six Years (2012-2018) of Researches on Catalytic EZH2 Inhibitors: The Boom of the 2-Pyridone Compounds. *Chem. Rec. N. Y. N* **18**, 1818–1832 (2018).

11. Chen, L. *et al.* The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/ β -catenin pathway. *Sci. Rep.* **6**, 29176 (2016).
12. Allas, L., Rochoux, Q., Leclercq, S., Boumédiene, K. & Baugé, C. Development of a simple osteoarthritis model useful to predict in vitro the anti-hypertrophic action of drugs. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* (2019). doi:10.1038/s41374-019-0303-0
13. Sengupta, D. *et al.* Quantitative Histone Mass Spectrometry Identifies Elevated Histone H3 Lysine 27 (Lys27) Trimethylation in Melanoma. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **15**, 765–775 (2016).
14. Kadri, A. *et al.* Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 2379–2386 (2008).
15. Glasson, S. S., Chambers, M. G., Berg, W. B. V. D. & Little, C. B. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, S17–S23 (2010).
16. Nepple, J. J., Thomason, K. M., An, T. W., Harris-Hayes, M. & Clohisy, J. C. What is the utility of biomarkers for assessing the pathophysiology of hip osteoarthritis? A systematic review. *Clin. Orthop.* **473**, 1683–1701 (2015).
17. Zhou, J. *et al.* Mitogen-activated protein kinase p38 induces HDAC4 degradation in hypertrophic chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 370–376 (2015).
18. De Santis, M. *et al.* The Role of Wnt Pathway in the Pathogenesis of OA and Its Potential Therapeutic Implications in the Field of Regenerative Medicine. *BioMed Research International* (2018). doi:10.1155/2018/7402947
19. Trenkmann, M. *et al.* Expression and function of EZH2 in synovial fibroblasts: epigenetic repression of the Wnt inhibitor SFRP1 in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1482–1488 (2011).
20. Smith, T. O., Dainty, J. R. & MacGregor, A. J. Changes in social isolation and loneliness following total hip and knee arthroplasty: longitudinal analysis of the English Longitudinal Study of Ageing (ELSA) cohort. *Osteoarthritis Cartilage* **25**, 1414–1419 (2017).
21. Dai, J. *et al.* Kdm6b regulates cartilage development and homeostasis through anabolic metabolism. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1295–1303 (2017).
22. LaBranche, T. P. *et al.* Nerve growth factor inhibition with tanezumab influences weight-bearing and subsequent cartilage damage in the rat medial meniscal tear model. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 295–302 (2017).

Figure legends

Figure 1: EZH2 increases inflammation.

Chondrocytes were transfected with pcDNA or pEZH2. After 24h, cells were treated with IL-1 β (1 ng/ml) for 48 h. (A) After treatment, RNA and proteins were extracted. mRNA relative expression of EZH2 was determined by real-time RT-PCR. (B) EZH2 protein expression was analyzed by western blot. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in IL1-1 β -treated cells (n=4). (C) Chondrocytes (P1) were transfected with pcDNA or pEZH2. After 24 hours cells were incubated with IL-1 β (1 ng/ml) for 48 h. RNA was extracted and medium collected. PGE2 release in medium was determined by ELISA assay. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *: p-value \leq 0.05. mRNA relative expression of IL-6 was determined by RT-PCR. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene or protein expression in IL1-1 β -treated cells (n=4). *: p-value \leq 0.05; **: p-value \leq 0.01.

Figure 2: EZH2 overexpression increases MMPs expression and release.

Chondrocytes were transfected with pcDNA or pEZH2. After 24h, cells were treated with IL-1 β (1 ng/ml) for 48 h. (A) mRNA relative expression of MMP-1, 3 and 13 was determined by RT-PCR. (B) MMPs release in medium was determined by ELISA assay. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene or protein expression in IL1-1 β -treated cells (n=4). *: p-value \leq 0.05; **: p-value \leq 0.01. MMP1, 3 and 13 release in medium was determined by ELISA assay. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *: p-value \leq 0.05.

Figure 3: EPZ-6438 attenuates IL-1 β -mediated inflammation.

Primary chondrocytes were treated with IL-1 β (1 ng/ml) and/or EPZ-6438 (10 μ M) for 48 h. PGE2 release in medium was determined by ELISA assay. mRNA relative expression of IL-6 was determined by RT-PCR. NO release was evaluated by Griess test. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in IL1-1 β -treated cells (n=4). *: p-value \leq 0.05; **: p-value \leq 0.01.

Figure 4: EPZ-6438 reduces IL-1 β -induced cartilage degradation.

Primary chondrocytes were treated with IL-1 β (1 ng/ml) in the presence or absence of EPZ-6438 (1 or 10 μ M) for 48 h. After treatment, RNA was extracted and medium collected. (A) mRNA relative expression was determined by real-time RT-PCR. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in IL-1 β -treated cells (n=4). *: p-value \leq 0.05; **: p-value \leq 0.01. (B) MMP13 release in

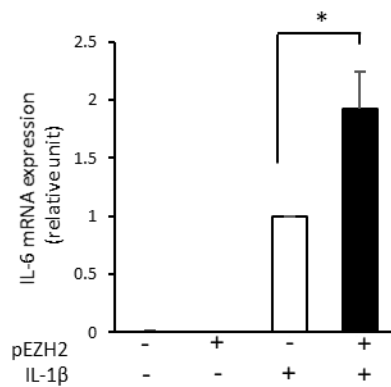
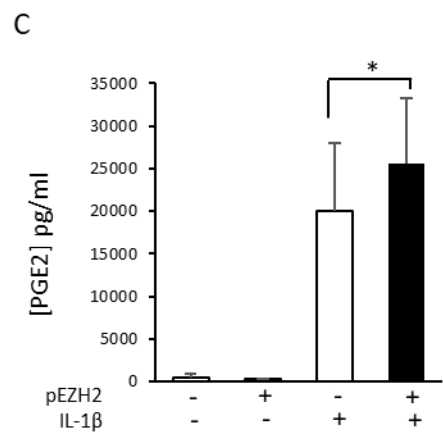
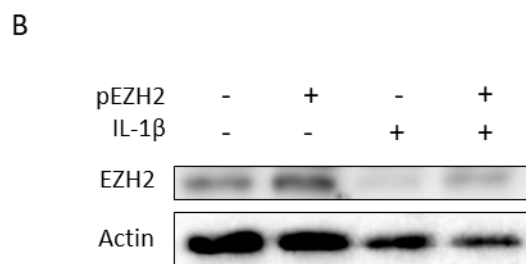
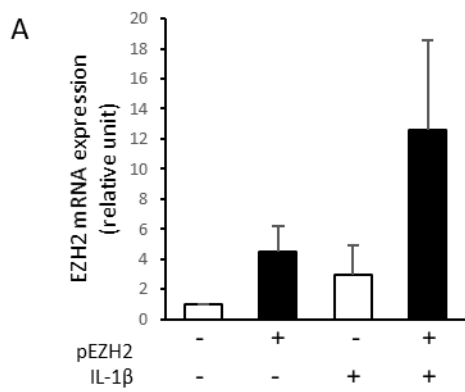
medium was determined by ELISA assay. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *: p-value \leq 0.05. **: p-value \leq 0.01. Primary chondrocytes were passed and transfected with EZH2, after 24h cells were incubated in the presence or absence of IL-1 β (1 ng/ml). (C) Human articular cartilage explants were cultivated for 7 days in the presence or absence of EPZ-6438 and/or IL-1 β . Explants were then sectioned and stain with safranin-O. Scale bare indicates 100 μ m.

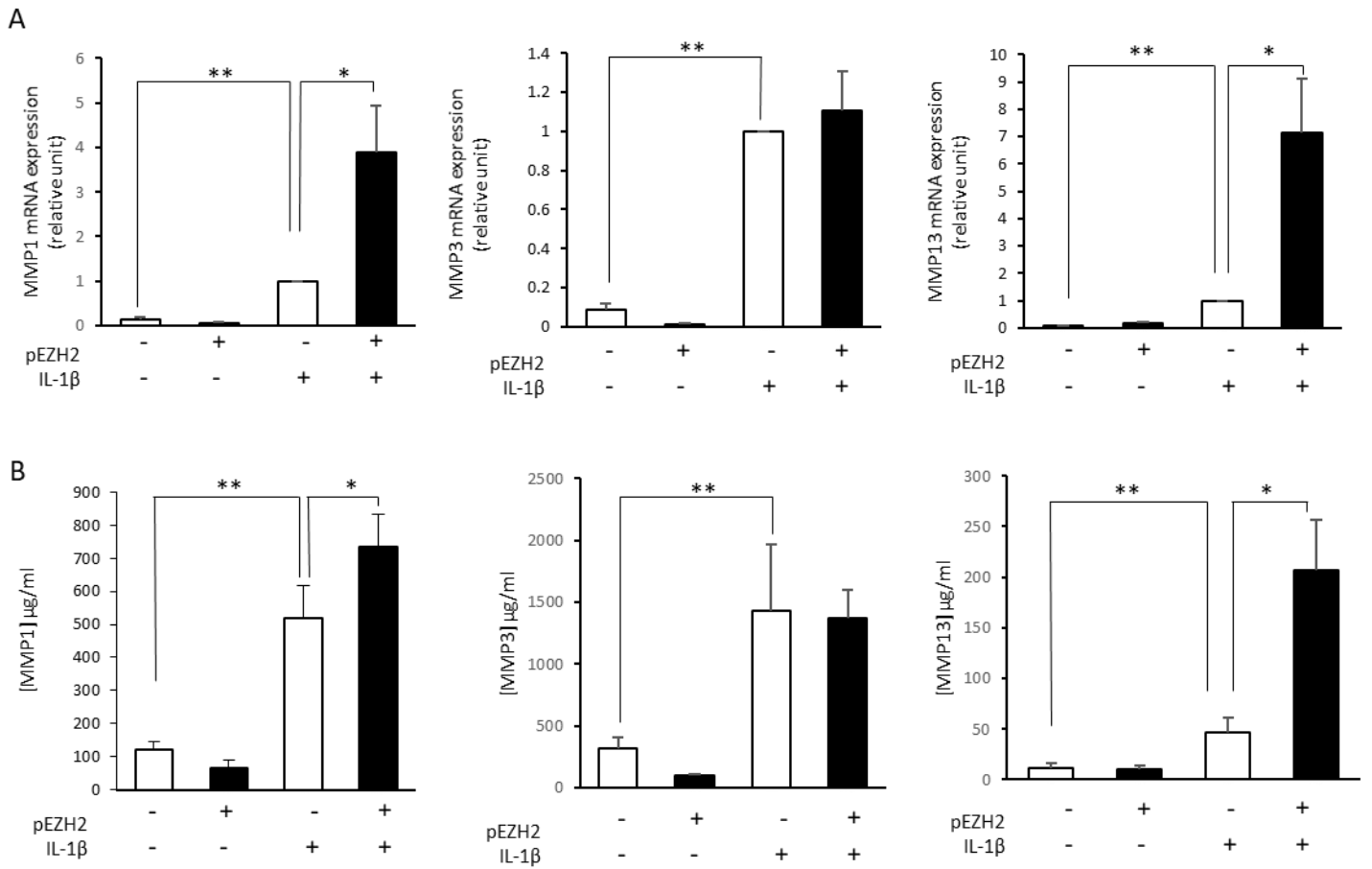
Figure 5: EPZ-6438 attenuates cartilage degradation in OA mice.

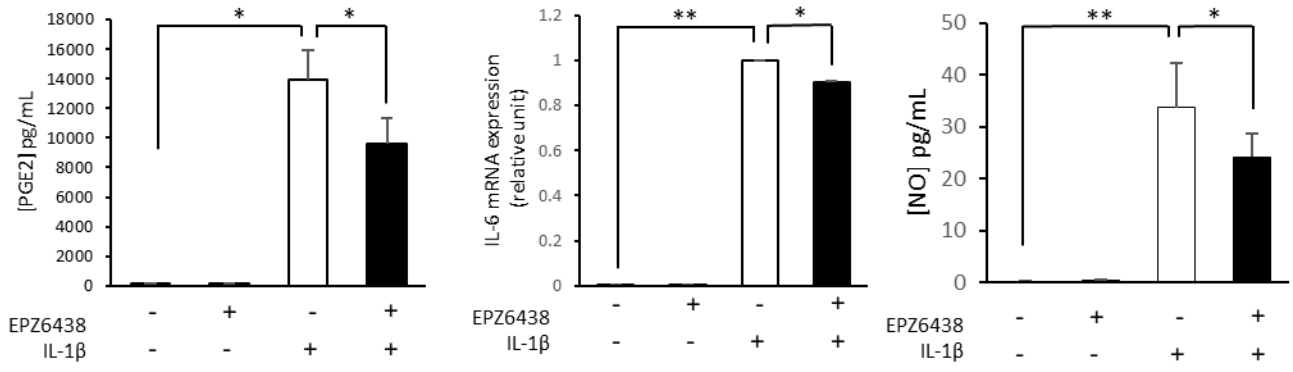
(A) Mice were anesthetized and underwent DMM surgery, and were injected with vehicle (n=9) or with EPZ-6438 (n=14). Each group received 3 times (at week 1, 2 and 4 after surgery) intraarticular injections of 50 μ l EPZ-6438 or 50 μ l of vehicle (DMSO). For each behavioral test (spontaneous locomotor activity and wheel of simple activity), the baseline was taken 3 days before the surgery. After that, measures were taken after surgery as well as EPZ-6438 injections and before euthanasia. (B) Histology of mice underwent sham or DMM surgery. (C) Knee sections were stained with safranin O/Fast green. Arrows point to cartilage damages. Scale bare represent 100 μ m. (D) Knee OARSI score. Data are expressed as means \pm SEM. *: p-value \leq 0.05

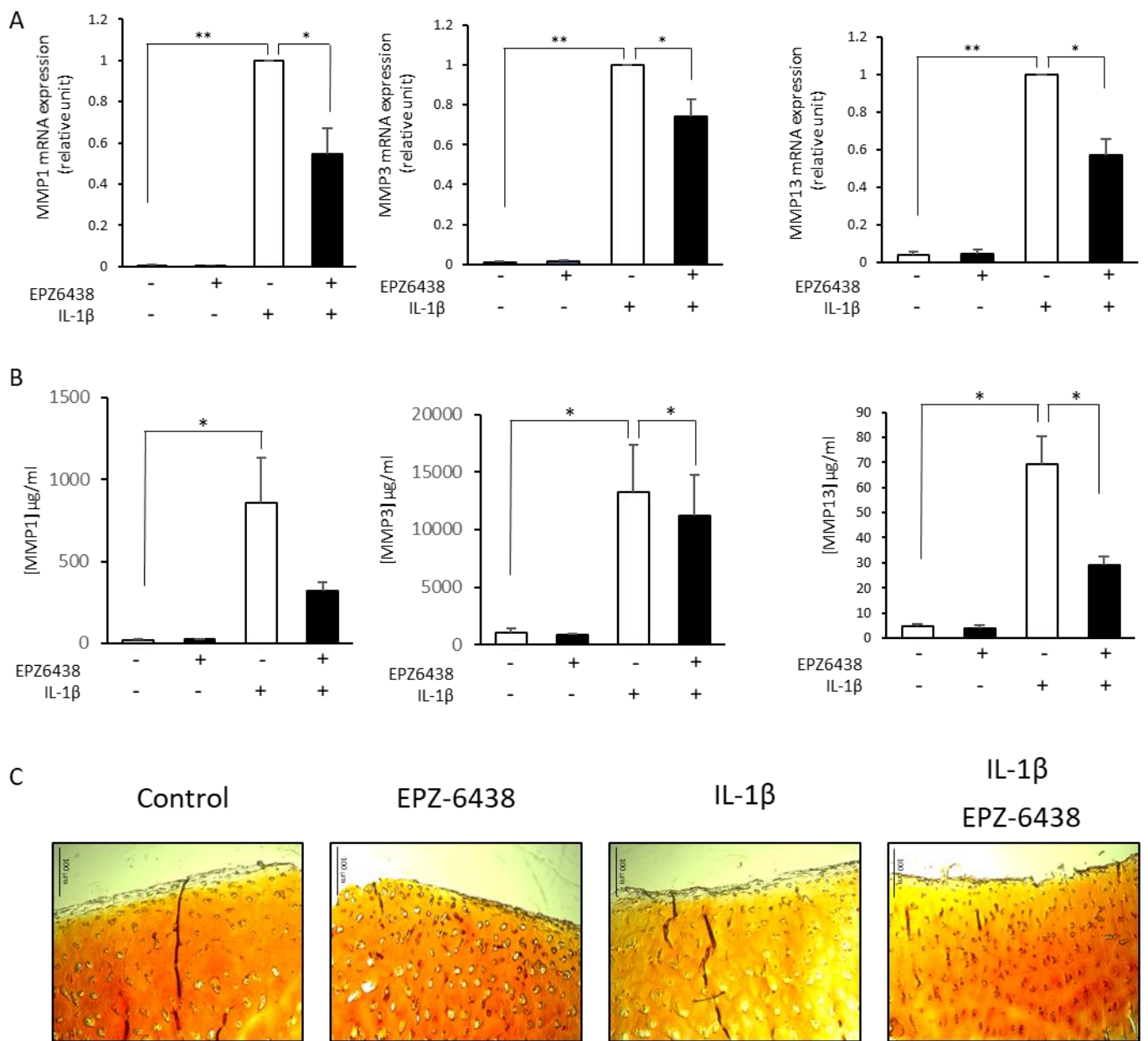
Figure 6: EPZ-6438 attenuates disability in OA mice.

(A) Spontaneous straightening. (B) cumulative running duration. Curves represent the mean value \pm SEM (n=23). *: p-value \leq 0.05. (C) EPZ-6438 reduces IL1-1 β -induced NGF expression. NGF mRNA relative expression was determined by real-time RT-PCR. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in IL-1 β -treated cells (n=4). *: p-value \leq 0.05; **: p-value \leq 0.01.



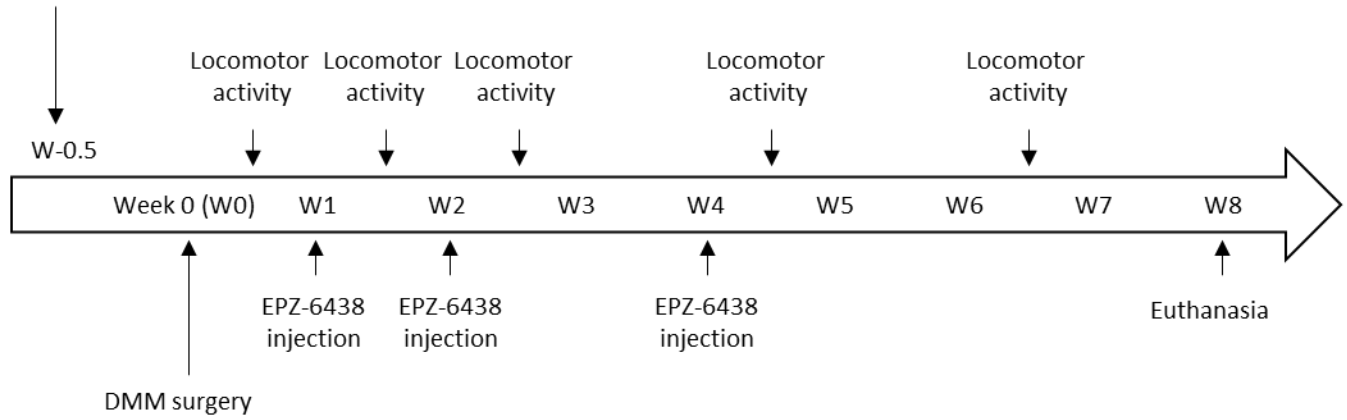




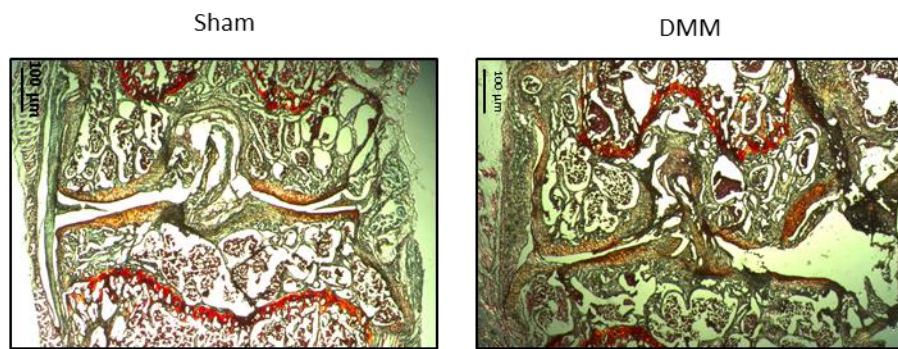


A

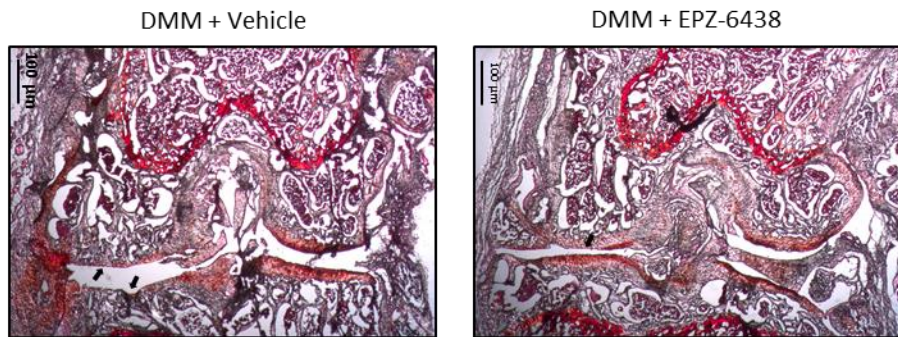
Spontaneous locomotor activity
Wheel of simple activity
Base line



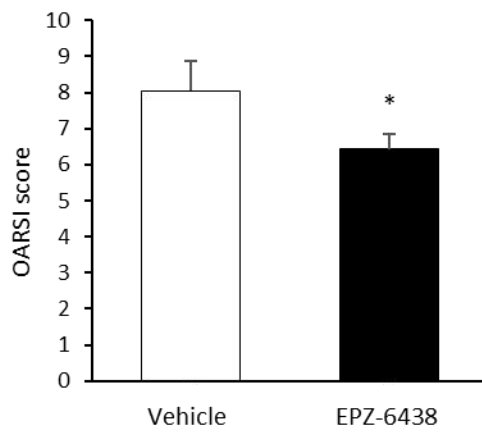
B

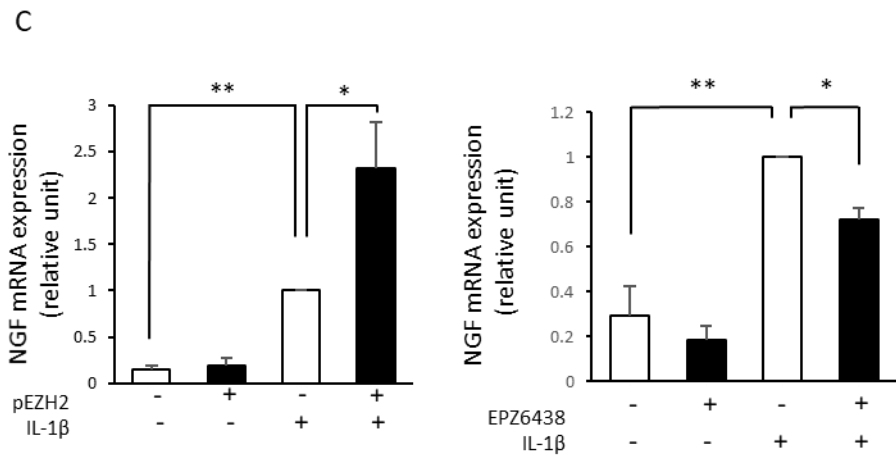
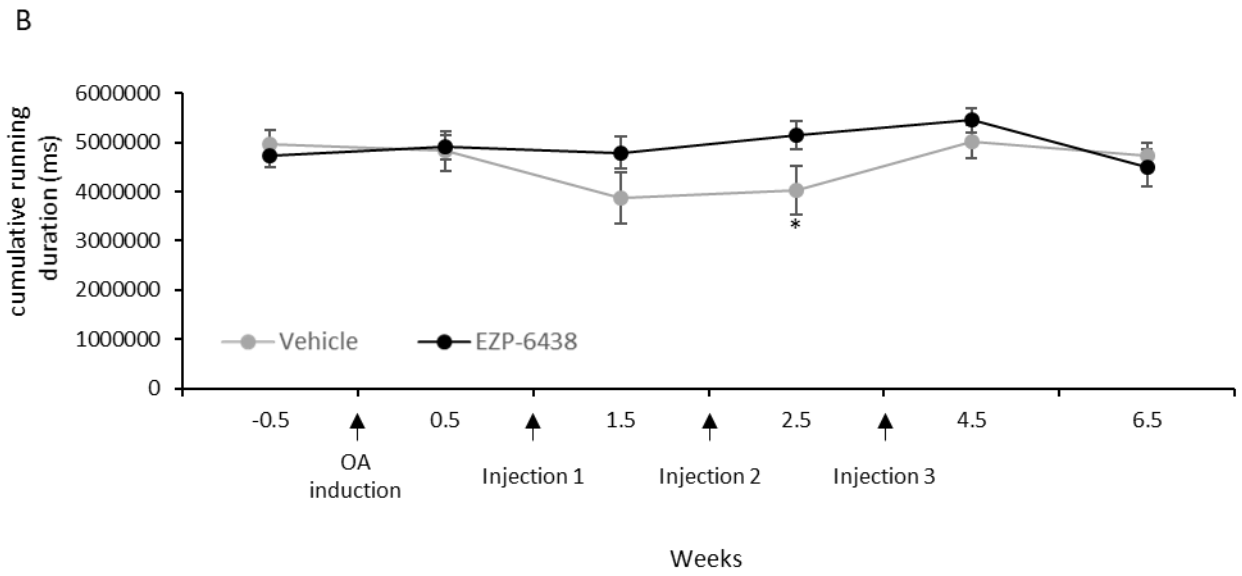
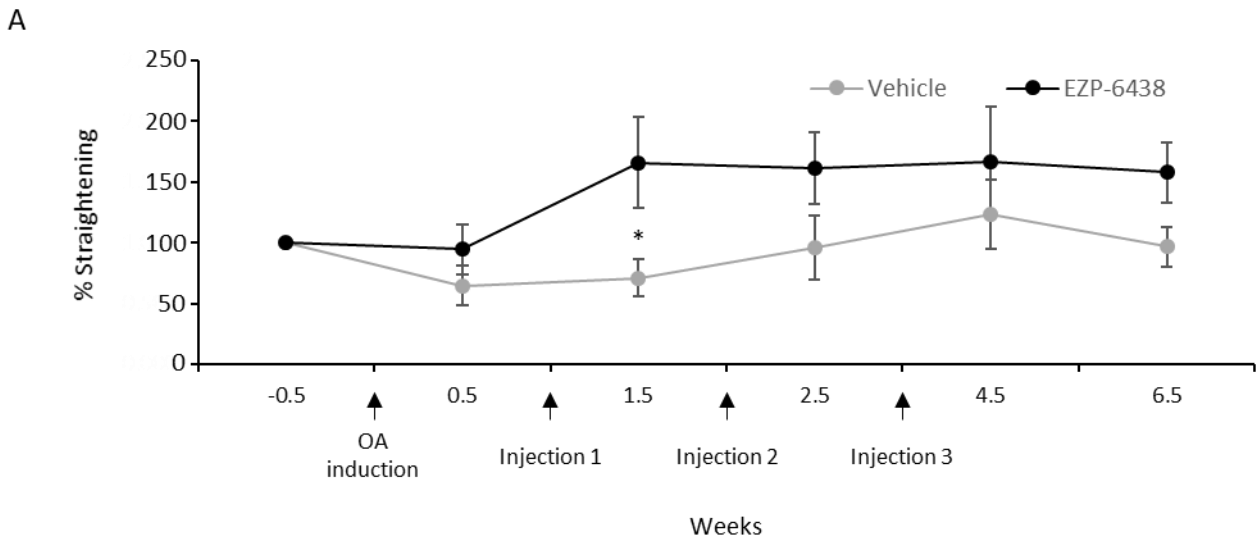


C



D





3.1.2 L'inhibition d'EZH2 inhibe l'hypertrophie des chondrocytes

Le modèle précédemment utilisé (stimulation des chondrocytes par $Il-1\beta$) permet de mimer en partie les processus d'inflammation, de diminution de l'anabolisme et d'augmentation des métalloprotéases responsables de la dégradation du cartilage observée au cours de l'arthrose. Cependant, ce modèle ne prend pas en compte l'hypertrophie des chondrocytes, qui entraîne la croissance d'ostéophytes et qui peut obstruer les mouvements de l'articulation et augmenter les douleurs ressenties par les patients. La littérature scientifique montre que le $TGF-\beta 1$ favorise l'hypertrophie des chondrocytes et la survenue des ostéophytes au cours de l'arthrose chez la souris. Nous avons donc évalué l'intérêt du traitement des chondrocytes par le $TGF-\beta 1$ comme modèle *in vitro* d'arthrose, puis tester l'effet de l'EPZ-6438 sur ce modèle. J'ai évalué dans un premier temps l'effet du $TGF-\beta 1$ sur les marqueurs de l'hypertrophie. Nos résultats montrent que $TGF-\beta 1$ augmente l'expression de COL1A1, COL10A1, RUNX2, VEGF et MMP13. L'hypertrophie induite par le $TGF-\beta 1$ a été approfondie en étudiant l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Celle-ci régule ce processus au cours du développement embryonnaire et de l'arthrose. Nous avons montré que le $TGF-\beta 1$ augmente l'expression de la β -caténine et contrecarre l'expression de SFRP1 (inhibiteur de la voie Wnt). En plus des effets sur l'hypertrophie, nous avons étudié l'impact du $TGF-\beta 1$ sur l'anabolisme des protéines cartilagineuses. Nos résultats montrent que le $TGF-\beta 1$ réduit l'expression de SOX9, ACAN et COL2A1 dans les chondrocytes *in vitro*. D'autre part, il réduit également la synthèse des glycosaminoglycanes (GAG). Dans un deuxième temps nous avons évalué le caractère prédictif de notre modèle en testant différentes molécules connues pour avoir une action anti-hypertrophique *in vivo*, à savoir le DMOG et la pterosine. Ayant validé le modèle, nous avons testé l'EPZ6438 (inhibiteur d'EZH2). Après avoir validé l'effet de l'EPZ6438 sur les chondrocytes en montrant qu'il réduit la méthylation de H3K27 par immunofluorescence, nous avons montré qu'il réduit l'expression de COL10A1 et MMP13 et qu'il contrecarre la diminution d'expression de COL2A1, ACAN et SOX9 induite par le $TGF-\beta 1$. De plus, l'EPZ6438 réduit la libération de MMP13 par le $TGF-\beta 1$.

En conclusion, nous avons montré qu'au-delà de l'inflammation, l'inhibition d'EZH2 réduit l'hypertrophie des chondrocytes induite par le $TGF-\beta$. EZH2 pourrait par conséquent devenir une cible pertinente pour le traitement de l'arthrose.



Development of a simple osteoarthritis model useful to predict in vitro the anti-hypertrophic action of drugs

Lyess Allas¹ · Quitterie Rochoux^{1,2} · Sylvain Leclercq^{1,3} · Karim Boumédiène¹ · Catherine Baugé¹

Received: 18 January 2019 / Revised: 18 June 2019 / Accepted: 7 July 2019
© United States & Canadian Academy of Pathology 2019

Abstract

Osteoarthritis (OA) is characterized by cartilage degradation, inflammation, and hypertrophy. Therapies are mainly symptomatic and aim to manage pain. Consequently, medical community is waiting for new treatments able to reduce OA process. This study aims to develop an in vitro simple OA model useful to predict drug ability to reduce cartilage hypertrophy. Human primary OA chondrocytes were incubated with transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). Hypertrophy was evaluated by Runx2, type X collagen, MMP13, and VEGF expression. Cartilage anabolism was investigated by Sox9, aggrecan, type II collagen, and glycosaminoglycan expression. In chondrocytes, TGF- β 1 increased expression of hypertrophic genes and activated canonical WNT pathway, while it decreased dramatically cartilage anabolism, suggesting that this treatment could mimic some OA features in vitro. Additionally, EZH2 inhibition, that has been previously reported to decrease cartilage hypertrophy and reduce OA development in vivo, attenuated COL10A1 and MMP13 upregulation and SOX9 downregulation induced by TGF- β 1 treatment. Similarly, pterostilbene (an inhibitor of *Sik3*), and DMOG (a hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase which mimicks hypoxia), repressed the expression of hypertrophy markers in TGF- β stimulated chondrocytes. In conclusion, we established an innovative OA model in vitro. This cheap and simple model will be useful to quickly screen new drugs with potential anti-arthritic effects, in complementary to current inflammatory models, and should permit to accelerate development of efficient treatments against OA able to reduce cartilage hypertrophy.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatologic disease worldwide, affecting more than 151 million of persons worldwide [1]. Disability and pain resulting from OA usually affects life quality of patients. Furthermore, it is highly onerous, costing up to 2.5% of gross domestic product in the western world [2].

OA is characterized by loss of articular cartilage, osteophyte formation, subchondral bone changes, fibrosis, and in many patients by inflammation. This disease is challenging

to manage because of the absence of cartilage self-repair. Currently, treatments are symptomatic and mainly aim to reduce pain and inflammatory eruptions. At advance stages, surgical procedures are inevitable, and prosthesis are employed to replace damaged joints. However, in about 20% of the patients, this procedure does not result in a pain free joint [3]. Consequently, medical community is waiting for treatments able to reduce OA process. However, the development of new anti-arthritic drugs is challenging in particular due to the absence of in vitro model able to mimic all OA hallmarks.

Chondrocytes in OA cartilage show an aberrant phenotype and actively produce cartilage-degrading enzymes, such metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases. Age and activation of inflammatory cytokines play a role in these changes. Additionally, during OA, articular chondrocytes taking a differentiation route resembling that of growth plate chondrocytes, expressing hypertrophy-like changes. They express type X collagen and MMP-13. These phenotype changes having similarities to terminal differentiating chondrocytes, are accompanied by acquisition of an

✉ Catherine Baugé
catherine.bauge@unicaen.fr

¹ Normandie Université, UNICAEN, EA7451, BioConnecT, Caen, France

² CHU, Service de Rhumatologie, Caen, France

³ Clinique Saint-Martin, Service de Chirurgie Orthopédique, Caen, France

autolytic phenotype resulting in destruction of the surrounding cartilage [4].

Human articular chondrocytes (HAC) treatment with interleukin-1 (IL-1)- β is the most approved in vitro OA model [5–7]. Its advantage is to mimic the process of inflammation, but it does not take into account the other components of the disease, especially cartilage hypertrophy.

Clinical studies have shown that TGF- β levels are very low or absent in normal articular joints, while they are elevated in OA patients synovium and cartilage [8–13]. These elevated levels of TGF- β in OA joints activate cells that are not normally exposed to high levels of TGF- β , leading to an altered cellular differentiation which may contribute to OA pathogenesis [3]. Experimental OA models in mice confirm the involvement of TGF- β , and particularly TGF- β 1, in development of this disabling disease. For instance, bolus injections of TGF- β 1 or adenoviral overexpression of TGF- β 1 in mouse knee joints induce the formation of osteophytes with structure and localization which are similar to osteophytes found in spontaneous murine OA [14, 15]. Additionally, the inhibition of TGF- β signaling pathways significantly decreases osteophyte formation in OA mice [16, 17]. These results indicate, that at least in experimental models, TGF- β is the main driver of osteophyte formation and chondrocyte hypertrophy [3]. Beside its effect on osteophyte formation, TGF- β is also involved in inflammation. Intra-articular injection of rat knee joints with TGF- β results in swelling and erythema within 1 day [18]. This TGF- β -induced inflammation contribute to joint damage in OA. These clinical and preclinical data conduct us to hypothesis that TGF- β 1 may be used in vitro to mimic some aspects of OA process.

In this study, we investigated the effect of TGF- β 1 in human OA articular chondrocytes, and evaluated the ability of three drugs known to reduce cartilage hypertrophy in vivo to counteract TGF- β effects in vitro. Together, our data permit to validate that human OA articular chondrocytes treated with TGF- β 1 could be used as an in vitro OA model to easily screen for the ability of drugs to slow down disease progression and to reduce cartilage hypertrophy.

Materials and methods

Cell culture and treatments

Human OA cartilage was obtained from the femoral heads of 20 patients undergoing hip replacement surgery (ages 49–85 years; median 73.5 years). The experimental protocol was approved by local ethical committee, named “Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III” (agreement #A13-D46-VOL.19). All methods were performed in

accordance with the relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all participants. They all signed agreement forms before the surgery, rendering to local legislation.

Chondrocytes obtained as previously described [19]. Briefly, cells were released by cartilage digestion with type XIV pronase (2 mg/ml for 30 min; Sigma-Aldrich) and type II collagenase (2 mg/ml for 15 h; Thermofisher). The cells were then washed with PBS and seeded at 4×10^4 cells/cm² in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml of penicillin, 100 μ g/ml of erythromycin and then incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ until they reached 80% confluency. At this stage (about 1 week), cells were treated with TGF- β 1 (R&D Biosystems; 5 ng/ml) for 1 or 2 days in the presence or absence of EPZ-6438 (Selleckchem), an EZH2 inhibitor also called taze-metostat, Pterostatin (AOBIOUS), a Sik-3 inhibitor, and DMOG (Echelon Biosciences Inc), a drug mimicking hypoxia.

Metalloproteinase 13 (MMP13) release assay

MMP13 release into conditioned media was quantified using commercially available enzyme immunoassay kit (R&D Biosystems). Absorbance was determined at 450 nm with a wavelength correction set at 540 nm (Multiskan GO spectrophotometer, Thermo Scientific, France).

GAG release assay

GAG release into the medium was measured using a sulfated glycosaminoglycan assay kit (Blyscan™, Biocolor) according manufacturer’s instructions.

RNA isolation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA was extracted with NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel) according to manufacturer’s protocol, and reverse transcribed into cDNA as previously described [5]. Amplification of the generated cDNA was performed by real-time PCR using Step One Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems) with appropriate primers. The relative mRNA level was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *RPL13a* expression was used as reference.

Protein extraction and western blotting

Cells were lysed and western blotting performed as previously described [5]. The following antibodies were used: type I, II, and X type collagen (ab34710, ab182563, ab34712) were purchased from Abcam, aggrecan

(AB10031) from Millipore, Sox9 (LS-C368527) from LSBio and β -actin (sc-47778), β -catenin (sc-7963), goat anti-mouse IgG-HRP and goat anti-rabbit IgG-HRP from Santa Cruz Biotechnology.

Immunocytochemistry

Cells were washed once with PBS and fixed in 4% PFA during 10 min. Then, cells were washed three times with PBS and incubated overnight at 4 °C with a solution composed by PBS, 0.25% Triton, 1% BSA and 1/100^o dilution of H3K27me3 antibody (C36B11, Cell signaling). Next, cells were washed and incubated with a solution composed by PBS, 0.25% triton, 1% BSA, 1/1000^o Hoechst solution and 1/400^o dilution of Alexa Fluor 594 Goat IgG Anti Rabbit IgG (111–585–003, Jackson). Fluorescence was evaluated using EVOS FL Auto 2 Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific).

Statistical analysis

Statistical significance was determined by Student's *t*-test. *P*-values less than 0.05 were considered significant.

Results

TGF- β 1 increased the expression of genes associated to cartilage hypertrophy in OA chondrocytes

First, we tested whether TGF- β 1 treatment is able to regulate the expression of genes associated to cartilage hypertrophy in human OA articular chondrocytes in vitro. We incubated cells with 5 ng/ml TGF- β 1 for 24 and 48 h, and next observed cell morphology and analyzed the expression of several genes known to be upregulated in hypertrophic OA cartilage. We investigated the expression of type X collagen (COL10A1) and Matrix Metalloproteinase 13 (MMP-13), the two most widely used markers of hypertrophic chondrocytes, as well as the expression of type I collagen (COL1A1), Runt Related Transcription Factor 2 (RUNX2), and Vascular endothelial growth factor (VEGF), which have also been associated to hypertrophy chondrocytes [4].

Microscopically, we did not observe any major difference in term of morphology between untreated cells and TGF- β treated-cells. It seems however, that TGF- β increased cell number (Fig. 1a). Concerning gene expression, TGF- β treatment strongly increased the level of mRNA of hypertrophic genes (COL10A1, MMP13, COL1A1, RUNX2 and VEGF) (Fig. 1b). This effect was also observed at protein level, at least for type X collagen and MMP-13 (Fig. 1b, c).

TGF- β 1 activated β -catenin/WNT pathway in OA chondrocytes

To confirm that TGF- β 1 treatment is able to induce hypertrophy in OA chondrocytes, we investigated Wnt pathways. Indeed, this signaling pathway is the major regulator of chondrocyte hypertrophy. Elevated canonical WNT signaling drives OA development by increasing RUNX2 activity thereby boosting hypertrophic differentiation of chondrocytes [4, 20].

To investigate canonical WNT signaling, we analyzed the expression of β -catenin, and secreted frizzled-related protein 1 precursor (SFRP1). We found that in OA chondrocytes, TGF- β 1 increased protein level of β -catenin (Fig. 2a), and down-regulated the WNT antagonist SFRP1 (Fig. 2b). This is coherent with an activation of canonical WNT signaling.

TGF- β 1 decreased cartilage anabolism in OA chondrocytes

Cartilage hypertrophy is known to be also associated to a loss of the differentiated phenotype of chondrocytes, which is correlated to a decreased expression of SRY-Box 9 (Sox9), a crucial factor for chondrocytes, and a reduced deposit of cartilage matrix composed of type II collagen (COL2A1), aggrecan (ACAN) and glycoaminoglycans (GAG). So, we investigated the expression of this cartilage markers in OA chondrocytes treated with TGF- β 1 for 24 and 48 h. In these experimental conditions, TGF- β 1 reduced COL2A1, ACAN and SOX9 expression at both mRNA and protein levels (Fig. 3a, b). Additionally, TGF- β 1 decreased GAG production (Fig. 3c).

Together, these results showed that TGF- β 1 treatment in OA chondrocytes is able to mimic in vitro some OA traits, and to induce phenotype resembling to hypertrophic OA chondrocytes, suggesting that this model could be used to test the effects of putative anti-arthritic drugs on chondrocyte hypertrophy.

EZH2 inhibition counteracted the increase of H3K27 trimethylation induced by TGF- β 1, and reduced hypertrophy in vitro

Recently, it has been shown that the inhibition of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), an histone methyltransferase, ameliorates osteoarthritis development in mouse OA model, through the reduction of cartilage hypertrophy [21]. Consequently, an EZH2 inhibitor should be a good tool to test the ability of our in vitro model to predict ability of drugs to reduce cartilage hypertrophy in vivo.

Herein, we investigated whether EPZ6438 (also named tazemetostat) counteracts TGF- β 1-induced hypertrophy

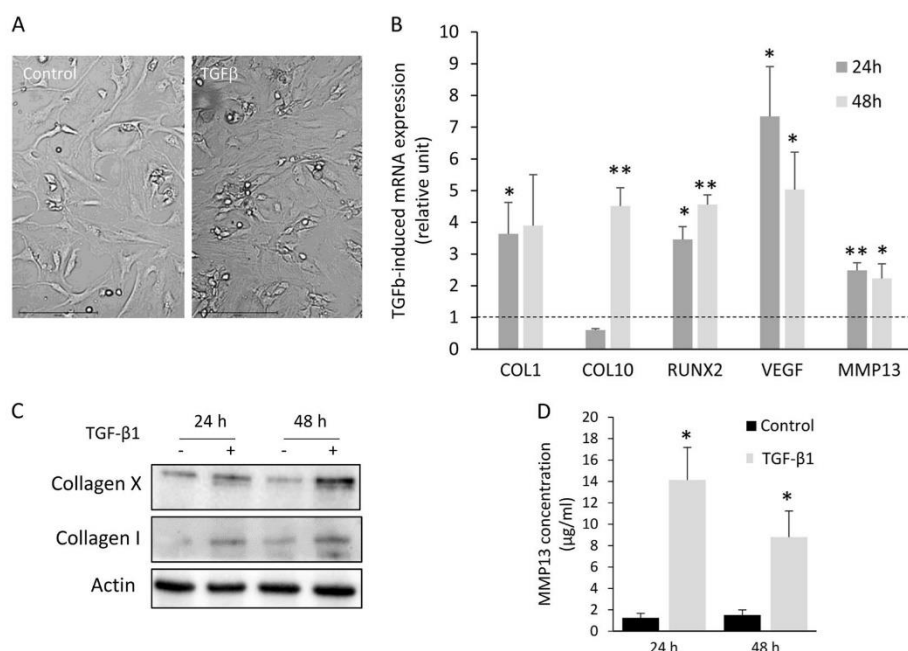


Fig. 1 TGF- β 1 stimulates chondrocytes hypertrophy. Human primary OA chondrocytes were treated with TGF- β 1 (5 ng/ml) for 24 or 48 h. After treatment, RNA and proteins were extracted. **a** Photograph of cells after treatments. **b** Relative mRNA expression of hypertrophy genes (type I and X collagen, Runx2, VEGF and MMP-13) was determined by real-time RT-PCR. Values were expressed as relative gene expression compared to untreated cells. Histograms represent

means \pm SEM ($n = 5$). * p -value ≤ 0.05 ; ** p -value ≤ 0.01 . **c** Protein expression of type I and X collagen was analyzed by Western-blot. Figure represents an image representative of results from three independent experiments. **d** MMP-13 release in medium was determined by ELISA assay. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). * p -value ≤ 0.05

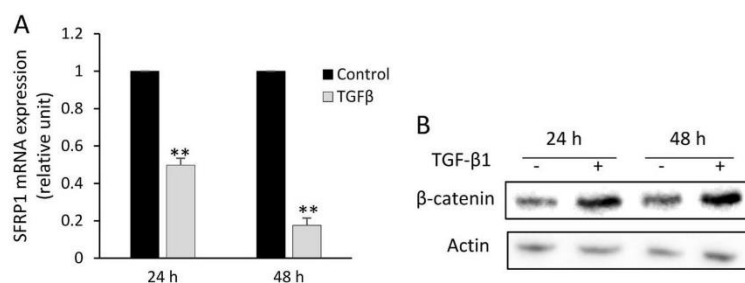


Fig. 2 TGF- β 1 activates β -catenin/WNT pathway. Primary OA chondrocytes were treated with TGF- β 1 (5 ng/ml) for 24 and 48 h. **a** After treatment, mRNA was extracted, and SFRP1 mRNA expression was

determined by real-time RT-PCR. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 5$). ** p -value ≤ 0.01 . **b** Proteins were extracted and β -catenin expression was evaluated by western blot ($n = 3$)

phenotype in cultures of human OA chondrocytes. First, we showed that EPZ6438 reduced, as expected, the trimethylation of H3K27 (H3K27me3) in chondrocytes, proving that the drug has efficiency inhibited the histone methylase EZH2 (Fig. 4). In addition, we observed that TGF- β 1 increased the proportion of H3K27me3 positive cells. This effect was counteracted by the presence of EPZ6438.

Next, we investigated EPZ6438 effect on the expression of genes associated to hypertrophic or differentiated articular chondrocytes. In human OA chondrocytes treated with TGF- β 1, EZH2 inhibitor reduced the expression of hypertrophic genes, namely MMP13 and type X collagen, while it increased Sox9, type II collagen and aggrecan expression (Fig. 5).

Fig. 3 TGF- β 1 reduces the expression of genes involved in cartilage anabolism. Primary OA chondrocytes were treated as previously. **a** COL2A1, ACAN and Sox9 expression were determined at mRNA level by RT-PCR. Data are expressed relative to untreated cells. Histograms represent means \pm SEM ($n = 5$). $**p$ -value ≤ 0.01 . **b** Protein expression were evaluated by western blot ($n = 3$). **c** GAG release into the medium was measured by Blyscan assay. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). $*p$ -value ≤ 0.05 ; $**p$ -value ≤ 0.01

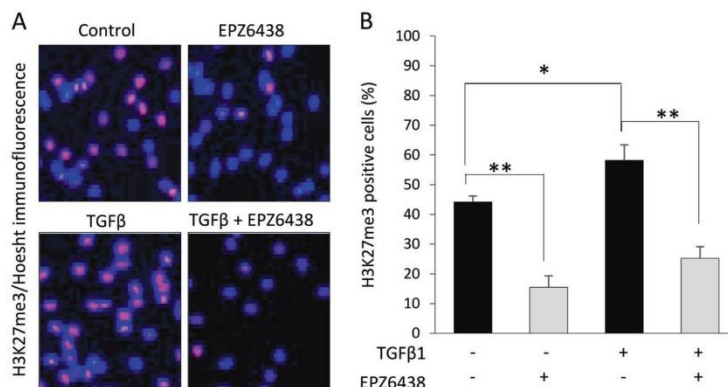
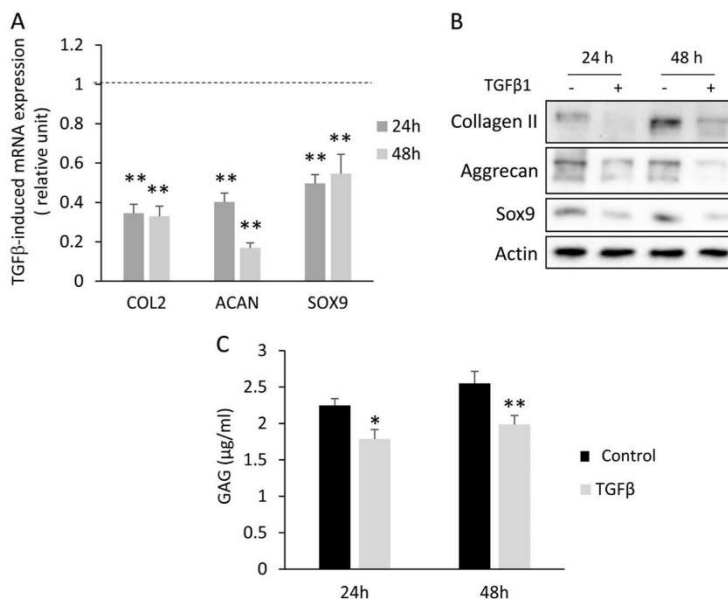


Fig. 4 EZH2 inhibition counteracts the increase of H3K27 trimethylation induced by TGF- β 1. Primary chondrocytes were treated with TGF- β 1 (5 ng/ml) in the presence or absence of EPZ-6438 (10 μ M) for 48 h. **a** After treatment, H3K27me3 levels (red) were evaluated by immunohistology. Nucleus was marked by Hoescht staining (blue). **b**

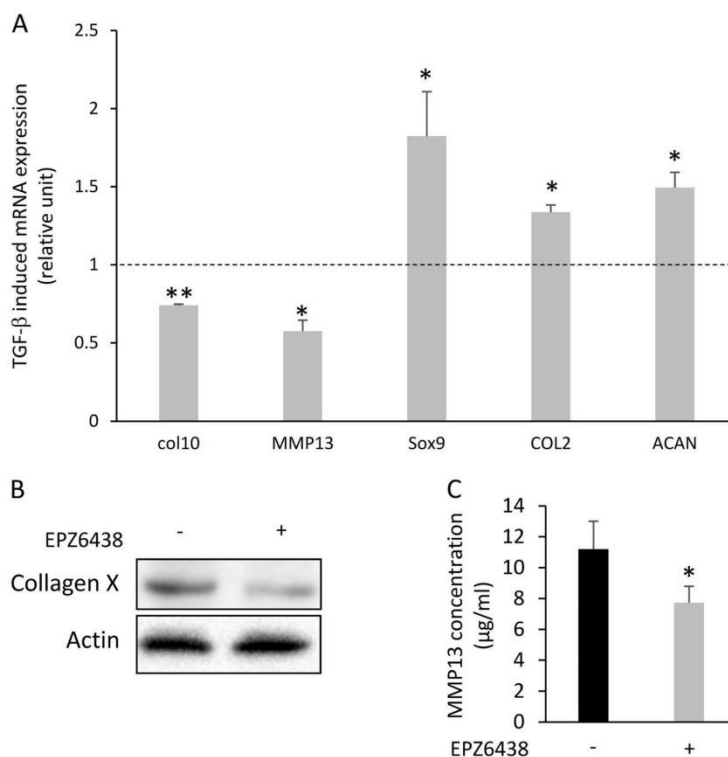
H3K27me3 positive cells were quantified in three independent experiments. For each experiments, at least 20 cells were counted. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). $*p$ -value ≤ 0.05 ; $**p$ -value ≤ 0.01

Pterisin B and DMOG reduced the expression of MMP13 and type X collagen in TGF- β stimulated chondrocytes

Next, we investigated the effect of two others drugs which are have been described as candidate therapeutic for OA due to their ability to reduce hypertrophy (Fig. 6). First, we tested pterisin B, a Sik3 pathway inhibitor, which delay chondrocyte hypertrophy and mineralization [22]. As expected, we observed that pterisin B reduces COL10A1

expression in TGF- β stimulated chondrocytes. Next, we studied the effects of dimethyloxalylglycine (DMOG), a hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase, which mimics hypoxia in stabilizing HIF factors and enhancing their nuclear localization. Hypoxia and DMOG are known to reduce the expression of markers associated with chondrocyte hypertrophy, in particular type X collagen and MMP13 [23, 24]. Herein, we showed that in our in vitro model, DMOG reduced the expression of these two markers of hypertrophy. Together, these experiments confirms that

Fig. 5 EPZ6438 counteracts the effects of TGF- β 1 in OA chondrocytes. Primary chondrocytes were treated with TGF- β 1 (5 ng/ml) in the presence or absence of EPZ-6438 (10 μ M) for 48 h. After treatment, RNA and proteins were extracted. **a** mRNA relative expression of type X collagen, MMP-13, Sox9, COL2A1, and ACAN was determined by real-time RT-PCR. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in TGF- β 1-treated cells ($n = 4$). Histograms represents. * p -value ≤ 0.05 ; ** p -value ≤ 0.01 . **b** Protein expression of collagen type X was determined by western blot ($n = 3$). **c** MMP13 release in medium was determined by ELISA assay. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). * p -value ≤ 0.05



human OA articular chondrocytes treated with TGF- β 1 can be used as an in vitro OA model to easily screen the ability of drugs to reduce cartilage hypertrophy.

Discussion

In this paper, we established a simple model of culture able to mimic some features of OA process, and particularly the shift of articular chondrocytes toward a hypertrophic phenotype. This in vitro model could be useful to predict the ability of drugs to reduce cartilage hypertrophy and thus to slow down OA disease in vivo.

OA is a complex disease, difficult to reproduce in vitro. At cartilage level, OA is characterized by a tissue erosion due mainly to inflammation, but also by the formation of osteophytes due to terminal differentiation of articular chondrocytes which become hypertrophic. Current in vitro models used to study molecular OA mechanisms or to test the anti-arthritis effects of drugs consist usually to mimic inflammation observed during OA, by treated chondrocytes with IL-1 β or TNF- α . Indeed, these cytokines have been found at an elevated level in synovial fluid of OA patients. These models permit to evaluate the ability of drugs to reduce inflammation as well as to decrease the expression of

enzymes involved in cartilage breakdown. However, they fail to reproduce the induction of hypertrophic phenotype of chondrocytes observed during OA pathology. Herein, we propose another model based on the incubation of OA chondrocytes with TGF- β 1. This model could be very useful to screen new drugs against OA, in complement to inflammatory models (based on IL-1 β or TNF- α), before performing preclinical trials in rodents.

As IL-1 β and TNF- α , TGF- β 1 level has been found increased in joints of OA patients [3, 4], and numerous studies show its involvement in OA process. Its role on cartilage is different in an OA joint than in a normal joint [3]. It would be a protective effect in normal chondrocytes, whereas it would be harmful in aged and OA chondrocytes. Herein, in this study, we only used aged OA chondrocytes. It is possible that different results would be observed in young normal chondrocytes. In human OA chondrocytes, we observed that TGF- β 1 treatment (5 ng/ml) increased hypertrophic markers, notably MMP13 and type X collagen. Type X collagen is considered as the standard marker for chondrocyte hypertrophy. MMP13, as called collagenase-3, is one of the major enzymes involved in the degradation of OA cartilage. Although accepted as a hypertrophy marker, its synthesis can be induced in chondrocytes by alternative routes, such as inflammation or

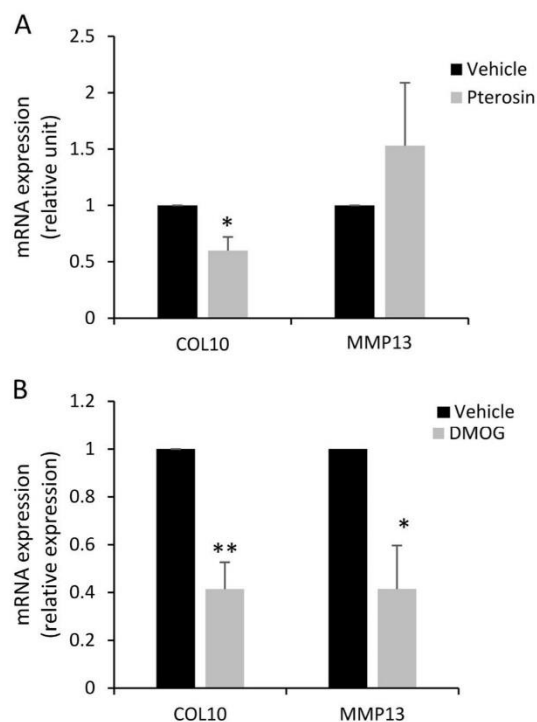


Fig. 6 Pterisin B and DMOG reduced the expression of MMP13 and type X collagen in TGF- β stimulated chondrocytes. Primary chondrocytes were treated with TGF- β 1 (5 ng/ml) in the presence or absence of PterisinB (300 μ M) or DMOG (500 μ M) for 48 h. After treatment, RNA were extracted. mRNA relative expression of type X collagen and MMP-13 was determined by real-time RT-PCR. Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in TGF- β 1-treated cells ($n = 3$). Histograms represents. * p -value ≤ 0.05 ; ** p -value ≤ 0.01

mechanical stress [4]. So, it can be also considered as a marker of inflammation and cartilage breakdown.

Additionally, we showed that TGF- β 1 activates the β -catenin/WNT pathway, and increases the expression of other hypertrophic markers, such as RUNX2 that is a master transcription factor involved in the control of chondrocyte hypertrophic differentiation, and that directly regulates the expression of type X collagen and MMP-13 [20, 25–27].

Contrary to hypertrophic genes, the markers of differentiated chondrocytes (SOX9, COL2A1, ACAN) were down-regulated by TGF- β 1 treatment. This is coherent with observation of the reduced synthesis of cartilage during advanced stage of OA. Consequently, treatment of human OA chondrocytes with TGF- β 1 mimics numerous features observed during OA. This culture method could thus be useful to reproduce chondrocyte hypertrophy in vitro, permitting to study molecular mechanisms involved in this process and to test putative new treatments against OA before animal experimentation.

To confirm the efficiency of this culture model to predict drug ability to reduce cartilage hypertrophy during OA, we investigated the effect of three drugs known for the ability to reduce cartilage hypertrophy. First, we tested an epidrug on the expression of a panel of gene regulated by TGF- β 1 in human OA chondrocytes. We found that EZH2 inhibition by EPZ-6438 opposites to the major effects of TGF- β 1: it increases COL2A1, ACAN as well as SOX9 expression and decreases MMP13 and COL10A1 synthesis. These results are fully in agreement with published data from in vivo experiments showing that intra-articular injections of an inhibitor of histone methyltransferase EZH2, a chromatin modifier that activates Wnt/ β -catenin signaling, reduced cartilage hypertrophy and also decreased articular cartilage degradation in surgically induced OA [21]. We also validate our model using two others drugs, pterisin B (a Sik-3 inhibitor) and DMOG (a mimic of hypoxia), which are known to reduce hypertrophy cartilage in vivo [22, 24].

In conclusion, we established a model able to induce chondrocyte hypertrophy in vitro, which permits to evaluate the ability of drugs to reduce cartilage hypertrophy. This tool should be useful to identify more quickly new drugs having anti-arthritic action. In addition, this study confirms that TGF- β 1 induces harmful effects in OA chondrocytes, suggesting that therapeutic strategy aiming to favor TGF- β 1 signaling to treat OA should be used with important precaution, and be very well controlled.

Acknowledgements This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-15-CE14-0002-1], Région Normandie and European Union [FEDER/FSE 2014-2020 – 16E00779/16P03685].

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Baugé C, Girard N, Lhuissier E, Bazille C, Boumediene K. Regulation and role of TGF β signaling pathway in aging and osteoarthritis joints. *Aging Dis.* 2014;5:394–405.
- Hilgsmann M, Cooper C, Arden N, Boers M, Branco JC, Luisa Brandi M, et al. Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43:303–13.
- van der Kraan PM. Differential role of transforming growth factor-beta in an osteoarthritic or a healthy joint. *J Bone Metab.* 2018;25:65–72.
- Baugé C, Attia J, Leclercq S, Pujol J-P, Galéra P, Boumediene K. Interleukin-1beta up-regulation of Smad7 via NF-kappaB activation in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2008;58:221–6.

5. Aury-Landas J, Bazille C, Allas L, Bouhout S, Chesneau C, Leclercq S, et al. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci Rep*. 2017;7:6483.
6. Baugé C, Lhuissier E, Girard N, Quesnelle C, Ewert G, Boumediene K. Anti-inflammatory effects of an injectable copolymer of fatty acids (Ara 3000 beta®) in joint diseases. *J Inflamm Lond Engl*. 2015;12:17.
7. Albro MB, Nims RJ, Cigan AD, Yeroushalmi KJ, Alliston T, Hung CT, et al. Accumulation of exogenous activated TGF- β in the superficial zone of articular cartilage. *Biophys J*. 2013;104:1794–804.
8. Jiang Q, Qiu Y-T, Chen M-J, Zhang Z-Y, Yang C. Synovial TGF- β 1 and MMP-3 levels and their correlation with the progression of temporomandibular joint osteoarthritis combined with disc displacement: a preliminary study. *Biomed Rep*. 2013;1:218–22.
9. Sandy JD, Chan DD, Trevino RL, Wimmer MA, Plaas A. Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23:1939–45.
10. Fava R, Olsen N, Keski-Oja J, Moses H, Pincus T. Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions. *J Exp Med*. 1989;169:291–6.
11. Zielinski S, Bartels K, Cebulski K, Kühne C, Kekow J. Evidence of proteolytic activation of transforming growth factor beta in synovial fluid. *Adv Exp Med Biol*. 2000;477:477–81.
12. Fang PK, Ma XC, Ma DL, Fu KY. Determination of interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 in synovial fluid aspirates of patients with temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999;57:922–8. discussion 928–9.
13. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 1994;71:279–90.
14. Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, et al. Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9:128–36.
15. Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol BaltimMd* 1950. 2002;169:507–14.
16. Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:3442–51.
17. Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl SM. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1990;171:231–47.
18. Baugé C, Legendre F, Leclercq S, Elissalde JM, Pujol JP, Galéra P, et al. Interleukin-1beta impairment of transforming growth factor beta1 signaling by down-regulation of transforming growth factor beta receptor type II and up-regulation of Smad7 in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3020–32.
19. van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage OARS Osteoarthritis Res Soc*. 2012;20:223–32.
20. Dong Y-F, Soung DY, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol*. 2006;208:77–86.
21. Chen L, Wu Y, Wu Y, Wang Y, Sun L, Li F. The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/ β -catenin pathway. *Sci Rep*. 2016;6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990905/>
22. Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, et al. Pterostilbene prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting SIK3. *Nat Commun*. 2016;7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820810/>
23. Sathy BN, Daly A, Gonzalez-Fernandez T, Olvera D, Cunniffe G, McCarthy HO, et al. Hypoxia mimicking hydrogels to regulate the fate of transplanted stem cells. *Acta Biomater*. 2019;88:314–24.
24. Markway BD, Cho H, Johnstone B. Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:R92.
25. Wang X, Manner PA, Homer A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12:963–73.
26. Hecht J, Seitz V, Urban M, Wagner F, Robinson PN, Stiege A, et al. Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene Expr Patterns*. 2007;7:102–12.
27. Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, et al. Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum*. 2009;60:166–78.

3.1.3 Le GSK-J4 n'a pas d'effet sur l'inflammation, le catabolisme et l'hypertrophie des chondrocytes

Nous avons montré qu'EZH2 réduit l'inflammation et le catabolisme dans les chondrocytes. Nous avons voulu savoir si l'inhibition des déméthylases JMJD3 et UTX aurait l'effet inverse.

Nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle, JMJD3 pourrait être impliquée dans l'hypertrophie ou l'inflammation liée à l'arthrose. Le rôle des demethylases dans les processus inflammatoires a été recherché en cultivant les chondrocytes à la fois en présence d'IL-1 β et de GSK-J4, un inhibiteur de JMJD3 et UTX. A l'issue de ces différentes cultures, des tests ELISA du catabolisme (MMP13) ont été réalisés sur les milieux. Les marqueurs chondrogéniques (collagène de type II, Agrécane, Sox9), les marqueurs de chondrocyte hypertrophique (COL10A1, COL1A1, MMP13) et du catabolisme (MMPs 1, 3, 13, ADAMST5) ont été évalués par RT-PCR.

Nos résultats montrent que le GSK-J4 n'a pas d'impact sur l'augmentation d'expression des MMP1, 3 et 13 ainsi que sur l'expression des marqueurs de l'anabolisme SOX9, COL2A1 et ACAN (figure 39). Le GSK-J4 n'a par conséquent pas d'effet sur l'induction du catabolisme et de l'inflammation induite par l'IL-1 β .

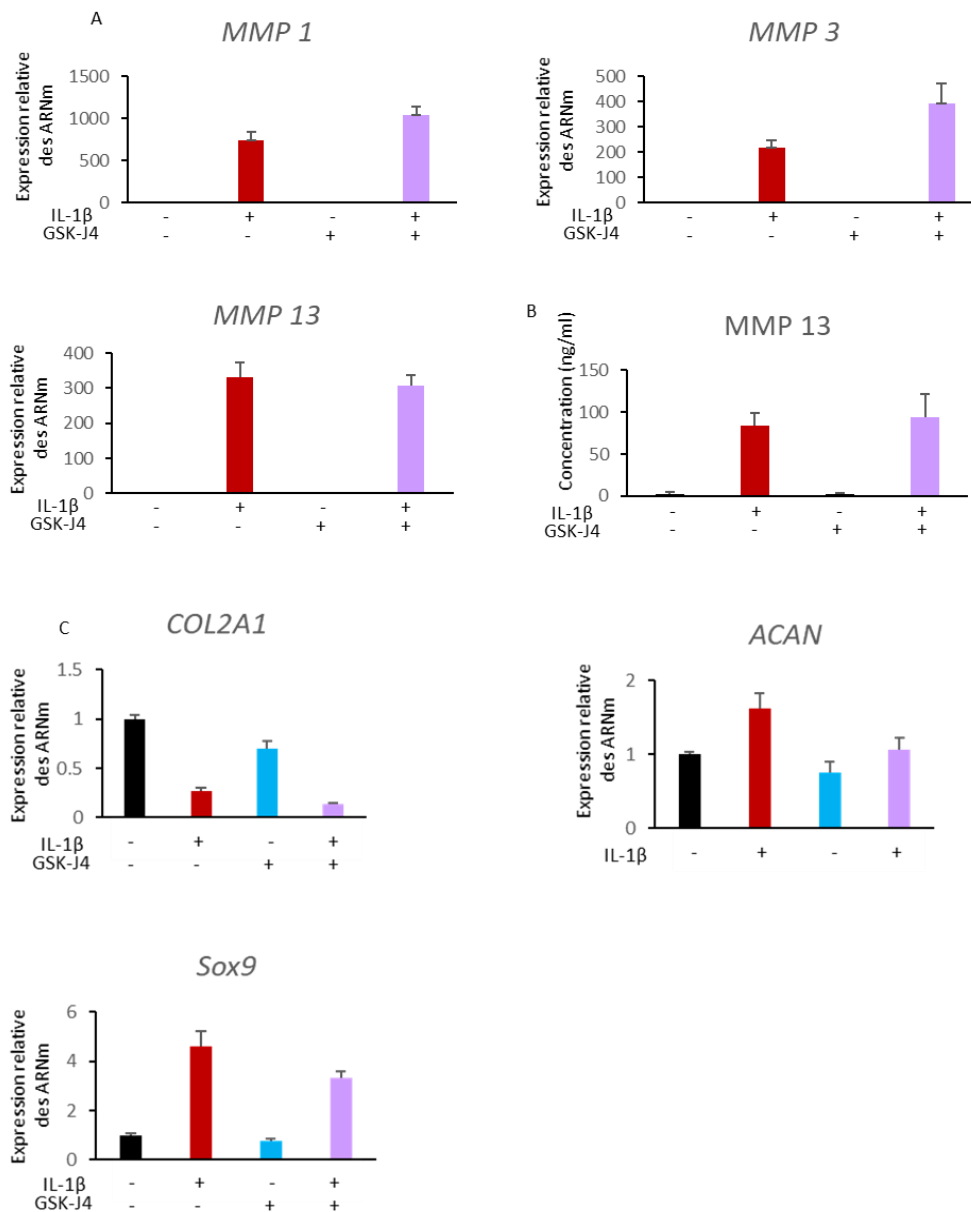


Figure 39 : Effet du GSK-J4 sur les chondrocytes traités par IL-1β.

A. Les chondrocytes ont été incubés en présence ou non d'IL-1β (1ng/ml) et/ou de GSKJ4 (10μM) pendant 48h. Des RT-PCR de MMP 1, 3 et 13 ont été effectuées (n=3). Les histogrammes montrent les résultats d'une expérience représentative (n=3). Les barres d'erreur représentent l'écart type du triplicat de l'expérience. **B.** La libération de MMP 13 dans les milieux de cultures a été quantifiée par test ELISA (n=3). Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± SEM (n=3). **C.** Effet du GSK-J4 sur les gènes de l'anabolisme. Les chondrocytes ont été incubés en présence ou non d'IL-1β (1ng/ml) et/ou de GSKJ4 (5μM ou 10μM) pendant 48h. Des RT-PCR de Sox9, COL1A1, COL2A1 et ACAN ont été effectuées.

Leur rôle dans l'hypertrophie a été évalué en cultivant les cellules en présence de TGF-β et de GSK-J4. A l'issue de ces différents traitements, les marqueurs chondrogéniques (collagène de type II, Agrécan, Sox9) et les marqueurs de chondrocyte hypertrophique (COL10A1, COL1A1, MMP13) ont été évalués par RT-PCR.

Le GSK-J4 n'a pas d'effet sur l'expression de COL10A1, MMP13 et COL1A1 et sur la baisse d'expression de SOX9, ACAN et COL2A1 induite par le TGF- β (figure 40). Le GSK-J4 n'a donc pas d'impact sur l'hypertrophie et la baisse de l'anabolisme induites par TGF- β .

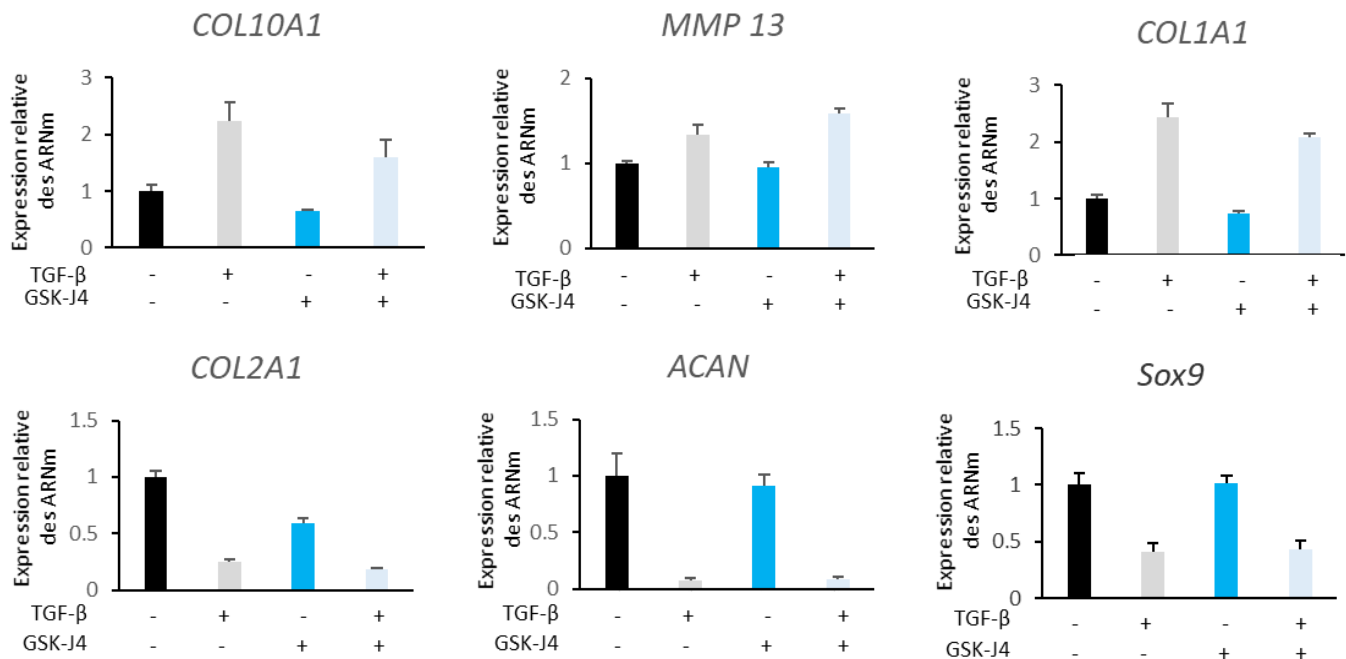


Figure 40 : Le GSK-J4 n'a pas d'impact sur les gènes matriciels et sur l'induction des marqueurs de l'hypertrophie et de l'anabolisme par le TGF- β .

Les HAC ont été incubés en présence ou non de TGF- β (5ng/ml) et/ou de GSKJ4 (10 μ M) pendant 48h. Des RT-PCR de COL10A1, MMP13, COL1A1, Sox9, COL2A1 et ACAN ont été effectuées. Les histogrammes montrent les résultats d'une expérience représentative (n=3). Les barres d'erreur représentent l'écart type du triplicat de l'expérience.

L'inhibition de JMJD3 et UTX n'a pas d'effet sur les processus inflammatoire, catabolique et hypertrophique dans les chondrocytes.

En conclusion de cette première partie, nous avons montré dans deux modèles cellulaires d'arthrose qu'EZH2 est impliquée dans les processus inflammatoires, cataboliques et hypertrophiques. In vivo nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 par l'EPZ-6438 réduit la dégradation du cartilage et le handicap locomoteur. L'injection intra-articulaire d'EPZ-6438 pourrait devenir une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement de l'arthrose. En revanche, nos résultats suggèrent que les histones déméthylases JMJD3 et UTX n'exercent pas un rôle essentiel dans cette pathologie.

3.2 JMJD3 et UTX favorisent la chondrogenèse, intérêt en ingénierie tissulaire du cartilage

Dans une deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressé au rôle de H3K27me3 au cours de la chondrogenèse. Parmi les stratégies en développement pour le traitement de l'arthrose, l'ingénierie tissulaire est très prometteuse. Néanmoins, les protocoles de différenciation doivent être améliorés afin de permettre la formation d'un cartilage hyalin stable. La régulation épigénétique joue un rôle prépondérant au cours de la formation du cartilage embryonnaire et la chondrogenèse. Les régulateurs dont font partie les enzymes de modification des histones constituent des cibles privilégiées pour améliorer les protocoles d'ingénierie tissulaire. L'objectif de notre étude est d'évaluer le rôle des déméthylases de H3K27me3, à savoir JMJD3 et UTX durant la chondrogenèse et leur potentiel implication en ingénierie tissulaire.

Nous avons amplifié des cellules souches mésenchymateuses (MSC) issus de moelles osseuses obtenues de biopsie de patients ayant subi une arthroplastie. Nous avons transfecté les MSC avec des vecteurs d'expression pour JMJD3 et UTX ou avec des siRNA dirigés contre leur ARNm respectif. Nous avons ensuite inclus les cellules dans l'alginate et les avons cultivées dans un milieu chondrogénique pendant 7 jours. Alternativement, nous avons évalué l'impact du GSK-J4, inhibiteur de JMJD3 et UTX, au cours de la chondrogenèse. Nous avons étudié l'expression des gènes par RT-PCR ou par transcriptomique (puce Agilent) afin d'identifier les gènes différentiellement régulés par le GSK-J4. L'enrichissement des ontologies et le réseau d'interactions protéines-protéines a été construit avec le logiciel STRING.

Nous avons montré que JMJD3 et UTX réduit l'expression des gènes spécifiques du cartilage tels que le collagène II et l'agrécan, alors que leur surexpression a l'effet inverse. De plus, nous avons identifié 281 gènes (62%) dont l'expression était inhibée et 174 (38%) dont l'expression était induite par le GSK-J4 au cours de la chondrogenèse. Les gènes dont l'expression était inhibée par le GSK-J4 sont impliqués dans l'ossification enchondrale et la différenciation chondrogénique. D'autre part, la surexpression de JMJD3 et UTX amplifie la formation du cartilage et la production du collagène *in vivo*.

Pour conclure, nous avons mis en évidence que JMJD3 et UTX favorisent la chondrogenèse et la formation du cartilage *in vivo*, montrant l'intérêt d'induire les déméthylases de H3K27 pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Article en préparation :

H3K27me3 demethylases enhance chondrogenesis. Impact on cartilage engineering.

Abstract

Osteoarthritis is the first cause of disability. Among emerging therapeutic strategies, cartilage tissue engineering seems promising. Histone methylation plays a preponderant role in cartilage development and therefore may be good target to improve cartilage engineering protocols. We evaluated the role of JMJD3 (KDM6B) and UTX (KDM6A), the both demethylases of histone H3 at the lysine 27 (H3K27) in chondrogenesis and its possible application for cartilage engineering.

Human MSCs were transfected with expression vectors for JMJD3 and/or UTX, or with siRNA targeting these genes. Alternatively, cells were treated with GSK-J4, a specific inhibitor of JMJD3 and UTX. Then, cells were embedded in alginate and cultivated into a chondrogenic medium. The expression of chondrogenic genes (SOX9, ACAN, COL2A1) were evaluated by RT-PCR. Differentially expressed genes (DEG) regulated by GSK-J4 were identified by whole-transcriptome microarray. Moreover, nude mice were implanted with alginate beads containing cells which overexpress JMJD3 or UTX, and cartilage formation was evaluated by immunohistochemistry and collagen assay.

JMJD3 or UTX inhibition reduced the expression of cartilage-specific genes such as collagen II and aggrecan, while their overexpression had the opposite effect. Additionally, we identified 281 genes (62%) which were down-regulated and 174 genes (38%) up regulated by GSK-J4 in MSCs undergoing chondrogenesis. DEGs were enriched in genes involved in endochondral ossification and chondrocytes differentiation. Furthermore, JMJD3 and UTX overexpression enhanced *in vivo* cartilage formation and collagen expression.

In conclusion, JMJD3 and UTX favor MSC chondrogenic differentiation and *in vivo* cartilage formation suggesting that histone demethylases improve chondrogenesis and cartilage engineering.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is one of the first causes of disability worldwide. The current treatments for patients suffering from it are mainly symptomatic, and none of them are able to repair cartilage damages. Furthermore, in contrast to vascular tissues, cartilage has a poor self-repair capacity. This is

why researchers are focusing on tissue engineering as a new approach for cartilage regeneration. The concept of autologous chondrocyte transplantation was first introduced by Mat Brittberg in 1994. According to this method, chondrocytes are isolated from articular cartilage and then replanted in the cartilage defects¹. Due to the low number of cells obtained after isolation, chondrocytes have to be amplified *in vitro*. However, after successive passages, chondrocytes lose their phenotype and differentiate in fibroblast-like cells². These molecular changes compromise cartilage biomechanical properties, which makes its clinical use compromised. Recent reports have proposed MSCs as an attractive alternative due to their chondrogenic potential, *in vitro* self-renewal capacity and immunomodulatory characteristics³. MSCs are multipotent stem cells discovered first in the bone marrow and can be isolated from other sources such as placenta, amniotic fluid, umbilical cord, adipose tissue, skeletal muscle, dental pulp, synovial membrane, and tendons. Nevertheless, maintaining chondrocyte phenotype in differentiated stem cells remains challenging.

Better understanding of cartilage development and physiology has led to new strategies involving the use of hypoxia, 3D scaffolds, mechanical stimuli and growth factors⁴. Many of these strategies have emerged because of discoveries made on endochondral ossification, a process during which cartilage and bone tissue are formed⁵.

During the past decade, numerous studies have found that epigenetic modifications play a preponderant role during endochondral ossification⁵. Epigenetic is the study of heritable phenotype changes that do not involve alterations in the DNA sequence⁶. Histone methylation is part of epigenetic, and it activates or deactivates gene expression regarding which amino-acid is concerned. For instance, the tri-methylation of the Histone H3 Lysine 27 (H3K27me3) inhibits genes expression⁵.

It has been shown that the H3K27 histone methyltransferases known as Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes cartilage development and maturity during endochondral ossification⁷. Moreover, research found that H3K27me3 demethylase called JmjC Domain-Containing Protein 3 (JMJD3 also known as KDM6B) is necessary for both early and late cartilage development during embryonic development^{8,9}. By demethylating the repressive mark H3K27me3, JMJD3 allows chondrocyte genes expression^{8,9}. Therefore, H3K27me3 demethylases could play an important role in *in vitro* chondrogenesis and could be used for cartilage engineering.

In vitro, genome wide study during MSC chondrogenic differentiation has revealed that histone modifications are dynamically regulated on chondrogenic genes allowing their expression. Indeed, while H3K27me3 mark is decreased on *sex-determining region Y (SRY) and related SRY- box 9 (Sox9)* and *aggrecan (ACAN)* promoters, epigenetic marks that are associated with gene expression including

H3K27ac, H3K4me3, H3K9ac and H3K36me3 are increased¹⁰. These data suggest that H3K27me3 demethylases Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome (UTX) and/or JMJD3 are crucial for cartilage gene expression during MSC chondrogenic differentiation.

In our study, we evaluated the role of the demethylases JMJD3 as well as UTX and the possible application for tissue engineering. We found that both JMJD3 and UTX controlled cartilage matrix genes expression whereas UTX was dispensable for chondrogenesis. H3K27me3 demethylases also enhanced cartilage formation after subcutaneous implantation in nude mice.

Material and methods

Stem cells amplification

Bone marrow was obtained from iliac crests of adult female donors (ages 53-77 years; median 64 years) that underwent a hip replacement surgery. All patients signed an agreement form according to local ethical committee named "Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III" (agreement #A13-D46-VOL.19). Cells were isolated as previously described¹¹. Cells were fractionated on a Hypaque-Ficoll (GE life science, Velizy-Villacoublay France) density gradient. Mononuclear cells were isolated, seeded at the density of $5 \cdot 10^4$ cells/cm² and cultured in alpha-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza, Levallois-Perret France), 2 mM L-glutamine, 1 ng/ml FGF-2 (Merck, Loiret France), and antibiotics (penicillin streptomycin, Lonza) at 37°C with 5% CO₂. The absence of DNA mycoplasma was verified by PCR. At confluency, cells were harvested by trypsinization (0.25% trypsin/1 mM EDTA, Invitrogen) and seeded at 10^3 cells/cm². Cells were used at passage 3 to 5.

Colonies forming unit capacity

MSC were seeded in 6 wells plate at low density (900 cells/cm²) and cultured 10 days (about 8 doublings). The cells were washed twice with PBS and incubated 30 min with a solution of 95 % ethanol and 0.1 % violet crystal.

Osteogenesis and adipogenesis culture and staining

MSC were cultured in an osteogenic medium ((Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Lonza) with 10% of fetal bovine serum (Lonza), antibiotics (penicillin streptomycin Lonza), 100 nM dexamethasone

(Merck), 50 mg/ml ascorbic acid-2-phosphate (Merck) and β -glycerol phosphate 10 mM (Merck)) or an adipocytic medium (DMEM with 10% of fetal bovine serum (Lonza), antibiotics (penicillin streptomycin Lonza), 100 nM dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine 0,5 mM (Merck)). After 14 days of culture, cells were washed with PBS 1X (Lonza) and were fixed 1 hour in Neutral Buffered Formalin (NBF PanReac AppliChem). Osteogenesis was evaluated by incubating the cells 20 min in a 2% alizarin red solution (pH=4.2), and adipogenesis by a 5 min incubation with 60% isopropanol and 15 min with neutral (0.3%) oiled red solution.

Chondrogenesis

Chondrogenesis was induced by cell culture in 3D (alginate) in chondrogenic medium. Cell cultures in alginate beads were performed as previously described¹¹. Briefly, MSC were suspended in alginate (Kelco) at the density of 5×10^6 cells/ml, dropped into CaCl_2 solution. After that, MSC were cultured in chondrogenic medium DMEM with antibiotics (penicillin/streptomycin, Lonza), 100 nM dexamethasone (Merck), 50 mg/ml ascorbic acid-2-phosphate (Merck), 40 mg/ml proline (Merck), 1 mM sodium pyruvate (Merck) and a 1:100 dilution of Insulin Transferin Selenium (ITS) +1 supplement (Merck), 10 ng/ml of TGF- β 3 (Merck). After culture, beads were dissolved in 55 mM sodium citrate, 150 mM NaCl and gently centrifuged to isolate cells for further analysis.

Plasmids, siRNAs and transfection

To overexpress UTX and JMJD3, pCMV-HA-UTX (#24168, Addgen) and pCMV-HA-JMJD3 (#24167, Addgen) were used respectively¹². Pmax-GFP was supplied by Amaxa. Pools of four control siRNAs (D-001810-10-50) or siRNAs directed against JMJD3 (L-023013-01-0005) or UTX (L-014140-01-0005) mRNA were obtained from Dharmacon.

For transfection, MSC were harvested and resuspended with P1 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Solution supplemented (Amaxa) with plasmid or siRNA. 4×10^6 of cells/DNA mixtures (8 μg) or 4×10^6 cells/RNA mixture (400 pmol) were added in a 1 cm^2 transfection cuvettes, and were nucleoporated according to the FF-104 predefined program using 4D-Nucleofector™ X Unit (Amaxa). 10 minutes after electroporation, cells were encapsulated in alginate beads and transferred to six-well plates and cultured on chondrogenic medium. The transfection was validated by cytometry after transfection of fluorescein coupled-siRNA (sc-36869, Santa Cruz Biotechnology) or pmaxGFP.

RNA isolation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA was extracted with NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Hoerdts France) according to manufacturer's protocol. After extraction, RNA underwent a DNase treatment and were reverse transcribed into cDNA as previously described¹³. Briefly, reverse transcription was done in mixture composed of 1µg of RNA, oligo dT (2.5 µM), 500 µM dNTP, 1X First Strand Buffer, 10 U/µL of Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (M-MLV-RT, Invitrogen Courtaboeuf France). The reaction lasts 50 min at 37°C then 15 min at 70°C using a thermocycler (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad Les Ulis France). Amplification of the generated cDNA was performed by real-time PCR using Step One Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems Courtaboeuf France) with the following primers; COL2A1-F: ACTGGATTGACCCCAACCAA; COL2A1-R: TTGGGAACGTTTGCTGGATT; RPL13A-F: GAGGTATGCTGCCCCACAAA; RPL13A-R: GTGGGATGCCGTCAAACAC; ACAN-F: TCGAGGACAGCGAGGCC; ACAN-R: TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA; SOX9-F: CCCATGTGGAAGGCAGATG; SOX9-R: TTCTGAGAGGCACAGGTGACA; SOX5-F: ATCCCAACTACCATGGCAGCT; SOX5-R: TGCAGTTGGAGTGGGCCTA; SOX6-F: GCAGTGATGAACATGTGGCCT; SOX6-R: CGTGTCCCAGTCAGCAGCATCT; UTX-F: TACAAATCCCGAACAACCC; UTX-R: TGAGGAGGCCTGGTACTGT; JMJD3-F: AGCTGGCCCTGGAACGATA; JMJD3-R: GGCCCTGGTAAGCATTT. The relative mRNA level was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. RPL13a was used as reference.

Protein extraction and western blotting

Cells were rinsed and then scraped into Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA lysis buffer) supplemented with inhibitors of phosphatases and proteases. The extracts (30 µg proteins) were subjected to fractionation by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad Marnes-la-Coquette France). Western blotting performed as previously described¹⁴. The following antibodies were used: JMJD3 (#3457) and UTX (D3Q1I) from Cell Signaling, β-actin (sc-47778), goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005) and goat antirabbit IgG-HRP (sc-516087) from Santa Cruz Biotechnology.

Gene expression microarray analysis

RNA integrity was assessed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies France, Les Ulis, France) using RNA 6000 Nano (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions. RNA integrity numbers above 9 were considered suitable for microarray analysis. Two-color microarray-based gene expression analysis was performed, according to the manufacturer's instructions (Agilent

Technologies). Briefly, 100 ng of total RNA were amplified and labeled using a Low input Quick Amp Labeling kit, Two-color (Agilent Technologies), and hybridized to a Human Gene Expression 8 × 60K v3 Microarray (design ID 072363, Agilent Technologies). Slides were scanned on a G2505C Microarray Scanner (Agilent Technologies). Raw data were extracted and Lowess normalized using Feature Extraction software (v. 10.7.3, Agilent Technologies), and analyzed using GeneSpring GX software (v. 13.1.1, Agilent Technologies). Microarray probes with a signal that is not positive and significant or not above the background were filtered out. Genes with a p-value ≤ 0.01 and a fold changes ≤ 2 were considered as differentially expressed genes (DEGs).

Gene-annotation enrichment analysis and Protein-Protein Interaction (PPI) network construction.

Protein-protein interaction network among differentially expressed genes was constructed using Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING v. 11)¹⁵. Networks with a p-value ≤ 0.05 were considered significantly enriched in interactions. Functional enrichment in the network with a False discovery rate (FDR) < 0.05 were considered significant.

In vivo experiments

Animal experimental procedures were performed according to local legislation, and procedures were approved by ethics committee (Comité d’Ethique Normandie en Matière d’Expérimentation Animale, agreement #19573) and authorized by the French Ministry of research.

30 NMRI-Foxn1 nu/nu (7 weeks of age, males provided by Janvier Lab) were housed 5/cage under a 12-hour light/dark cycle with *ad libitum* access to water and food. Cages were kept in a completely germ-free facility (ONCOModels 30 m² Cyceron, Caen France). Each animal was humanely handled throughout the experiment in accordance with internationally accepted ethical principles for laboratory animal use and care, and all efforts were made to minimize animal suffering.

Cellularized alginate were implanted subcutaneously in nude mice in a sterile environment. During the procedure, mice were anesthetized with 2% isoflurane. One incision of 5 mm was realized in the dorsal region and another in the lumbar region of the skin. At each lateral sides of the lesions, two subcutaneous pouches were created to place the beads. To reduce animal number, each mice received four beads: untransfected cells (Ctrl), JMJD3, UTX or GFP transfected cells.

After 4 weeks, mice were anesthetized and then euthanized with CO₂. 5 mice were used for collagen measurements and one or two specimens per condition were used to have 20 to 30 mg of tissue

required. 15 mice were used for immunohistochemistry. Specimens were collected and embedded in Optimal Cutting Temperature (OCT) compound.

Histochemistry and immunofluorescence

Sections with 10 µm thickness were prepared using a cryostat (CM3050 S, Leica). Slides were thawed and incubated at room temperature for 30 min. Sections were incubated 5 min with Fast-green to non-specific staining and 5 min with Safranin-O to stain cartilage.

For immunofluorescence, sections were washed once with Phosphate Buffered Saline (PBS, Lonza) for 5 min. After that, slides were incubated overnight at 4°C with a solution composed by PBS, 0.25% Triton x100, 1% BSA and 1/500^e dilution of Collagen I (ab34710 Abcam), Collagen II (ab34712 Abcam) or Aggrecan (AB1031 MerckMillipore) antibodies. Next, slides were washed and incubated for one hour with a solution composed by PBS, 0.25% triton, 1% BSA, Hoechst solution (1/1000^e) and dilution of 1/400^e Alexa Fluor 594 Goat IgG Anti Rabbit IgG (111-585-003, Jackson). Fluorescence was evaluated using EVOS FL Auto 2 Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific Illkirch-Graffenstaden France).

Insoluble collagen assay

Collagen content was determined using Sircol (S2000 Insoluble collagen assay, Biocolor) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 550 nm using Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific).

Statistical analysis

Statistical significance was determined by Student's t-test. P-values less than 0.05 were considered significant. For in vitro study, at least three independent experiments were performed using cells obtained from different patients.

Results

hBM-MSC isolation and validation

First, we evaluated the quality of our cells. Human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSC) were isolated from osteoarthritis donors. After amplification, hBM-MSC differentiation and colony forming unit potential were evaluated. As expected, cells were able to form colonies (figure 1A), and

under adequate conditions, they were able to undergo adipogenic differentiation as shown by the staining of lipid vacuoles with oiled red O (figure 1B) and osteogenic differentiation as demonstrated by the alizarin red staining (figure 1C). Finally, we checked the ability of cells to undergo chondrogenesis (figure 2D). We cultivated hBM-MSCs in alginate beads in a chondrogenic medium and observed an increase expression of chondrocyte specific markers such as COL2A1 and SOX9.

JMJD3 but not UTX is upregulated during hBM-MSCs chondrogenic differentiation

We then studied the role of H3K27me3 demethylases during MSC differentiation into chondrocytes. First, we evaluated how JMJD3 and UTX are regulated during chondrogenesis (figure 2A). Our results showed that JMJD3 was up-regulated during hBM-MSCs chondrogenic differentiation while UTX was stable.

GSK-J4 inhibits chondrogenesis

After that, we evaluated the impact of demethylases inhibition during chondrogenesis (figure 2B). We induced chondrogenesis of hBM-MSCs in the presence or not of GSK-J4, an inhibitor of both UTX and JMJD3¹⁶. We found that after 3 and 7 days, GSK-J4 inhibited the expression of SOX5 and SOX6 mRNA as well as ACAN and COL2A1 (figure 2C).

GSK-J4 regulates genes involved in extracellular matrix, cartilage and bone development

To identify GSK-J4-target genes, we compared gene expression profiling of MSCs after 7 days of chondrogenic differentiation with or without inhibitor (figure 4). We paid attention to genes whose expression was regulated by GSK-J4 with a fold-change above 2. We found 281 genes down-regulated by GSK-J4 (61,75%) and 174 genes up-regulated by GSK-J4.

We found that endochondral ossification and chondrocytes differentiation pathways were significantly enriched, with a majority of genes being down-regulated by GSK-J4 (Table 1). An important majority of down-regulated genes were clustered into pathways involved ECM (components, organization, ECM/receptor interaction) (Table 2, figure 3). Our previous observations regarding the effect of GSK-J4 on chondrogenesis are then confirmed by our functional enrichment in the network.

These results were consolidated by the protein-protein interaction network, where most of genes that were highlighted were involved in ECM formation, organization or interaction (figure 3). Furthermore, a significant part of up-regulated genes coded for metallothionein (MT) and belonged to the mineral

absorption pathway (Table 3). We also found that WNT pathway was enriched in our gene ontologies analysis (Table 3).

JMJD3 but not UTX knock-down inhibits chondrogenesis

To determine whether JMJD3 and/or UTX are involved in chondrogenesis, we knocked-down their mRNA using siRNA (figure 4A). Our transfection method had a 90% viability and 60-89% efficacy. First, JMJD3 and UTX downregulation by siRNA were confirmed by RT-PCR and western-blot (figure 4B, C). We found that siJMJD3 but not siUTX reduced SOXs, ACAN and COL2A1 expression compared to siCtrl (figure 4D). The results show the importance of JMJD3 for BM-MSc chondrogenic differentiation.

JMJD3 and UTX ectopic expression enhances chondrogenesis

Since demethylation inhibition decreased chondrogenesis, we hypothesized that their overexpression would have had the opposite effect. To test this assumption, we transfected JMJD3 or UTX expression vectors in BM-MSc before inducing chondrogenesis for 7 days (figure 5A). Our results indicate that both UTX and JMJD3 enhanced ACAN and COL2A1 mRNA expression and tend to increase SOX9, 5 and 6 (figure 5B). These data suggest that JMJD3 and UTX enhance chondrogenesis.

JMJD3 and UTX enhance *in vivo* cartilage formation

We finally evaluated the potential application of demethylases overexpression for tissue engineering since it enhanced chondrogenesis *in vitro*. We subcutaneously implanted alginate beads in nude mice after overexpression of JMJD3, UTX or GFP (as control) and 7 days of chondrogenesis. Four weeks later, mice were euthanized and specimens dissected. Disks containing cells overexpressing UTX and more significantly JMJD3, were larger (320 and 528 mm² respectively) than disks containing non-transfected cells (Ctrl) or pGFP (213 and 165 mm² respectively) (figure 6B, C). Moreover, type II collagen was more expressed in UTX and JMJD3 conditions. However, we detected no difference in aggrecan expression nor in expression of type I collagen (figure 6B). We also analyzed total collagen content in the obtained tissues. As shown in figure 6D, JMJD3 overexpression increased collagen content (140 µg/mg of tissue) compared to GFP (103 µg/mg of tissue).

Discussion

In this study, we highlighted that JMJD3 and UTX demethylases enhance hBM-MSC chondrogenic differentiation. Moreover, we have proved the application of H3K27me3 demethylases in cartilage engineering.

Tissue engineering is a promising strategy to repair cartilage damages in OA patients. This method made significant progress throughout the years, especially with the new insights found on endochondral ossification. Indeed, research on cartilage development during embryogenesis is the best inspiration for cartilage engineering⁴. Epigenetic regulation plays a preponderant role during both osteochondral ossification and *in vitro* chondrogenesis⁵.

We found that treatment of BM-hMSC with GSK-J4 reduces SOX5, 6, ACAN and COL2A1 expression during chondrogenesis. In addition. Most genes regulated by GSK-J4 belong to the extracellular matrix, chondrogenesis and endochondral ossification processes. Furthermore, our results suggest a role of Wnt pathway. Wnt is an essential factor for growth plate and craniofacial development and during embryogenesis^{5,17}. *In vitro*, studies showed that Wnt signaling promotes chondrogenic gene expression and cartilage formation^{18–20}. Thus, since JMJD3 and/or UTX regulate Wnt pathway, GSK-J4 might inhibit chondrogenesis by altering their interaction. It has been demonstrated that JMJD3 and UTX regulate Wnt signaling in other differentiation systems. For instance, JMJD3 enhances odontogenesis (teeth development) by activation Wnt pathway²¹. Similarly, UTX mediates adipogenic differentiation by enhancing Wnt signaling²². Interestingly, an important part of genes that are up-regulated by GSK-J4 during chondrogenesis belong to the metallothionein (MT) pathway. During skeletal development, MT are induced by the increase of ions such as Zn²⁺ and Cd^{23–27}. Thus, GSK-J4 may alters Zn²⁺ or Cd regulation inducing the expression of MT.

We also have shown that siJMJD3 inhibits BM-MSC chondrogenic differentiation by counteracting ACAN, COL2A1, SOX5 and SOX6. These results are confirmed by the role of JMJD3 during endochondral ossification. Indeed, JMJD3 knock-out (KO) alters skeletal development by inhibiting both early and late chondrogenesis^{8,9}. Moreover, JMJD3 KO reduces COL2A1 expression and accelerates cartilage damages during osteoarthritis. JMJD3 is therefore primordial for cartilage development and homeostasis⁹. We did not observe the same effect with siUTX, meaning that most of GSK-J4 effect on chondrogenesis are due to JMJD3 inhibition. This result might be explained by the fact that only JMJD3 is regulated in our chondrogenesis model. The same observation had been made in another study where only JMJD3 was increased during 2D MSC chondrogenic differentiation²⁸. Another team found that H3K27me3 is erased on chondrocytes specific genes : SOX9, 5, 6, COMP, ACAN, COL11A2,

COL11A1, COL9A3, COL9A2¹⁰. However, authors were not able to observed any regulation of COL2A1 locus during chondrogenesis¹⁰. This result might be due to the differences between our models. Indeed, we used alginate bead and TGF- β 3 as the only growth factor, while they used alginate discs and they supplemented the medium with TGF- β 3 and bone morphogenetic protein 2 (BMP2).

Furthermore, we confirmed the implication of H3K27 demethylases on chondrogenesis by overexpression. We found that JMJD3 and UTX ectopic expression enhances ACAN and COL2A1 expression. The fact that siUTX had no impact on chondrogenesis in contrast to pUTX may be explained by its transcriptional regulation. Generally, JMJD3 is considered to be induced by stimuli while UTX is expressed at basal level whatever the conditions^{12,29,30}. We made indeed the same observation in our chondrogenic model. The knock down of UTX may have no effect on chondrogenesis because UTX was already at a very low level of expression. Therefore, UTX and JMJD3 seem to have the same role but seem to be regulated differently.

Finally, we demonstrated for the first time that JMJD3 and UTX overexpression enhances cartilage formation *in vivo*. After subcutaneous implantation, UTX and especially JMJD3 overexpressing tissue were significantly larger and contained more collagen II. This data is encouraging and give better understanding of the role of epigenetic in chondrogenesis and new insights on how it could improve cartilage engineering protocols.

To conclude, this study demonstrates that JMJD3 and UTX enhance chondrogenesis and have the potential to improve current cartilage engineering protocols.

Acknowledgements

This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-15-CE14-0002-01], Région Normandie, European Union [FEDER/FSE 2014-2020 – 16E00779/16P03685], and Société Française de Rhumatologie (SFR).

References

1. Brittberg, M. *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**, 889–895 (1994).
2. Duval, E. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **60**, 3038–3048 (2009).
3. Baugé *et al.* Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments, Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments. *Stem Cells Int. Stem Cells Int.* **2015**, **2015**, e438026 (2015).
4. Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J. & Noël, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* **27**, 307–314 (2009).
5. Allas, L., Boumédiene, K. & Baugé, C. Epigenetic dynamic during endochondral ossification and articular cartilage development. *Bone* (2018). doi:10.1016/j.bone.2018.10.004
6. Riddihough, G. & Zahn, L. M. What Is Epigenetics? *Science* **330**, 611–611 (2010).
7. Lui, J. C. *et al.* EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy. *Nat. Commun.* **7**, 13685 (2016).
8. Zhang, F. *et al.* JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice. *J. Mol. Cell Biol.* **7**, 23–34 (2015).
9. Dai, J. *et al.* Kdm6b regulates cartilage development and homeostasis through anabolic metabolism. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1295–1303 (2017).
10. Herlofsen, S. R. *et al.* Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* **14**, 105 (2013).
11. Duval, E. *et al.* Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 6042–6051 (2012).
12. Agger, K. *et al.* UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* **449**, 731–734 (2007).
13. Aury-Landas, J. *et al.* Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
14. Allas, L., Rochoux, Q., Leclercq, S., Boumédiene, K. & Baugé, C. Development of a simple osteoarthritis model useful to predict in vitro the anti-hypertrophic action of drugs. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* (2019). doi:10.1038/s41374-019-0303-0

15. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
16. Kruidenier, L. *et al.* A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* **488**, 404–408 (2012).
17. Gerhardt, B. *et al.* Notum attenuates Wnt/ β catenin signaling to promote tracheal cartilage patterning. *Dev. Biol.* **436**, 14–27 (2018).
18. Okura, T. *et al.* Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/ β -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Sci. Rep.* **9**, 2808 (2019).
19. Huang, X., Zhong, L., Hendriks, J., Post, J. N. & Karperien, M. The Effects of the WNT-Signaling Modulators BIO and PKF118-310 on the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
20. Öztürk, E., Hobiger, S., Despot-Slade, E., Pichler, M. & Zenobi-Wong, M. Hypoxia regulates RhoA and Wnt/ β -catenin signaling in a context-dependent way to control re-differentiation of chondrocytes. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
21. Zhou, Y. *et al.* Bivalent Histone Codes on WNT5A during Odontogenic Differentiation. *J. Dent. Res.* **97**, 99–107 (2018).
22. Shuai, Y. *et al.* MiR-199a-3p mediates the adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating KDM6A/WNT signaling. *Life Sci.* **220**, 84–91 (2019).
23. von Zglinicki, T. *et al.* Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *J. Cell Sci.* **103 (Pt 4)**, 1073–1081 (1992).
24. Litchfield, T. M. & Sauer, G. R. Metallothionein Induction in Calcifying Growth Plate Cartilage Chondrocytes. *Connect. Tissue Res.* **35**, 189–195 (1996).
25. Litchfield, T. M., Ishikawa, Y., Wu, L. N., Wuthier, R. E. & Sauer, G. R. Effect of metal ions on calcifying growth plate cartilage chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.* **62**, 341–349 (1998).
26. Sauer, G. R., Smith, D. M., Cahalane, M., Wu, L. N. Y. & Wuthier, R. E. Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* **88**, 954–969 (2003).
27. Won, Y. *et al.* Pleiotropic roles of metallothioneins as regulators of chondrocyte apoptosis and catabolic and anabolic pathways during osteoarthritis pathogenesis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 2045–2052 (2016).
28. Yapp, C., Carr, A. J., Price, A., Oppermann, U. & Snelling, S. J. B. H3K27me3 demethylases regulate in vitro chondrogenesis and chondrocyte activity in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 158 (2016).
29. Van der Meulen, J., Speleman, F. & Van Vlierberghe, P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics* **9**, 658–668 (2014).

30. Arcipowski, K. M., Martinez, C. A. & Ntziachristos, P. Histone demethylases in physiology and cancer: a tale of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **36**, 59–67 (2016).

Tables

Table 1: Functional enrichment in the network, Biological Process (GO)

#term ID	Pathway description	FDR	Matching proteins in the network
GO:0030198	Extracellular matrix organization	6.10E-11	ACAN,ADAMTS9,ADAMTSL2,CCDC80,COL10A1,COL11A2,COL27A1,COL2A1,COL5A2,COL9A2,COL9A3,FERMT1,FMOD,GREM1,HAPLN1,HAS2,IBSP,IHH,ITGB3,LAMA1*,LOXL2,LUM,MATN3,MMP13,OLFML2A,SCUBE3,SMO C2,SOX9,SPARC,SPP1,SULF1
GO:0002062	Chondrocyte differentiation	0.0002	COL27A1,COL2A1,FGFR3,HMGA2,IHH,PTH1R,RUNX1,SOX9,SULF1
GO:0051216	Cartilage development	0.00099	COL11A2,COL27A1,COL2A1,FGFR3,HMGA2,IHH,LUM,MMP13,PTH1R,RUNX1,SOX9,SULF1
GO:0001958	Endochondral ossification	0.0044	COL2A1,DLX5,FGFR3,MMP13,PHOSPHO1*

* : GSK-J4 Up regulated genes

Table 2: Functional enrichment in the network, Cellular Component (GO)

#term ID	Pathway description	FDR	Matching proteins in the network
GO:0031012	Extracellular matrix	9.21E-11	ADAMTS9,ADAMTSL2,ASPN,CCDC80,CHADL,COL10A1,COL11A2,COL27A1,COL2A1,COL5A2,FMOD,HAPLN1,IBSP,IHH,LAMA1*,LEPREL1,LOXL2,LUM,MATN2,MATN3,MMP13,OLFML2A,OMD,PHOSPHO1*,SFRP1,SMOC2,SPARC,TGFB3,WNT11
GO:0005576	Extracellular region collagen-containing	2.11E-10	ACAN,ADAMTS16,ADAMTS9,ADAMTSL1*,ADAMTSL2,ANGPTL4*,ANTXR2*,APOL6,ASPN,CCDC3,CCDC80,CDCA8,CGREF1,CHADL,CKB,CLEC3A,COL10A1,COL11A2,COL27A1,COL2A1,COL5A2,COL9A2,COL9A3,CSTA,CTSC,CTS Z*,CXCL13,CXCL14,DKK1,DNM3,EPHB3,ERVMER34-1,FGF11,FGFBP2,FGFR3,FMOD,FNDC1,FTH1,GIG25,GPRC5B,GREM1,HAPLN1,HIST2H3A,IBSP,IGF1,IGFBP5,IHH,IL17RA,INHBB,KIF23,KITLG,LAMA1*,LEFTY2,LEPREL1,LOXL2,LRRC17,LUM,MATN2,MATN3,MIA,MMP13,NMB,NOTCH4,NPTX2,OLFML2A,OMD,PDGFRL,PENK,PHOSPHO1*,PLIN2,PNLIPRP3,PTX3,PYGL,RBP4,S100A1,SCG5,SCRG1,SCUBE3,SEMA3A,SERPINA5,SFRP1,SLC11A2,SMOC2,SPARC,SPP1,SULF1,TGFB3,THY1,TNFRSF25,TNFSF11,TPX2,WFDC1,WLS,WNT11
GO:0062023	Extracellular matrix	1.50E-05	CCDC80,COL11A2,COL27A1,COL2A1,COL5A2,LAMA1*,LEPREL1,LOXL2,LUM,MATN2,OMD,SFRP1,SMOC2,SPARC,TGFB3

* : GSK-J4 Up regulated genes

Table 3: Functional enrichment in the network, KEGG Pathways

#term ID	Pathway description	FDR	Matching proteins in the network
hsa04978	Mineral absorption	0.00018	ATP2B1*,FTH1*,MT1A*,MT1B*,MT1E*,MT1HL1*,MT1X*,MT2A*,SLC11A2*
hsa04512	ECM-receptor interaction	0.0082	COL2A1,COL9A2,COL9A3,HMMR,IBSP,ITGB3,LAMA1*,SPP1
hsa04310	Wnt signaling pathway	0.0358	DKK1,FZD4*,FZD9,LEF1,MYC,NFATC1,NKD2,SFRP1,WNT11

* : GSK-J4 Up regulated genes

Figure legends

Figure 1: hBM-MSC isolation and validation.

(A) hBM-MSC CFU capacity was evaluated. hBM-MSC were seeded at low density (900 cells/cm²) for 10 days and were stained with violet crystal.

(B-C) hBM-MSC ability to adipogenesis and osteogenesis was tested. hBM-MSC were cultivated in adipogenic or osteogenic medium for 14 days and stained with oiled red (B) or alizarin red (C) respectively.

(D) hBM-MSC chondrogenic differentiation validation. hBM-MSC were cultured in alginate beads in chondrogenic medium during 7 days. After treatment, RNA was extracted. mRNA relative expression of SOX9, and COL2A1 was determined by realtime RT-PCR.

Data are expressed as means \pm SEM relatives to gene expression in undifferentiated cell (n=3).

Figure 2: GSK-J4 inhibits chondrogenesis.

(A) Expression of JMJD3 and UTX in undifferentiated stem cells and differentiated stem cells after chondrogenesis.

(B) hBM-MSC were cultured in alginate beads in chondrogenic medium in the presence or absence of GSK-J4 during 7 days. After treatment, RNA was extracted and mRNA expression was determined by realtime RT-PCR.

(C) MRNA relative expression of chondrogenic markers SOX5, 6 and 9 as well as ACAN and COL2A1.

Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in undifferentiated cells (n=3). * = pvalue \leq 0.05, ** = pvalue \leq 0.001.

Figure 3: GSK-J4 regulates genes involved in extracellular matrix, cartilage.

Protein-protein interaction network of the genes regulated by GSK-J4 during chondrogenesis was constructed using String tools.

Figure 4: H3K27me3 demethylase knock-down inhibits chondrogenesis. (A) hBM-MSC were transfected with either siRNA control (siCtrl), siUTX and/or siJMJD3. After nucleofection, cells were cultured in alginate beads in a chondrogenic medium for 7 days.

RNA and proteins were extracted after treatment. Protein and mRNA relative expression of JMJD3 and UTX was evaluated by RT-PCR (B) and western blot (C).

(D) mRNA relative expression of SOX5, 6 and 9, ACAN and COL2A1 was determined by realtime RT-PCR.

Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in undifferentiated cell (n=3). * = pvalue \leq 0.05, ** = pvalue \leq 0.001.

Figure 5: JMJD3 and UTX enhance chondrogenesis.

(A) hBM-MSC were transfected with either empty vector (pCtrl), pJMJD3 or pUTX. After nucleofection, cells were cultured in alginate beads in a chondrogenic medium for 7 days.

(B) RNA was extracted after treatment. mRNA relative expression of SOX5, 6 and 9, ACAN and COL2A1 was determined by realtime RT-PCR.

Data are expressed as means \pm SEM relative to gene expression in undifferentiated cell (n=5). * = pvalue \leq 0.05, ** = pvalue \leq 0.001.

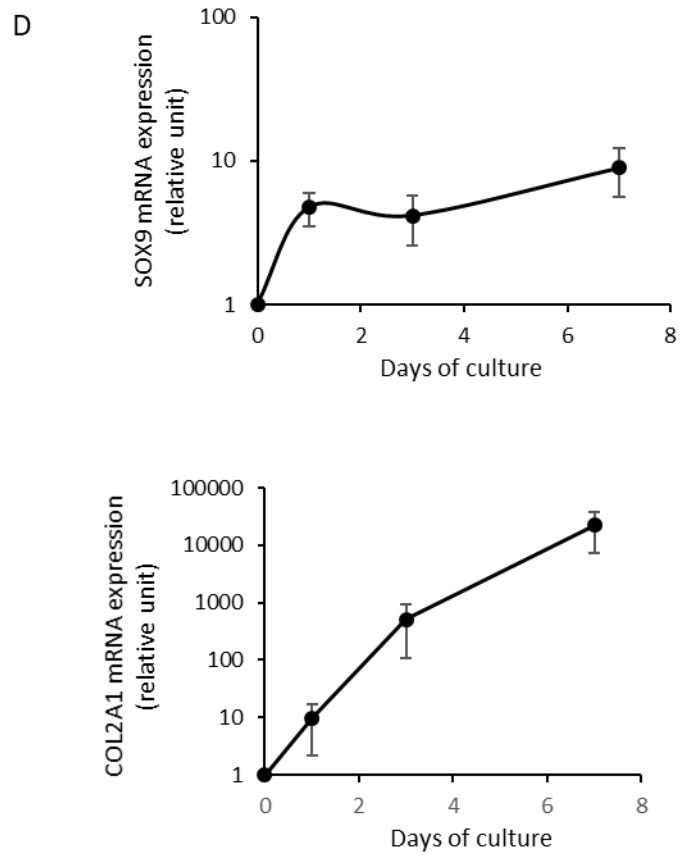
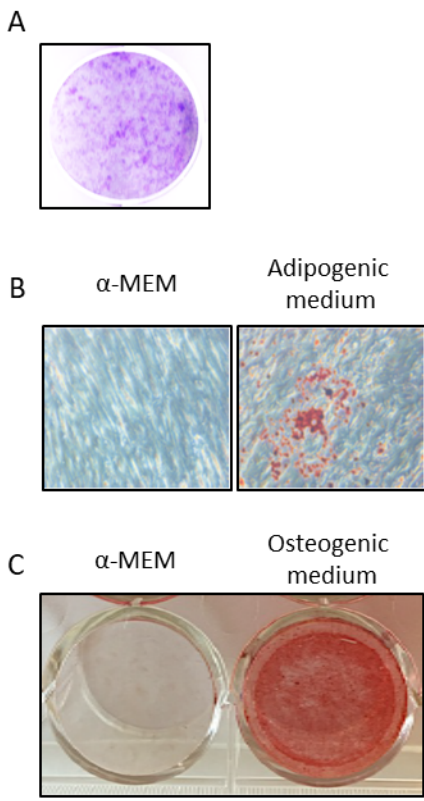
Figure 6: JMJD3 and UTX enhance *in vivo* cartilage formation.

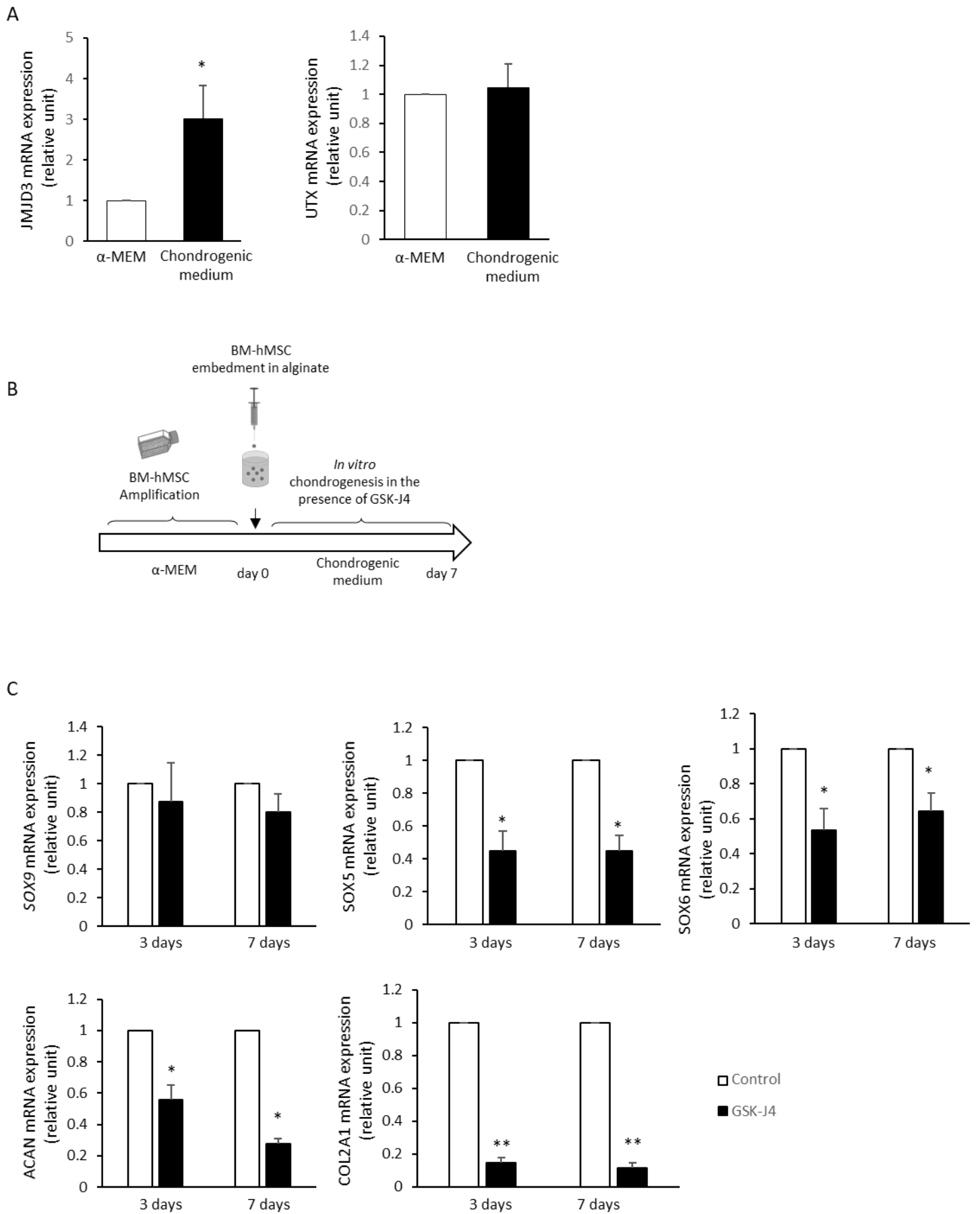
(A) After amplification and transfection hBM-MSC (P3-5) were embedded in alginate and cultured in a chondrogenic medium for 7 days. After that, 30 NMRI-Foxn1 nu/nu (7 weeks of age, males) received subcutaneously four different conditions of cellularized alginate beads (non transfected cells (Ctrl), JMJD3, UTX or GFP transfected cells).

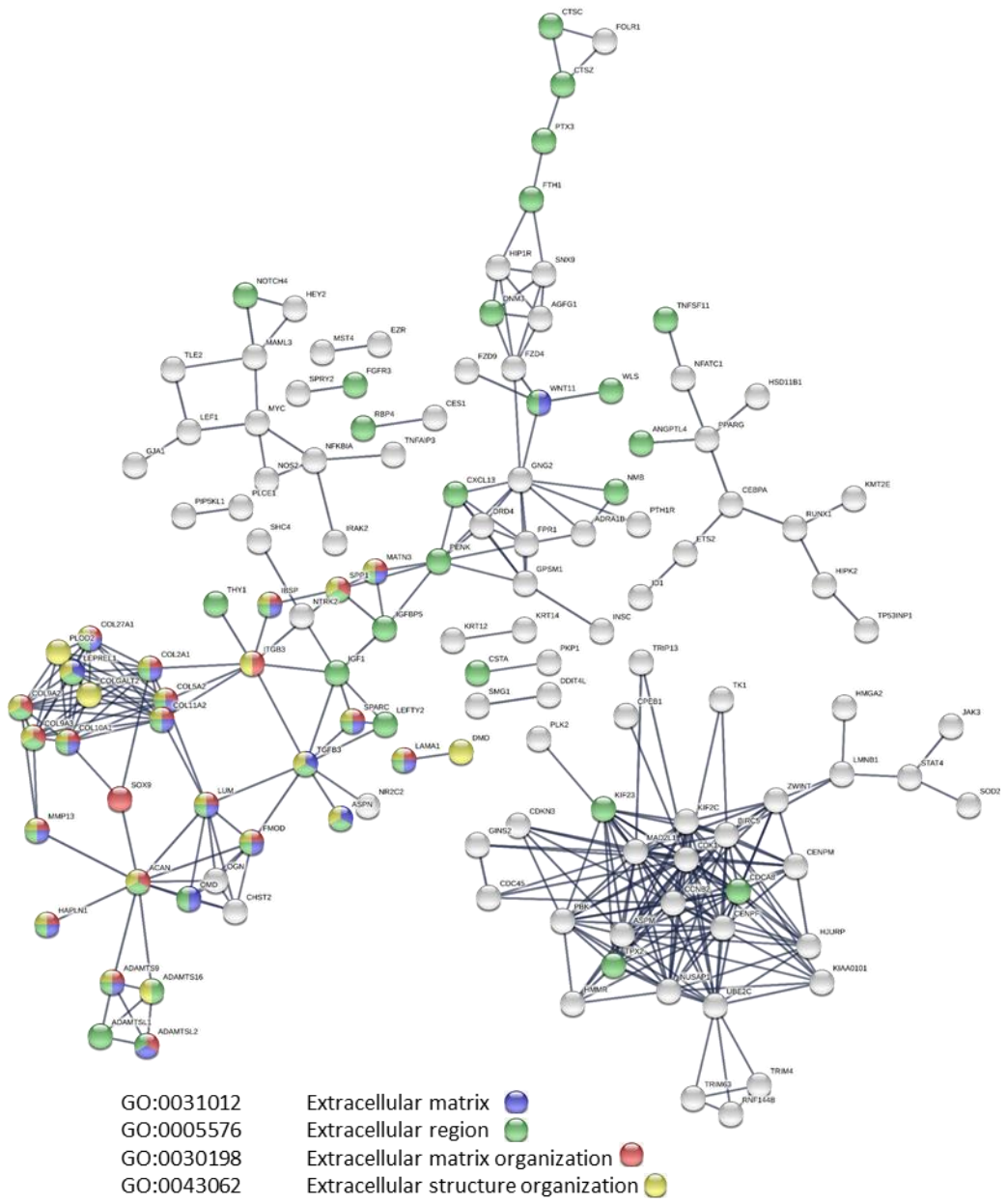
(B) After 4 weeks, specimens were collected, sections were made and incubated with safranin-O or with primary antibodies (Collagen I, Collagen II or Aggrecan). Images are representative of 15 independent experiments.

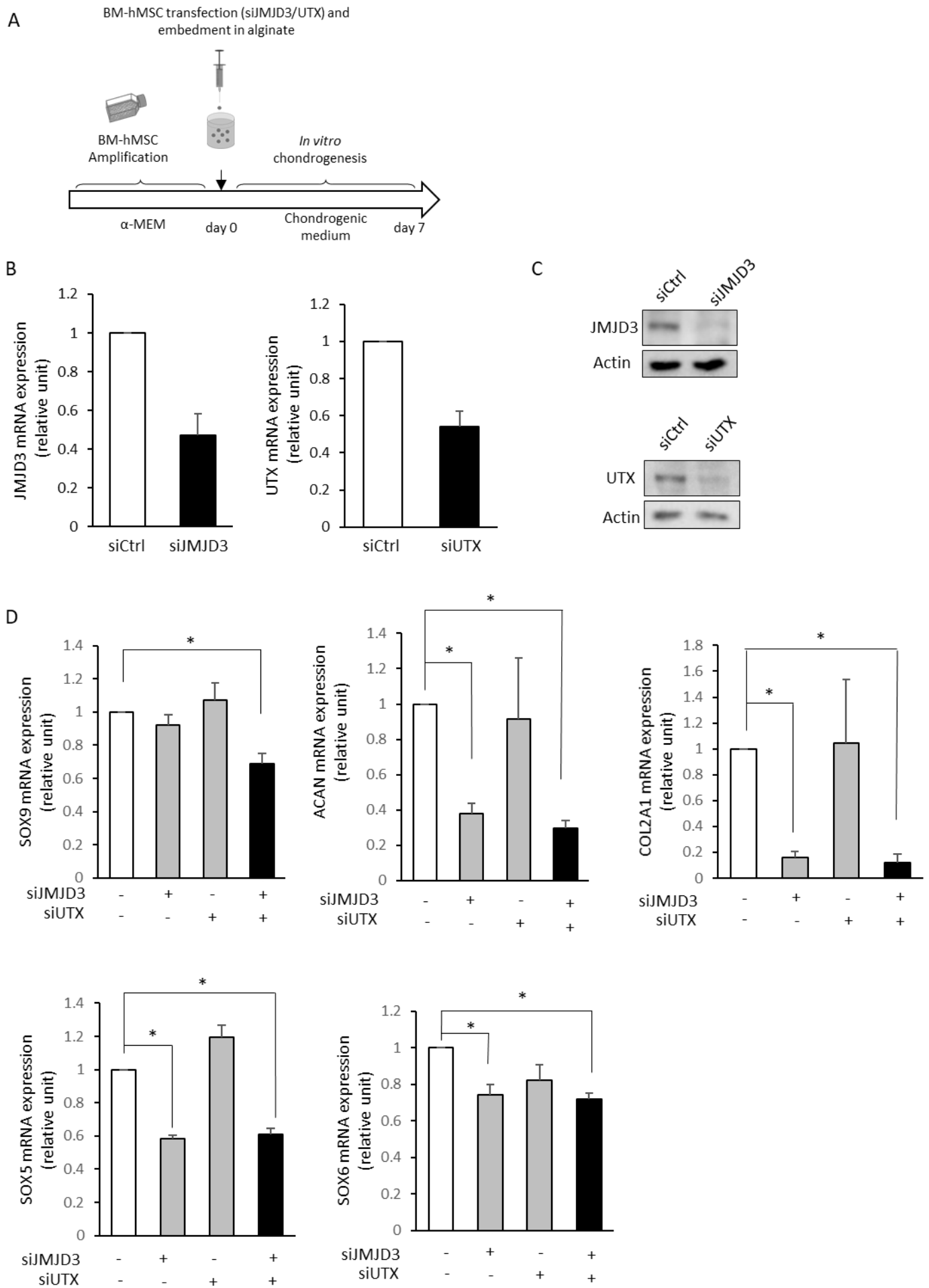
(C) Cartilage disk surface was measured, data are expressed as means \pm SEM (n=3 for GFP condition, n=4 for UTX condition and n=6 for JMJD3 condition)* = pvalue \leq 0.05, ** = pvalue \leq 0.001 compared to GFP).

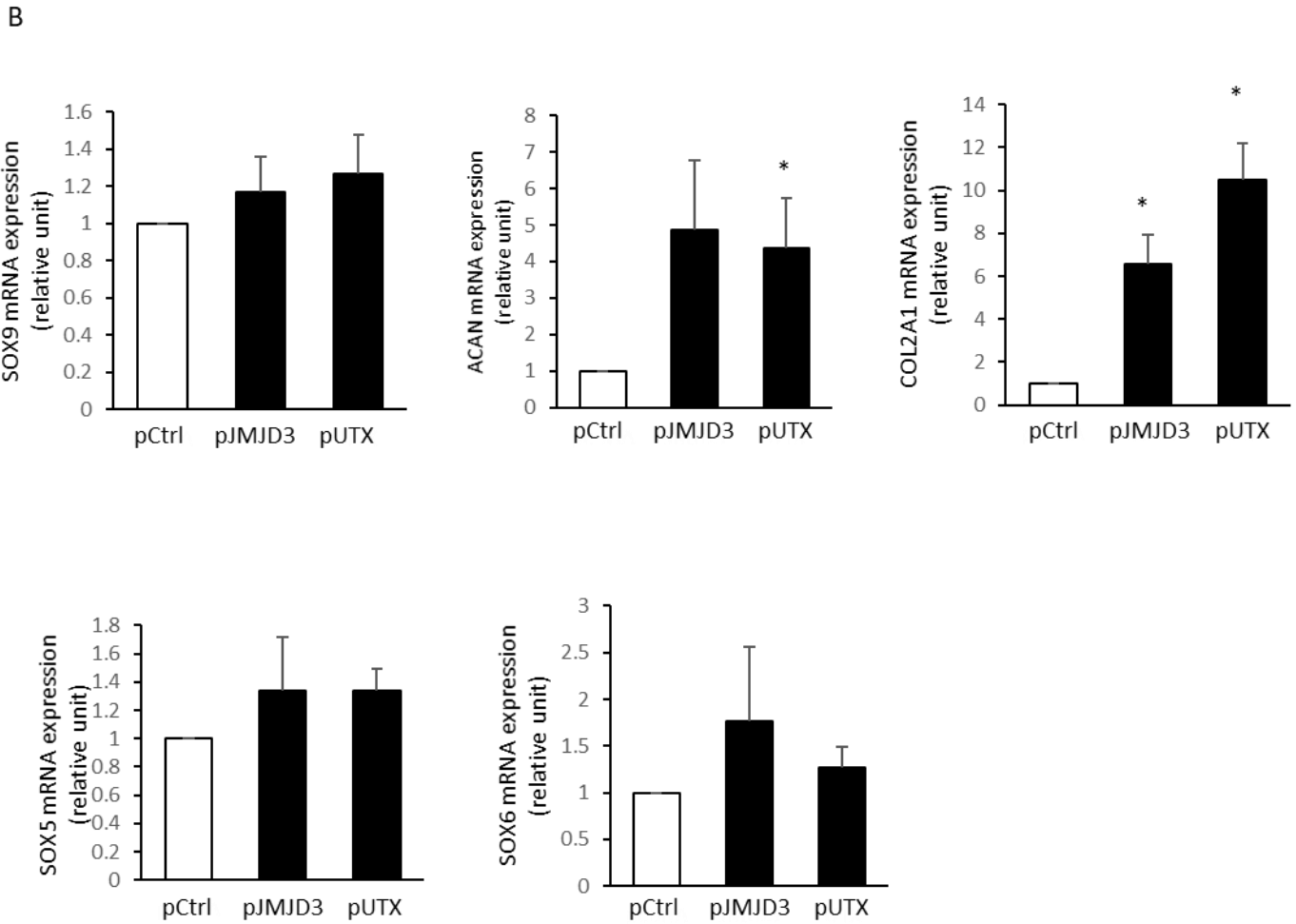
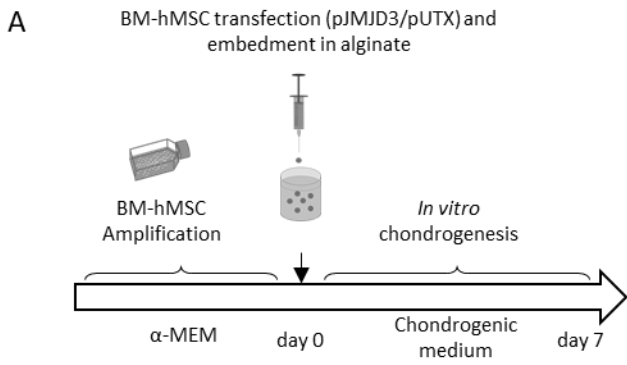
(D) Collagen concentration was determined using Sircol assay. data are expressed as means \pm SEM (n=3 for each condition), * = pvalue \leq 0.05 compared to pGFP).

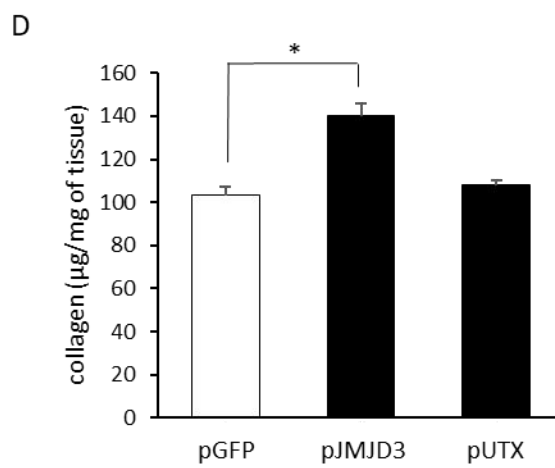
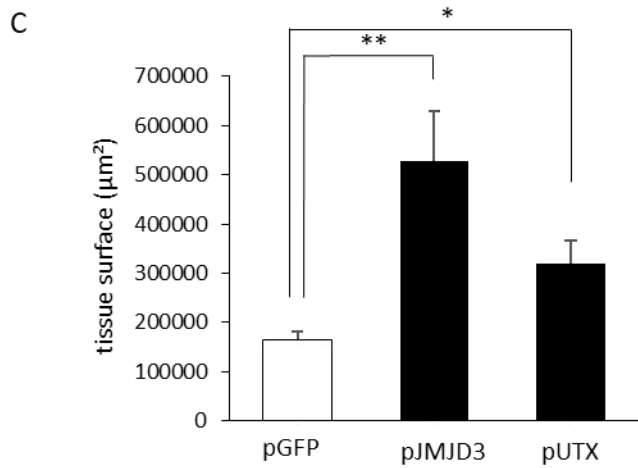
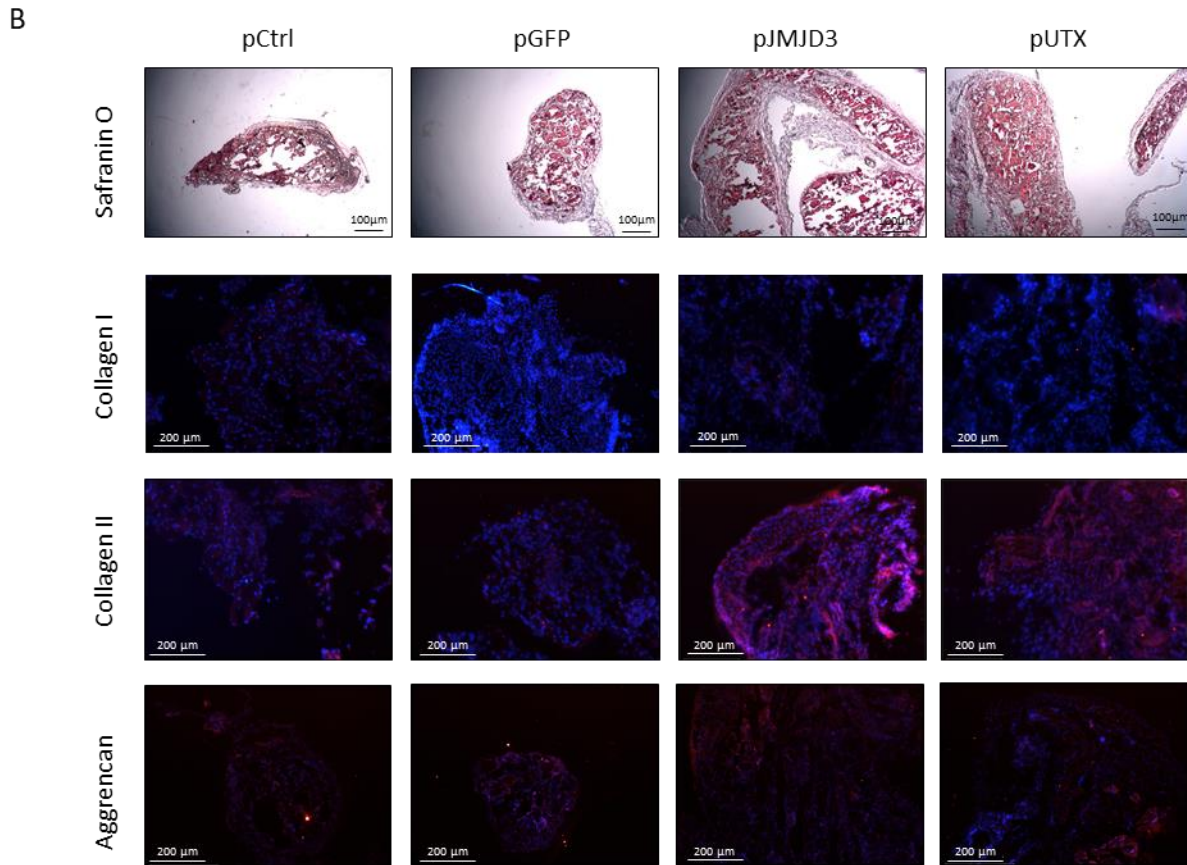
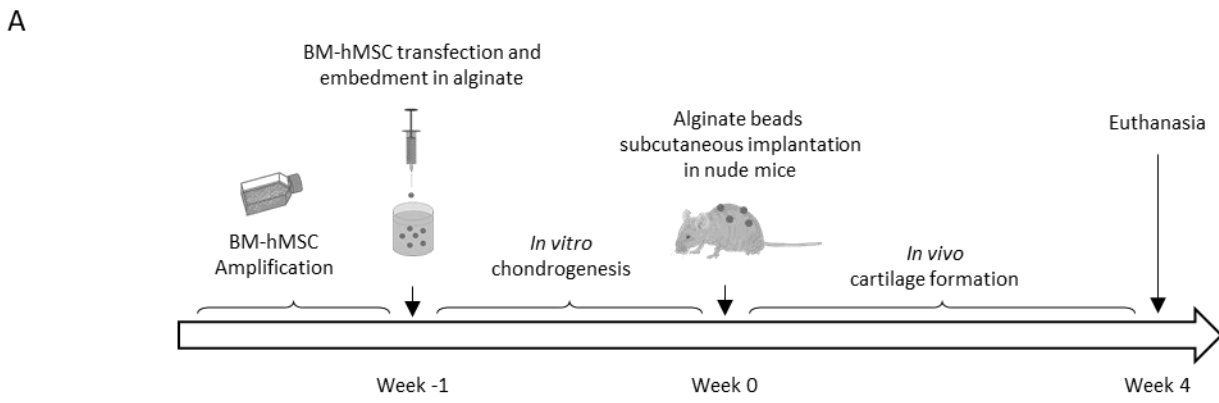












4 Discussion générale et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré l'importance de la tri-méthylation de H3K27 dans le cartilage. Nous avons mis en évidence qu'EZH2 est impliquée dans les processus d'inflammation, d'hypertrophie et de destruction du cartilage et que son inhibition réduit *in vivo* la dégradation du cartilage et le handicap locomoteur provoqués par la maladie. Par ailleurs, nous avons montré que JMJD3 et UTX favorisent la chondrogenèse à partir de cellules souches mésenchymateuses (MSC) et que la surexpression de JMJD3 et UTX permet *in vivo* d'obtenir une meilleure qualité de cartilage. D'après nos résultats, la méthylation de H3K27 régule l'homéostasie et le développement du cartilage.

L'inhibition d'EZH2 réduit l'inflammation, le catabolisme et l'hypertrophie des chondrocytes au cours de l'arthrose

Nos résultats montrent que l'inhibition de l'histone méthyltransférase EZH2 réduit l'inflammation dans les chondrocytes. Ces résultats sont en cohérence avec les données que nous avons obtenues précédemment en utilisant le DZNep (Aury-Landas et al., 2017). L'implication d'EZH2 dans le processus inflammatoire a également été démontrée dans d'autres pathologies. En effet, il a été montré qu'EZH2 favorise l'activation des macrophages, microglies et lymphocytes dans les maladies du système nerveux central et auto-immunes (Malhotra et al., 2018; Zhang et al., 2018b; Zhou et al., 2019a). Nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 par l'EPZ-6438 permet d'atténuer ses effets pro-inflammatoires, mais également pro-cataboliques et hypertrophiques. Les effets *in vitro* sont en accord avec nos observations *in vivo* montrant que l'inhibition d'EZH2 réduit les atteintes tissulaires et améliore la motricité chez les souris arthrosiques.

La spécificité d'EPZ-6438 envers EZH2 est relativement bonne ($K_i=2,5$ mM). Cet inhibiteur a une sélectivité 35 fois plus forte envers EZH2 qu'EZH1 et plus de 4500 fois plus forte envers EZH2 comparée aux autres histones méthyltransférases (Knutson et al., 2014). Nous aurions voulu confirmer le rôle d'EZH2 dans les chondrocytes par la stratégie d'interférence par ARN. Toutefois, nous avons rencontré des difficultés. Dans un premier temps, notre méthode de transfection de siRNA a été validée en utilisant un siRNA fluorescent (figure 43).

Ainsi, bien que l'efficacité de transfection soit excellente (figure 41A) et que le siEZH2 réduise l'expression d'EZH2, il n'a pas d'effet sur l'expression des MMP1,3 et 13 (figure 41B, C). Ceci peut être expliqué par le fait que dans nos conditions expérimentales le siEZH2 n'a pas réduit H3K27me3 en présence d'IL-1 β (figure 41D). Nous sommes néanmoins confiants sur la spécificité de l'EPZ-6438 dans nos expériences, puisque la surexpression d'EZH2 a eu les effets inverses.

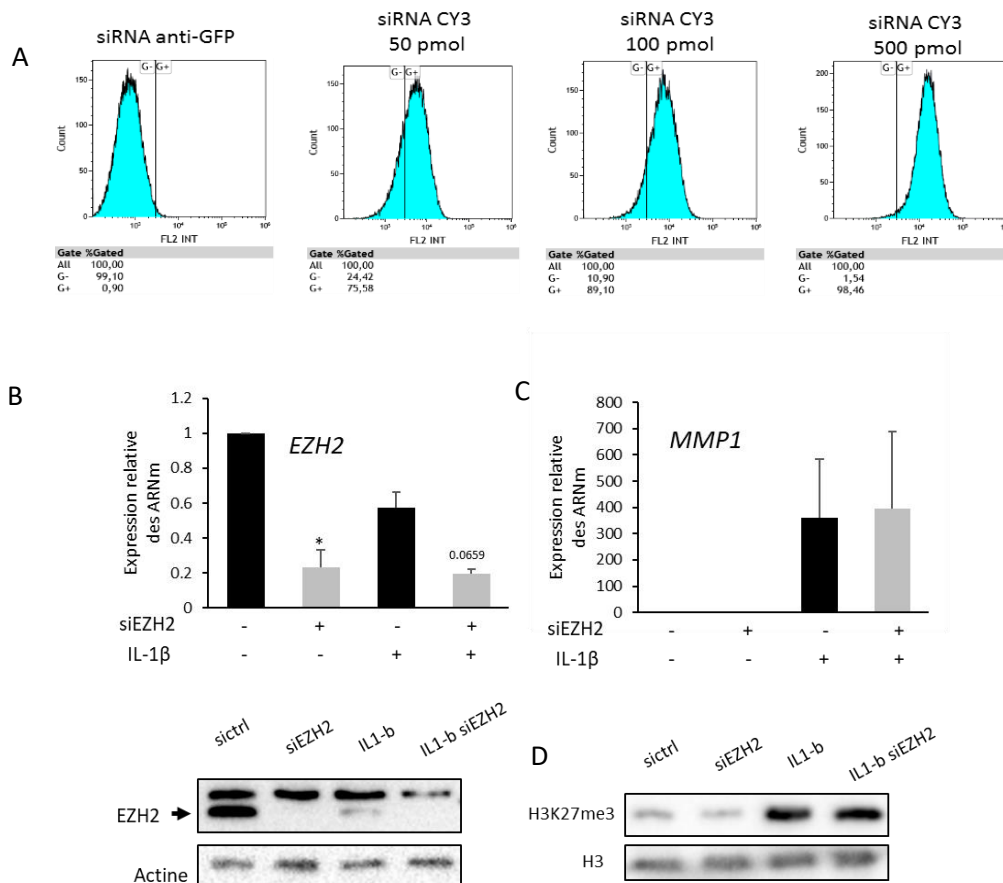


Figure 41 : L'inhibition d'EZH2 par siRNA ne réduit pas l'expression de MMPs.

(A) Validation de la méthode de transfection de siRNA par nucléofection. Les HAC ont été transfectés par siRNA EZH2 ou sictrl puis incubés en présence ou non d'IL-1 β (1ng/ml) pendant 48h. (B) RT-PCR et westernblot d'EZH2 ont été effectués. (n=3, \pm SEM, * p-value \leq 0.05). (C) RT-PCR de MMP1. (D) Western blot de H3K27me3.

Choix du modèle animal

Nous avons utilisé comme modèle d'arthrose expérimentale, la ménisectomie par section du ménisque médial chez la souris. Ce modèle a l'avantage de mettre en jeu tous les composants de l'articulation. En effet, en fonction du grade OARSI, les articulations peuvent présenter une érosion du

cartilage et de l'os sous-chondral, une synovite et une croissance d'ostéophytes. Nous avons également testé le modèle d'injection de Monosodium iodoacetate (MIA) intra-articulaire. Nous avons constaté sur des coupes histologiques que le modèle méniscectomie induit bien plus de dommages (scores OARSI moyen 4.5) comparé au modèle MIA (scores OARSI moyen 2) (figure 42).

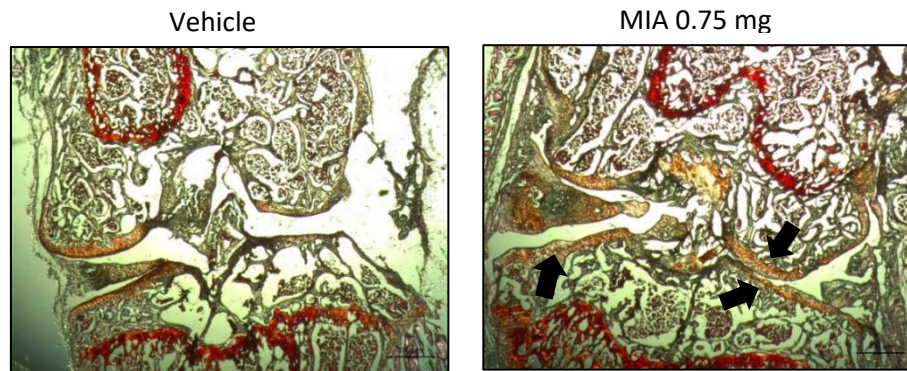


Figure 42 : Le modèle méniscectomie induit plus de dommages que le modèle MIA.
Les coupes ont été marquées par une coloration safranin-O/fast green, les flèches pointent vers des lésions du cartilage. Monosodium iodoacetate (MIA).

Pour cette raison et pour le fait que le modèle méniscectomie soit plus complet, nous avons décidé de tester dans un premier temps l'EPZ-6438 sur le modèle méniscectomie. C'est par ailleurs le modèle le plus utilisé dans la littérature. Néanmoins, comme tous les modèles animaux, le modèle méniscectomie présente des avantages et des inconvénients. Les modèles chirurgicaux comme celui-ci, utilisent des souris jeunes alors que l'arthrose se développe très largement chez les patients âgés. De plus, l'intervention chirurgicale doit être réalisée avec exactitude pour ne pas ajouter une variabilité dans les résultats. C'est pourquoi, il serait pertinent d'évaluer l'effet de l'EPZ-6438 sur d'autres modèles arthrosiques tels que le modèle MIA, qui est décrit comme le plus apte à l'étude de la douleur induite. Il existe également le modèle de luxation transitoire de l'articulation dans lequel l'animal est placé dans un appareil qui exerce une pression sur sa patte arrière (Christiansen et al., 2012). La pression provoque le déplacement antérieur du tibia. Ce modèle a l'avantage d'être reproductible puisqu'il ne nécessite pas d'intervention humaine. Cependant, l'appareil est toujours en cours de développement et n'est pas accessible à toutes les unités de recherche travaillant dans le domaine de la rhumatologie. Il existe également des souches de souris telles que les STR/ort qui développent spontanément de l'arthrose (Fang and Beier, 2014). L'avantage de ce modèle est qu'il ne nécessite aucune intervention. Néanmoins, l'arthrose ne se développe pas dans toutes les souris et il nécessite une période d'hébergement de plus de 20 semaines pour observer les premiers signes d'arthrose (Fang

and Beier, 2014). L'utilisation de modèles d'obésité est également très pertinente. Ces modèles consistent à alimenter les animaux avec un régime fort en glucides et lipides. Ces modèles permettent d'étudier l'arthrose causée par la surcharge pondérale et le dérèglement métabolique lié à la libération d'adipokines. Cependant, comme le modèle STR/ort, celui-ci nécessite une longue période d'hébergement en animalerie et toutes les souris ne développent pas nécessairement d'arthrose (Datta et al., 2017).

Compte tenu de nos résultats, il sera judicieux de poursuivre le développement de nos études *in vivo* jusqu'au stade clinique. Dans cette perspective, l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) impose d'évaluer l'intérêt thérapeutique d'une molécule sur un modèle rongeur et un modèle non-rongeur. Le chien est un bon modèle car beaucoup développent l'arthrose au cours de leur vieillissement (Meeson et al., 2019). Les chevaux de compétitions sont également très concernés par l'arthrose due à l'usure de leurs articulations. Le porc du fait de sa proximité avec l'homme est aussi un bon modèle d'étude, cependant l'arthrose doit être induite dans cet animal (McCoy, 2015).

L'inhibition d'EZH2 améliore l'activité locomotrice des souris arthrosiques et probablement la douleur

Les traitements vis-à-vis d'un malade visent à guérir, soulager les symptômes ou en prévenir l'apparition dans le but principal d'améliorer la qualité de vie. Selon l'OMS la qualité de vie se définit comme «la perception qu'a un individu de sa place dans l'existence, dans le contexte de la culture et du système de valeurs dans lesquelles il vit, en relation avec ses objectifs, ses attentes, ses normes et ses inquiétudes» (Group, 1994). En d'autres termes, la qualité de vie regroupe l'état physiologique et psychologique, le bien-être, la vie sociale et professionnelle. C'est pourquoi une thérapie efficace est d'abord celle qui va améliorer de manière significative la qualité de vie des patients.

La douleur est le symptôme le plus handicapant lors de l'arthrose. Celle-ci est un facteur d'isolement social, elle peut impacter la vie professionnelle et entraîner une dépression chez les patients (Thakur et al., 2014). Nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 atténue la perte de mobilité provoquée par l'arthrose dans notre modèle murin. En effet, nous avons montré pour la première fois que l'injection intra-articulaire d'EPZ-6438 augmente la durée cumulée de course et le nombre de redressements. Ceci peut être lié au fait que le traitement réduit la dégradation du cartilage et/ou la douleur. Nous avons utilisé l'actimétrie pour mesurer les redressements et la roue complexe pour mesurer la durée de course. D'autres tests permettant d'évaluer la douleur (filaments de Von Frey) ou la posture des animaux (incapacité statique) sont couramment utilisés pour l'étude des symptômes de l'arthrose.

Le Von Frey consiste à appliquer perpendiculairement des filaments de différentes forces sur les pattes arrières et de mesurer celui qui permet d'obtenir le retrait de celle-ci. Plus le seuil de sensibilité de retrait de la patte est faible plus la douleur ressentie par l'animal est importante. L'incapacitation statique consiste à poser les souris sur des capteurs qui permettent de mesurer la différence de charge pondérale supportée par les pattes arrières. Lorsqu'une patte est atteinte, l'animal tend à répartir son poids vers la patte saine. Nous avons tenté de mettre au point ces tests, mais les résultats obtenus avec ces deux méthodes n'ont pas été concluants, car nous n'avons pas observé de différence significative de seuil de retrait ou de charge supportée entre les souris normales et opérées (figure 43). Cela peut être dû à un manque d'expérience des expérimentateurs et/ou des outils non adaptés ou pas assez sensibles pour mesurer la douleur chez les souris.

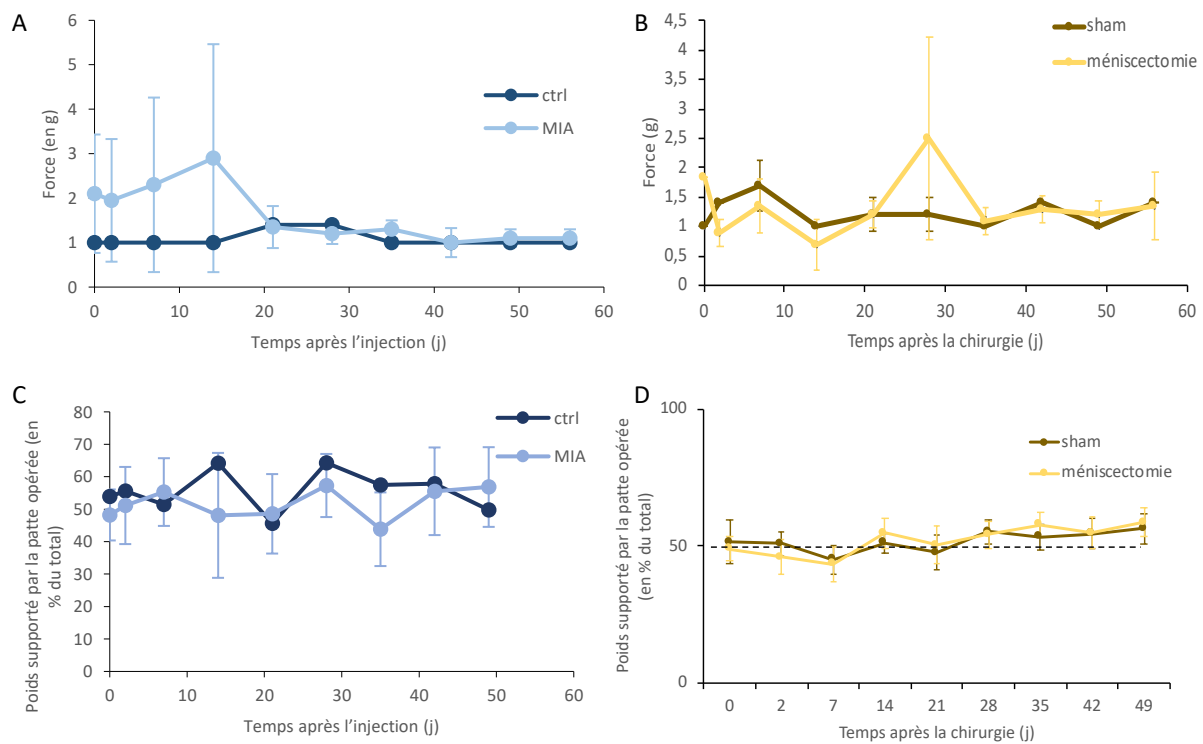


Figure 43 : Tests d'évaluation de la douleur.

(A, B) Mesure de l'allodynie mécanique. L'allodynie mécanique est évaluée à l'aide des filaments de Von Frey. Les valeurs représentent la force maximale exercées avant le retrait de la patte. (C, D) Mesure de l'incapacitation statique. Les changements dans la distribution pondérale entre les deux pattes arrières sont évalués par le test d'incapacitation statique. L'appui sur la patte droite (qui a reçu l'injection) est exprimé en pourcentage de la somme de l'appui sur la patte droite et de l'appui sur la patte gauche (en pourcentage). Les valeurs représentent les moyennes pour chaque groupe \pm SEM. Groupe sham (B, D n=2), groupe contrôle (A, C n=2), groupe ménisectomie (B, D n=3), MIA (A, C n=3).

L'EPZ-6438 pourrait réduire la douleur en réduisant la libération du NGF dans l'articulation. En effet, nous avons mis en évidence qu'EZH2 induit l'expression du NGF dans les chondrocytes. Le NGF joue

un rôle clef dans les processus de douleur, en particulier ceux associés à inflammation. Le NGF est libéré à la suite d'une lésion tissulaire et se fixe sur les récepteurs *Tropomyosin receptor kinase A* (TrkA) présents sur les nocicepteurs qui entraînent la transduction du signal de douleur vers le cerveau. La suite de ces résultats sera d'évaluer *in vitro* la libération du NGF par les chondrocytes traités par l'IL-1 β et le TGF- β grâce à un test ELISA ayant une bonne sensibilité. En effet, nous avons déjà évalué la libération du NGF par test ELISA. Cependant, celui-ci n'a pas permis de détecter le NGF présent dans le milieu de culture. Des RT-PCR seront également réalisées afin de savoir si l'EPZ-6438 affecte l'expression du NGF dans l'articulation des souris arthrosiques. De plus, l'immunohistofluorescence du NGF dans l'articulation permettrait par ailleurs de connaître sa distribution tissulaire.

Il a été montré dans la littérature que l'injection intra-articulaire de NGF augmente la douleur chez les rongeurs (Ashraf et al., 2014). Un anticorps anti-NGF (Tanezumab) est par ailleurs utilisé en essai clinique. Les essais montrent que le Tanezumab réduit la douleur mais peut par ailleurs entraîner une accélération du développement arthrosique (Hochberg et al., 2016). C'est pourquoi la prise en charge de la maladie comprend la douleur, mais également la réduction de l'inflammation et la dégradation du cartilage. Une approche pertinente pour savoir si les effets de l'EPZ-6438 passent à travers une action du NGF, serait d'injecter le NGF et l'EPZ-6438 en intra-articulaire chez des souris normales. Le cas échéant, l'EPZ-6438 devrait dans cette situation réduire la douleur et le handicap.

En plus de la douleur et handicap, l'arthrose affecte aussi la santé mentale des patients. En effet, des études ont montré que 20% des patients atteints d'arthrose souffrent de dépression et d'anxiété (Tsuji et al., 2019). C'est pourquoi la suite de cette étude comportementale sera d'évaluer en collaboration avec Véronique Agin (Inserm UMR-S 1237 Phind), d'autres paramètres sur les souris arthrosiques comme notamment l'anxiété et la dépression. Il existe plusieurs tests de dépression et d'anxiété couramment utilisés dans les laboratoires de recherche en neuroscience (Belovicova et al., 2017). Le test *Open field* pourrait être employé pour mesurer l'anxiété. Ce test consiste à placer l'animal dans une enceinte fermée et mesurer ensuite ces déplacements. Les souris sont des animaux explorateurs de leur environnement, ce qui leur permet de prévenir un danger potentiel (Belovicova et al., 2017). Si l'EPZ-6438 réduit l'anxiété ou augmente la mobilité, l'activité exploratrice sera ainsi augmentée. Le test *Light-dark box* (LBD) permet également de mesurer l'anxiété. Il nécessite de placer l'animal dans une boîte comprenant un compartiment à l'obscurité et un autre à la lumière. Etant donné que les souris préfèrent l'obscurité elles resteront de préférence dans le compartiment sombre. Plus une souris est anxieuse moins elle ira explorer le compartiment lumineux (Belovicova et al., 2017). Ainsi, si notre traitement réduit l'anxiété, le temps passé dans le compartiment lumineux augmentera. S'agissant de la dépression le *Forced Swim Test* peut être envisagé. En effet, au cours de ce test l'animal

est placé dans un cylindre rempli d'eau. L'animal passe par une première phase d'hyperactivité où il tentera de sortir de l'eau, puis une deuxième phase de désespoir où il va s'immobiliser (Belovicova et al., 2017). Si l'EPZ-6438 affecte l'anxiété ou la mobilité, la durée de la première phase doit augmenter. Le *sucrose preference test* est aussi intéressant pour évaluer la dépression chez les souris arthrosiques. Dans ce test, l'animal a accès à de l'eau simple et de l'eau sucrée. Une souris normale va avoir une préférence pour l'eau sucrée, contrairement à une souris en dépression qui s'en désintéressera (Belovicova et al., 2017). Dans le cas où notre molécule réduit la dépression, elle devrait renforcer l'intérêt des souris arthrosiques pour l'eau sucrée.

Application de JMJD3 et UTX en thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire

Nous avons montré *in vitro* que la surexpression de JMJD3 et UTX favorise la chondrogenèse. D'autre part, nos analyses immunohistologiques montrent que la surexpression de JMJD3 et UTX favorise également la chondrogenèse à plus long terme après implantation *in vivo*. Des études complémentaires seront nécessaires afin de confirmer ces résultats en vue d'un passage en clinique. Des tests *in situ* (dans l'articulation) sur des modèles gros animaux devront être envisagés ainsi que des tests d'innocuité, car UTX et JMJD3 sont impliquées dans la tumorigène de certains cancers (Arcipowski et al., 2016). Si ces tests sont satisfaisants, un protocole clinique pourrait être mis en place.

D'abord l'origine des cellules doit être prise en considération. Les cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse peuvent être prélevées du patient avant la procédure ou à partir d'une banque de cellules histocompatibles. L'avantage de l'autogreffe est qu'il n'y a aucun risque de rejet. Cependant, les cellules devront être amplifiées ce qui diminuera leur potentiel chondrogénique. Il sera par ailleurs important de comparer l'efficacité de JMJD3 et UTX à favoriser la chondrogenèse de cellules souches issues d'origines différentes. En effet, nous avons utilisé des MSC provenant de la moelle osseuse, car c'est le type cellulaire le plus caractérisé dans la littérature. Par conséquent il sera intéressant d'évaluer l'impact de JMJD3 et UTX sur la différenciation chondrogénique de MSC issues du tissu adipeux ou du cordon ombilical par exemple.

Une fois les cellules obtenues et amplifiées, elles devront être transfectées par un vecteur d'expression contenant JMJD3 ou UTX. La méthode utilisée ici était la nucléofection, car elle permet d'obtenir des taux de viabilité et efficacité importants. Nous avons par ailleurs testé d'autres méthodes de transfection (viromère, lipofectamine), mais celles-ci n'ont pas permis d'obtenir une efficacité suffisante. *A contrario* des vecteurs viraux, la nucléofection permet de contourner le problème de la réponse immunitaire qui peut se déclencher chez certains patients. Un autre intérêt de cette méthode

est que la transfection sera transitoire, les vecteurs permettront d'amplifier la chondrogenèse puis ils disparaîtront après plusieurs semaines en culture et une fois *in vivo*. Si la transfection stable est envisagée d'autres tests sont au préalable nécessaires. En effet, JMJD3 favorise la différenciation hypertrophique (Zhang et al., 2015a). Il faudra donc s'assurer que les cellules ne poursuivent pas leur différenciation jusqu'au stade terminal.

Après l'inclusion des cellules dans l'alginate, deux possibilités peuvent être envisagées. La première serait de concevoir des feuillets d'alginate permettant d'être greffés directement dans les lésions. La deuxième consisterait à former des billes d'alginate ou des feuillets qui seront ensuite implantés en sous-cutané chez le patient ou un animal (porc, bovin). Après 4 semaines d'incubation, le cartilage néoformé des feuillets est récupéré et taillé dans les dimensions des lésions articulaires. Les billes sont en revanche dissociées et digérées par collagénases. Les chondrocytes obtenus après différenciation sont alors injectés directement en intra-articulaire ou incubés dans un hydrogel avant d'être implantés au niveau des lésions.

L'ANSM classe les médicaments de thérapie innovante (MTI) en 4 catégories : les médicaments de "thérapie génique", les médicaments de "thérapie cellulaire somatique", les médicaments "issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire" et les médicaments "combinés de thérapie innovante". Puisque la thérapie que nous proposons fait intervenir la transfection et la thérapie tissulaire ou cellulaire elle est considérée comme médicaments combinés de thérapie innovante. S'agissant des MTI, l'autorisation de mise sur le marché (AMM) est centralisée et délivrée par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) après évaluation des essais cliniques. Comme toutes procédures d'AMM, les trois critères principaux d'évaluation sont la qualité, la sécurité et l'efficacité. La partie qualité comporte tous les éléments matériels nécessaires à la mise en place du protocole et notamment les procédures de contrôle qualité afin de garantir une parfaite reproductibilité. Des contrôles bactériologiques pourraient être envisagés tout au long de la procédure par RT-PCR. De plus, après 7 jours de culture *in vitro* et avant l'incubation *in vivo*, un contrôle par RT-PCR du bon déroulement de la chondrogenèse pourrait aussi être envisagé. La partie sécurité comporte les études précliniques toxicologiques, pharmacologiques et pharmacocinétiques. La partie efficacité contient les résultats cliniques réalisés chez les sujets sains ou les patients. Celle-ci permet d'établir les conditions d'application du protocole et d'établir le rapport bénéfice risque. La procédure devra démontrer son efficacité à produire du cartilage et d'améliorer la qualité de vie des patients. Elle devra également démontrer sa non toxicité et supériorité thérapeutique par rapport aux autres thérapies existantes.

Outre leur capacité à se différencier en chondrocytes, les cellules souches mésenchymateuses ont également des propriétés paracrines et immunomodulatrices (Maumus et al., 2018). Elles ont

également des propriétés anti-fibrotiques et apoptotiques (Maumus et al., 2018). Il sera donc important d'évaluer l'effet de la transfection de JMJD3 et UTX sur ces différents processus. Ainsi une partie des cellules transfectée pourrait être maintenue à l'état multipotent, et injectée en intra-articulaire en parallèle des cellules différenciées.

EZH2, JMJD3 et UTX, entre antagonisme et synergie

Nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 par l'EPZ-6438 réduit l'expression des marqueurs du catabolisme, de l'inflammation et de l'hypertrophie dans les chondrocytes traités à l'IL-1 β . Cependant, l'inhibition de JMJD3 et UTX par le GSK-J4 n'a pas donné l'effet inverse. Néanmoins, *in vivo* il a été montré que l'inactivation de JMJD3 au cours de l'arthrose accentue la dégradation du cartilage en réduisant l'anabolisme (Dai et al., 2017). De la même manière, le traitement de macrophages issus de patients atteints d'arthrite rhumatoïde avec le GSK-J4 réduit la libération de cytokines pro-inflammatoires (De Santa et al., 2007). Cependant, il a été montré que le GSK-J4 augmente l'expression de MMP13 et du collagène X dans les chondrocytes traités au TGF- β . Ainsi, l'action d'EZH2, JMJD3 et UTX peut s'opposer ou non en fonction du type cellulaire et du modèle étudié. Ceci peut s'expliquer par l'expression des différents partenaires avec lesquels JMJD3, UTX et EZH2 interagissent. En effet, étant des cofacteurs, la régulation de leurs cibles est conditionnée par la présence ou non de facteurs de transcriptions spécifiques d'un type cellulaire ou d'une condition physiologique.

La méthylation des histones nécessite d'être finement régulée au cours du développement squelettique et de l'arthrose. Il a été montré que *Lysine Demethylase 4B* (KDM4B) une déméthylase de H3K9me3, favorise la chondrogenèse en déméthylant le promoteur de SOX9 (Lee et al., 2016). Comme H3K27me3, les marques répressives telles que H3K9me3 doivent être déméthylées sur les gènes chondrogeniques afin de permettre la différenciation.

S'agissant de la différenciation hypertrophique des chondrocytes, la situation est plus complexe. En effet, H3K9me3 est mise en place par ESET lors de l'ossification enchondrale afin de réprimer l'expression de Runx2 (Yang et al., 2013). La déméthylase PHF2 agit de manière inverse et favorise l'hypertrophie en augmentant l'expression de Runx2. Concernant H3K27me3, JMJD3 favorise l'hypertrophie des chondrocytes en déméthylant le gène Runx2 (Zhang et al., 2015a). Mais EZH2 est également indispensable à la différenciation hypertrophique en réprimant l'expression d'inhibiteur d'IGF et de cycline (Lui et al., 2016). Cette complexité montre qu'EZH2, JMJD3 et UTX peuvent avoir le même rôle lorsqu'elles n'ont pas les mêmes cibles à un moment donné.

Nous avons inhibé EZH2 en utilisant l'EPZ-6438 dans notre modèle de différenciation. Cependant celui-ci n'a eu aucun effet significatif sur la chondrogenèse. Dans la plupart des processus de différenciation où EZH2 est impliquée, elle réprime les gènes de cellules différenciées afin de maintenir les cellules dans un état de pluripotence ou multipotence (De Santa et al., 2007). Dans les cellules souches H3K27me3 se retrouve dans les domaines bivalents contenant également la marque H3K4me3. Ainsi, lorsque les cellules souches se différencient, elles perdent l'une ou l'autre des marques en fonction du lignage vers lequel elles s'engagent (De Santa et al., 2007). A titre d'exemple, il a été montré qu'EZH2 réprime la différenciation des progéniteurs hépatiques *a contrario* de JMJD3 et UTX en déméthylant H3K27me3 (Pediconi et al., 2019). Il en est de même pour les différenciations adipogénique et ostéogénique où EZH2 a un rôle antagoniste à JMJD3 et UTX (Batool et al., 2019). Il se pourrait qu'EZH2 dans notre modèle, ne soit pas présent sur les gènes chondrogéniques au moment de la différenciation des MSC. Afin de valider cette hypothèse, un N-ChIP ou un ChIP-seq pourrait être envisagé pour connaître les positions de JMJD3, UTX et EZH2 au moment de la différenciation.

Les voies de signalisation Wnt et métallothionéine (MT) dans l'arthrose et la chondrogenèse

Nos résultats montrent par ailleurs un lien entre H3K27me3 et les voies de signalisation Wnt et MT.

Nous avons mis en évidence que le TGF- β induit la voie Wnt/ β -caténine dans les chondrocytes hypertrophiques. De plus, l'EPZ-6438 contrecarre les effets du TGF- β . Comme montré dans la littérature (Chen et al., 2016b), il est possible qu'EZH2 induise l'hypertrophie en activant la voie Wnt/ β -caténine dans notre modèle. Afin de tester cette hypothèse, les effets d'une surexpression d'EZH2 pourraient dans un premier temps être évalués dans les chondrocytes, afin de savoir si elle favorise l'hypertrophie induite par le TGF- β . Le cas échéant, il serait intéressant de tester si l'inhibition de la voie Wnt contrecarre l'effet d'EZH2. Cette hypothèse serait en cohérence avec une étude qui a montré que l'inhibition d'EZH2 réduit l'hypertrophie des chondrocytes *in vitro* dans un modèle inflammatoire (traitement par l'IL-1 β) et *in vivo* dans un modèle d'arthrose murin en contrecarrant la voie Wnt/ β -caténine (Chen et al., 2016a).

Nous avons d'autre part, trouvé dans notre analyse transcriptomique que l'expression des acteurs de la voie Wnt sont inhibés par le GSK-J4. La voie Wnt est également impliquée dans l'ossification enchondrale et la chondrogenèse *in vitro* (Allas et al., 2018). JMJD3 et/ou UTX pourraient favoriser la chondrogenèse en activant la voie Wnt. Il serait par conséquent intéressant de surexprimer JMJD3 et UTX en parallèle d'inhiber la voie Wnt, afin de déterminer si l'effet des déméthylases peut être en partie contrecarré.

De manière intéressante, nous avons mis en exergue dans notre étude transcriptomique, qu'une importante partie des gènes augmentés par le GSK-J4 font partie de la famille des métallothionéines (MT). Il est connu qu'au cours de l'ossification enchondrale, les métallothionéines sont induites par l'augmentation des ions tels que Zn^{2+} ou Cd (von Zglinicki et al., 1992; Litchfield and Sauer, 1996; Litchfield et al., 1998; Sauer et al., 2003; Won et al., 2016). Le GSK-J4 augmenterait leur expression indirectement, car il inhibe des déméthylases associées à l'activation de l'expression génique. Le GSK-J4 agirait soit en augmentant l'expression de leurs facteurs de transcription, soit en augmentant la production d'ions. D'autre part, nous avons réanalysé les données transcriptomiques d'une étude précédente, portant sur l'effet anti-inflammatoire du DZNep sur les chondrocytes traités à l'IL-1 β . En effet, nous les avons comparées aux données de l'étude sur l'effet du GSK-J4 dans la chondrogenèse. Nous avons trouvé que les métallothionéines MT1B, MT1E, MT1L, MT1A, MT1X et MT2A sont à la fois augmentées par le GSK-J4 au cours de la chondrogenèse et diminuées par le DZNep dans les chondrocytes traités à l'IL-1 β . Il existerait donc potentiellement un lien entre la méthylation de H3K27 et les métallothionéines. De plus, une étude a montré que l'invalidation des MT1 ou 2 au cours de l'arthrose, augmente les dommages causés au cartilage chez la souris (Won et al., 2016). Cependant, la surexpression de MT2 a également un effet délétère sur le cartilage (Won et al., 2016), ce qui suggère que l'homéostasie du cartilage dépend fortement de la bonne régulation des métallothionéines. De plus, des études ont retrouvé les MT surexprimées dans la membrane synoviale de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Winters et al., 1997; Backman et al., 1998). Le rôle des MT dans l'inflammation et le développement du cartilage doit par conséquent être exploré. Sachant qu'EZH2 amplifie l'inflammation et que les MT sont induites par le Zn^{2+} , il serait intéressant de la surexprimer dans les chondrocytes traités à l'IL-1 β et au Zn^{2+} , afin de savoir si les MT vont contrecarrer ou favoriser l'effet d'EZH2.

Conclusion

Notre étude a montré l'importance de la marque H3K27me3 dans le cartilage. Alors qu'EZH2 est impliquée dans l'inflammation, l'hypertrophie des chondrocytes et la destruction du cartilage. JMJD3 et UTX favorisent la chondrogenèse, la formation du cartilage et la production de collagène. Deux potentielles stratégies thérapeutiques ont été proposées au vu des résultats de cette étude. D'une part, l'injection intra-articulaire d'un inhibiteur d'EZH2 permettrait d'atténuer la dégradation du cartilage et le handicap locomoteur. D'autre part, l'implantation du cartilage néoformé *in vivo* en sous-cutané avec des cellules souches surexprimant JMJD3 ou UTX permettrait de réparer les lésions chez les patients.

5 Références bibliographiques

Agger, K., Cloos, P.A.C., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449, 731–734.

Agricola, R., Heijboer, M.P., Roze, R.H., Reijman, M., Bierma-Zeinstra, S.M.A., Verhaar, J. a. N., Weinans, H., and Waarsing, J.H. (2013a). Pincer deformity does not lead to osteoarthritis of the hip whereas acetabular dysplasia does: acetabular coverage and development of osteoarthritis in a nationwide prospective cohort study (CHECK). *Osteoarthritis Cartilage* 21, 1514–1521.

Agricola, R., Waarsing, J.H., Arden, N.K., Carr, A.J., Bierma-Zeinstra, S.M.A., Thomas, G.E., Weinans, H., and Glyn-Jones, S. (2013b). Cam impingement of the hip: a risk factor for hip osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 630–634.

Alford, J.W., and Cole, B.J. (2005). Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am. J. Sports Med.* 33, 295–306.

Allas, L., Boumédiene, K., and Baugé, C. (2018). Epigenetic dynamic during endochondral ossification and articular cartilage development. *Bone*.

Allas, L., Rochoux, Q., Leclercq, S., Boumédiene, K., and Baugé, C. (2019). Development of a simple osteoarthritis model useful to predict in vitro the anti-hypertrophic action of drugs. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 786–794.

Arcipowski, K.M., Martinez, C.A., and Ntziachristos, P. (2016). Histone demethylases in physiology and cancer: a tale of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 36, 59–67.

Ashraf, S., Mapp, P.I., Burston, J., Bennett, A.J., Chapman, V., and Walsh, D.A. (2014). Augmented pain behavioural responses to intra-articular injection of nerve growth factor in two animal models of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1710–1718.

Aspberg, A. (2012). The different roles of aggrecan interaction domains. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 60, 987–996.

Aury-Landas, J., Bazille, C., Allas, L., Bouhout, S., Chesneau, C., Leclercq, S., Boumédiene, K., and Baugé, C. (2017). Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci. Rep.* 7.

Baboolal, T.G., Mastbergen, S.C., Jones, E., Calder, S.J., Lafeber, F.P.J.G., and McGonagle, D. (2016). Synovial fluid hyaluronan mediates MSC attachment to cartilage, a potential novel mechanism contributing to cartilage repair in osteoarthritis using knee joint distraction. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 908–915.

- Backman, J.T., Siegle, I., and Fritz, P. (1998). Immunohistochemical localization of metallothionein in synovial tissue of patients with chronic inflammatory and degenerative joint disease. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *433*, 153–160.
- van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B.J., and Hughes, T.R. (2010). Most “Dark Matter” Transcripts Are Associated With Known Genes. *PLoS Biol.* *8*.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V., and Tabin, C.J. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* *2*, e216.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* *21*, 381–395.
- Bantignies, F., and Cavalli, G. (2011). Polycomb group proteins: repression in 3D. *Trends Genet.* *TIG 27*, 454–464.
- Barbero, A., Ploegert, S., Heberer, M., and Martin, I. (2003). Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *48*, 1315–1325.
- Barroso, M., Kao, D., Blom, H.J., Tavares de Almeida, I., Castro, R., Loscalzo, J., and Handy, D.E. (2016). S-adenosylhomocysteine induces inflammation through NFκB: A possible role for EZH2 in endothelial cell activation. *Biochim. Biophys. Acta* *1862*, 82–92.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* *129*, 823–837.
- Barter, M.J., Tselepi, M., Gómez, R., Woods, S., Hui, W., Smith, G.R., Shanley, D.P., Clark, I.M., and Young, D.A. (2015). Genome-Wide MicroRNA and Gene Analysis of Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Identifies an Essential Role and Multiple Targets for miR-140-5p. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 3266–3280.
- Barter, M.J., Gomez, R., Hyatt, S., Cheung, K., Skelton, A.J., Xu, Y., Clark, I.M., and Young, D.A. (2017). The long non-coding RNA ROCR contributes to SOX9 expression and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *144*, 4510–4521.
- Basad, E., Ishaque, B., Bachmann, G., Stürz, H., and Steinmeyer, J. (2010). Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* *18*, 519–527.
- Batool, A., Jin, C., and Liu, Y.-X. (2019). Role of EZH2 in cell lineage determination and relative signaling pathways. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *24*, 947–960.
- Baugé, C., Attia, J., Leclercq, S., Pujol, J.-P., Galéra, P., and Boumédiene, K. (2008). Interleukin-1beta up-regulation of Smad7 via NF-kappaB activation in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *58*, 221–226.
- Baugé, Catherine, Boumédiene, K., Baugé, Catherine, Boumédiene, K., and Diene, K. (2015). Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments. *Stem Cells Int.* *2015*, 2015, e438026.

- Beane, O.S., and Darling, E.M. (2012). Isolation, Characterization, and Differentiation of Stem Cells for Cartilage Regeneration. *Ann. Biomed. Eng.* *40*, 2079–2097.
- Becerra, J., Andrades, J.A., Guerado, E., Zamora-Navas, P., López-Puertas, J.M., and Reddi, A.H. (2010). Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* *16*, 617–627.
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatlosova, K., and Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip. Toxicol.* *10*, 40–43.
- Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J.M., Alvarez, A.B., Peña, R., Bonilla, F., and de Herreros, A.G. (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.* *22*, 756–769.
- Beswick, A.D., Wylde, V., Goberman-Hill, R., Blom, A., and Dieppe, P. (2012). What proportion of patients report long-term pain after total hip or knee replacement for osteoarthritis? A systematic review of prospective studies in unselected patients. *BMJ Open* *2*, e000435.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* *125*, 1111–1124.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* *16*, 6–21.
- Bochtler, M., Kolano, A., and Xu, G.-L. (2017). DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *39*, 1–13.
- Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003a). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* *22*, 5323–5335.
- Bradley, E.W., McGee-Lawrence, M.E., and Westendorf, J.J. (2011). Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *21*, 101–113.
- Bradley, E.W., Carpio, L.R., and Westendorf, J.J. (2013). Histone deacetylase 3 suppression increases PH domain and leucine-rich repeat phosphatase (Phlpp)1 expression in chondrocytes to suppress Akt signaling and matrix secretion. *J. Biol. Chem.* *288*, 9572–9582.
- Bradley, E.W., Carpio, L.R., Olson, E.N., and Westendorf, J.J. (2015). Histone deacetylase 7 (Hdac7) suppresses chondrocyte proliferation and β -catenin activity during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* *290*, 118–126.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* *331*, 889–895.
- Brower-Toland, B., Riddle, N.C., Jiang, H., Huisinga, K.L., and Elgin, S.C.R. (2009). Multiple SET methyltransferases are required to maintain normal heterochromatin domains in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *181*, 1303–1319.
- Buckwalter, J.A., and Mankin, H.J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.* *47*, 477–486.

- Budd, E., de Andrés, M.C., Sanchez-Elsner, T., and Oreffo, R.O.C. (2017). MiR-146b is down-regulated during the chondrogenic differentiation of human bone marrow derived skeletal stem cells and up-regulated in osteoarthritis. *Sci. Rep.* 7, 46704.
- Bumgarner, S.L., Neuert, G., Voight, B.F., Symbor-Nagrabska, A., Grisafi, P., van Oudenaarden, A., and Fink, G.R. (2012). Single-cell analysis reveals that noncoding RNAs contribute to clonal heterogeneity by modulating transcription factor recruitment. *Mol. Cell* 45, 470–482.
- Burgold, T., Spreafico, F., Santa, F.D., Totaro, M.G., Prosperini, E., Natoli, G., and Testa, G. (2008). The Histone H3 Lysine 27-Specific Demethylase Jmjd3 Is Required for Neural Commitment. *PLOS ONE* 3, e3034.
- Camilleri, E.T., Dudakovic, A., Riester, S.M., Galeano-Garces, C., Paradise, C.R., Bradley, E.W., McGee-Lawrence, M.E., Im, H.-J., Karperien, M., Krych, A.J., et al. (2018). Loss of histone methyltransferase Ezh2 stimulates an osteogenic transcriptional program in chondrocytes but does not affect cartilage development. *J. Biol. Chem.* 293, 19001–19011.
- Carlson, H.L., Quinn, J.J., Yang, Y.W., Thornburg, C.K., Chang, H.Y., and Stadler, H.S. (2015). LncRNA-HIT Functions as an Epigenetic Regulator of Chondrogenesis through Its Recruitment of p100/CBP Complexes. *PLOS Genet.* 11, e1005680.
- Carpio, L.R., and Westendorf, J.J. (2016). Histone Deacetylases in Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 18, 52.
- Cawston, T.E., and Young, D.A. (2009). Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res.* 339, 221.
- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., and Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 147, 358–369.
- Cha, T.-L., Zhou, B.P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C.-C., Chen, C.-T., Ping, B., Otte, A.P., and Hung, M.-C. (2005). Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science* 310, 306–310.
- Chang, C.-J., Yang, J.-Y., Xia, W., Chen, C.-T., Xie, X., Chao, C.-H., Woodward, W.A., Hsu, J.-M., Hortobagyi, G.N., and Hung, M.-C. (2011). EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- β -catenin signaling. *Cancer Cell* 19, 86–100.
- Chang, S., McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2004). Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8467–8476.
- Chang, S., Young, B.D., Li, S., Qi, X., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2006). Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 126, 321–334.
- Charlesworth, J., Fitzpatrick, J., Perera, N.K.P., and Orchard, J. (2019). Osteoarthritis- a systematic review of long-term safety implications for osteoarthritis of the knee. *BMC Musculoskelet. Disord.* 20, 151.

- Chen, C., Xie, J., Rajappa, R., Deng, L., Fredberg, J., and Yang, L. (2015). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *47*, 121–129.
- Chen, L., Wu, Y., Wu, Y., Wang, Y., Sun, L., and Li, F. (2016a). The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/ β -catenin pathway. *Sci. Rep.* *6*, 29176.
- Chen, S., Bohrer, L.R., Rai, A.N., Pan, Y., Gan, L., Zhou, X., Bagchi, A., Simon, J.A., and Huang, H. (2010). Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat. Cell Biol.* *12*, 1108–1114.
- Chen, Y.G., Satpathy, A.T., and Chang, H.Y. (2017). Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs. *Nat. Immunol.* *18*, 962–972.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., et al. (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* *308*, 1149–1154.
- Cherubino, P., Grassi, F.A., Bulgheroni, P., and Ronga, M. (2003). Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J. Orthop. Surg. Hong Kong* *11*, 10–15.
- Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A.C., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* *128*, 1063–1076.
- Christiansen, B.A., Anderson, M.J., Lee, C.A., Williams, J.C., Yik, J.H.N., and Haudenschild, D.R. (2012). Musculoskeletal changes following non-invasive knee injury using a novel mouse model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *20*, 773–782.
- Ciccone, D.N., Su, H., Hevi, S., Gay, F., Lei, H., Bajko, J., Xu, G., Li, E., and Chen, T. (2009). KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* *461*, 415–418.
- Cloos, P.A.C., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H., and Helin, K. (2006). The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* *442*, 307–311.
- Coghlan, R.F., Oberdorf, J.A., Sienko, S., Aiona, M.D., Boston, B.A., Connelly, K.J., Bahney, C., LaRouche, J., Almubarak, S.M., Coleman, D.T., et al. (2017). A degradation fragment of type X collagen is a real-time marker for bone growth velocity. *Sci. Transl. Med.* *9*.
- Cucchiari, M., and Madry, H. (2019). Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair. *Nat. Rev. Rheumatol.* *15*, 18–29.
- Cucchiari, M., Orth, P., and Madry, H. (2013). Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *91*, 625–636.
- Dai, J., Lu, J., Zhang, Y., and Shen, Y. (2010). Jmjd3 activates Mash1 gene in RA-induced neuronal differentiation of P19 cells. *J. Cell. Biochem.* *110*, 1457–1463.

- Dai, J., Yu, D., Wang, Y., Chen, Y., Sun, H., Zhang, X., Zhu, S., Pan, Z., Heng, B.C., Zhang, S., et al. (2017). Kdm6b regulates cartilage development and homeostasis through anabolic metabolism. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 1295–1303.
- Daly, A.C., Sathy, B.N., and Kelly, D.J. (2018). Engineering large cartilage tissues using dynamic bioreactor culture at defined oxygen conditions. *J. Tissue Eng.* *9*.
- Datta, P., Zhang, Y., Parousis, A., Sharma, A., Rossomacha, E., Endisha, H., Wu, B., Kacprzak, I., Mahomed, N.N., Gandhi, R., et al. (2017). High-fat diet-induced acceleration of osteoarthritis is associated with a distinct and sustained plasma metabolite signature. *Sci. Rep.* *7*, 8205.
- De Santa, F., Totaro, M.G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., and Natoli, G. (2007). The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* *130*, 1083–1094.
- De Santis, M., Di Matteo, B., Chisari, E., Cincinelli, G., Angele, P., Lattermann, C., Filardo, G., Vitale, N.D., Selmi, C., and Kon, E. (2018). The Role of Wnt Pathway in the Pathogenesis of OA and Its Potential Therapeutic Implications in the Field of Regenerative Medicine.
- Dhillon, M.S., Patel, S., and Bansal, T. (2019). Improvising PRP for use in osteoarthritis knee- upcoming trends and futuristic view. *J. Clin. Orthop. Trauma* *10*, 32–35.
- Di Croce, L., and Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 1147–1155.
- DiBartola, A.C., Everhart, J.S., Magnussen, R.A., Carey, J.L., Brophy, R.H., Schmitt, L.C., and Flanigan, D.C. (2016). Correlation between histological outcome and surgical cartilage repair technique in the knee: A meta-analysis. *The Knee* *23*, 344–349.
- Ding, X.C., Weiler, J., and Grosshans, H. (2009). Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. *Trends Biotechnol.* *27*, 27–36.
- Dressel, U., Bailey, P.J., Wang, S.C., Downes, M., Evans, R.M., and Muscat, G.E. (2001). A dynamic role for HDAC7 in MEK2-mediated muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* *276*, 17007–17013.
- Drewell, R.A., Goddard, C.J., Thomas, J.O., and Surani, M.A. (2002). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1139–1144.
- Duval, E., Leclercq, S., Elissalde, J.-M., Demoor, M., Galéra, P., and Boumédiène, K. (2009). Hypoxia-inducible factor 1 α inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1 α -dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *60*, 3038–3048.
- Duval, E., Baugé, C., Andriamanalijaona, R., Bénateau, H., Leclercq, S., Dutoit, S., Poulain, L., Galéra, P., and Boumédiène, K. (2012). Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials* *33*, 6042–6051.
- Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E.J., Booth, R., Gabay, O., and Hall, D.J. (2011). Tumor necrosis factor α -mediated cleavage and inactivation of SirT1 in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *63*, 2363–2373.

Edmunds, J.W., Mahadevan, L.C., and Clayton, A.L. (2008). Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J.* 27, 406–420.

ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816.

Evans, C.H., Ghivizzani, S.C., and Robbins, P.D. (2018). Arthritis gene therapy is becoming a reality. *Nat. Rev. Rheumatol.* 14, 381–382.

Eyre, D.R., Weis, M.A., and Wu, J.-J. (2006). Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur. Cell. Mater.* 12, 57–63.

Ezhkova, E., Pasolli, H.A., Parker, J.S., Stokes, N., Su, I.-hsin, Hannon, G., Tarakhovskiy, A., and Fuchs, E. (2009). Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell* 136, 1122–1135.

Faghihi, M.A., Zhang, M., Huang, J., Modarresi, F., Van der Brug, M.P., Nalls, M.A., Cookson, M.R., St-Laurent, G., and Wahlestedt, C. (2010). Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol.* 11, R56.

Fang, H., and Beier, F. (2014). Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 413–421.

Fellows, C.R., Williams, R., Davies, I.R., Gohil, K., Baird, D.M., Fairclough, J., Rooney, P., Archer, C.W., and Khan, I.M. (2017). Characterisation of a divergent progenitor cell sub-populations in human osteoarthritic cartilage: the role of telomere erosion and replicative senescence. *Sci. Rep.* 7.

Felson, D.T., McLaughlin, S., Goggins, J., LaValley, M.P., Gale, M.E., Totterman, S., Li, W., Hill, C., and Gale, D. (2003). Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Ann. Intern. Med.* 139, 330–336.

Fernandes, L., Hagen, K.B., Bijlsma, J.W.J., Andreassen, O., Christensen, P., Conaghan, P.G., Doherty, M., Geenen, R., Hammond, A., Kjekou, I., et al. (2013). EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1125–1135.

Ferrell, J.E. (2012). Bistability, bifurcations, and Waddington's epigenetic landscape. *Curr. Biol.* CB 22, R458–466.

Filardo, G., Kon, E., Perdisa, F., Di Matteo, B., Di Martino, A., Iacono, F., Zaffagnini, S., Balboni, F., Vaccari, V., and Marcacci, M. (2013). Osteochondral scaffold reconstruction for complex knee lesions: a comparative evaluation. *The Knee* 20, 570–576.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.

Finney, A., Porcheret, M., Grime, J., Jordan, K.P., Handy, J., Healey, E., Ryan, S., Jester, R., and Dziedzic, K. (2013). Defining the content of an opportunistic osteoarthritis consultation with primary health care professionals: a Delphi consensus study. *Arthritis Care Res.* 65, 962–968.

- Fioravanti, R., Stazi, G., Zwergel, C., Valente, S., and Mai, A. (2018). Six Years (2012-2018) of Researches on Catalytic EZH2 Inhibitors: The Boom of the 2-Pyridone Compounds. *Chem. Rec. N. Y. N* *18*, 1818–1832.
- Fischer, D.D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F.A.M., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P., and Cohen, D. (2002). Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem.* *277*, 6656–6666.
- Foyt, D.A., Norman, M.D.A., Yu, T.T.L., and Gentleman, E. (2018). Exploiting Advanced Hydrogel Technologies to Address Key Challenges in Regenerative Medicine. *Adv. Healthc. Mater.* *7*, e1700939.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif.* *3*, 393–403.
- Fujii, S., Tokita, K., Wada, N., Ito, K., Yamauchi, C., Ito, Y., and Ochiai, A. (2011). MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene* *30*, 4118–4128.
- Gabay, O., Zaal, K.J., Sanchez, C., Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Song, Y., He, X.H., and McBurney, M.W. (2013). Sirt1-deficient mice exhibit an altered cartilage phenotype. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* *80*, 613–620.
- Gabler, J., Ruetze, M., Kynast, K.L., Grossner, T., Diederichs, S., and Richter, W. (2015). Stage-Specific miRs in Chondrocyte Maturation: Differentiation-Dependent and Hypertrophy-Related miR Clusters and the miR-181 Family. *Tissue Eng. Part A* *21*, 2840–2851.
- Gagarina, V., Gabay, O., Dvir-Ginzberg, M., Lee, E.J., Brady, J.K., Quon, M.J., and Hall, D.J. (2010). SirT1 enhances survival of human osteoarthritic chondrocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and activating the insulin-like growth factor receptor pathway. *Arthritis Rheum.* *62*, 1383–1392.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* *277*, 25748–25755.
- García-García, A., De, C.C., and Méndez-Ferrer, S. (2015). BMSCs and hematopoiesis. *Immunol. Lett.* *168*, 129–135.
- Geiman, T.M., Sankpal, U.T., Robertson, A.K., Zhao, Y., Zhao, Y., and Robertson, K.D. (2004). DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *318*, 544–555.
- Geisler, S., and Coller, J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 699–712.
- Gerhardt, B., Leesman, L., Burra, K., Snowball, J., Rosenzweig, R., Guzman, N., Ambalavanan, M., and Sinner, D. (2018). Notum attenuates Wnt/ β catenin signaling to promote tracheal cartilage patterning. *Dev. Biol.* *436*, 14–27.
- Glasson, S.S., Chambers, M.G., Berg, W.B.V.D., and Little, C.B. (2010). The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* *18*, S17–S23.

- Glyn-Jones, S., Palmer, A.J.R., Agricola, R., Price, A.J., Vincent, T.L., Weinans, H., and Carr, A.J. (2015a). Osteoarthritis. *Lancet Lond. Engl.* *386*, 376–387.
- Goldring, M.B., and Goldring, S.R. (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1192*, 230–237.
- Goldring, M.B., and Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *23*, 471–478.
- Grant, P.A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., et al. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* *11*, 1640–1650.
- Grime, J., and Dudley, B. (2014). Developing written information on osteoarthritis for patients: facilitating user involvement by exposure to qualitative research. *Health Expect. Int. J. Public Particip. Health Care Health Policy* *17*, 164–173.
- Group, W. (1994). Development of the WHOQOL: Rationale and Current Status. *Int. J. Ment. Health* *23*, 24–56.
- Guérit, D., Philipot, D., Chuchana, P., Toupet, K., Brondello, J.-M., Mathieu, M., Jorgensen, C., and Noël, D. (2013). Sox9-regulated miRNA-574-3p inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* *8*, e62582.
- Guilak, F., and Mow, V.C. (2000). The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *J. Biomech.* *33*, 1663–1673.
- Guilak, F., Nims, R.J., Dicks, A., Wu, C.-L., and Meulenbelt, I. (2018). Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *71–72*, 40–50.
- Haberland, M., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 32–42.
- Han, P., and Chang, C.-P. (2015). Long non-coding RNA and chromatin remodeling. *RNA Biol.* *12*, 1094–1098.
- Haq, S.H. (2016). 5-Aza-2'-deoxycytidine acts as a modulator of chondrocyte hypertrophy and maturation in chick caudal region chondrocytes in culture. *Anat. Cell Biol.* *49*, 107–115.
- Haseeb, A., and Haqqi, T.M. (2013). Immunopathogenesis of Osteoarthritis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *146*, 185–196.
- Hata, K., Takashima, R., Amano, K., Ono, K., Nakanishi, M., Yoshida, M., Wakabayashi, M., Matsuda, A., Maeda, Y., Suzuki, Y., et al. (2013). Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nat. Commun.* *4*, 2850.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 522–531.
- Heinegård, D., and Saxne, T. (2011). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *7*, 50–56.

Herlofsen, S.R., Bryne, J.C., Høyby, T., Wang, L., Issner, R., Zhang, X., Coyne, M.J., Boyle, P., Gu, H., Meza-Zepeda, L.A., et al. (2013a). Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* *14*, 105.

Herlofsen, S.R., Bryne, J.C., Høyby, T., Wang, L., Issner, R., Zhang, X., Coyne, M.J., Boyle, P., Gu, H., Meza-Zepeda, L.A., et al. (2013b). Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* *14*, 105.

Heyneman, C.A., Lawless-Liday, C., and Wall, G.C. (2000). Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs* *60*, 555–574.

Hinz, B., and Brune, K. (2012). Paracetamol and cyclooxygenase inhibition: is there a cause for concern? *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 20–25.

Hirsch, G., Kitas, G., and Klocke, R. (2013). Intra-articular corticosteroid injection in osteoarthritis of the knee and hip: factors predicting pain relief—a systematic review. *Semin. Arthritis Rheum.* *42*, 451–473.

Hochberg, M.C., Tive, L.A., Abramson, S.B., Vignon, E., Verburg, K.M., West, C.R., Smith, M.D., and Hungerford, D.S. (2016). When Is Osteonecrosis Not Osteonecrosis?: Adjudication of Reported Serious Adverse Joint Events in the Tanezumab Clinical Development Program. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ *68*, 382–391.

Hodawadekar, S.C., and Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* *26*, 5528–5540.

Hohenauer, T., and Moore, A.W. (2012). The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 2267–2282.

Højfeldt, J.W., Agger, K., and Helin, K. (2013). Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 917–930.

Hong, E., and Reddi, A.H. (2013). Dedifferentiation and redifferentiation of articular chondrocytes from surface and middle zones: changes in microRNAs-221/-222, -140, and -143/145 expression. *Tissue Eng. Part A* *19*, 1015–1022.

Horton, J.R., Upadhyay, A.K., Qi, H.H., Zhang, X., Shi, Y., and Cheng, X. (2010). Enzymatic and structural insights for substrate specificity of a family of jumonji histone lysine demethylases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 38–43.

Hsieh, C.L. (1997). Stability of patch methylation and its impact in regions of transcriptional initiation and elongation. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5897–5904.

Huang, J., Zhao, L., and Chen, D. (2019). Growth factor signalling in osteoarthritis. *Growth Factors* Chur Switz. 1–9.

Huang, X., Zhong, L., Hendriks, J., Post, J.N., and Karperien, M. (2018). The Effects of the WNT-Signaling Modulators BIO and PKF118-310 on the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.

Hui, T., A., P., Zhao, Y., Yang, J., Ye, L., and Wang, C. (2018). EZH2 regulates dental pulp inflammation by direct effect on inflammatory factors. *Arch. Oral Biol.* *85*, 16–22.

- Hundley, H.A., and Bass, B.L. (2010). ADAR editing in double-stranded UTRs and other non-coding RNA sequences. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 377–383.
- Hunter, C.J., and Levenston, M.E. (2004). Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng.* *10*, 736–746.
- Hunter, D.J., and Bierma-Zeinstra, S. (2019). Osteoarthritis. *Lancet Lond. Engl.* *393*, 1745–1759.
- Hunziker, E.B., and Rosenberg, L.C. (1996). Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J. Bone Joint Surg. Am.* *78*, 721–733.
- Hussain, S.M., Cicuttini, F.M., Alyousef, B., and Wang, Y. (2018). Female hormonal factors and osteoarthritis of the knee, hip and hand: a narrative review. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* *21*, 132–139.
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., and Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp. Mol. Med.* *49*, e324.
- Ideno, H., Shimada, A., Imaizumi, K., Kimura, H., Abe, M., Nakashima, K., and Nifuji, A. (2013). Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr. Patterns GEP* *13*, 84–90.
- Ishikawa, T., Nishida, T., Ono, M., Takarada, T., Nguyen, H.T., Kurihara, S., Furumatsu, T., Murase, Y., Takigawa, M., Oohashi, T., et al. (2018). Physiological role of urothelial cancer-associated one long noncoding RNA in human skeletogenic cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* *233*, 4825–4840.
- Issa, J.-P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 988–993.
- Issaeva, I., Zonis, Y., Rozovskaia, T., Orlovsky, K., Croce, C.M., Nakamura, T., Mazo, A., Eisenbach, L., and Canaani, E. (2007). Knockdown of ALR (MLL2) Reveals ALR Target Genes and Leads to Alterations in Cell Adhesion and Growth. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1889–1903.
- Jeltsch, A., and Jurkowska, R.Z. (2016). Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.* *44*, 8556–8575.
- Jiang, Y., and Tuan, R.S. (2015). Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *11*, 206–212.
- Jones, E.A., Crawford, A., English, A., Henshaw, K., Mundy, J., Corscadden, D., Chapman, T., Emery, P., Hatton, P., and McGonagle, D. (2008). Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum.* *58*, 1731–1740.
- Jordan, K.M., Arden, N.K., Doherty, M., Bannwarth, B., Bijlsma, J.W.J., Dieppe, P., Gunther, K., Hauselmann, H., Herrero-Beaumont, G., Kaklamanis, P., et al. (2003). EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann. Rheum. Dis.* *62*, 1145–1155.
- Kadri, A., Ea, H.K., Bazille, C., Hannouche, D., Lioté, F., and Cohen-Solal, M.E. (2008). Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* *58*, 2379–2386.

- Khalil, A.M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., van Oudenaarden, A., et al. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11667–11672.
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., et al. (2013). Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* *23*, 839–852.
- Kim, M.-K., Ha, C.-W., In, Y., Cho, S.-D., Choi, E.-S., Ha, J.-K., Lee, J.-H., Yoo, J.-D., Bin, S.-I., Choi, C.-H., et al. (2018). A Multicenter, Double-Blind, Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell and Gene Therapy in Knee Osteoarthritis Patients. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*
- Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., and Chrousos, G.P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci. Signal.* *3*, ra8.
- Kirmizis, A., Bartley, S.M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P.J. (2004). Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev.* *18*, 1592–1605.
- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 89–97.
- Knutson, S.K., Kawano, S., Minoshima, Y., Warholic, N.M., Huang, K.-C., Xiao, Y., Kadowaki, T., Uesugi, M., Kuznetsov, G., Kumar, N., et al. (2014). Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 842–854.
- Kobayashi, T., Lu, J., Cobb, B.S., Rodda, S.J., McMahon, A.P., Schipani, E., Merckenschlager, M., and Kronenberg, H.M. (2008). Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1949–1954.
- Kornienko, A.E., Guenzl, P.M., Barlow, D.P., and Pauler, F.M. (2013). Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC Biol.* *11*, 59.
- Kozhemyakina, E., Zhang, M., Ionescu, A., Ayturk, U.M., Ono, N., Kobayashi, A., Kronenberg, H., Warman, M.L., and Lassar, A.B. (2015). Identification of a Prg4-expressing articular cartilage progenitor cell population in mice. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *67*, 1261–1273.
- van der Kraan, P.M., Goumans, M.-J., Blaney Davidson, E., and ten Dijke, P. (2012). Age-dependent alteration of TGF- β signalling in osteoarthritis. *Cell Tissue Res.* *347*, 257–265.
- Kruidenier, L., Chung, C., Cheng, Z., Liddle, J., Che, K., Joberty, G., Bantscheff, M., Bountra, C., Bridges, A., Diallo, H., et al. (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* *488*, 404–408.
- Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., and Kurosaka, M. (2007). Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* *15*, 226–231.
- Kyba, M., and Brock, H.W. (1998). The *Drosophila* polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2712–2720.

- LaBranche, T.P., Bendele, A.M., Omura, B.C., Gropp, K.E., Hurst, S.I., Bagi, C.M., Cummings, T.R., Grantham, L.E., Shelton, D.L., and Zorbas, M.A. (2017). Nerve growth factor inhibition with tanezumab influences weight-bearing and subsequent cartilage damage in the rat medial meniscal tear model. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 295–302.
- Lachner, M., O’Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116–120.
- Lamo-Espinosa, J.M., Mora, G., Blanco, J.F., Granero-Moltó, F., Núñez-Córdoba, J.M., López-Elío, S., Andreu, E., Sánchez-Guijo, F., Aquerreta, J.D., Bondía, J.M., et al. (2018). Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: long-term follow up of a multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II). *J. Transl. Med.* *16*, 213.
- Lan, F., Bayliss, P.E., Rinn, J.L., Whetstone, J.R., Wang, J.K., Chen, S., Iwase, S., Alpatov, R., Issaeva, I., Canaani, E., et al. (2007). A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* *449*, 689–694.
- Lane, N.E., and Corr, M. (2017). Osteoarthritis in 2016: Anti-NGF treatments for pain - two steps forward, one step back? *Nat. Rev. Rheumatol.* *13*, 76–78.
- Latos, P.A., Pauler, F.M., Koerner, M.V., Şenergin, H.B., Hudson, Q.J., Stocsits, R.R., Allhoff, W., Stricker, S.H., Klement, R.M., Warczuk, K.E., et al. (2012). Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing. *Science* *338*, 1469–1472.
- Lawrence, R.C., Felson, D.T., Helmick, C.G., Arnold, L.M., Choi, H., Deyo, R.A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., et al. (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* *58*, 26–35.
- Lawson, K.A., Teteak, C.J., Zou, J., Hacquebord, J., Ghatan, A., Zielinska-Kwiatkowska, A., Fernandes, R.J., Chansky, H.A., and Yang, L. (2013). Mesenchyme-specific knockout of ESET histone methyltransferase causes ectopic hypertrophy and terminal differentiation of articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* *288*, 32119–32125.
- Lee, H.-L., Yu, B., Deng, P., Wang, C.-Y., and Hong, C. (2016). Transforming Growth Factor- β -Induced KDM4B Promotes Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *34*, 711–719.
- Lee, S., Yoon, D.S., Paik, S., Lee, K.-M., Jang, Y., and Lee, J.W. (2014). microRNA-495 inhibits chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *Stem Cells Dev.* *23*, 1798–1808.
- Leshner, J.M., Dreyfuss, P., Hager, N., Kaplan, M., and Furman, M. (2008). Hip joint pain referral patterns: a descriptive study. *Pain Med. Malden Mass* *9*, 22–25.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* *442*, 91–95.
- Li, H., Xie, H., Liu, W., Hu, R., Huang, B., Tan, Y.-F., Xu, K., Sheng, Z.-F., Zhou, H.-D., Wu, X.-P., et al. (2009). A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J. Clin. Invest.* *119*, 3666–3677.

- Li, L., Liu, B., Wapinski, O.L., Tsai, M.-C., Qu, K., Zhang, J., Carlson, J.C., Lin, M., Fang, F., Gupta, R.A., et al. (2013). Targeted disruption of Hotair leads to homeotic transformation and gene derepression. *Cell Rep.* 5, 3–12.
- Li, Y., Luo, W., Zhu, S., and Lei, G. (2017). T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond. *Front. Immunol.* 8.
- Lin, Y., Wu, Y., Li, J., Dong, C., Ye, X., Chi, Y.-I., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2010). The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J.* 29, 1803–1816.
- Linn, F.C., and Sokoloff, L. (1965). MOVEMENT AND COMPOSITION OF INTERSTITIAL FLUID OF CARTILAGE. *Arthritis Rheum.* 8, 481–494.
- Litchfield, T.M., and Sauer, G.R. (1996). Metallothionein Induction in Calcifying Growth Plate Cartilage Chondrocytes. *Connect. Tissue Res.* 35, 189–195.
- Litchfield, T.M., Ishikawa, Y., Wu, L.N., Wuthier, R.E., and Sauer, G.R. (1998). Effect of metal ions on calcifying growth plate cartilage chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.* 62, 341–349.
- Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O.V., Zhou, T.Y., Gassmann, R., Liu, W.T., Ohgi, K.A., Benner, C., Garcia-Bassets, I., Aggarwal, A.K., et al. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466, 508–512.
- Liu, X., Machado, G.C., Eyles, J.P., Ravi, V., and Hunter, D.J. (2018). Dietary supplements for treating osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* 52, 167–175.
- Loenarz, C., Ge, W., Coleman, M.L., Rose, N.R., Cooper, C.D.O., Klose, R.J., Ratcliffe, P.J., and Schofield, C.J. (2010). PHF8, a gene associated with cleft lip/palate and mental retardation, encodes for an Nepsilon-dimethyl lysine demethylase. *Hum. Mol. Genet.* 19, 217–222.
- Lolli, A., Lambertini, E., Penolazzi, L., Angelozzi, M., Morganti, C., Franceschetti, T., Pelucchi, S., Gambari, R., and Piva, R. (2014). Pro-chondrogenic effect of miR-221 and slug depletion in human MSCs. *Stem Cell Rev.* 10, 841–855.
- Lolli, A., Narcisi, R., Lambertini, E., Penolazzi, L., Angelozzi, M., Kops, N., Gasparini, S., van Osch, G.J.V.M., and Piva, R. (2016). Silencing of Antichondrogenic MicroRNA-221 in Human Mesenchymal Stem Cells Promotes Cartilage Repair In Vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 1801–1811.
- Long, F., and Ornitz, D.M. (2013). Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008334.
- Lories, R.J., and Luyten, F.P. (2011). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 43–49.
- Lu, J., McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2000). Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol. Cell* 6, 233–244.
- Lui, J.C., Garrison, P., Nguyen, Q., Ad, M., Keembiyehetty, C., Chen, W., Jee, Y.H., Landman, E., Nilsson, O., Barnes, K.M., et al. (2016). EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy. *Nat. Commun.* 7, 13685.

- McDonald, I.J., Liu, S.-C., Huang, C.-C., Kuo, S.-J., Tsai, C.-H., and Tang, C.-H. (2019). Associations between Adipokines in Arthritic Disease and Implications for Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Madry, H., Kaul, G., Cucchiarini, M., Stein, U., Zurakowski, D., Remberger, K., Menger, M.D., Kohn, D., and Trippel, S.B. (2005). Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther.* *12*, 1171–1179.
- Malemud, C.J. (2017). Matrix Metalloproteinases and Synovial Joint Pathology. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *148*, 305–325.
- Malhotra, S., Villar, L.M., Costa, C., Midaglia, L., Cubedo, M., Medina, S., Fissolo, N., Río, J., Castelló, J., Álvarez-Cermeño, J.C., et al. (2018). Circulating EZH2-positive T cells are decreased in multiple sclerosis patients. *J. Neuroinflammation* *15*, 296.
- Manferdini, C., Maumus, M., Gabusi, E., Piacentini, A., Filardo, G., Peyrafitte, J.-A., Jorgensen, C., Bourin, P., Fleury-Cappellesso, S., Facchini, A., et al. (2013). Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum.* *65*, 1271–1281.
- Manferdini, C., Paoletta, F., Gabusi, E., Gambari, L., Piacentini, A., Filardo, G., Fleury-Cappellesso, S., Barbero, A., Murphy, M., and Lisignoli, G. (2017). Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation. *Osteoarthritis Cartilage* *25*, 1161–1171.
- Maniar, K.H., Jones, I.A., Gopalakrishna, R., and Vangsness, C.T. (2018). Lowering side effects of NSAID usage in osteoarthritis: recent attempts at minimizing dosage. *Expert Opin. Pharmacother.* *19*, 93–102.
- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* *469*, 343–349.
- Mariner, P.D., Walters, R.D., Espinoza, C.A., Drullinger, L.F., Wagner, S.D., Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2008). Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol. Cell* *29*, 499–509.
- Maumus, M., Pers, Y.-M., Ruiz, M., Jorgensen, C., and Noël, D. (2018). [Mesenchymal stem cells and regenerative medicine: future perspectives in osteoarthritis]. *Med. Sci.* *MS 34*, 1092–1099.
- McAlindon, T.E., LaValley, M.P., Harvey, W.F., Price, L.L., Driban, J.B., Zhang, M., and Ward, R.J. (2017). Effect of Intra-articular Triamcinolone vs Saline on Knee Cartilage Volume and Pain in Patients With Knee Osteoarthritis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* *317*, 1967–1975.
- McBurney, M.W., Yang, X., Jardine, K., Bieman, M., Th'ng, J., and Lemieux, M. (2003). The absence of SIR2alpha protein has no effect on global gene silencing in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cancer Res.* *MCR 1*, 402–409.
- McCoy, A.M. (2015). Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet. Pathol.* *52*, 803–818.
- McGonagle, D., Baboolal, T.G., and Jones, E. (2017). Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *13*, 719–730.

- McGrath, M.S., Marker, D.R., Seyler, T.M., Ulrich, S.D., and Mont, M.A. (2009). Surface Replacement is Comparable to Primary Total Hip Arthroplasty. *Clin. Orthop.* 467, 94–100.
- Meeson, R.L., Todhunter, R.J., Blunn, G., Nuki, G., and Pitsillides, A.A. (2019). Spontaneous dog osteoarthritis - a One Medicine vision. *Nat. Rev. Rheumatol.* 15, 273–287.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10, 155–159.
- Milz, S., Benjamin, M., and Putz, R. (2005). Molecular parameters indicating adaptation to mechanical stress in fibrous connective tissue. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 178, 1–71.
- Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S.P., Higashiyama, R., Inoue, A., Kato, Y., Sato, T., Lotz, M.K., and Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum.* 60, 2723–2730.
- Mochizuki, T., Muneta, T., Sakaguchi, Y., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., and Sekiya, I. (2006). Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum.* 54, 843–853.
- Morisset, S., Frisbie, D.D., Robbins, P.D., Nixon, A.J., and McIlwraith, C.W. (2007). IL-1ra/IGF-1 gene therapy modulates repair of microfractured chondral defects. *Clin. Orthop.* 462, 221–228.
- Mow, V.C., and Guo, X.E. (2002). Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4, 175–209.
- Mow, V.C., Ratcliffe, A., and Poole, A.R. (1992). Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13, 67–97.
- Murtaugh, L.C., Zeng, L., Chyung, J.H., and Lassar, A.B. (2001). The chick transcriptional repressor Nkx3.2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis. *Dev. Cell* 1, 411–422.
- Muthuri, S.G., McWilliams, D.F., Doherty, M., and Zhang, W. (2011). History of knee injuries and knee osteoarthritis: a meta-analysis of observational studies. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1286–1293.
- Nehrer, S., Domayer, S., Dorotka, R., Schatz, K., Bindreiter, U., and Kotz, R. (2006). Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur. J. Radiol.* 57, 3–8.
- Nepple, J.J., Thomason, K.M., An, T.W., Harris-Hayes, M., and Clohisy, J.C. (2015). What is the utility of biomarkers for assessing the pathophysiology of hip osteoarthritis? A systematic review. *Clin. Orthop.* 473, 1683–1701.
- Nguyen, A.T., and Zhang, Y. (2011). The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev.* 25, 1345–1358.
- Ntziachristos, P., Tsirogos, A., Van Vlierberghe, P., Nedjic, J., Trimarchi, T., Flaherty, M.S., Ferres-Marco, D., da Ros, V., Tang, Z., Siegle, J., et al. (2012). Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* 18, 298–301.

- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., and Jenuwein, T. (2001). The Polycomb-Group Gene *Ezh2* Is Required for Early Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4330–4336.
- Okada, Y., Shinmei, M., Tanaka, O., Naka, K., Kimura, A., Nakanishi, I., Bayliss, M.T., Iwata, K., and Nagase, H. (1992). Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *66*, 680–690.
- Okura, T., Ohkawara, B., Takegami, Y., Ito, M., Masuda, A., Seki, T., Ishiguro, N., and Ohno, K. (2019). Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/ β -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Sci. Rep.* *9*, 2808.
- Oppenheimer, H., Gabay, O., Meir, H., Haze, A., Kandel, L., Liebergall, M., Gagarina, V., Lee, E.J., and Dvir-Ginzberg, M. (2012). 75-kd sirtuin 1 blocks tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *64*, 718–728.
- Oppong, R., Jowett, S., Nicholls, E., Whitehurst, D.G.T., Hill, S., Hammond, A., Hay, E.M., and Dziedzic, K. (2015). Joint protection and hand exercises for hand osteoarthritis: an economic evaluation comparing methods for the analysis of factorial trials. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *54*, 876–883.
- Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., Sentís, J., Sánchez, A., and García-Sancho, J. (2014). Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results. *Transplantation* *97*, e66-68.
- Ossendorf, C., Kaps, C., Kreuz, P.C., Burmester, G.R., Sittinger, M., and Erggelet, C. (2007). Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res. Ther.* *9*, R41.
- Öztürk, E., Hobiger, S., Despot-Slade, E., Pichler, M., and Zenobi-Wong, M. (2017). Hypoxia regulates RhoA and Wnt/ β -catenin signaling in a context-dependent way to control re-differentiation of chondrocytes. *Sci. Rep.* *7*.
- Papaiouannou, G., Mirzamohammadi, F., Lisse, T.S., Nishimori, S., Wein, M.N., and Kobayashi, T. (2015). MicroRNA-140 Provides Robustness to the Regulation of Hypertrophic Chondrocyte Differentiation by the PTHrP-HDAC4 Pathway. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *30*, 1044–1052.
- Parthun, M.R. (2007). Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* *26*, 5319–5328.
- Paskins, Z., Sanders, T., and Hassell, A.B. (2014). Comparison of patient experiences of the osteoarthritis consultation with GP attitudes and beliefs to OA: a narrative review. *BMC Fam. Pract.* *15*, 46.
- Patel, A., Dharmarajan, V., Vought, V.E., and Cosgrove, M.S. (2009). On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex. *J. Biol. Chem.* *284*, 24242–24256.
- Pediconi, N., Salerno, D., Lupacchini, L., Angrisani, A., Peruzzi, G., De Smaele, E., Levrero, M., and Belloni, L. (2019). EZH2, JMJD3, and UTX epigenetically regulate hepatic plasticity inducing retro-differentiation and proliferation of liver cells. *Cell Death Dis.* *10*, 518.
- Perry, A.S., Watson, R.W.G., Lawler, M., and Hollywood, D. (2010). The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* *7*, 668–680.

- Pers, Y.-M., Rackwitz, L., Ferreira, R., Pullig, O., Delfour, C., Barry, F., Sensebe, L., Casteilla, L., Fleury, S., Bourin, P., et al. (2016). Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl. Med.* *5*, 847–856.
- Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O’Sullivan, R.J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., et al. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* *12*, 1577–1589.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* *21*, 533–542.
- Piao, J., Tsuji, K., Ochi, H., Iwata, M., Koga, D., Okawa, A., Morita, S., Takeda, S., and Asou, Y. (2013). Sirt6 regulates postnatal growth plate differentiation and proliferation via Ihh signaling. *Sci. Rep.* *3*, 3022.
- Porcheret, M., Main, C., Croft, P., McKinley, R., Hassell, A., and Dziedzic, K. (2014). Development of a behaviour change intervention: a case study on the practical application of theory. *Implement. Sci.* *9*, 42.
- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* *28*, 1057–1068.
- Portoso, M., Ragazzini, R., Brenčič, Ž., Moiani, A., Michaud, A., Vassilev, I., Wassef, M., Servant, N., Sargueil, B., and Margueron, R. (2017). PRC2 is dispensable for HOTAIR-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* *36*, 981–994.
- Rausch Osthoff, A.-K., Juhl, C.B., Knittle, K., Dagfinrud, H., Hurkmans, E., Braun, J., Schoones, J., Vliet Vlieland, T.P.M., and Niedermann, K. (2018). Effects of exercise and physical activity promotion: meta-analysis informing the 2018 EULAR recommendations for physical activity in people with rheumatoid arthritis, spondyloarthritis and hip/knee osteoarthritis. *RMD Open* *4*, e000713.
- Razidlo, D.F., Whitney, T.J., Casper, M.E., McGee-Lawrence, M.E., Stensgard, B.A., Li, X., Secretto, F.J., Knutson, S.K., Hiebert, S.W., and Westendorf, J.J. (2010). Histone Deacetylase 3 Depletion in Osteo/Chondroprogenitor Cells Decreases Bone Density and Increases Marrow Fat. *PLOS ONE* *5*, e11492.
- Riddihough, G., and Zahn, L.M. (2010). What Is Epigenetics? *Science* *330*, 611–611.
- Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 145–166.
- Roberts, S.B., Wootton, E., De Ferrari, L., Albagha, O.M., and Salter, D.M. (2015). Epigenetics of osteoarticular diseases: recent developments. *Rheumatol. Int.* *35*, 1293–1305.
- Sacitharan, P.K. (2019). Ageing and Osteoarthritis. *Subcell. Biochem.* *91*, 123–159.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., and Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* *52*, 2521–2529.
- Salaffi, F., Ciapetti, A., and Carotti, M. (2014). The sources of pain in osteoarthritis: a pathophysiological review. *Reumatismo* *66*, 57–71.

Sander, S., Bullinger, L., Klapproth, K., Fiedler, K., Kestler, H.A., Barth, T.F.E., Möller, P., Stilgenbauer, S., Pollack, J.R., and Wirth, T. (2008). MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* *112*, 4202–4212.

Sauer, G.R., Smith, D.M., Cahalane, M., Wu, L.N.Y., and Wuthier, R.E. (2003). Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* *88*, 954–969.

Schotanus, M.G., Boonen, B., and Kort, N.P. (2016). Patient specific guides for total knee arthroplasty are ready for primetime. *World J. Orthop.* *7*, 61–68.

Schwarz, D., Varum, S., Zemke, M., Schöler, A., Baggiolini, A., Draganova, K., Koseki, H., Schübeler, D., and Sommer, L. (2014). Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 867–877.

Seenundun, S., Rampalli, S., Liu, Q.-C., Aziz, A., Palii, C., Hong, S., Blais, A., Brand, M., Ge, K., and Dilworth, F.J. (2010). UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J.* *29*, 1401–1411.

Sengupta, D., Byrum, S.D., Avaritt, N.L., Davis, L., Shields, B., Mahmoud, F., Reynolds, M., Orr, L.M., Mackintosh, S.G., Shalin, S.C., et al. (2016). Quantitative Histone Mass Spectrometry Identifies Elevated Histone H3 Lysine 27 (Lys27) Trimethylation in Melanoma. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *15*, 765–775.

Shahrouki, P., and Larsson, E. (2012). The Non-Coding Oncogene: A Case of Missing DNA Evidence? *Front. Genet.* *3*.

Sharma, L., Chmiel, J.S., Almagor, O., Felson, D., Guermazi, A., Roemer, F., Lewis, C.E., Segal, N., Torner, J., Cooke, T.D.V., et al. (2013). The role of varus and valgus alignment in the initial development of knee cartilage damage by MRI: the MOST study. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 235–240.

Shaw, T., and Martin, P. (2009). Epigenetic reprogramming during wound healing: loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes. *EMBO Rep.* *10*, 881–886.

Shayevitch, R., Askayo, D., Keydar, I., and Ast, G. (2018). The importance of DNA methylation of exons on alternative splicing. *RNA N. Y. N* *24*, 1351–1362.

Shen, J., Wang, C., Li, D., Xu, T., Myers, J., Ashton, J.M., Wang, T., Zuscik, M.J., McAlinden, A., and O’Keefe, R.J. (2017). DNA methyltransferase 3b regulates articular cartilage homeostasis by altering metabolism. *JCI Insight* *2*.

Shilatifard, A. (2012). The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 65–95.

Shpargel, K.B., Sengoku, T., Yokoyama, S., and Magnuson, T. (2012a). UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. *PLoS Genet.* *8*, e1002964.

Shpargel, K.B., Starmer, J., Yee, D., Pohlers, M., and Magnuson, T. (2014). KDM6 Demethylase Independent Loss of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation during Early Embryonic Development. *PLOS Genet.* *10*, e1004507.

- Shuai, Y., Yang, R., Mu, R., Yu, Y., Rong, L., and Jin, L. (2019). MiR-199a-3p mediates the adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating KDM6A/WNT signaling. *Life Sci.* *220*, 84–91.
- Sinha, K.M., Yasuda, H., Coombes, M.M., Dent, S.Y.R., and de Crombrughe, B. (2010). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor Osterix by NO66, a Jumonji family histone demethylase. *EMBO J.* *29*, 68–79.
- Smith, T.O., Dainty, J.R., and MacGregor, A.J. (2017). Changes in social isolation and loneliness following total hip and knee arthroplasty: longitudinal analysis of the English Longitudinal Study of Ageing (ELSA) cohort. *Osteoarthritis Cartilage* *25*, 1414–1419.
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* *1*, 461–468.
- Steinert, A.F., Ghivizzani, S.C., Rethwilm, A., Tuan, R.S., Evans, C.H., and Nöth, U. (2007). Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* *9*, 213.
- Steinwachs, M.R., Waibl, B., and Mumme, M. (2014). Arthroscopic Treatment of Cartilage Lesions With Microfracture and BST-CarGel. *Arthrosc. Tech.* *3*, e399–e402.
- Sulewska, A., Niklinska, W., Kozlowski, M., Minarowski, L., Naumnik, W., Niklinski, J., Dabrowska, K., and Chyczewski, L. (2007). DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem. Cytobiol.* *45*, 149–158.
- Swigut, T., and Wysocka, J. (2007). H3K27 demethylases, at long last. *Cell* *131*, 29–32.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., et al. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* *47*, D607–D613.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., et al. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* *16*, 1779–1791.
- Takayama, K., Ishida, K., Matsushita, T., Fujita, N., Hayashi, S., Sasaki, K., Tei, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Fujioka, H., et al. (2009). SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *60*, 2731–2740.
- Tamer, T.M. (2013). Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip. Toxicol.* *6*, 111–125.
- Tang, Y., Li, T., Li, J., Yang, J., Liu, H., Zhang, X.J., and Le, W. (2014). Jmjd3 is essential for the epigenetic modulation of microglia phenotypes in the immune pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* *21*, 369–380.
- Taylor, S.E.B., Li, Y.H., Smeriglio, P., Rath, M., Wong, W.H., and Bhutani, N. (2016). Stable 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) Acquisition Marks Gene Activation During Chondrogenic Differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *31*, 524–534.

- Thakur, M., Dickenson, A.H., and Baron, R. (2014). Osteoarthritis pain: nociceptive or neuropathic? *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 374–380.
- Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C.A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M.O., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3131–3141.
- Tjeertes, J.V., Miller, K.M., and Jackson, S.P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO J.* *28*, 1878–1889.
- Trattng, S., Winalski, C.S., Marlovits, S., Jurvelin, J.S., Welsch, G.H., and Potter, H.G. (2011). Magnetic Resonance Imaging of Cartilage Repair. *Cartilage* *2*, 5–26.
- Trenkmann, M., Brock, M., Gay, R.E., Kolling, C., Speich, R., Michel, B.A., Gay, S., and Huber, L.C. (2011). Expression and function of EZH2 in synovial fibroblasts: epigenetic repression of the Wnt inhibitor SFRP1 in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 1482–1488.
- Trerotola, M., Relli, V., Simeone, P., and Alberti, S. (2015). Epigenetic inheritance and the missing heritability. *Hum. Genomics* *9*.
- Trivedi, C.M., Luo, Y., Yin, Z., Zhang, M., Zhu, W., Wang, T., Floss, T., Goettlicher, M., Noppinger, P.R., Wurst, W., et al. (2007). Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nat. Med.* *13*, 324–331.
- Tsuji, T., Nakata, K., Vietri, J., and Jaffe, D.H. (2019). The added burden of depression in patients with osteoarthritis in Japan. *Clin. Outcomes Res. CEOR* *11*, 411–421.
- Tumes, D., Hirahara, K., Papadopoulos, M., Shinoda, K., Onodera, A., Kumagai, J., Yip, K.H., Pant, H., Kokubo, K., Kiuchi, M., et al. (2019). Ezh2 controls development of natural killer T cells, which cause spontaneous asthma-like pathology. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Turajane, T., Chaveewanakorn, U., Fongsarun, W., Aojanepong, J., and Papadopoulos, K.I. (2017). Avoidance of Total Knee Arthroplasty in Early Osteoarthritis of the Knee with Intra-Articular Implantation of Autologous Activated Peripheral Blood Stem Cells versus Hyaluronic Acid: A Randomized Controlled Trial with Differential Effects of Growth Factor Addition. *Stem Cells Int.* *2017*.
- Uthman, O.A., van der Windt, D.A., Jordan, J.L., Dziedzic, K.S., Healey, E.L., Peat, G.M., and Foster, N.E. (2014). Exercise for lower limb osteoarthritis: systematic review incorporating trial sequential analysis and network meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* *48*, 1579.
- Van der Meulen, J., Speleman, F., and Van Vlierberghe, P. (2014). The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics* *9*, 658–668.
- Van der Meulen, J., Sanghvi, V., Mavrakis, K., Durinck, K., Fang, F., Matthijssens, F., Rondou, P., Rosen, M., Pieters, T., Vandenberghe, P., et al. (2015). The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *125*, 13–21.
- Vega, R.B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A.C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J.M., Richardson, J.A., et al. (2004a). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* *119*, 555–566.

- Vega, R.B., Harrison, B.C., Meadows, E., Roberts, C.R., Papst, P.J., Olson, E.N., and McKinsey, T.A. (2004b). Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8374–8385.
- Verkleij, S.P.J., Luijsterburg, P. a. J., Bohnen, A.M., Koes, B.W., and Bierma-Zeinstra, S.M.A. (2011). NSAIDs vs acetaminophen in knee and hip osteoarthritis: a systematic review regarding heterogeneity influencing the outcomes. *Osteoarthritis Cartilage* *19*, 921–929.
- Vinatier, C., and Guicheux, J. (2016). Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* *59*, 139–144.
- Vinatier, C., Bouffi, C., Merceron, C., Gordeladze, J., Brondello, J.-M., Jorgensen, C., Weiss, P., Guicheux, J., and Noël, D. (2009a). Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* *4*, 318–329.
- Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., and Noël, D. (2009b). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* *27*, 307–314.
- Völkel, P., Dupret, B., Le Bourhis, X., and Angrand, P.-O. (2015). Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *Am. J. Transl. Res.* *7*, 175–193.
- Waddington, C.H. (2012). The Epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* *41*, 10–13.
- Wagner, E.J., and Carpenter, P.B. (2012). Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 115–126.
- Wang, T., and He, C. (2018). Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev.*
- Wang, C., Lee, J.-E., Cho, Y.-W., Xiao, Y., Jin, Q., Liu, C., and Ge, K. (2012a). UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 15324–15329.
- Wang, C., Abu-Amer, Y., O’Keefe, R.J., and Shen, J. (2018). Loss of Dnmt3b in Chondrocytes Leads to Delayed Endochondral Ossification and Fracture Repair. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *33*, 283–297.
- Wang, Y., Wluka, A.E., Berry, P.A., Siew, T., Teichtahl, A.J., Urquhart, D.M., Lloyd, D.G., Jones, G., and Cicuttini, F.M. (2012b). Increase in vastus medialis cross-sectional area is associated with reduced pain, cartilage loss, and joint replacement risk in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 3917–3925.
- Washietl, S., Pedersen, J.S., Korbil, J.O., Stocsits, C., Gruber, A.R., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Reiche, K., Tanzer, A., et al. (2007). Structured RNAs in the ENCODE selected regions of the human genome. *Genome Res.* *17*, 852–864.
- Watt, F.E. (2018). Musculoskeletal pain and menopause. *Post Reprod. Health* *24*, 34–43.
- Watt, F., and Molloy, P.L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* *2*, 1136–1143.

- Winters, C., Jasani, B., Marchant, S., and Morgan, A.J. (1997). Immunocytochemical identification of metallothionein-positive cells in rheumatoid synovium and analysis of their cell lineage. *Histochem. J.* *29*, 301–307.
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł.A., and Szukiewicz, D. (2014). The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis.
- Won, Y., Shin, Y., Chun, C.-H., Cho, Y., Ha, C.-W., Kim, J.-H., and Chun, J.-S. (2016). Pleiotropic roles of metallothioneins as regulators of chondrocyte apoptosis and catabolic and anabolic pathways during osteoarthritis pathogenesis. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 2045–2052.
- Wu, X., and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *18*, 517–534.
- Xu, J., Kang, Y., Liao, W., and Yu, L. (2012a). MiR-194 regulates chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by targeting Sox5. *PloS One* *7*, e31861.
- Xu, J., Shao, Z., Li, D., Xie, H., Kim, W., Huang, J., Taylor, J.E., Pinello, L., Glass, K., Jaffe, J.D., et al. (2015). Developmental Control of Polycomb Subunit Composition by GATA Factors Mediates a Switch to Non-Canonical Functions. *Mol. Cell* *57*, 304–316.
- Xu, K., Wu, Z.J., Groner, A.C., He, H.H., Cai, C., Lis, R.T., Wu, X., Stack, E.C., Loda, M., Liu, T., et al. (2012b). EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* *338*, 1465–1469.
- Xu, T., Wang, C., Shen, J., Tong, P., and O’Keefe, R. (2018). Ablation of Dnmt3b in chondrocytes suppresses cell maturation during embryonic development. *J. Cell. Biochem.* *119*, 5852–5863.
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. (2006). JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* *125*, 483–495.
- Yang, X.-J., and Seto, E. (2003). Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 143–153.
- Yang, X.-J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* *26*, 5310–5318.
- Yang, X.-J., and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 206–218.
- Yang, C.-Y., Chanalaris, A., and Troeberg, L. (2017). ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the “usual suspects.” *Osteoarthritis Cartilage* *25*, 1000–1009.
- Yang, H., Pesavento, J.J., Starnes, T.W., Cryderman, D.E., Wallrath, L.L., Kelleher, N.L., and Mizzen, C.A. (2008). Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. *J. Biol. Chem.* *283*, 12085–12092.
- Yang, L., Lawson, K.A., Teteak, C.J., Zou, J., Hacquebord, J., Patterson, D., Ghatan, A.C., Mei, Q., Zielinska-Kwiatkowska, A., Bain, S.D., et al. (2013). ESET histone methyltransferase is essential to hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes and formation of epiphyseal plates. *Dev. Biol.* *380*, 99–110.

- Yapp, C., Carr, A.J., Price, A., Oppermann, U., and Snelling, S.J.B. (2016). H3K27me3 demethylases regulate in vitro chondrogenesis and chondrocyte activity in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* *18*, 158.
- Yu, X., Qi, Y., Zhao, T., Fang, J., Liu, X., Xu, T., Yang, Q., and Dai, X. (2018). NGF increases FGF2 expression and promotes endothelial cell migration and tube formation through PI3K/Akt and ERK/MAPK pathways in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*.
- Zee, B.M., Levin, R.S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N.S., and Garcia, B.A. (2010). In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J. Biol. Chem.* *285*, 3341–3350.
- Zelik, K.E., and Kuo, A.D. (2010). Human walking isn't all hard work: evidence of soft tissue contributions to energy dissipation and return. *J. Exp. Biol.* *213*, 4257–4264.
- Zeng, L., Kempf, H., Murtaugh, L.C., Sato, M.E., and Lassar, A.B. (2002). Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes Dev.* *16*, 1990–2005.
- von Zglinicki, T., Edwall, C., Ostlund, E., Lind, B., Nordberg, M., Ringertz, N.R., and Wroblewski, J. (1992). Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *J. Cell Sci.* *103 (Pt 4)*, 1073–1081.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Chang, S., Antos, C.L., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2002a). Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* *110*, 479–488.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A., and Olson, E.N. (2002b). Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7302–7312.
- Zhang, F., Xu, L., Xu, L., Xu, Q., Li, D., Yang, Y., Karsenty, G., and Chen, C.D. (2015a). JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice. *J. Mol. Cell Biol.* *7*, 23–34.
- Zhang, H., Lang, Z., and Zhu, J.-K. (2018a). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 489.
- Zhang, M., Egan, B., and Wang, J. (2015c). Epigenetic mechanisms underlying the aberrant catabolic and anabolic activities of osteoarthritic chondrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *67*, 101–109.
- Zhang, X., Zhao, X., Fiskus, W., Lin, J., Lwin, T., Rao, R., Zhang, Y., Chan, J.C., Fu, K., Marquez, V.E., et al. (2012a). Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas. *Cancer Cell* *22*, 506–523.
- Zhang, X., Wang, Y., Yuan, J., Li, N., Pei, S., Xu, J., Luo, X., Mao, C., Liu, J., Yu, T., et al. (2018b). Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3. *J. Exp. Med.* *215*, 1365–1382.
- Zhang, Y., Niu, J., Felson, D.T., Choi, H.K., Nevitt, M., and Neogi, T. (2010). Methodologic challenges in studying risk factors for progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res.* *62*, 1527–1532.
- Zhang, Z., Kang, Y., Zhang, Z., Zhang, H., Duan, X., Liu, J., Li, X., and Liao, W. (2012b). Expression of microRNAs during chondrogenesis of human adipose-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* *20*, 1638–1646.

Zhou, J., Li, P., Chen, Q., Wei, X., Zhao, T., Wang, Z., and Wei, L. (2015). Mitogen-activated protein kinase p38 induces HDAC4 degradation in hypertrophic chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 370–376.

Zhou, J., Huang, S., Wang, Z., Huang, J., Xu, L., Tang, X., Wan, Y.Y., Li, Q., Symonds, A.L.J., Long, H., et al. (2019a). Targeting EZH2 histone methyltransferase activity alleviates experimental intestinal inflammation. *Nat. Commun.* *10*, 2427.

Zhou, Y., Zheng, L., Li, F., Wan, M., Fan, Y., Zhou, X., Du, W., Pi, C., Cui, D., Zhang, B., et al. (2018). Bivalent Histone Codes on WNT5A during Odontogenic Differentiation. *J. Dent. Res.* *97*, 99–107.

Zhou, Y., Chen, M., O’Keefe, R.J., Shen, J., Li, Z., Zhou, J., Zhou, X., and Mao, J.J. (2019b). Epigenetic and therapeutic implications of dnmt3b in temporomandibular joint osteoarthritis. *Am. J. Transl. Res.* *11*, 1736–1747.

Zimmermann, P., Boeuf, S., Dickhut, A., Boehmer, S., Olek, S., and Richter, W. (2008). Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. *Arthritis Rheum.* *58*, 2743–2753.

6 Annexes

CV Lyess ALLAS

Autres travaux auxquels j'ai participé :

- **Allas L**, Boumédiene K, Baugé C. Epigenetic dynamic during endochondral ossification and its impact on in vitro chondrogenesis. *Bone*. 2019 Mar;120:523-532.
- Aury-Landas J, Bazille C, **Allas L**, Bouhout S, Chesneau C, Leclercq S, Boumediene K, Baugé C. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci Rep*. 2017;7:6483.
- Lhuissier E, **Allas L**, Aury-Landas J, Boumediene K, Baugé C. The inhibition of histone demethylase JMJD3 and UTX reduces proliferation in chondrosarcomas. 2019 Jun 26. doi: 10.1002/iub.2110. IUBMB Life.

ALLAS Lyess (26 ans)
BioConnect Université de Caen Normandie
14032 Caen Cedex

Parcours académique

- 09/2019 Master spécialisé à Toulouse Business School (TBS), contrat de professionnalisation à UCB pharma (chargé de missions marketing)
- 2016-2019 **Doctorat « Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie »**, en cours de préparation, Université de Caen Normandie (UNICAEN), soutenance automne 2019
- 2016 **Master 2 Sciences Biomédicales, Signalisation et différenciation cellulaire (mention Très-bien, rang : 1/10)** à l'UNICAEN
- 2014 **Licence Biologie (mention Bien, rang : 2/31)** à l'UNICAEN.
- 2011 **Bac S spécialité SVT** au Lycée Charles de Gaulle 14000 Caen

Expérience professionnelle

Recherche :

Depuis le 1^{er} octobre 2016-... : **EA 7451** BioConnect, Caen

Doctorat, sous la direction de Catherine Baugé

Sujet : Méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 : rôle et régulation dans le cartilage articulaire.

Financement : Allocation doctorale ministérielle

Du 1^{er} oct 2015 au 30 juin 2016 : **EA 4652** Microenvironnement cellulaire et Pathologie (MILPAT), Equipe BioConnect, Caen.

Stage diplômant (M2R), sous la direction du Dr. Catherine Baugé et du Pr. Karim Boumediene

Sujet : Rôle des H3K27me3 demethylases JMJD3 et UTX au cours de l'arthrose et de la chondrogenèse.

Du 13 avril 2015 au 5 juin 2015 : **EA 4652** MILPAT, Equipe BioConnect, Caen.

Stage diplômant (M1), sous la direction du Dr. Catherine Baugé.

Sujet : Mécanismes de résistance des chondrosarcomes au cisplatine.

Du 30 juin 2014 au 1^{er} aout 2014 : **UMR-S INSERM U919**, Caen.

Stage non diplômant, sous la direction du Dr. Isabelle Bardou.

Sujet : Recapture du TPA neuronal par les astrocytes.

Du 10 mars 2014 au 17 mars 2014 : **Laboratoire d'Immunologie et Immunopathologie**, Caen.

Stage diplômant (L3), sous la direction du Pr. Brigitte le Mauff.

Sujet : Développement de cellules présentatrices d'antigène artificielles.

Du 5 aout 2013 au 9 aout 2013 : **Imagerie et Stratégies Thérapeutiques de la Schizophrénie**, Caen.

Stage non diplômant, sous la direction du Dr. Annick Haelewyn.

Sujet : Imagerie fonctionnelle par résonance magnétique de la schizophrénie.

Enseignements dispensés

Février Mars 2018 45h de physiologie animale (TP) UFR science, L2 biologie

Encadrement de stagiaire :

Novembre 2017-Juin 2018 Encadrement (Ophélie GRARD, M2 6 mois)
Janvier-Juin 2017 Encadrement technique (Quitterie Rochoux, M2 6 mois)
Avril 2016 Maître de stage (Cécilia Thomine, L3 une semaine)

Vulgarisation scientifique :

Novembre 2017 Organisation d'un stand pour la fête de la science. Obtention d'un financement de 150 euros (FSDIE/OPTIC)
Mars 2016 Participation au concours ma thèse en 180 secondes « Normandie »

Activités d'expertises :

Mars 2018 Membre du jury de la sélection posters aux Journées des écoles doctorales 2018
Novembre, décembre 2017 Co-reviewing d'articles (Sage Journals, Cytokine)

Vie associative et sociétés savantes :

2017-2018 Trésorier de l'association OPTIC (Organisation Pour les doctorants Interdisciplinaire de Caen)
Depuis octobre 2016 Membre de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire
Depuis octobre 2017 Membre de la Société Française de Biologie cellulaire

Compétences et savoir-faire

Expertise scientifique : Biologie cellulaire et moléculaire, Epigénétique, Chondrocyte, Cartilage articulaire, Rhumatologie, Cellules souches mésenchymateuse, Différenciation cellulaire, culture 2D vs 3D.

Expertise technique : Culture cellulaire (chondrocytes primaires, cellules souches mésenchymateuses ; culture en 2D et 3D ; culture en normoxie et hypoxie), extraction de protéines et d'ARN, Western Blot, RT-PCR en temps réel, Immunohistochimie, transfection.

Compétences transversales : Adaptation aux interlocuteurs, habilité à maîtriser et appliquer rapidement des nouveaux concepts, autonomie de travail et autoformation. Collaborations (régionale/nationale), veille scientifique et technologique. Trésorerie (gestion budgétaire, rédaction de demande de financement).

Informatique : C2i (certificat informatique et internet), maîtrise de logiciels de traitement de texte et de présentation : Open office, Word, Excel, Power Point. Maîtrise de logiciels d'analyse d'image : image Lab et image J.

Langues : Français langue maternelle, anglais lu, écrit (article, revue) et parlé (congrès)

Formation continue

Mai 2018	Formation à la chirurgie sur petit animal, unité de recherche UMR 1132 Bioscar (3 h)
Avril 2018	Doctoriales Séminaire résidentiel sur l'insertion professionnelle et la gestion de projet en équipe (40 h)
Avril 2018	Formation à l'enseignement et la recherche (15 h) à l'école supérieure du professorat et de l'éducation (ESPE)
Juin 2017	Diplôme universitaire d'expérimentation animale (80 h)
Avril 2017	Formation à l'utilisation du cryostat au laboratoire Inserm U919 SP2U (3 h)
Mars 2017	Journée de formation à la vulgarisation scientifique (MT180) (7 h)
Janvier 2016	Hygiène et Sécurité : Risques spécifiques et généraux dans les laboratoires de biologie et chimie, Unicaen (30h)

Prix et Bourses

Mars 2018	Bourse de voyage pour le congrès de la FEBS (Federation of European Biochemical Societies)
Novembre 2017	Prix de la meilleure communication orale - Journée Normande de Recherche Biomédicale
Juillet 2016	Allocation au concours de l'école doctorale Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement

Publications

Articles et revues

Allas L, Rochoux Q, Leclercq S, Boumédiene K, Baugé C. Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) treatment as a new in vitro model of osteoarthritis. *Lab Invest.* 2019 Aug 13. doi: 10.1038/s41374-019-0303-0

Lhuissier E, **Allas L**, Aury-Landas J, Boumediene K, Baugé C. The inhibition of histone demethylase JMJD3 and UTX reduces proliferation in chondrosarcomas. 2019 Jun 26. doi: 10.1002/iub.2110. *IUBMB Life.*

Allas L, Boumédiene K, Baugé C. Epigenetic dynamic during endochondral ossification and its impact on in vitro chondrogenesis. *Bone.* 2019 Mar;120:523-532.

Aury-Landas J, Bazille C, **Allas L**, Bouhout S, Chesneau C, Leclercq S, Boumediene K, Baugé C. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci Rep.* 2017;7:6483.

En preparation

Allas L, Rochoux Q, Ribet J, Maubert E, Grad O, Dujarrier C, Leclercq S, Cohen-Solal M, Korn E, Agin V, Boumédiene K & Baugé C. EZH2 inhibition attenuates inflammation and cartilage degradation during osteoarthritis

Allas L, Rochoux Q, Rondeaux J, Maubert E, Leclercq S, Agin V, Fraineau S, Boumédiene K & Baugé C. JMJD3 enhances chondrogenesis. Impact on cartilage engineering.

Communications orales

Congrès internationaux

Allas L, Rochoux Q, Berthelot M, Leclercq S, Boumédiene K, Baugé C. Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) treatment as a new in vitro model of osteoarthritis. **18th FEBS Young Scientists' Forum**. (Prague, 4-7 Juillet 2018)

Congrès nationaux

Allas L, Aury-Landas J, Bazille C, Rochoux Q, Bertelot M, Leclercq S, Boumédiene K, Baugé C. Turning OFF genes involved in osteoarthritis via epigenetic therapy. **Journées annuelles de l'EdNBISE 2018** (Rouen, 22-23 mars 2018).

Allas L, Aury-Landas J, Bazille C, Rochoux Q, Chesneau C, Leclercq S, Boumédiene K, Baugé C. EZH2 inhibition reduces IL-1 β -mediated inflammation and increases anabolic gene expression in human chondrocytes. **Journée normande de la recherche biomédicale (JNRB Caen, Novembre 2017)**. Prix de la meilleure communication orale.

Aury-Landas J, Bazille C, **Allas L**, Bouhout S, Chesneau C, Leclercq S, Boumédiene K, Baugé C. Histone methylase EZH2 inhibitor, 3-deazaneplanocin A (DZNep), has anti-inflammatory and chondroprotective effects in human articular chondrocytes. **EPIBREST 2016** (Brest, 7-9 décembre 2016)

Lhuissier E, **Allas L**, Bazille C, Boumediene K, Baugé C. L'inhibition pharmacologique de la méthylation de H3K27 réduit la croissance des chondrosarcomes. **9èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest** (Deauville, 18-20 Mai 2016)

Lhuissier E, **Allas L**, Bazille C, Boumediene K, Baugé C. GSK-J4 : Nouvel agent chimiothérapeutique contre les chondrosarcomes. **Journées annuelles de l'EdNBISE 2016**. (Rouen, 10-11 mars 2016)

Communications affichées

Congrès internationaux

Aury-Landas J, **Allas L**, Rochoux Q, Leclercq S, Boumediene K, Baugé C. EZH2 inhibition reduces IL-1 β -mediated inflammation and increases anabolic gene expression in human chondrocytes. **2018 World Congress on Osteoarthritis**, (Liverpool, 26-29 avril 2018)

Allas L, Rochoux Q, Berthelot M, Leclercq S, Boumédiene K, Baugé C. Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) treatment as a new in vitro model of osteoarthritis. **18th FEBS Young Scientists' Forum**. (Prague, 7-12 Juillet 2018)

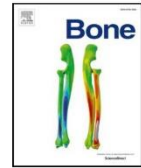
Congrès nationaux

Allas L, Rochoux Q, Leclercq S, Maubert E, Boumédiene E, Baugé C. The histone demethylases JMJD3 and UTX favor mesenchymal stem cell differentiation into chondrocyte. **Journées annuelles de l'EdNBISE 2019**. (Caen, 10-11 mars 2019)

Allas L, Rochoux Q, Leclercq S, Boumédiene K, Baugé C. Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) treatment as a new in vitro model of osteoarthritis useful to screen the efficiency of drugs with anti-hypertrophic effects. **Journée normande de la recherche biomédicale** (JNRB Caen, Novembre 2018)

Allas L, Berthelot M, Leclercq S, Boumediene K, Baugé C. TGF- β long-term treatment alters cartilage anabolism and induces hypertrophy in human chondrocytes. **Journées annuelles de l'EdNBISE 2017**. (Le Havre, 16-17 mars 2017)

Allas L, Berthelot M, Leclercq S, Boumediene K, Baugé C. TGF- β long-term treatment alters cartilage anabolism and induces hypertrophy in human chondrocytes **Journée normande de la recherche biomédicale 2017**. (Caen, Novembre 2016)



Review Article

Epigenetic dynamic during endochondral ossification and articular cartilage development



Lyess Allas, Karim Boumédiène, Catherine Baugé*

Normandie Univ, UNICAEN, EA7451 BioConnecT, Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Epigenetics
Endochondral ossification
Gene regulation
Cartilage
Chondrogenesis
DNA methylation
Histone methylation
lncRNA
miRNA

ABSTRACT

Within the last decade epigenetics has emerged as fundamental regulator of numerous cellular processes, including those orchestrating embryonic and fetal development. As such, epigenetic factors play especially crucial roles in endochondral ossification, the process by which bone tissue is created, as well during articular cartilage formation. In this review, we summarize the recent discoveries that characterize how DNA methylation, histone post-translational modifications and non-coding RNA (e.g., miRNA and lncRNA) epigenetically regulate endochondral ossification and chondrogenesis.

Epigenetic is the study of reversible changes in gene expression transmitted during cell divisions that do not result from DNA sequence modification. The epigenome includes DNA methylation, post-translational histone modifications which induce changes in chromatin structure, as well as non-coding RNA expression [1]. According to its condensation state, chromatin permits or prevents the access of the transcriptional machinery to DNA sequences.

Epigenetic marks are established by proteins called “writers”, such as DNA methyltransferases (DNMT), histone acetyltransferases (HAT), and histone methyltransferases (HMT), whereas they are removed by proteins known as “erasers”, especially histone deacetylases (HDAC), histone demethylases (KDM) and DNA demethylases (TET). They are interpreted by transcription factors and cofactors referred to as “readers”. Non coding RNA (ncRNA) also act as epigenetic regulators by controlling DNA transcription, RNA maturation and translation. As developed in this review, many epigenetic actors and chromatin remodeling complexes regulate endochondral ossification as well as cartilage development. Epigenetic processes are also major mediators in joint disease development. However, this role in joint diseases has been well-documented elsewhere these last months [2–5].

1. Endochondral ossification

The mechanical integrity of the skeleton is imparted primarily by two tissues: bone and cartilage. During development, cells from

different embryonic origins undergo a similar sequence of events to form fetal skeletal cartilage [6]. The paraxial mesoderm gives rise to the sclerotome, a developmental structure that will pattern the vertebrae and ribs of the axial skeleton. In contrast, the lateral flank mesoderm generates the limb bud that patterns long bones of the limbs. Endochondral ossification contributes in part to formation of the craniofacial bones, including the cranial base, mandible and temporal bones.

In each case, development of skeletal elements begins with cellular condensations. Cells within these condensations then undergo the complex process of chondrogenesis [7]. During this process, mesenchymal chondrogenitor cells aggregate. The expression of cell adhesion molecules increases. These changes in cell behavior are tightly regulated by activation of chondrocyte-selective transcription factors, particularly, the transcription factor Sex Determining Region Y-Box 9 (SOX9). Sox9 is expressed very early in the development and is the major regulator of the chondrogenic program [8].

Cells at the core of condensations change in morphology from fibroblast-like to more spherical, and increase the synthesis of specific extracellular molecules, including aggrecan and collagens type II, IX and XI. This is mediated through the transcription factor trio SOX5/6/9. At the same time, cells at the periphery of condensation retain a fibroblastic morphology and differentiate into perichondrial cells that continue to express type I collagen [6].

Chondrocytes at the core of the condensations quickly proliferate to promote limb extension and linear growth of the developing skeleton.

* Corresponding author at: BioConnecT, Université de Caen Normandie, 14032 Caen, France.
E-mail address: catherine.bauge@unicaen.fr (C. Baugé).

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.004>

Received 29 August 2018; Received in revised form 3 October 2018; Accepted 4 October 2018
Available online 06 October 2018

8756-3282/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

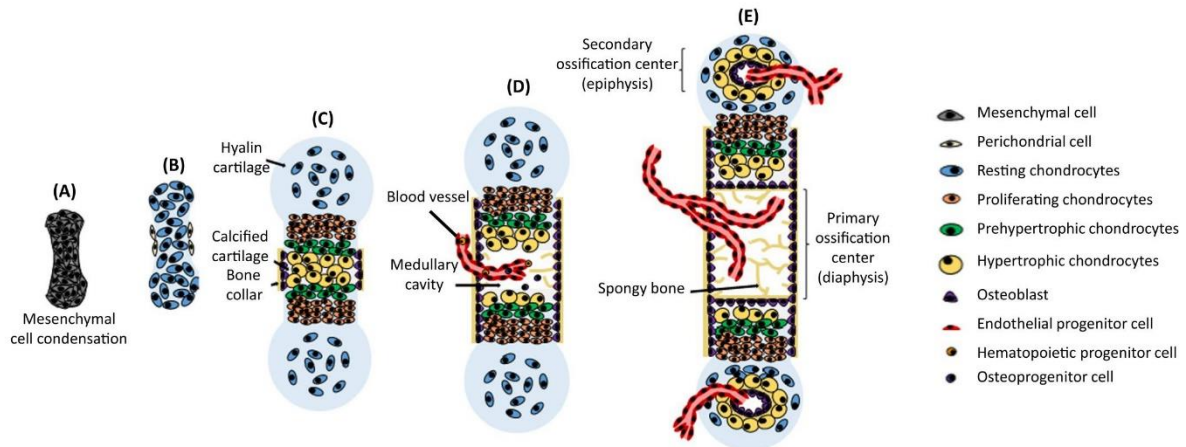


Fig. 1. Endochondral ossification. (A) Mesenchymal cells condensation. (B) Fetal hyaline cartilage model develops. (C) Cartilage calcifies and a periosteal bone collar forms around diaphysis. (D) Primary ossification center forms in the diaphysis. (E) Secondary ossification center forms in epiphysis.

Next, they stop to proliferate and undergo progressive hypertrophy. This final step of differentiation is a well-coordinated program that is governed, in part, by the transcription factor runt-related transcription factor 2 (RUNX2) [8]. This ordered process of proliferation and differentiation leads to the formation of stratified zones of cells at different cell cycle stages [7] (Fig. 1). At the extremity of the elements, in the resting zone, chondrocytes exhibit a round cell morphology and are quiescent, whereas chondrocytes in the columnar or proliferative zone have a more flattened morphology and rapidly proliferate. Then, towards the core of the elements is a zone of post-mitotic cells that begin to enlarge and are characterized by the expression of Indian Hedgehog (IHH) and decreased expression of SOX9. This is the prehypertrophic zone. Finally, the hypertrophic zone represents terminal, enlarged chondrocytes that produce a unique mineralized extracellular matrix (ECM) containing type X collagen. Hypertrophic chondrocytes also produce matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and vascular endothelial growth factor (VEGF) to facilitate matrix remodeling and vascular invasion. This invading vasculature permits the entry of osteoprogenitors that differentiate into osteoblasts. Hypertrophic chondrocytes undergo apoptosis [9,10]; thereby, cartilage serves as a template and is replaced

by bone during endochondral ossification.

2. Articular cartilage formation and maintenance

Articular cartilage plays an important role in withstanding mechanical stress associated with joint movement at the ends of long bones. It differs from growth plate cartilage in terms of extracellular matrix content, cellular organization and mechanical properties. Articular cartilage is comprised primarily of ECM, composed mainly of collagens and proteoglycans, populated sparsely with chondrocytes that perform matrix-generation and maintenance functions (Fig. 2). Mature articular cartilage has a zonal organization that is divided into a superficial layer, a mid layer, the deep layer, and the calcified layer, in order from the surface of articular cartilage towards the bone.

During skeletal patterning, articular cartilage formation begins at the interzones, regions of undifferentiated mesenchyme that separate developing skeletal elements. The interzone is also the presumptive joint formation site [11]. This suggests that articular “stable” chondrocytes may have a distinct embryonic origin compared to the “transient” chondrocytes that derive from the mesenchymal condensations

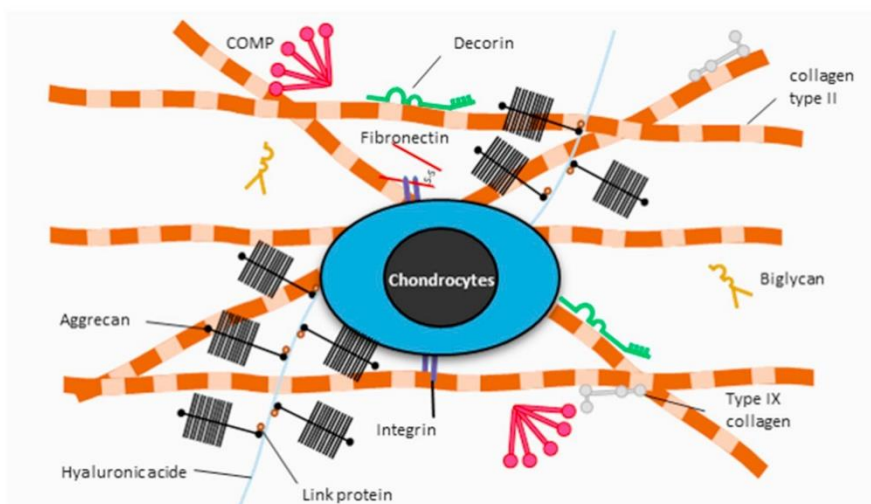


Fig. 2. Components of cartilage. Cartilage is composed of specialized cells called chondrocytes that produce an abundant extracellular matrix. Three main protein classes are present in articular cartilage: collagens (mainly type II collagen), proteoglycans (mainly aggrecan), and non-collagenous proteins (including link protein, fibronectin and cartilage oligomeric matrix protein, COMP). Other proteoglycans are present such as decorin and biglycan.

forming the bulk of anlagen [12]. Interzones first appear as densely cellular, homogenous regions. As joint development progresses, the interzone derives three layers: two chondrogenic layers that cover the articular surfaces of the developing opposed skeletal elements, and an intermediate layer that separates them. Some evidences suggests that the cells derived from this intermediate layer differentiate to become articular chondrocytes, whereas the outer layer chondrocytes are incorporated into the growing epiphysis [11,13].

Transient growth cartilage and articular cartilage differ in their collagen composition during development. In embryonic growth cartilage, collagen type-IIA expression precedes production of collagen type-IIB, which is not detectable at later stages of development. In contrast, in articular cartilage collagen type-IIA protein is not produced within the interzone, which reinforces the belief that the cartilage anlagen that forms individual skeletal elements is not continuous [14,15].

Other substantial differences exist between articular chondrocytes and transient chondrocytes. Contrary to growth plate chondrocytes, articular chondrocytes maintain a stable phenotype characterized by small cell size, and they do not undergo a sequence of proliferation, maturation, hypertrophy, apoptosis and ossification [11]. Also, they maintain joint function throughout life and do so by retaining a stable and permanent phenotype, producing all the macromolecular components of articular cartilage including aggrecan and collagen II, and providing the tissue with functional resilience.

However, in pathological conditions, articular chondrocytes can potentially undergo maturation and hypertrophy, and display traits of transient growth plate chondrocytes. This shift from a permanent to a transient chondrocyte phenotype is seen for instance in the joints of osteoarthritic patients [12]. Traits expressed by such abnormal articular chondrocytes include an enlarged hypertrophic cell size, increased production of metalloproteases (such as MMP13), and expression of hypertrophic genes, such as alkaline phosphatase or type X collagen. These aberrant characteristics are associated with joint dysfunction and disease.

These processes of endochondral ossification and articular cartilage formation are highly organized and tightly controlled. In particular, as we will discuss in this review, epigenetic regulations plays crucial roles in this orchestration. This includes DNA methylation, histone post-translational modifications (acetylation, methylation) and non-coding RNA.

3. DNA methylation

DNA methylation is the addition of a methyl group to the DNA, at CpG dinucleotides to convert cytosine to 5-methylcytosine (5mC). DNA methylation favors genomic integrity and largely contributes to gene silencing [16].

DNA methylation patterns are established and modified in response to environmental factors by three DNA methyltransferases (DNMT), named DNMT1, DNMT3A and DNMT3B. DNMT1 is a maintenance methyltransferase that methylates hemi-methylated DNA (one strand). It is therefore important for transferring patterns of methylation to a newly synthesized strand after DNA replication. DNMT3A and DNMT3B are *de novo* methyltransferases, which add methylation to unmethylated cytosines [1].

While embryonic regulation of genomic DNA methylation is crucial and relatively well documented during the early stages of development, less is known about its involvement during endochondral ossification and chondrogenesis. DNA methylation is an essential step by which embryonic stem cells silence several key transcription factors, such as SOX2, octamer-binding transcription factor 3/4 (OCT3/4), and Nanog homeobox (NANOG) [17–19], and partial disruptions of the DNA methylation machinery by genetic mutations often cause serious developmental defects [20–23]; however, its role in cartilage and/or in chondrocytes is unclear.

An early study using chick embryos reported the possible role of DNA methylation in the regulation of type I and II collagen genes

during chondrocyte differentiation and dedifferentiation [24]; however, the methylation status of promoter CpG islands was found to be preserved in critical genes, such as SOX9 and RUNX2, during chondrogenesis [25]. This observation may indicate a retained capability of the mesenchymal progenitor cells to change their differentiation status even after chondrogenesis, since similar observations about adipogenesis of MSCs have been reported [26–29]. In contrast, two CpG sites within the COL10A1 promoter appear to be demethylated during chondrocyte differentiation from mesenchymal stem cells correlating with COL10A1 expression [30].

Recently, using genetically modified murine models, DNMT3B has been identified as a critical epigenetic factor in the regulation of articular chondrocyte differentiation and in the maintenance of articular cartilage homeostasis [31], as well in the regulation of chondrocyte hypertrophic differentiation [32,33].

Additional insight has been demonstrated using potent demethylation agents, especially 5-azacytidine (5-azaC) and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC). Pretreatment of mesenchymal stem cells with 5-azaC facilitates osteogenic differentiation, causing hypomethylation of genomic DNA and increased gene expression [34,35]. Furthermore, 5-azaC promotes terminal differentiation of articular chondrocytes [36,37] by acting as a modulator of chondrocyte hypertrophy and maturation in cultured chick caudal region chondrocytes [38].

Methylated cytosines (5mC) can be further oxidized to 5-hydroxymethylcytosines (5hmC) by Ten-eleven-translocation (TET) proteins [39–41], leading to either a stable 5hmC gain, or further oxidation to 5-formylcytosines (5fC) and 5-carboxylcytosines (5caC) and DNA demethylation. 5hmC acquisition appears to play a major regulatory role in cartilage differentiation and development [42]. Changes in 5hmC levels have been reported during limb development, and global 5hmC levels increase during both *in vitro* and *in vivo* chondrogenesis. Interestingly, stable gains in 5hmC were observed in specific subsets of genes including genes associated with cartilage development and in chondrogenic lineage-specific genes, such as SOX5, 6 and 9, as well as COL2A1, whereas minimal changes were observed in the housekeeping genes HPRT (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) and beta-actin [42]. Additionally, gene expression changes in Tet family members, TET 1, 2 and 3, demonstrate a similar pattern during chondrogenic differentiation, with an initial increase followed by a decline in TET expression. Moreover, knockdown of TET1 leads to both decreased 5hmC levels and impaired *in vitro* chondrogenic differentiation [42].

4. Histone acetylation

RUNX2 and SOX9 are often referred to as master regulators of osteoblast and chondrocyte lineage commitment, respectively. These transcription factors bind DNA and provide docking sites for transcriptional co-activators and repressors, including histone deacetylases (HDAC) and their enzymatic counterparts, histone acetyl transferases (HAT), permitting a tissue-specific gene expression regulation [43].

The HAT writers add a negatively charged acetyl groups (CH₃CO) to ϵ -amino groups of lysine residues in the N-terminal histone tails to neutralize the positively charged sidechains. This reduces the affinity of histones for negatively charged DNA, and thereby favors chromatin decompaction, facilitating the access of the transcriptional machinery to DNA target sequences. Conversely, by erasing acetyl groups, HDACs favor chromatin condensation and transcriptional repression. HDACs can also deacetylate lysine residues on non-histone proteins, including RUNX2, affecting their stability and/or cellular localization to influence gene expression programs [43,44].

In human, HDACs are subdivided into four classes. Classical HDACs, comprise class I, II and IV and have a zinc dependent activity, while class III (sirtuins, SIRT) are nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) dependent. Class II HDAC (HDAC4-9 and 10) demonstrate a more tissue restricted expression pattern than class I HDAC (HDAC 1-3 and 8),

making them important contributors to cell-specific differentiation programs.

The roles of HDACs in the first step of endochondral ossification are difficult to ascertain because many HDAC knock-out mice die during early embryogenesis (Table 1). However, HDAC2/4/5/6/8 and 9 do not appear to regulate mesenchymal condensation because individual deletion of these enzymes allows early endochondral bone formation [45–47]. But it cannot be excluded that some redundancy exists among these HDACs in regulating the endochondral ossification process, as is the case for HDAC5/9 that compensate during heart development [45].

More is known about the functions of HDACs within subsequent phases of endochondral ossification. During commitment of mesenchymal precursors to the chondrocyte lineage, HDAC1 associates with Nkx3.2, one of major transcriptional repressors governing cartilage formation during endochondral ossification [48,49]. This complex also represses Smad-dependent signaling to control BMP2 responses [50]. During the following stages, HDAC1 regulates expression of chondrocyte specific matrix genes including aggrecan, collagens (type II and IX) and COMP [43]. HDAC2, highly homologous to HDAC1, also regulates the expression of cartilage ECM genes (aggrecan, collagen type II and XI) [51]. A role for HDAC1 during bone formation was also supported by the differential expression of HDAC1 during osteoblast differentiation. Indeed, its expression decreases during osteoblast differentiation, whereas its knock-down stimulates osteoblastic differentiation [52]. Mechanistically, HDAC1 regulates osteoblast differentiation through a physical association with RUNX2 to decrease transcriptional activity and to repress the stimulatory effects of p300 [52].

HDAC3 and HDAC4 control chondrocyte hypertrophy. HDAC3 is highly expressed in resting and prehypertrophic growth plate

chondrocytes, as well as in articular chondrocytes [43]. Conditional deletion of HDAC3 in osteo-chondroprogenitor cells decreases growth plate height, and expands the hypertrophic zone [53]. HDAC3-deficient chondrocytes enter in hypertrophy sooner, exhibit increased expression of cytokine and matrix-degrading genes (IL-6, MMP3, MMP13) and a reduced abundance of genes related to extracellular matrix production, bone development, and ossification (aggrecan, collagen type II and X, IHH, osteopontine) [54–56].

The expression pattern of HDAC3 partially overlaps with that of HDAC4, which is also required for proper endochondral ossification [47]. Both control chondrocyte hypertrophy through their interaction with the key transcription factors RUNX2 and MEF2, as well as with corepressor ZPF521 [47,53,57]. However, unlike HDAC3, HDAC4 expression is maintained in hypertrophic chondrocytes, and mice with germline deletion of HDAC4 function are viable, but exhibit premature endochondral ossification [47]. Thus, genetic deletion of HDAC4 causes premature ossification and accelerated chondrocyte hypertrophy, as evidenced by increased expression of IHH, RUNX2 and collagen type X within the developing growth plate [47]. In contrast, HDAC4 over-expression *in vivo* mimics the RUNX2 KO phenotype and results in inhibition of endochondral ossification [47]. HDAC4 also regulates osteoblast maturation by controlling expression of MMP13 through a RUNX2-dependent and PTH-sensitive mechanism [58]. Also, BMP signaling facilitates nuclear export of HDAC4, impeding its ability to bind and repress nuclear transcription factors like RUNX2 [59,60]. Recently, it was highlighted that mitogen-activated protein kinase p38 (p38 MAPK) increases caspase-dependent HDAC4 degradation and consequently induces RUNX2 expression as well as hypertrophic differentiation [61].

Table 1
Skeletal phenotypes resulting from epigenetic alterations in mice.

Component	Genetic modification	Cell affected	Results	References
Histone deacetylases				
HDAC1	KO	All (germline deletion)	Embryonic lethal	[1, 2]
HDAC2	KO	All (germline deletion)	Reduced body size (reduced vertebrae/pelvis size)	[3]
HDAC3	KO	All (germline deletion)	Embryonic lethal	[4, 5]
HDAC3	cKO	Osteochondral lineage (<i>Osx:Cre</i> deletion)	Severe osteopenia due to abnormal maturation of osteoblasts. Reduced body size. Cortical bone loss. Trabecular bone loss. Decreased bone formation rate. Increased bone marrow adipocyte differentiation	[6]
HDAC4	KO	All (germline deletion)	Premature ossification of developing bones due to ectopic and early onset chondrocyte hypertrophy	[7]
HDAC4	Tg	Chondrocytes (<i>Col2a1</i> promoter driven)	No endochondral ossification	[7]
HDAC5	Tg	All (antagonization of <i>Hdac5</i> repressor)	Trabecular bone loss. Decreased cortical bone strength. Decreased bone formation rate	[8]
HDAC6	KO	All (germline deletion)	Increased trabecular bone mineral density	[9]
HDAC7	ciKO	Early chondrocytes (tamoxifen-inducible <i>Col2a1:Cre</i> deletion)	Increased proliferation and β -catenin levels in growth plate chondrocytes. Expanded proliferative zone	[10]
HDAC8	KO	All (germline deletion)	Ossification defects in frontal and interparietal bones	[11]
HDAC8	cKO	Pre-osteoblasts (<i>Twist1:Cre</i> deletion)	No effect	[11]
HDAC8	cKO	Osteoblasts (<i>Col1a1:Cre</i> deletion)	No effect	[11]
HDAC8	cKO	Chondrocytes (<i>Col2a1:Cre</i> deletion)	No effect	[11]
HDAC8	cKO	Neural crest cells (<i>Wnt1:Cre</i> deletion)	Ossification defects in frontal and interparietal bones	[11]
SIRT1	KO	All (germline deletion)	Reduced body size. Cranio-facial abnormalities. Trabecular bone loss. Altered cartilage phenotype. Increased apoptotic chondrocytes and OA severity with age	[12, 13]
SIRT6	KO	All (germline deletion)	Reduced body size. Defects in proliferation and hypertrophic chondrocyte differentiation	[14]
Histone methyltransferases				
ESET	cKO	Mesenchymal cells (<i>Prx1:Cre</i> deletion)	Accelerated chondrocyte hypertrophy. Defect in long bone growth. Defect in trabecular bone formation	[15, 16]
EZH2	KO	All (germline deletion)	Embryonic lethal	[17]
EZH2/EZH1	cKO	<i>Col2-cre</i> <i>Ezh1</i> ^{-/-} <i>Ezh2</i> ^{fl/fl}	Decreased overall body growth and longitudinal bone growth. Insufficient growth of the rib cage and by the abnormal vertebral column. Decreased chondrocyte proliferation and hypertrophy	[17]
EZH2	cKO	Neural crest cells (<i>Wnt1:Cre</i> deletion)	Defect in craniofacial bone and cartilage formation	[18]
Histone demethylase				
JMJD3	KO	All (germline deletion)	Reduced proliferation and hypertrophy of chondrocytes. Delayed endochondral ossification	[19]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Component	Genetic modification	Cell affected	Results	References
miRNA process DICER	cKO	Chondrocytes (<i>Col2a1:Cre</i> deletion)	Accelerated differentiation into postmitotic hypertrophic chondrocytes. Defects in skeletal growth	[20]
miR-140	KO	All (germline deletion)	Defects in growth of endochondral bones. Dwarfism and craniofacial deformities.	[21]

References

- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 2002;21:2672–81. doi:<https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2672>.
- Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 2007;21:1790–802. doi:<https://doi.org/10.1101/gad.1563807>.
- Zimmermann S, Kiefer F, Prudenziati M, et al. Reduced body size and decreased intestinal tumor rates in HDAC2-mutant mice. *Cancer Res* 2007;67:9047–54. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0312>.
- Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, et al. Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell* 2008;30:61–72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.030>.
- Montgomery RL, Potthoff MJ, Haberland M, et al. Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3588–97. doi:<https://doi.org/10.1172/JCI35847>.
- Razidlo DF, Whitney TJ, Casper ME, et al. Histone Deacetylase 3 Depletion in Osteo/Chondroprogenitor Cells Decreases Bone Density and Increases Marrow Fat. *PLoS ONE* 2010;5. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011492>.
- Vega RB, Matsuda K, Oh J, et al. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 2004;119:555–66. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.024>.
- Li H, Xie H, Liu W, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009;119:3666–77. doi:<https://doi.org/10.1172/JCI39832>.
- Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, et al. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* 2008;28:1688–701. doi:<https://doi.org/10.1128/MCB.01154-06>.
- Bradley EW, Carpio LR, Olson EN, et al. Histone deacetylase 7 (Hdac7) suppresses chondrocyte proliferation and β -catenin activity during endochondral ossification. *J Biol Chem* 2015;290:118–26. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.596247>.
- Haberland M, Mokalled MH, Montgomery RL, et al. Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8. *Genes Dev* 2009;23:1625–30. doi:<https://doi.org/10.1101/gad.1809209>.
- Lemieux ME, Yang X, Jardine K, et al. The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals. *Mech Ageing Dev* 2005;126:1097–105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.04.006>.
- Gabay O, Zaal KJ, Sanchez C, et al. Sirt1-deficient mice exhibit an altered cartilage phenotype. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2013;80:613–20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.01.001>.
- Piao J, Tsuji K, Ochi H, et al. Sirt6 regulates postnatal growth plate differentiation and proliferation via Ihh signaling. *Sci Rep* 2013;3:3022. doi:<https://doi.org/10.1038/srep03022>.
- Yang L, Lawson KA, Tetek CJ, et al. ESET histone methyltransferase is essential to hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes and formation of epiphyseal plates. *Dev Biol* 2013;380:99–110. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.031>.
- Lawson KA, Tetek CJ, Zou J, et al. Mesenchyme-specific knockout of ESET histone methyltransferase causes ectopic hypertrophy and terminal differentiation of articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2013;288:32119–25. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473827>.
- Lui JC, Garrison P, Nguyen Q, et al. EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy. *Nat Commun* 2016;7:13685. doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms13685>.
- Schwarz D, Varum S, Zemke M, et al. Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation. *Dev Camb Engl* 2014;141:867–77. doi:<https://doi.org/10.1242/dev.094342>.
- Zhang F, Xu L, Xu L, et al. JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice. *J Mol Cell Biol* 2015;7:23–34. doi:<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv003>.
- Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, et al. Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1949–54. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0707900105>.
- Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, et al. Chondrocyte-Specific MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling. *Mol Cell Biol* 2011;31:3019–28. doi:<https://doi.org/10.1128/MCB.05178-11>.

Less is known about the role of other HDACs in endochondral ossification, but numerous HDACs regulate or interact with RUNX2. HDAC5, like HDAC4, is expressed in mature osteoblasts [62]. It regulates TGF- β -dependent signaling and downstream gene repression in osteoblasts through an interaction with a RUNX2/SMAD3 complex [62]. HDAC6 is expressed in differentiated osteoblasts, binds RUNX2 to repress gene expression, but is also rapidly exported from the nucleus [60,63]. HDAC6 deficiency results in a minor increase in trabecular bone density [64]. HDAC7 also inhibits the activity of RUNX2 and slows osteoblast maturation [59]. In addition, HDAC7, which is highly expressed in proliferating cells within the growth plate, suppresses chondrocyte proliferation and β -catenin activity during endochondral ossification [65].

HDAC class III members, called sirtuins, are structurally distinct from class I and II HDACs. They are NAD⁺-dependent protein deacetylases that cleave off acetyl, as well as other acyl groups, from the e-

amino group of lysines in histones, but also in other substrate proteins. Seven sirtuin (SIRT1–7) isoforms have been identified in mammalian cells. Compared with normal mice, Sirt1-null mice are smaller, and have cranio-facial abnormalities [66,67]. Additionally, SIRT1 KO mice exhibit delays in long bone mineralization [68] and possess an altered cartilage phenotype, characterized by low levels of type II collagen, aggrecan and glycosaminoglycan (GAG) content and a high level of MMP-13 [69]. Additional observations showed that, like heterozygous SIRT1 mice, SIRT1-null mice exhibit increased chondrocyte apoptosis and OA severity with age, as compared to equivalent WT mice [69,70]. SIRT1 also promotes chondrocyte survival under various stress conditions [70–74], further supporting its role in maintaining cartilage homeostasis. Furthermore, Sirtuin 6 (SIRT6) has been found highly expressed in the growth plate preferentially in proliferating and pre-hypertrophic chondrocytes. Homozygous SIRT6 null mice are smaller than their wild-type (WT) littermates at birth and exhibit defects in

proliferation and hypertrophic chondrocyte differentiation, by interacting with the IHH signaling pathway [75].

In contrast to deacetylation, various *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate that histone acetylation favors cartilage differentiation. In particular, the HAT p300 potentiates SOX9-dependent transcription through histone hyperacetylation. Beside its HAT activity, p300 can also acetylate non histone proteins. It can act as a coactivator to cartilage homeoprotein-1 (CART1), a protein expressed selectively in chondrocyte lineage during embryonic development [76], through acetylation of the conserved lysine residue adjacent to the homeodomain [77]. During chondrogenesis, SOX9 also specifically interacts with Tat interactive protein-60 (Tip60) to increase acetylation of SOX9 and subsequent enhancement of its transcriptional activity [78].

5. Histone methylation

Besides acetylation, histones can undergo methylation. This post-translational modification is driven by histone methyltransferases (HMT) which add a methyl group (-CH₃) to lysine or arginine residues at the N-terminal tail of histones.

The methylation of histone lysine residues is associated with either transcription activation or repression depending on concerned amino acid. Indeed, lysine methylation is interpreted by both positive and negative transcription regulators. For instance, histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me₃) and H3K36me₃ are associated with gene expression, while H3K27me₃ and H3K9me₃ are associated with transcriptional repression.

Histone methylation is dynamically regulated during endochondral ossification by various histone methyltransferases and demethylases. For instance, H3K9 methyltransferases including PR domain zinc finger protein 2 (PRDM2), Suppressor of variegation 3-9, drosophila homolog of 1 and 2 (SUV39H1, SUV39H2) G9a, GLP (G9a-like protein) and ERG-associated protein with SET domain (ESET) are predominantly expressed in both prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate development. These expression patterns overlap with the distributions of H3K9 HKM, especially H3K9me₁ and H3K9me₃. In addition, H3K9 methyltransferases and H3K9me₃ are enriched within trabecular bone [79]. ESET, a H3K9-specific histone methyltransferase also called Set domain protein bifurcated 1 (SETDB1), is transiently upregulated in prehypertrophic chondrocytes in newborn mice. ESET controls hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes and formation of epiphyseal plates [80], as well as the terminal differentiation of articular chondrocytes [81]. ESET conditional deletion in mesenchymal cells causes acceleration of chondrocyte hypertrophy during embryonic and prenatal development, resulting in a defect in long bone growth and trabecular bone formation. This effect is associated with a significant reduction of IHH protein in pre- and early hypertrophic chondrocytes. One of mechanism explaining this phenotype is that ESET physically interacts with both RUNX2 and HDAC4 to repress the expression of RUNX2 target genes by a H3K9 methylation-dependent mechanism [80]. Conversely, the transcription factor AT-rich interactive domain 5b (ARID5b) facilitates chondrocyte differentiation and promotes expression of chondrogenic genes by recruiting the H3K9me₂ demethylase PHD Finger Protein 2 (PHF2) to SOX9-regulated chondrogenic gene promoters [82].

H3K27 methylation plays also a crucial role in the regulation of chondrocyte proliferation and hypertrophy. H3K27 methylation is regulated by the histone methyltransferase Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2). In contrast, H3K27 methylation is removed by the demethylases Jumonji domain containing-3 (JMJD3) and ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on X chromosome (UTX), also called KDM6B and KDM6A, respectively. Loss of both EZH2 and its homolog EZH1 in cartilage induces severe growth retardation in mice, characterized by the alteration of chondrocyte proliferation due to an increase of cyclin-dependent kinase inhibitors CDKN2a/b, and changes in chondrocyte hypertrophy due to the inhibition of insulin-like growth

factor (IGF) signaling by IGF-binding proteins (IGFBP). Both increases of CDKN2a/b and IGFBP are linked to a decrease of H3K27me₃ on their respective promoter [83]. Also, conditional inactivation of EZH2 prevents craniofacial bone and cartilage formation, due to massive derepression of HOX genes in neural crest cells that are usually devoid of HOX gene expression [84].

Conversely, JMJD3-deficient mice exhibit markedly reduced proliferation and hypertrophy of chondrocytes and a severe delay of endochondral ossification. This histone demethylase is highly expressed in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during endochondral bone formation. Genetic and biochemical analysis reveal that JMJD3 cooperates with RUNX2 to promote chondrocyte proliferation and hypertrophy. JMJD3 acts as a RUNX2 co-activator and this interaction not only induces H3K27me₃-demethylation-dependent RUNX2 expression, but also recruits RUNX2 on the JMJD3 promoter [85]. JMJD3 expression increases during TGF- β induced MSC chondrogenesis [86]. Moreover, incubation with the H3K27 demethylase inhibitor GSK-J4 during chondrogenesis inhibits MEC synthesis and chondrogenic gene expression by MSCs [86].

The histone-lysine N-methyltransferase DOT1L likely also plays a role in chondrogenesis. This H3 lysine-79 specific methyltransferase is strongly expressed within mouse developing limbs during chondrogenesis. Furthermore knockdown studies in ATDC5 cells suggest that DOT1L is involved in chondrogenic differentiation, presumably through the regulation of canonical WNT-signaling [87].

6. miRNA

Non coding RNA (ncRNA), particularly miRNA, are important epigenetic regulators of physiological and pathological processes.

MiRNA are evolutionarily conserved non-coding RNA measuring approximately 22 nucleotides that control translation and/or mRNA degradation [88]. Biogenesis of miRNA (Fig. 3) begins in the nucleus by their transcription as primary miRNA (pri-miRNA). Next, the pri-miRNA undergoes a first cleavage catalyzed by a complex formed by DROSHA and DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8), to produce a miRNA precursor (pre-miRNA). This pre-miRNA is then exported to the cytoplasm by Exportin-5-RAS-related nuclear protein guanosine 5'-triphosphate (Exportin-5-RAN-GTP). The maturation continues with a second cleavage by the RNase III DICER, which produces a miRNA duplex. The miRNA guide strand is next loaded into miRNA-induced silencing complex (miRISC) containing DICER1 and Argonaute (AGO) proteins to mediate gene extinction [89].

Interestingly, germline deletion of DICER limits growth plate chondrocyte proliferation and accelerates differentiation into post-mitotic hypertrophic chondrocytes, leading to severe skeletal growth defects [90]. In addition, *in vitro* knockdown of DICER inhibits chondrogenic differentiation, showing that miRNA machinery is also crucial for chondrogenesis [91].

MiRNA microarray analysis highlight that miR-193b, miR-199a-3p/hsa-miR-199b-3p, miR-455-3p, miR-381, miR-92a, miR-320c, and miR-136 miR-23b, miR-140, miR-181 and miR-210 are upregulated during MSCs differentiation into chondrocytes, while miR-490-5p, miR-4287, miR-BART8, and miR-US25-1 are downregulated [92,93]. The roles of the majority of these miRNA are still largely unknown, but several studies demonstrate the crucial role of miR-410. Mice deficient in miR-140 present an impairment of longitudinal bone growth and an acceleration of hypertrophic differentiation [94]. Among others, miR-140 targets p38 MAPK signaling pathway, which promotes activity and expression of mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (MEF2C), a transcription factor that controls chondrocyte hypertrophy and bone development [61,94]. Furthermore, *in vitro*, miR-140 expression has been found to increase in parallel with SOX9 and COL2A1 during MSC chondrogenic differentiation *in vitro* [95]; thus, miR-140 may promote chondrogenesis by enhancing WNT signaling [91]. Moreover, this miRNA consistently decreases during chondrocyte

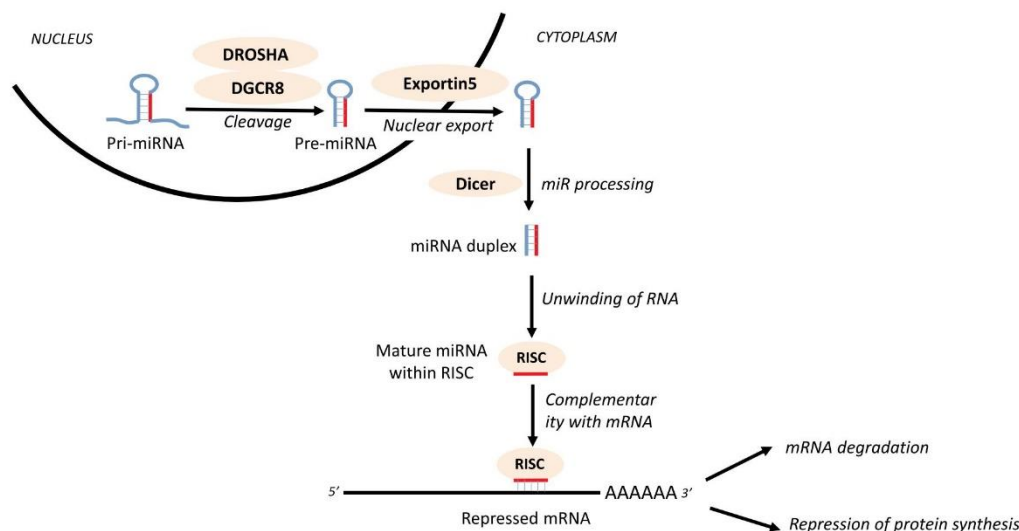


Fig. 3. miRNA biogenesis. MiRNA are transcribed by RNA poll II into primary transcripts (pri-miRNA). Then, pri-miRNA are cleaved into precursor miRNA (pre-miRNA) by the micro-processor complex formed by the ribonuclease DROSHA and the DNA binding protein DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8). Next, the pre-miRNA are exported to the cytoplasm by Ran-GTP-dependent dsRNA-binding protein, Exportin-5. In the cytoplasm, DICER, an RNAase III-type endonuclease, cleaves pre-miRNA to produce a duplex. Finally, the guide miRNA generated by DICER is loaded onto the RNA-induced silencing complex (RISC) and consequently binds to the 3'UTR of target genes, inducing degradation or translational inhibition of the target mRNA.

dedifferentiation and its expression is recovered during re-differentiation in a 3D culture with TGF- β 1 [96]. miR-23b was also described as a miRNA promoting MSC chondrogenic differentiation [97]. miR-574-3p, which is regulated by direct binding of SOX9 on its promoter, is likewise involved in the commitment of MSCs towards chondrocytes [98]. On the other hand, some miRNAs, such as miR-495 and miR-194, directly target mRNA of SOX9 or SOX5, inhibiting MSC differentiation into chondrocytes [99,100]. Additionally, miR-146a affects skeletal cell differentiation by down-regulation of SMAD2 and SMAD3 protein translation [101]. Furthermore, decreased production of miR-221 induces an increase of chondrogenic markers, including collagen type II (COL2A1), and SOX9 [102]. Interestingly, miR-221 silencing promotes MSCs differentiation towards chondrocytes *in vitro* in the absence of TGF β , and strongly enhanced *in vivo* cartilage repair [103].

7. Long non-coding RNAs

Long non-coding RNA (lncRNA) are a class of RNA transcripts longer than 200 nucleotides lacking open reading frames. They are important regulators of a variety of biological processes, including transcriptional regulation, mRNA processing and stability, chromatin organization and scaffolding for multi-protein complexes [104]. Whereas a vast number of lncRNA are expressed in human cells, their physiological functions remain mostly unknown. Even fewer studies have investigated their role in endochondral ossification and/or cartilage development and maintenance [105]; however, one of the best-studied lncRNA is HOTAIR. Among its multiple roles, it is now clear that this lncRNA regulates skeletal element development. Indeed, mice lacking HOTAIR exhibit homeotic transformation of the spine and malformation of metacarpal-carpal bones [106]. Mechanistically, HOTAIR recruits PRC2 to the HOXD cluster, where it mediates H3K27 methylation to repress the expression of several 5' HOXD genes [107], namely HOXD11 and HOXD13 [106].

The lncRNA HOTTIP functions as an enhancer to regulate the expression of 5' HOXA genes and control the growth and elongation of zeugopod and autopod skeletal elements [108]. At molecular level, HOTTIP modulates gene expression by chromosomal looping, placing

the recruited Trithorax/WDR5/MLL protein complexes proximal to 5' HOXA genes to facilitate H3K4me3 and gene expression [108,109]. Additionally, HOTTIP function is associated with endochondral ossification [110]. Also, lncRNA-HIT was identified within the HOXA locus [111]. This lncRNA is expressed in mice embryo limb mesenchyme just before cartilaginous differentiation [105]. lncRNA-HIT associates with chondrogenic genes and promotes their expression by recruiting p100 and the histone acetyltransferase CREB-binding protein (CBP) [105].

The lncRNA DANCR may also promote chondrogenic differentiation of synovium-derived MSCs (SMSC) in concert with SOX4 [112], by interaction with SMAD3, and STAT3 mRNA to regulate their stability [113]. DANCR favors also SMSC proliferation through MYC regulation [113]. Other Sox transcription factors interact also with lncRNA. For instance, ROCR, which is induced during chondrogenic differentiation, plays an important role in the induction of SOX9 and cartilage gene expression [114]. Similarly, UCA1 plays an important role in the skeletal development [115]. UCA1 is expressed in normal human chondrocytes and favors chondrocyte differentiation of these cells, but UCA1 is not detected in human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs).

H19 is also a new player in musculoskeletal system. H19 could promote osteogenic differentiation by suppressing the TGF- β /pSmad3/histone deacetylase 4/5 (HDAC4/5) signaling pathway, and enhancing the expression of osteogenic marker genes such as RUNX2 and osteocalcin (OCN), and by serving as a competing endogenous RNA for both miR-141 and miR-22, which are the negative regulators of WNT/ β -catenin signaling. H19 could also promote chondrogenic differentiation, in particular H19 may regulate the expression of collagen type 2 through miR-675 [116].

8. Conclusion and perspectives

Chondrogenesis during both MSC chondrogenic differentiation and endochondral ossification is intrinsically controlled by epigenetic mechanisms, including DNA methylation, histone post-translational modification and non-coding RNA. All these regulatory processes are strongly interconnected together.

Investigations of their involvement during endochondral ossification as well as cartilage differentiation and stability could be useful in cartilage tissue-engineering applications. For instance, inhibition of DNA methylation or effective miRNA-based treatment modalities that should have minimal or no off-target side effects, could provide promising approaches to maintain the chondrocyte phenotype. A better understanding of epigenetic regulation during chondrogenesis and chondrocyte terminal differentiation and hypertrophy may open new strategies to decelerate chondrocyte dedifferentiation and hypertrophy observed during autologous chondrocyte implantation, or to promote chondrogenesis of stem cells. Consequently, more information regarding how epigenetic regulations established and maintains the chondrocyte phenotype is required and new “epidrugs” need to be developed improve the outcome of cartilage cell therapy.

Competing interests

Authors declare no competing interests.

Fundings

Agence Nationale de la Recherche, France [ANR-15-CE14-0002-01]; Région Normandie, France; European Union, France [FEDER/FSE 2014-2020 – 16E00779/16P03685] and the Société Française de Rhumatologie, France (SFR).

References

- [1] A.S. Perry, R.W.G. Watson, M. Lawler, D. Hollywood, The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer, *Nat. Rev. Urol.* 7 (12) (Dec 2010) 668–680.
- [2] M. Kato, S. Yasuda, T. Atsumi, The role of genetics and epigenetics in rheumatic diseases: are they really a target to be aimed at? *Rheumatol. Int.* 38 (8) (Aug 2018) 1333–1338.
- [3] C.J. Malesud, MicroRNAs and osteoarthritis, *Cell* 7 (8) (Aug 1, 2018).
- [4] A. Del Real, L. Riancho-Zarrabeitia, L. López-Delgado, J.A. Riancho, Epigenetics of skeletal diseases, *Curr. Osteoporos. Rep.* 16 (3) (Jun 2018) 246–255.
- [5] M.J. Peffers, P. Balaskas, A. Smagul, Osteoarthritis year in review 2017: genetics and epigenetics, *Osteoarthr. Cartil.* 26 (3) (Mar 2018) 304–311.
- [6] F. Long, D.M. Ornitz, Development of the endochondral skeleton, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (1) (Jan 2013) [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579395/>.
- [7] W. Wang, D. Rigueur, K.M. Lyons, TGF β signaling in cartilage development and maintenance, *Birth Defects Res. C Embryo Today* 102 (1) (Mar 2014) 37–51.
- [8] K. Hata, Y. Takahata, T. Murakami, R. Nishimura, Transcriptional network controlling endochondral ossification, *J. Bone Metab.* 24 (2) (May 2017) 75–82.
- [9] M. Inada, Y. Wang, M.H. Byrne, M.U. Rahman, C. Miyaura, C. López-Otin, S.M. Krane, Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (49) (Dec 7, 2004) 17192–17197.
- [10] I.M. Shapiro, C.S. Adams, T. Freeman, V. Srinivas, Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate, *Birth Defects Res. C Embryo Today* 75 (4) (Dec 2005) 330–339.
- [11] K.A. Staines, A.S. Pollard, I.M. McGonnell, C. Farquharson, A.A. Pitsillides, Cartilage to bone transitions in health and disease, *J. Endocrinol.* 219 (1) (Oct 2013) R1–12.
- [12] M. Pacifici, E. Koyama, Y. Shibukawa, C. Wu, Y. Tamamura, M. Enomoto-Iwamoto, M. Iwamoto, Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068 (Apr 2006) 74–86.
- [13] M.M. Ito, M.Y. Kida, Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone, *J. Anat.* 197 (Pt 4) (Nov 2000) 659–679.
- [14] L.J. Ng, P.P. Tam, K.S. Cheah, Preferential expression of alternatively spliced mRNAs encoding type II procollagen with a cysteine-rich amino-propeptide in differentiating cartilage and nonchondrogenic tissues during early mouse development, *Dev. Biol.* 159 (2) (Oct 1993) 403–417.
- [15] A.A. Pitsillides, D.E. Ashhurst, A critical evaluation of specific aspects of joint development, *Dev. Dyn.* 237 (9) (Sep 2008) 2284–2294.
- [16] A. Bird, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.* 16 (1) (Jan 1, 2002) 6–21.
- [17] N. Hattori, K. Nishino, Y.-G. Ko, N. Hattori, J. Ohgane, S. Tanaka, K. Shiota, Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells, *J. Biol. Chem.* 279 (17) (Apr 23, 2004) 17063–17069.
- [18] N. Hattori, Y. Imao, K. Nishino, N. Hattori, J. Ohgane, S. Yagi, S. Tanaka, K. Shiota, Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells, *Genes Cells* 12 (3) (Mar 1, 2007) 387–396.
- [19] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 (4) (Aug 25, 2006) 663–676.
- [20] R.E. Amir, I.B. Van den Veyver, M. Wan, C.Q. Tran, U. Francke, H.Y. Zoghbi, Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2, *Nat. Genet.* 23 (2) (Oct 1999) 185–188.
- [21] G. Egger, G.N. Liang, A. Aparicio, P.A. Jones, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, *Nature* 429 (6990) (May 27, 2004) 457–463.
- [22] M. Ehrlich, The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease, *Clin. Immunol.* 109 (1) (Oct 2003) 17–28.
- [23] F. Mohn, M. Weber, M. Rebhan, T.C. Roloff, J. Richter, M.B. Stadler, M. Bibel, D. Schübeler, Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors, *Mol. Cell* 30 (6) (Jun 20, 2008) 755–766.
- [24] M.P. Fernández, M.F. Young, M.E. Sobel, Methylation of type II and type I collagen genes in differentiated and dedifferentiated chondrocytes, *J. Biol. Chem.* 260 (4) (Feb 25, 1985) 2374–2378.
- [25] Y. Ezura, I. Sekiya, H. Koga, T. Muneta, M. Noda, Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells, *Arthritis Rheum.* 60 (5) (May 2009) 1416–1426.
- [26] A.C. Boquest, A. Noer, A.L. Sorensen, K. Vekterud, P. Collas, CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage, *Stem Cells* 25 (4) (2007) 852–861.
- [27] M.-I. Kang, H.-S. Kim, Y.-C. Jung, Y.-H. Kim, S.-J. Hong, M.-K. Kim, K.-H. Baek, C.-C. Kim, M.-G. Rhyu, Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation, *J. Cell. Biochem.* 102 (1) (Sep 1, 2007) 224–239.
- [28] J. Kawai, K. Hirose, S. Fushiki, S. Hirotsune, N. Ozawa, A. Hara, Y. Hayashizaki, S. Watanabe, Comparison of Dna methylation patterns among mouse-cell lines by restriction landmark genomic scanning, *Mol. Cell. Biol.* 14 (11) (Nov 1994) 7421–7427.
- [29] A. Noer, A.L. Sorensen, A.C. Boquest, P. Collas, Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue, *Mol. Cell* 17 (8) (Aug 2006) 3543–3556.
- [30] P. Zimmermann, S. Boeuf, A. Dickhut, S. Boehmer, S. Olek, W. Richter, Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter, *Arthritis Rheum.* 58 (9) (Sep 2008) 2743–2753.
- [31] J. Shen, C. Wang, D. Li, T. Xu, J. Myers, J.M. Ashton, T. Wang, M.J. Zuscik, A. McAlinden, R.J. O’Keefe, DNA methyltransferase 3b regulates articular cartilage homeostasis by altering metabolism, *JCI Insight* 2 (12) (Jun 15, 2017).
- [32] C. Wang, Y. Abu-Amer, R.J. O’Keefe, J. Shen, Loss of Dnmt3b in chondrocytes leads to delayed endochondral ossification and fracture repair, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 33 (2) (Feb 2018) 283–297.
- [33] T. Xu, C. Wang, J. Shen, P. Tong, R. O’Keefe, Ablation of Dnmt3b in chondrocytes suppresses cell maturation during embryonic development, *J. Cell. Biochem.* 119 (7) (Jul 1, 2018) 5852–5863.
- [34] A.T. El-Serafi, R.O.C. Oreffo, H.I. Roach, Epigenetic modifiers influence lineage commitment of human bone marrow stromal cells: differential effects of 5-aza-deoxycytidine and trichostatin A, *Differ. Res. Biol. Divers.* 81 (1) (Jan 2011) 35–41.
- [35] G.-S. Zhou, X.-L. Zhang, J.-P. Wu, R.-P. Zhang, L.-X. Xiang, L.-C. Dai, J.-Z. Shao, 5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation, *Cytotechnology* 60 (1–3) (Jul 2009) 11–22.
- [36] M.J. Zuscik, J.F. Baden, Q. Wu, T.J. Sheu, E.M. Schwarz, H. Drissi, R.J. O’Keefe, J.E. Puzas, R.N. Rosier, 5-Azacytidine alters TGF-beta and BMP signaling and induces maturation in articular chondrocytes, *J. Cell. Biochem.* 92 (2) (May 15, 2004) 316–331.
- [37] M.-L. Ho, J.-K. Chang, S.-C. Wu, Y.-H. Chung, C.-H. Chen, S.-H. Hung, G.-J. Wang, A novel terminal differentiation model of human articular chondrocytes in three-dimensional cultures mimicking chondrocytic changes in osteoarthritis, *Cell Biol. Int.* 30 (3) (Mar 2006) 288–294.
- [38] S.H. Haq, 5-Aza-2’-deoxycytidine acts as a modulator of chondrocyte hypertrophy and maturation in chick caudal region chondrocytes in culture, *Anat. Cell Biol.* 49 (2) (Jun 2016) 107–115.
- [39] S. Ito, A.C. D’Alessio, O.V. Taranova, K. Hong, L.C. Sowers, Y. Zhang, Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell self-renewal, and ICM specification, *Nature* 466 (7310) (Aug 26, 2010) 1129–1133.
- [40] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S.C. Wu, L.B. Collins, J.A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science* 333 (6047) (Sep 2, 2011) 1300–1303.
- [41] M. Tahiliani, K.P. Koh, Y. Shen, W.A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L.M. Iyer, D.R. Liu, L. Aravind, A. Rao, Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 324 (5929) (May 15, 2009) 930–935.
- [42] S.E.B. Taylor, Y.H. Li, P. Smeriglio, M. Rath, W.H. Wong, N. Bhatnani, Stable 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) acquisition marks gene activation during chondrogenic differentiation, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 31 (3) (Mar 2016) 524–534.
- [43] E.W. Bradley, M.E. McGee-Lawrence, J.J. Westendorf, Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 21 (2) (2011) 101–113.
- [44] E.-J. Jeon, K.-Y. Lee, N.-S. Choi, M.-H. Lee, H.-N. Kim, Y.-H. Jin, H.-M. Ryou, J.-Y. Choi, M. Yoshida, N. Nishino, B.-C. Oh, K.-S. Lee, Y.H. Lee, S.-C. Bae, Bone

- morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation, *J. Biol. Chem.* 281 (24) (Jun 16, 2006) 16502–16511.
- [45] S. Chang, T.A. McKinsey, C.L. Zhang, J.A. Richardson, J.A. Hill, E.N. Olson, Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development, *Mol. Cell. Biol.* 24 (19) (Oct 2004) 8467–8476.
- [46] C.M. Trivedi, Y. Luo, Z. Yin, M. Zhang, W. Zhu, T. Wang, T. Floss, M. Goettlicher, P.R. Noppinger, W. Wurst, V.A. Ferrari, C.S. Abrams, P.J. Gruber, J.A. Epstein, Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity, *Nat. Med.* 13 (3) (Mar 2007) 324–331.
- [47] R.B. Vega, K. Matsuda, J. Oh, A.C. Barbosa, X. Yang, E. Meadows, J. McAnally, C. Pomajzl, J.M. Shelton, J.A. Richardson, G. Karsenty, E.N. Olson, Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis, *Cell* 119 (4) (Nov 12, 2004) 555–566.
- [48] L.C. Murtaugh, L. Zeng, J.H. Chyung, A.B. Lassar, The chick transcriptional repressor Nkx3.2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis, *Dev. Cell* 1 (3) (Sep 2001) 411–422.
- [49] L. Zeng, H. Kempf, L.C. Murtaugh, M.E. Sato, A.B. Lassar, Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis, *Genes Dev.* 16 (15) (Aug 1, 2002) 1990–2005.
- [50] D.-W. Kim, A.B. Lassar, Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2, *Mol. Cell. Biol.* 23 (23) (Dec 2003) 8704–8717.
- [51] S. Hong, A. Derfoul, L. Pereira-Mouries, D.J. Hall, A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes, *FASEB J.* 23 (10) (Oct 2009) 3539–3552.
- [52] H.W. Lee, J.H. Suh, A.Y. Kim, Y.S. Lee, S.Y. Park, J.B. Kim, Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation, *Mol. Endocrinol.* 20 (10) (Oct 2006) 2432–2443 Baltimore, Md.
- [53] D.F. Razidlo, T.J. Whitney, M.E. Casper, M.E. McGee-Lawrence, B.A. Stensgard, X. Li, F.J. Secreto, S.K. Knutson, S.W. Hiebert, J.J. Westendorf, Histone deacetylase 3 depletion in osteo/chondrogenitor cells decreases bone density and increases marrow fat, *PLoS ONE* 5 (7) (Jul 9, 2010) [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901996/>.
- [54] E.W. Bradley, L.R. Carpio, J.J. Westendorf, Histone deacetylase 3 suppression increases PH domain and leucine-rich repeat phosphatase (Lrrpp)1 expression in chondrocytes to suppress Akt signaling and matrix secretion, *J. Biol. Chem.* 288 (14) (Apr 5, 2013) 9572–9582.
- [55] L.R. Carpio, J.J. Westendorf, Histone deacetylases in cartilage homeostasis and osteoarthritis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 18 (8) (Aug 2016) 52.
- [56] L.R. Carpio, E.W. Bradley, M.E. McGee-Lawrence, M.M. Weivoda, D.D. Poston, A. Dudakovic, M. Xu, T. Tchkonina, J.L. Kirkland, A.J. van Wijnen, M.J. Oursler, J.J. Westendorf, Histone deacetylase 3 supports endochondral bone formation by controlling cytokine signaling and matrix remodeling, *Sci. Signal.* 9 (440) (09, 2016) ra79.
- [57] D. Correa, E. Hesse, D. Seriwatanachai, R. Kiviranta, H. Saito, K. Yamana, L. Neff, A. Atfi, L. Coillard, D. Sitara, Y. Maeda, S. Warming, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, W.C. Horne, B. Lanske, R. Baron, Zfp521 is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes, *Dev. Cell* 19 (4) (Oct 19, 2010) 533–546.
- [58] E. Kozhemyakina, T. Cohen, T.-P. Yao, A.B. Lassar, Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway, *Mol. Cell. Biol.* 29 (21) (Nov, 2009) 5751–5762.
- [59] E.D. Jensen, T.M. Schroeder, J. Bailey, R. Gopalakrishnan, J.J. Westendorf, Histone deacetylase 7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in a deacetylation-independent manner, *J. Bone Miner. Res.* 23 (3) (Mar, 2008) 361–372.
- [60] E.D. Jensen, R. Gopalakrishnan, J.J. Westendorf, Bone morphogenetic protein 2 activates protein kinase D to regulate histone deacetylase 7 localization and repression of Runx2, *J. Biol. Chem.* 284 (4) (Jan 23, 2009) 2225–2234.
- [61] J. Zhou, P. Li, Q. Chen, X. Wei, T. Zhao, Z. Wang, L. Wei, Mitogen-activated protein kinase p38 induces HDAC4 degradation in hypertrophic chondrocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (2) (Feb 2015) 370–376.
- [62] J.S. Kang, T. Alliston, R. Delston, R. Derynck, Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3, *EMBO J.* 24 (14) (Jul 20, 2005) 2543–2555.
- [63] J.J. Westendorf, S.K. Zaidi, J.E. Cascino, R. Kahler, A.J. van Wijnen, J.B. Lian, M. Yoshida, G.S. Stein, X. Li, Runx2 (Cbf1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter, *Mol. Cell. Biol.* 22 (22) (Nov, 2002) 7982–7992.
- [64] Y. Zhang, S. Kwon, T. Yamaguchi, F. Cubizolles, S. Rouseaux, M. Kneissel, C. Cao, N. Li, H.-L. Cheng, K. Chua, D. Lombard, A. Mizeracki, G. Matthias, F.W. Alt, S. Khochbin, P. Matthias, Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally, *Mol. Cell. Biol.* 28 (5) (Mar 2008) 1688–1701.
- [65] E.W. Bradley, L.R. Carpio, E.N. Olson, J.J. Westendorf, Histone deacetylase 7 (Hdac7) suppresses chondrocyte proliferation and beta-catenin activity during endochondral ossification, *J. Biol. Chem.* 290 (1) (Jan 2, 2015) 118–126.
- [66] M.W. McBurney, X. Yang, K. Jardine, M. Bieman, J. Th'ng, M. Lemieux, The absence of SIR2alpha protein has no effect on global gene silencing in mouse embryonic stem cells, *Mol. Cancer Res.* 1 (5) (Mar 2003) 402–409.
- [67] M.W. McBurney, X. Yang, K. Jardine, M. Hixon, K. Boekelheide, J.R. Webb, P.M. Lansford, M. Lemieux, The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis, *Mol. Cell. Biol.* 23 (1) (Jan 2003) 38–54.
- [68] M.E. Lemieux, X. Yang, K. Jardine, X. He, K.X. Jacobsen, W.A. Staines, M.E. Harper, M.W. McBurney, The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals, *Mech. Ageing Dev.* 126 (10) (Oct 2005) 1097–1105.
- [69] O. Gabay, K.J. Zaal, C. Sanchez, M. Dvir-Ginzberg, V. Gagarina, Y. Song, X.H. He, M.W. McBurney, Sirt1-deficient mice exhibit an altered cartilage phenotype, *Joint Bone Spine* 80 (6) (Dec 2013) 613–620.
- [70] O. Gabay, H. Oppenheimer, H. Meir, K. Zaal, C. Sanchez, M. Dvir-Ginzberg, Increased apoptotic chondrocytes in articular cartilage from adult heterozygous Sirt1 mice, *Ann. Rheum. Dis.* 71 (4) (Apr 2012) 613–616.
- [71] M. Dvir-Ginzberg, V. Gagarina, E.J. Lee, R. Booth, O. Gabay, D.J. Hall, Tumor necrosis factor alpha-mediated cleavage and inactivation of Sirt1 in human osteoarthritic chondrocytes, *Arthritis Rheum.* 63 (8) (Aug 2011) 2363–2373.
- [72] V. Gagarina, O. Gabay, M. Dvir-Ginzberg, E.J. Lee, J.K. Brady, M.J. Quon, D.J. Hall, Sirt1 enhances survival of human osteoarthritic chondrocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and activating the insulin-like growth factor receptor pathway, *Arthritis Rheum.* 62 (5) (May 2010) 1383–1392.
- [73] H. Oppenheimer, O. Gabay, H. Meir, A. Haze, L. Kandel, M. Liebergall, V. Gagarina, E.J. Lee, M. Dvir-Ginzberg, 75-kd sirtuin 1 blocks tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes, *Arthritis Rheum.* 64 (3) (Mar 2012) 718–728.
- [74] K. Takayama, K. Ishida, T. Matsushita, N. Fujita, S. Hayashi, K. Sasaki, K. Tei, S. Kubo, T. Matsumoto, H. Fujioka, M. Kurosaka, R. Kuroda, SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes, *Arthritis Rheum.* 60 (9) (Sep 2009) 2731–2740.
- [75] J. Piao, K. Tsuji, H. Ochi, M. Iwata, D. Koga, A. Okawa, S. Morita, S. Takeda, Y. Asou, Sirt6 regulates postnatal growth plate differentiation and proliferation via Ihh signaling, *Sci. Rep.* 3 (Oct 23, 2013) 3022.
- [76] T. Iio, K. Furukawa, A. Yamaguchi, H. Shindo, S. Yamashita, T. Tsukazaki, P300/CBP acts as a coactivator to cartilage homeoprotein-1 (Cart1), paired-like homeoprotein, through acetylation of the conserved lysine residue adjacent to the homeodomain, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18 (8) (Aug 2003) 1419–1429.
- [77] T. Furumatsu, M. Tsuda, K. Yoshida, N. Taniguchi, T. Ito, M. Hashimoto, T. Ito, H. Asahara, Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription, *J. Biol. Chem.* 280 (42) (Oct 21, 2005) 35203–35208.
- [78] T. Hattori, F. Coustry, S. Stephens, H. Eberspaecher, M. Takigawa, H. Yasuda, B. de Crombrughe, Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60 via chromatin association with Sox9 and Sox5, *Nucleic Acids Res.* 36 (9) (May 2008) 3011–3024.
- [79] H. Ideno, A. Shimada, K. Imaizumi, H. Kimura, M. Abe, K. Nakashima, A. Nifuji, Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development, *Gene Expr. Patterns* 13 (3–4) (Mar 2013) 84–90.
- [80] L. Yang, K.A. Lawson, C.J. Teteak, J. Zou, J. Hacquebord, D. Patterson, A.C. Ghatan, Q. Mei, A. Zielinska-Kwiatkowska, S.D. Bain, R.J. Fernandes, H.A. Chansky, ESET histone methyltransferase is essential to hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes and formation of epiphyseal plates, *Dev. Biol.* 380 (1) (Aug 1, 2013) 99–110.
- [81] K.A. Lawson, C.J. Teteak, J. Zou, J. Hacquebord, A. Ghatan, A. Zielinska-Kwiatkowska, R.J. Fernandes, H.A. Chansky, L. Yang, Mesenchyme-specific knockout of ESET histone methyltransferase causes ectopic hypertrophy and terminal differentiation of articular chondrocytes, *J. Biol. Chem.* 288 (45) (Nov 8, 2013) 32119–32125.
- [82] K. Hata, R. Takashima, K. Amano, K. Ono, M. Nakanishi, M. Yoshida, M. Wakabayashi, A. Matsuda, Y. Maeda, Y. Suzuki, S. Sugano, R.H. Whitson, R. Nishimura, T. Yoneda, Arid5b facilitates chondrogenesis by repressing the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2850.
- [83] J.C. Lui, P. Garrison, Q. Nguyen, M. Ad, C. Keembiyehetty, W. Chen, Y.H. Jee, E. Landman, O. Nilsson, K.M. Barnes, J. Baron, EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy, *Nat. Commun.* 7 (Nov 29, 2016) 13685.
- [84] D. Schwarz, S. Varum, M. Zemke, A. Schöler, A. Baggolini, K. Draganova, H. Koseki, D. Schübeler, L. Sommer, Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation, *Development* 141 (4) (Feb 2014) 867–877.
- [85] F. Zhang, L. Xu, L. Xu, Q. Xu, D. Li, Y. Yang, G. Karsenty, C.D. Chen, JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice, *J. Mol. Cell Biol.* 7 (1) (Feb 2015) 23–34.
- [86] C. Yapp, A.J. Carr, A. Price, U. Oppermann, S.J.B. Snelling, H3K27me3 demethylases regulate *in vitro* chondrogenesis and chondrocyte activity in osteoarthritis, *Arthritis Res. Ther.* 18 (2016) [Internet]. [cited 2016 Aug 31]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4936015/>.
- [87] M.C. Castaño Betancourt, F. Cailotto, H.J. Kerkhof, F.M.F. Cornelis, S.A. Doherty, D.J. Hart, A. Hofman, F.P. Luyten, R.A. Maciewicz, M. Mangino, S. Metrustry, K. Muir, M.J. Peters, F. Rivadeneira, M. Wheeler, W. Zhang, N. Arden, T.D. Spector, A.G. Uitterlinden, M. Doherty, R.J.U. Lories, A.M. Valdes, J.B.J. van Meurs, Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (21) (May 22, 2012) 8218–8223.
- [88] M. Ha, V.N. Kim, Regulation of microRNA biogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (8) (Aug 2014) 509–524.
- [89] X.C. Ding, J. Weiler, H. Großhans, Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs, *Trends Biotechnol.* 27 (1) (Jan 1, 2009) 27–36.
- [90] T. Kobayashi, J. Lu, B.S. Cobb, S.J. Rodda, A.P. McMahon, E. Schipani, M. Merkschlager, H.M. Kronenberg, Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (6) (Feb 12, 2008) 1949–1954.

- [91] M.J. Barter, M. Tselepi, R. Gómez, S. Woods, W. Hui, G.R. Smith, D.P. Shanley, I.M. Clark, D.A. Young, Genome-wide microRNA and gene analysis of mesenchymal stem cell chondrogenesis identifies an essential role and multiple targets for miR-140-5p, *Stem Cells* 33 (11) (Nov 1, 2015) 3266–3280.
- [92] Z. Zhang, Y. Kang, Z. Zhang, H. Zhang, X. Duan, J. Liu, X. Li, W. Liao, Expression of microRNAs during chondrogenesis of human adipose-derived stem cells, *Osteoarthr. Cartil.* 20 (12) (Dec 2012) 1638–1646.
- [93] J. Gabler, M. Ruetze, K.L. Kynast, T. Grossner, S. Diederichs, W. Richter, Stage-specific miRs in chondrocyte maturation: differentiation-dependent and hypertrophy-related miR clusters and the miR-181 family, *Tissue Eng. A* 21 (23–24) (Dec 2015) 2840–2851.
- [94] G. Papaioannou, F. Mirzamohammadi, T.S. Lisse, S. Nishimori, M.N. Wein, T. Kobayashi, MicroRNA-140 provides robustness to the regulation of hypertrophic chondrocyte differentiation by the PTHrP-IDAC4 pathway, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 30 (6) (Jun 2015) 1044–1052.
- [95] S. Miyaki, T. Nakasa, S. Otsuki, S.P. Grogan, R. Higashiyama, A. Inoue, Y. Kato, T. Sato, M.K. Lotz, H. Asahara, MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses, *Arthritis Rheum.* 60 (9) (Sep 2009) 2723–2730.
- [96] E. Hong, A.H. Reddi, Dedifferentiation and redifferentiation of articular chondrocytes from surface and middle zones: changes in microRNAs-221/-222, -140, and -143/145 expression, *Tissue Eng. A* 19 (7–8) (Apr 2013) 1015–1022.
- [97] O. Ham, B.-W. Song, S.-Y. Lee, E. Choi, M.-J. Cha, C.Y. Lee, J.-H. Park, I.-K. Kim, W. Chang, S. Lim, C.H. Lee, S. Kim, Y. Jang, K.-C. Hwang, The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling, *Biomaterials* 33 (18) (Jun 2012) 4500–4507.
- [98] D. Guérit, D. Philpôt, P. Chuchana, K. Toupet, J.-M. Brondello, M. Mathieu, C. Jorgensen, D. Noël, Sox9-regulated miRNA-574-3p inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *PLoS ONE* 8 (4) (2013) e62582.
- [99] S. Lee, D.S. Yoon, S. Paik, K.-M. Lee, Y. Jang, J.W. Lee, microRNA-495 inhibits chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by targeting Sox9, *Stem Cells Dev.* 23 (15) (Aug 1, 2014) 1798–1808.
- [100] J. Xu, Y. Kang, W. Liao, L. Yu, MiR-194 regulates chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by targeting Sox5, *PLoS ONE* 7 (3) (Mar 1, 2012) e31861.
- [101] K.S.C. Cheung, N. Sposito, P.S. Stumpf, D.I. Wilson, T. Sanchez-Elsner, R.O.C. Oreffo, MicroRNA-146a regulates human foetal femur derived skeletal stem cell differentiation by down-regulating SMAD2 and SMAD3, *PLoS ONE* 9 (6) (Jun 3, 2014) [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4043645/>.
- [102] A. Lolli, E. Lambertini, L. Penolazzi, M. Angelozzi, C. Morganti, T. Franceschetti, S. Pelucchi, R. Gambari, R. Piva, Pro-chondrogenic effect of miR-221 and slug depletion in human MSCs, *Stem Cell Rev.* 10 (6) (Dec 2014) 841–855.
- [103] A. Lolli, R. Narcisi, E. Lambertini, L. Penolazzi, M. Angelozzi, N. Kops, S. Gasparini, G.J. van Osch, R. Piva, Silencing of antichondrogenic microRNA-221 in human mesenchymal stem cells promotes cartilage repair in vivo, *Stem Cells* 34 (7) (Jul, 2016) 1801–1811.
- [104] S. Geisler, J. Collier, RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (11) (Nov 2013) 699–712.
- [105] H.L. Carlson, J.J. Quinn, Y.W. Yang, C.K. Thornburg, H.Y. Chang, H.S. Stadler, LncRNA-HIT functions as an epigenetic regulator of chondrogenesis through its recruitment of p 100/CBP complexes, *PLoS Genet.* 11 (12) (Dec 2015) e1005680.
- [106] L. Li, B. Liu, O.L. Wapinski, M.-C. Tsai, K. Qu, J. Zhang, J.C. Carlson, M. Lin, F. Fang, R.A. Gupta, J.A. Helms, H.Y. Chang, Targeted disruption of hotair leads to homeotic transformation and gene de-repression, *Cell Rep.* 5 (1) (Oct 17, 2013) 3–12.
- [107] J.L. Rinn, M. Kertesz, J.K. Wang, S.L. Squazzo, X. Xu, S.A. Brugmann, H. Goodnough, J.A. Helms, P.J. Farnham, E. Segal, H.Y. Chang, Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by non-coding RNAs, *Cell* 129 (7) (Jun 29, 2007) 1311–1323.
- [108] K.C. Wang, Y.W. Yang, B. Liu, A. Sanyal, R. Corces-Zimmerman, Y. Chen, B.R. Lajoie, A. Protacio, R.A. Flynn, R.A. Gupta, J. Wysocka, M. Lei, J. Dekker, J.A. Helms, H.Y. Chang, Long noncoding RNA programs active chromatin domain to coordinate homeotic gene activation, *Nature* 472 (7341) (Apr 7, 2011) 120–124.
- [109] B. Schuettengruber, D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc, G. Cavalli, Genome regulation by polycomb and trithorax proteins, *Cell* 128 (4) (Feb 23, 2007) 735–745.
- [110] D. Kim, J. Song, J. Han, Y. Kim, C.-H. Chun, E.-J. Jin, Two non-coding RNAs, MicroRNA-101 and HOTTIP contribute cartilage integrity by epigenetic and homeotic regulation of integrin- α 1, *Cell. Signal.* 25 (12) (Dec 2013) 2878–2887.
- [111] E.J. Richards, G. Zhang, Z.-P. Li, J. Permeth-Wey, S. Challa, Y. Li, W. Kong, S. Dan, M.M. Bui, D. Coppola, W.-M. Mao, T.A. Sellers, J.Q. Cheng, Long non-coding RNAs (LncRNA) regulated by transforming growth factor (TGF) β , *J. Biol. Chem.* 290 (11) (Mar 13, 2015) 6857–6867.
- [112] L. Zhang, S. Chen, N. Bao, C. Yang, Y. Ti, L. Zhou, J. Zhao, Sox4 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cell via activation of long noncoding RNA DANCR, *J. Mol. Histol.* 46 (6) (Dec 2015) 467–473.
- [113] L. Zhang, C. Yang, S. Chen, G. Wang, B. Shi, X. Tao, L. Zhou, J. Zhao, Long non-coding RNA DANCR is a positive regulator of proliferation and chondrogenic differentiation in human synovium-derived stem cells, *DNA Cell Biol.* 36 (2) (Feb 2017) 136–142.
- [114] M.J. Barter, R. Gomez, S. Hyatt, K. Cheung, A.J. Skelton, Y. Xu, I.M. Clark, D.A. Young, The long non-coding RNA ROCR contributes to SOX9 expression and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Development* 144 (24) (15, 2017) 4510–4521.
- [115] T. Ishikawa, T. Nishida, M. Ono, T. Takarada, H.T. Nguyen, S. Kurihara, T. Furumatsu, Y. Murase, M. Takigawa, T. Ohashi, H. Kamioka, S. Kubota, Physiological role of urothelial cancer-associated one long noncoding RNA in human skeletal cell differentiation, *J. Cell. Physiol.* 233 (6) (Jun 2018) 4825–4840.
- [116] Y. Liu, G. Li, J. Zhang, The role of long non-coding RNA H19 in musculoskeletal system: a new player in an old game, *Exp. Cell Res.* 360 (2) (Nov 15, 2017) 61–65.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes

Juliette Aury-Landas¹, Céline Bazille^{1,2}, Lyess Allas¹, Sara Bouhout¹, Christophe Chesneau³, Sylvain Leclercq^{1,4}, Karim Boumédiène¹ & Catherine Bauge¹

3-Deazaneplanocin A (DZNep) is an inhibitor of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase (SAHH) known to inhibit EZH2, a histone methylase upregulated during osteoarthritis. In this study, we assessed its effects in human articular chondrocytes. Anti-inflammatory effects were assessed by Nitric Oxide (NO), Prostaglandin E2 (PGE2) and Metalloprotease (MMP) release in IL-1 β -stimulated chondrocytes. MAPK and NF κ B activation was analyzed by western blotting. Differentially expressed genes (DEG) regulated by DZNep were identified by whole-transcriptome microarray. DZNep inhibited SAHH activity and was not toxic. It counteracted NO, PGE2 and MMP release, and reduced MAPK activation induced by IL-1 β . By whole-transcriptome analysis, we identified that DZNep counteracts the effect of IL-1 β on the expression of 81 protein-coding genes, including *CITED2*, an MMP inhibitor. These genes are organized in a protein-protein network centred on *EGR1*, which is known to functionally interact with *EZH2*. Gene ontologies enrichment analysis confirmed that DZNep counteracts IL-1 β -induced expression of genes involved in cartilage matrix breakdown (*MMPs* and *ADAMTS*). In addition, DZNep up-regulated cartilage specific genes, such as *COL2A1* and *SOX9*, suggesting a chondroprotective effect of DZNep. DZNep exhibits anti-inflammatory effects, and regulates genes implicated in chondroprotective response in human articular chondrocytes, suggesting that inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases could be effective treatments for OA.

Cytokines, particularly Interleukin-1 beta (IL-1 β), play a major role in the development and progression of osteoarthritis (OA). IL-1 β is highly present in the synovial fluid of OA patients and contributes to the degradative process of cartilage in causing overproduction of Prostaglandin E2 (PGE2), Reactive Oxygen Species (ROS), Nitric Oxide (NO) and metalloproteinases (MMPs). These MMPs, produced by chondrocytes, cause severe joint damages. In particular, MMP-1 and MMP-13 induce the digestion of type II Collagen, the principal collagenous material in hyaline cartilage, while MMP-3 is involved in the breakdown of extracellular matrix by degrading proteoglycans.

IL-1 β induces its pro-inflammatory effect through the activation of protein kinase cascades involving the MAP Kinase (MAPK) and/or NF κ B signalling pathways. The MAPK pathway consists of ERK, p38 and JNK. These MAPK subtypes are constitutively expressed in articular chondrocytes and transiently activated by numerous stimuli, including IL-1 β . Several studies suggest that MAPK are also able to modulate the IL-1 β -induced NF κ B pathway. NF κ B normally exists as an inactive cytoplasmic complex bound to inhibitory proteins of the I κ B family. Its induction requires the activation of I κ B/kinase complex that phosphorylates I κ B molecules, triggering their degradation. Release of I κ B results in the nuclear translocation of NF κ B and its binding to specific DNA

¹Normandie University, UNICAEN, EA7451, BioConnect, Caen, France. ²CHU de Caen, Service d'Anatomie Pathologique, Caen, France. ³Normandie University, UNICAEN, CNRS UMR 6139, LMNO, Caen, France. ⁴Clinique Saint-Martin, Service de Chirurgie Orthopédique, Caen, France. Juliette Aury-Landas and Céline Bazille contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.B. (email: catherine.bauge@unicaen.fr)

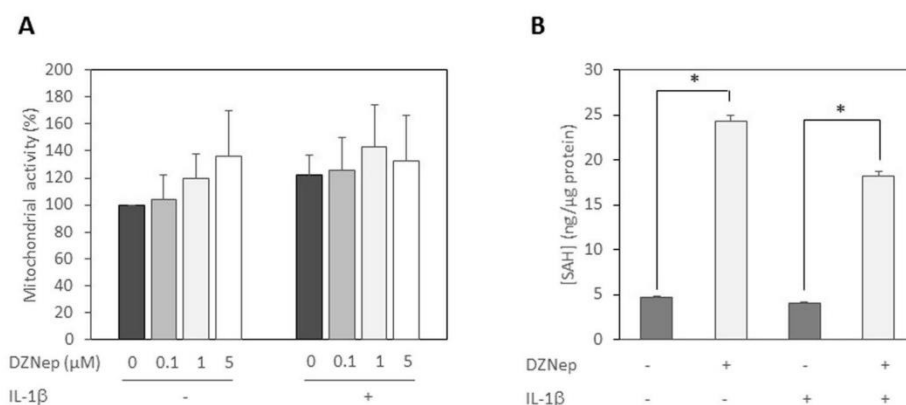


Figure 1. DZNeP, a SAHH inhibitor, was not toxic in chondrocytes. **(A)** Primary chondrocytes were treated with DZNeP (0 μM, 0.1 μM, 1 μM or 5 μM) in the presence or absence of IL-1β (1 ng/mL) for 72 h. After treatment, cell viability was assessed by WST-1 assay. Data are expressed as means ± SEM. **(B)** Primary chondrocytes were treated or not with DZNeP (1 μM) in the presence of IL-1β (1 ng/mL) for 72 h. After treatment, proteins were extracted, and SAH levels were determined in cells by ELISA assay. Data are expressed as means ± SEM. *p-value ≤ 0.05.

sites, inducing the transcription of target genes, such as *MMPs*. Interestingly, MAPK as well as NFκB pathway have been shown to be activated in OA cartilage and can play a key role in the cartilage destruction seen in OA^{1,2}.

IL-1β is one of the most important cytokines involved in the pathogenesis of OA, disturbing the catabolism and anabolism processes and causing considerable pain and disability^{3,4}. Therefore, the use of pharmacological treatments to inhibit IL-1β effects presents a useful strategy to treat OA⁵. In addition, IL-1β treatment of chondrocytes is an easy way to mimic inflammatory part of osteoarthritis *in vitro*, permitting to assess the interest of anti-arthritis molecules. Such studies have highlighted the anti-inflammatory effects of tested drugs by measuring the repression of expression of inflammatory markers, such as MMPs, PGE2 or NO levels, as well as the activation of MAPK and NFκB pathways induced by IL-1β⁶.

Recently, 3-Deazaneplanocin A (DZNeP), a carbocyclic adenosine analog derived from the naturally occurring antibiotic neplanocin A, has been reported to have anti-inflammatory effects. For instance, in the context of allogeneic graft, this molecule reduces the inflammatory infiltration in liver, intestine and skin of recipients⁷. In this study, both interferon-γ (INF-γ) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were down-regulated by DZNeP indicating an ameliorated inflammatory environment in recipients. Besides, in breast cancer cells, microarray analysis showed that DZNeP regulates numerous genes involved in inflammation supporting that this analog may regulate a wide range of genes involved in inflammation network⁸. Also, DZNeP induces significant decreased inflammatory phenotypic cytokines, including TNF-α, IL-6, IL-12, IL-1β and MCP-1, in RAW264.7 cells and in murine polarized macrophages obtained from mice treated with lipopolysaccharide plus IFN-γ⁹. Together, these data suggest that DZNeP may be an innovative molecule to counteract inflammation process during OA.

DZNeP is a potent inhibitor of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase (SAHH), a component of the methionine cycle¹⁰. SAHH catalyzes the reversible hydrolysis of S-Adenosyl-L-Homocysteine (SAH) to adenosine and homocysteine, which is converted to methionine. When this enzyme is inhibited, SAH accumulates in cells, leading to inhibition of the histone methyltransferase (HMT) activity and the subsequent histone methylation inhibition. In particular, DZNeP has been reported to specifically inhibit the histone methylase EZH2 leading to a decrease of the methylation of the histone H3 on the lysine 27 (H3K27)¹¹. Interestingly, EZH2 has been recently described as a regulator of chondrocyte proliferation and hypertrophy^{12,13}. In addition, EZH2 level was found significantly increased in chondrocytes of OA patients compared to normal humans, suggesting that this methylase may be involved in OA development¹³.

In this study, we assessed *in vitro* the effects of DZNeP in human articular chondrocytes. We showed that this inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and EZH2 histone lysine-N-methyltransferase has anti-inflammatory, anti-catabolic and chondroprotective effects since it reduces IL-1β-induced MAPK activation, NO and PGE2 production and MMP expression while it upregulates Sox9 and COL2A1. We suggest also a putative role of *CITED2* and *EGR1* in this response.

Results

DZNeP is not toxic for chondrocytes and inhibits SAHH. DZNeP was initially used for its ability to induce apoptosis in tumoral cells, while it has been described to be safe for normal cells. We first assessed the toxicity of DZNeP on human chondrocytes. Primary chondrocytes were treated 72 h by increasing doses of DZNeP in the presence or absence of IL-1β. Cells treated with DZNeP showed no sign of cytotoxic effects or any negative effects on cell viability under light microscopy. Measurement of the metabolic activity by WST-1 assay confirmed that DZNeP (0.1 to 5 μM) was not toxic for human chondrocytes (Fig. 1A).

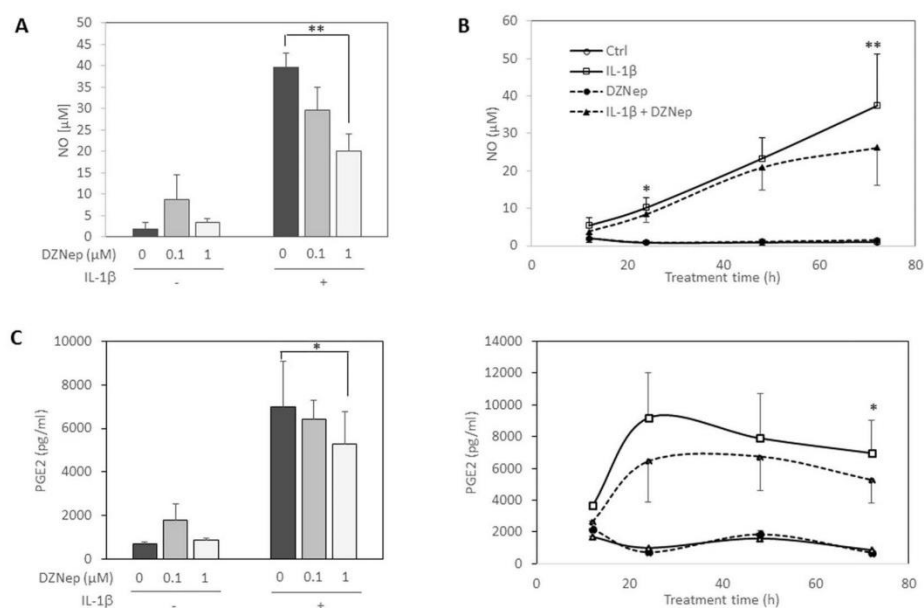


Figure 2. DZNP reduced NO and PGE2 production induced by IL-1 β . **(A)** Primary chondrocytes were treated or not with DZNP (0 μ M, 0.1 μ M or 1 μ M) in the presence or absence of IL-1 β (1 ng/mL) for 72 h. **(B)** Primary chondrocytes were treated or not with DZNP (1 μ M) in the presence or absence of IL-1 β (1 ng/mL) for 12 h, 24 h, 48 h or 72 h. After treatment, NO production was measured in culture medium by Griess reaction assay. **(C)** Cells were treated or not with DZNP (1 μ M) in the presence or absence of IL-1 β (1 ng/mL) for 72 h. After treatment, PGE2 was quantified in culture medium by ELISA assay. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance between “IL-1 β ” and “IL-1 β + DZNP” conditions are represented. *p-value \leq 0.05; **p-value \leq 0.01.

Next, inhibitory activity of DZNP against SAH hydrolase in human chondrocytes was measured by the elevation in SAH concentration in proteins extracted from whole cells¹⁰. As expected, DZNP treatment induced SAH intracellular accumulation in both untreated and IL-1 β -stimulated chondrocytes (Fig. 1B).

DZNP reduces NO and PGE2 production induced by IL-1 β . Then, we investigated the effect of DZNP on the production of NO induced by IL-1 β . A 72 h-treatment with DZNP prevented IL-1 β -stimulation of NO release in medium in a dose-dependent manner (Fig. 2A). The dose of 1 μ M of DZNP was chosen for the following experiments as this dose reduced significantly the production of NO induced by IL-1 β . Time course experiments (from 12 h to 72 h) confirmed that DZNP counteracted the induction of NO by IL-1 β (Fig. 2B).

Additionally, DZNP (1 μ M) significantly reduces the PGE2 release in IL-1-treated chondrocytes (Fig. 2C).

DZNP counteracts MMPs release induced by IL-1 β . We pursued this study by analysing the effect of DZNP on IL-1 β -induced expression of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 at protein level. DZNP treatment dose-dependently reduced IL-1 β -induced release of MMPs (Fig. 3A). The effects were statistically significant for MMP-1 and MMP-3 with 1 μ M of DZNP. For MMP-13, we observed the same pattern, but the decrease did not reach statistical significance. Time course experiments (from 12 h to 72 h) indicated that DZNP significantly reduces MMP-1, MMP-3 and MMP-13 release from 24 h of treatment (Fig. 3B). Similar effects were observed at mRNA level after 48 h of DZNP-treatment in chondrocytes (Fig. 3C). Interestingly, DZNP was also able to counteract MMP release induced by IL-1 β in synoviocytes (data not shown).

DZNP reduces MAPK activation by IL-1 β . Furthermore, we investigated signalling pathways induced by IL-1 β , namely MAPK (p38, ERK and JNK) and NF κ B pathways (Fig. 4). Western-blot analyses indicated that DZNP-treatment reduced IL-1 β -induced phosphorylation of JNK and p38. Concerning NF κ B pathway, we could not detect any changes in I κ B- α phosphorylation or degradation induced by IL-1 β in the presence of DZNP.

DZNP counteracts the IL-1 β effect on expression of genes involved in cartilage matrix degradation. To identify IL-1 β -target genes that are regulated by DZNP, we compared gene expression profiling of chondrocytes treated or not by DZNP, in the presence of IL-1 β . We paid attention to genes whose expression was regulated by IL-1 β with a fold-change above 2 and counteracted by DZNP with a fold-change above 1.6.

Among the 936 genes up-regulated by IL-1 β , 62 corresponding to 55 unique protein-coding genes were down-regulated by DZNP (Suppl. Table 1). Gene Ontology analysis (Fig. 5A, Suppl. Table 2) showed that these

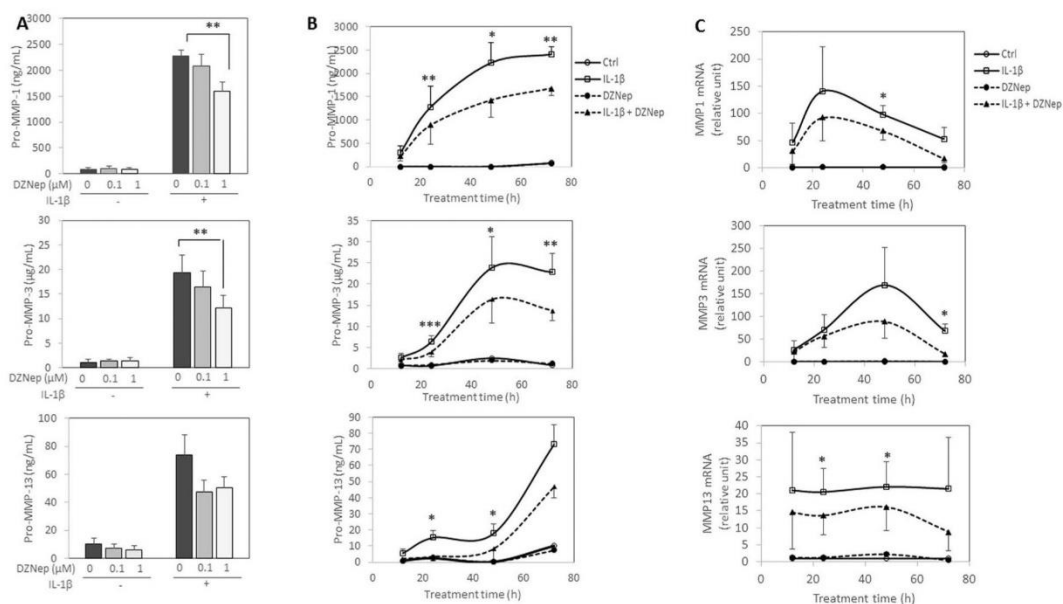


Figure 3. DZnep reduced MMP release and mRNA expression of MMPs induced by IL-1 β . **(A)** Primary chondrocytes were treated or not with DZnep (0 μ M, 0.1 μ M or 1 μ M) in the presence or absence of IL-1 β (1 ng/mL) for 72 h. **(B–C)** Primary chondrocytes were treated or not with DZnep (1 μ M) in the presence or absence of IL-1 β (1 ng/mL) for 12 h, 24 h, 48 h or 72 h. After treatment, protein levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 were determined in culture medium by ELISA assay **(B)**. RNA was also extracted, and relative expression of *MMP-1*, *MMP-3* and *MMP-13* were determined in cells by real-time RT-PCR, using *GAPDH* expression as reference **(C)**. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance between “IL-1 β ” and “IL-1 β + DZnep” conditions are represented. **p*-value \leq 0.05; ***p*-value \leq 0.01; ****p*-value \leq 0.001.

genes are enriched in molecular functions which can be ranged in two groups “peptidase activity/endopeptidase/metallopeptidase activity/proteolysis”, and “growth factor activity”. These genes included *MMP1*, *MMP3*, *ADAMT4*, *CIS* for the first group, and *IL-6* and *CXCL1* for the second one.

Conversely, among the 863 genes down-regulated by IL-1 β , 29 entities corresponding to 26 unique protein-coding genes were up-regulated by DZnep. These genes are enriched for the molecular function “transcription factor activity/transcription regulator activity” and “transition metal ion binding/cation binding/metal ion binding” (Fig. 5A, Suppl. Table 3).

PPI network of the 81 proteins encoded by DEGs was built using STRING. This network was significantly enriched in protein-protein interactions (30 interactions, *p*-value = 1.78×10^{-10}). It was centred on *EGR1*, which seemed to play a central role considering that it had 8 directly related proteins (Fig. 5B).

Furthermore, we performed RT-PCR on several relevant genes. As expected, DZnep reduced the IL-1 β -induced expression of *ADAMT4*, and counteracted the IL-1 β -induced reduction of *EGR1* but also *CITED2*, a gene known to inhibit MMP expression (Fig. 6A).

DZnep has chondroprotective effects. Furthermore, we also paid attention to DEG when chondrocytes were treated by DZnep alone (in the absence of IL-1 β). A total of 925 DEGs including 392 up- (283 unique protein-coding genes) and 533 down-regulated genes (413 unique protein-coding genes), with a fold-change above 1.6, were identified in chondrocytes treated with DZnep compared to untreated chondrocytes (Suppl. Table 4). These genes are enriched in numerous biological processes, namely “Wnt signaling pathway” (*TCF7*, *WNT3*, *NR4A2*, *SOX4*, *SNAI2*, *FZD4*, *DISC1*), “osteoblast differentiation” (*MSX2*, *RSPO2*, *GDF10*, *COL6A1*, *RPS11*, *SNAI2*, *RBMX*, *MYBBP1A*, *IGFBP5*) and “cell division” (*KIFC1*, *NEK2*, *ARF6*, *AURKA*, *SPC24*, *FAM83D*, *SPC25*, *KIF2C*, *CDCA8*, *CDCA7*, *OIP5*, *CDCA2*, *BUB1*, *SKA1*, *CCNA2*, *CDCA5*, *CDK1*, *KIF11*, *SYCE3*, *CDC23*, *BIRC5*, *TACC3*, *CDC25C*, *UBE2C*, *CCNB2*, *MAD2L1*, *SPAG5*, *KNL1*, *ZWINT*, *CENPW*, *BUB1B*), but also “regulation of chondrocyte differentiation” (*ADAMT57*, *GREM1*, *SNAI2*). Also, there was enrichment in cellular components, such as “extracellular matrix” (*RPL35A*, *HIST4H4*, *LGALS1*, *VIM*, *DCN*, *CFP*, *VWF*, *RPS19*, *RPS17*, *HTRA1*, *TGFBI*, *COL1A2*, *TGM2*, *COL6A1*, *RPS13*, *RPL11*, *RPS20*, *RPS11*), and KEGG pathways, in particular for “mineral absorption” (*MT1M*, *MT1A*, *ATP1B2*, *MT2A*, *MT1B*, *SLC40A1*, *MT1F*).

These data are in agreement with literature since *EZH2* has been recently reported to regulate chondrocyte proliferation and hypertrophy through Wnt signalling pathway regulation^{12,13}. Also, they suggest that DZnep might have chondroprotective effects. So, we investigated the expression of several essential genes in chondrocytes (Fig. 6B). Interestingly, *SOX9* and *COL2A1* were up-regulated by DZnep in chondrocytes. However, this

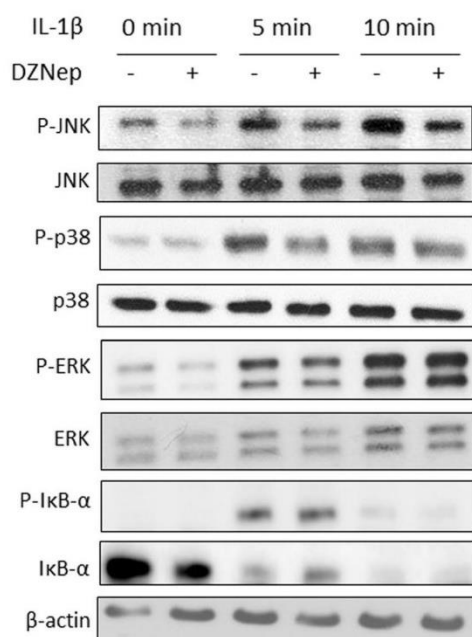


Figure 4. DZNep reduced MAPK pathway activation by IL-1β. Primary chondrocytes were treated or not with DZNep (1 μM) in the presence of IL-1β (1 ng/mL) for 0 min, 5 min or 10 min. After treatment, proteins were extracted, and levels of P-JNK and JNK, P-p38 and p38, P-ERK and ERK, P-IκB-α and IκB-α were determined in cells by western blotting.

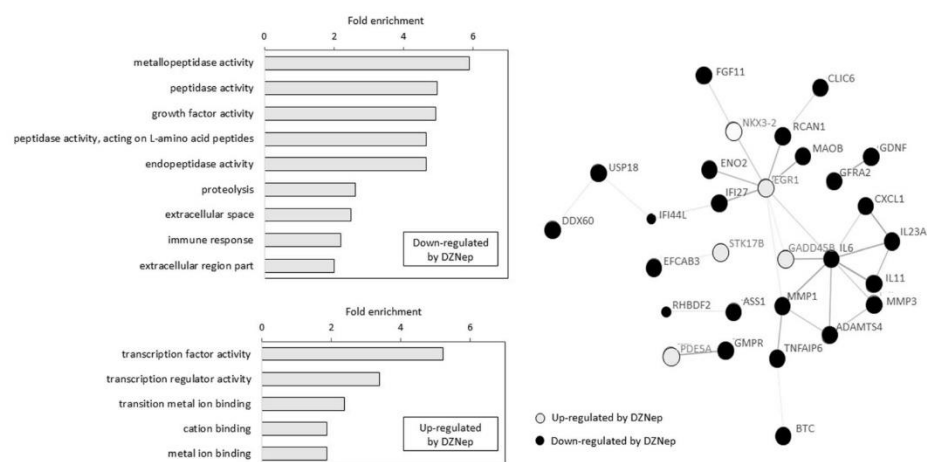


Figure 5. Gene ontology enrichment and PPI network of genes IL-1β-target genes regulated by DZNep. (A) Gene ontology enrichment of the genes regulated by DZNep in IL-1β-treated chondrocytes, using DAVID tool. (B) Confidence view of the PPI network built by STRING. Disconnected nodes are hidden.

effect was statistically significant only after 48 h-treatment, this could explain why these genes were not identified in the microarray experiment.

Discussion

Osteoarthritis is characterized by irreversible degradation of articular cartilage due to the overexpression of MMPs and reduction of anabolic activity of chondrocytes, and is still difficult to treat. In the present study, we

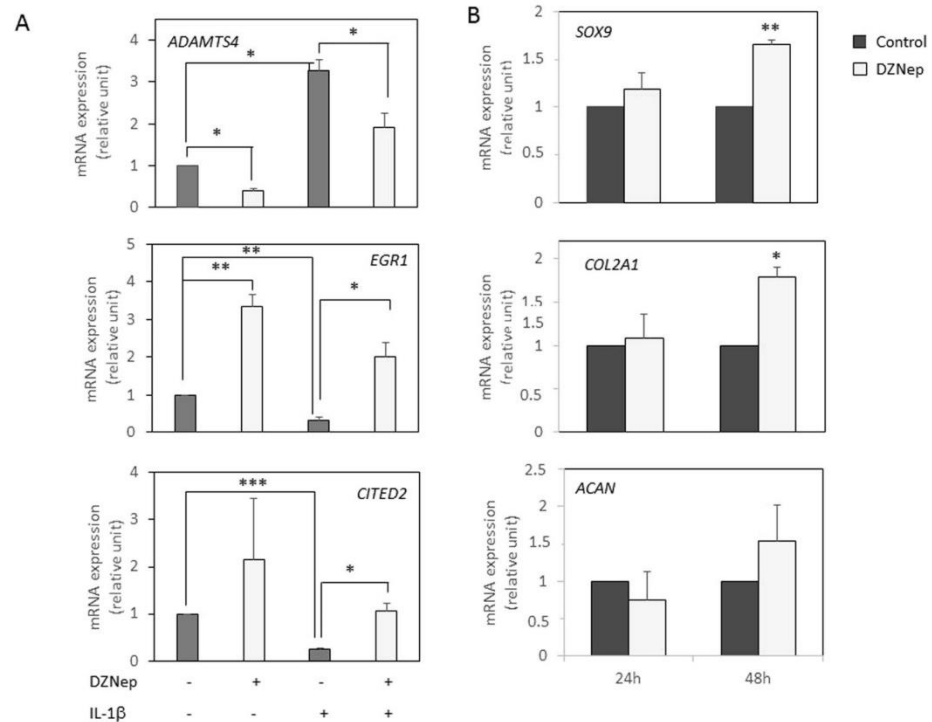


Figure 6. DZNep upregulated *COL2A1* and *SOX9* expression. Primary chondrocytes were treated or not with DZNep (1 μ M) in the presence or absence of IL-1 β (1 ng/mL) for 24 h (A), or in the absence of IL-1 β (1 ng/mL) for 24 h or 48 h (B). After treatments, mRNA were extracted, and relative gene expression was determined by real-time RT-PCR, using *GAPDH* expression as reference. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance are represented. *p-value \leq 0.05, **p-value \leq 0.01, ***p-value \leq 0.001.

bring out the anti-inflammatory, anti-catabolic and chondroprotective effects of DZNep, a SAHH inhibitor known to inhibit EZH2 methylase.

Interestingly, we showed, in an *in vitro* model of inflammatory joint diseases, that DZNep reduces the activation of MAPK pathways (p38 and JNK), decreases the production of inflammatory molecules, such as NO and PGE2, and regulates the expression of collagenases (MMP-1, and -13), stromelysins (MMP-3) and aggrecanases (ADAMTS-4) in IL-1 β -treated chondrocytes. These anti-inflammatory and anti-catabolic effects of DZNep could be mediated (at least in part) by CBP/p300-interacting transactivator with ED-rich tail 2 (CITED2, previously identified as MRG1 or p35srj). Indeed, we show that this key transcriptional modulator in inflammation and stress responses, is up-regulated by DZNep in chondrocytes both in the absence or presence of IL-1 β . Interestingly, in chondrocytes, CITED2 overexpression is known to result in the reduction of MMP-1 and MMP-13 expression^{14,15}. In addition, *in vivo*, reduced CITED2 expression in cartilage contributes to OA pathogenesis, and its restoration in OA joints by gene transfer reduces cartilage degradation, and MMP-13 and ADAMTS-5 expression¹⁶. This suggests that DZNep may act, in chondrocytes, as an anti-inflammatory agent, which protects against the catabolism of extracellular matrix. This is in agreement with recent observations of Chen and collaborators who show that EZH2 inhibition, by EPZ005687, delays OA development in experimental osteoarthritis model in mice, and reduced the expression of the enzymes of extracellular matrix breakdown such as MMP-3, MMP-13 and ADAMTS-5 in OA cartilage¹³. In addition, these researchers show that EZH2 inhibition reduces chondrocyte hypertrophy, *in vitro* and *in vivo*, by regulating Wnt signalling pathways¹³. This is coherent with our transcriptomic analysis which shows an enrichment in cellular functions linked to “Wnt signalling pathway” and “osteoblast differentiation” in DZNep-treated chondrocytes.

Besides the reduction of cartilage extracellular matrix breakdown, DZNep could have chondroprotective effects. Indeed, we found that, in human chondrocytes, it upregulates *SOX9* and *COL2A1*, two major genes involved in cartilage anabolism. *SOX9* is a crucial transcriptional factor for chondrogenesis and chondrocyte differentiation. It is a transactivator of many genes preferentially expressed in non-hypertrophic chondrocytes, including *COL2A1*. This latter encodes type II collagen, the major hyaline cartilage matrix component.

Our whole-transcriptome data and PPI analysis revealed that *EGR1* (also named *NgfiA*, *Krox24*, *Zif268*), is upregulated by DZNep in both unstimulated and IL-1 β -stimulated chondrocytes, and it may play a central role in DZNep-treated chondrocytes. Interestingly, this transcriptional factor is known to functionally interact with

PRC complex and EZH2¹⁷, and is one of the major regulator of Sox9 expression in chondrocytes. It is able to bind to SOX9 promoter and favors its transcription¹⁷.

In conclusion, DZNep has anti-inflammatory and protective effects in chondrocytes. It represses the IL-1 β -induced expression of enzymes involved in cartilage breakdown, and induces expression of chondrogenic factors, such as *COL2A1* and *SOX9*. These effects seem to be related to *CITED2* and *EGR1* expression. These results indicate that developing inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases may be beneficial for the prevention or therapeutic treatment of osteoarthritis.

Methods

Reagents. Reagents were supplied by *Invitrogen (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)* unless otherwise noted. IL-1 β (*Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France*) was resuspended in phosphate buffered saline (PBS) with bovine serum albumin (BSA). Oligonucleotides were supplied by *Eurogentec (Angers, France)*. DZNep-HCl was provided by *R&D Biosystems (Lille, France)* and resuspended in PBS.

Cell culture and treatments. Human articular chondrocytes (HAC) were prepared from femoral head obtained after total hip replacement in osteoarthritis patients. The experimental protocol was approved by local ethical committee, named "Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III" (agreement #A13-D46-VOL.19). Informed consent was obtained from all participants. They all signed agreement forms before the surgery, according to local legislation.

Cells were isolated and cultured as previously described¹⁸.

Survival assay. Cell survival was assessed by tetrazolium colorimetric WST-1 assay (*Roche Diagnostics, Meylan, France*). Chondrocytes were plated into 96-well microtiter plates. At the end of treatment, 10 μ l of WST-1 solution were added to wells. Optical density was measured on a spectrophotometer plate reader (Multiskan GO spectrophotometer, *Thermo Scientific, France*) at 450 nm. Survival was calculated according to the formula: $OD_{\text{test}}/OD_{\text{control}}$.

S-Adenosyl-L-Homocysteine (SAH) assay. SAH accumulation was assayed using commercially available ELISA kit (*Cell Biolabs, Inc, Lille, France*). Forty μ g of proteins extracted from cells using RIPA buffer were used. Absorbance was determined at 450 nm with a wavelength correction set at 540 nm (Multiskan GO spectrophotometer, *Thermo Scientific, France*).

Nitric Oxide (NO) assay. Generation of NO was determined by measuring nitrite accumulation in culture supernatants using Griess reagent (1% sulphanilamide and 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride in 5% H₃PO₄, *Sigma-Aldrich*). Sample and Griess reagent were mixed and incubated for 5 min. The absorption was estimated by a plate reader (Multiskan GO spectrophotometer, *Thermo Scientific, France*) at 540 nm. Sodium nitrite (NaNO₂, *Sigma-Aldrich*) was used as positive control.

Metalloproteinases (MMPs) and PGE2 release assay. MMPs and PGE2 released into conditioned media was quantified using commercially available enzyme immunoassay kit (*R&D Biosystems*). Absorbance was determined at 450 nm with a wavelength correction set at 540 nm (Multiskan GO spectrophotometer, *Thermo Scientific, France*).

RNA isolation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA was extracted with Trizol reagent according to the manufacturer's condition (*Invitrogen*), and reverse transcribed into cDNA as previously described¹⁸. Amplification of the generated cDNA was performed by real-time PCR in Step One Plus Real Time PCR system (*Applied Biosystems*) with appropriate primers. The relative mRNA level was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Protein extraction and western blotting. Cells were lysed and western blotting performed as previously described¹⁹. Following antibodies were used: Phospho-SAPK/JNK Thr183/Tyr185 (#9251), SAPK/JNK (#9252), Phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182 (#9211), p38 MAPK (#9212), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) Thr202/Tyr204 (#4347), p44/42 MAPK (Erk1/2) (#4695), Phospho-IkappaB- α (Ser32) (#9241) and I κ B- α (#9242), from *Cell signalling*, β -actin (sc-47778), goat anti-mouse IgG-HRP and goat anti-rabbit IgG-HRP from *Santa Cruz biotechnology*.

RNA Isolation and gene expression microarray analysis. Total RNA was isolated from cell culture using NucleoSpin RNA (*Macherey-Nagel, Hoerdt, France*), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were measured on a MultiScan GO spectrophotometer with a μ Drop Plate (*ThermoFisher Scientific, France*). RNA integrity was assessed on a 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies France, Les Ulis, France*) using RNA 6000 Nano (*Agilent Technologies*), according to the manufacturer's instructions. RNA integrity numbers above 8 were considered suitable for microarray analysis. Two-color microarray-based gene expression analysis was performed, according to the manufacturer's instructions (*Agilent Technologies*). Briefly, 100 ng of total RNA were amplified and labeled using a Low input Quick Amp Labeling kit, Two-color (*Agilent Technologies*), and hybridized to a Human Gene Expression 4 \times 44 K v2 Microarray (design ID 026652, *Agilent Technologies*). Slides were scanned on a G2505C Microarray Scanner (*Agilent Technologies*). Raw data were extracted and Lowess normalized using Feature Extraction software (v. 10.7.3, *Agilent Technologies*), and analyzed using GeneSpring GX software (v. 13.1.1, *Agilent Technologies*). Microarray probes with a signal that is not positive and significant or not above the background were filtered out.

Gene-annotation enrichment analysis and Protein-Protein Interaction (PPI) network construction. Gene-annotation enrichment among the genes showing significant differential expression was performed with the Functional annotation tool of the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (v. 6.7, DAVID) tool²⁰ considering the biological processes option (GOTERM_BP_FAT), the cellular compartment option (GOTERM_CC_FAT), the molecular function option (GOTERM_MF_FAT) or the Pathways database (KEGG_Pathway). Enrichments with a p-value < 0.05 were considered as significant.

Protein-protein interaction network among DEGs was constructed using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (v. 10, STRING). Networks with a p-value ≤ 0.05 were considered significantly enriched in interactions.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using R. Data were tested for normality using a Shapiro-Wilk test. The data were analysed using repeated measures Anova (Fisher test). Post-hoc analyses were done using a paired t-tests (alternative less). Differences between groups were considered statistically significant when p-value below 0.05 were measured.

Data availability statement. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Saklatvala, J. Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-kappaB pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis. *Curr. Drug Targets* **8**, 305–313 (2007).
2. Loeser, R. F., Erickson, E. A. & Long, D. L. Mitogen-Activated Protein Kinases as Therapeutic Targets in Osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **20**, 581–586 (2008).
3. Kimura, M. *et al.* A critical role for allograft inflammatory factor-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 3316–3322 (2007).
4. Yang, B. *et al.* Effect of microRNA-145 on IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett.* **588**, 2344–2352 (2014).
5. Chen, W.-P. *et al.* Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase expression in human chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* **19**, 174–177 (2014).
6. Baugé, C. & Boumédiène, K. In *Advances in Genetics Research* **10**, 115–128 (2013).
7. Wang, J., Li, L., Xu, M., Rong, R. & Zhu, T. Modulation of Allogeneic CD8+ T-Cell Response by DZNep Controls GVHD While Preserving Hematopoietic Chimerism. *Transplantation* **96**, 774–781 (2013).
8. Sun, F. *et al.* Combinatorial pharmacologic approaches target EZH2-mediated gene repression in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 3191–3202 (2009).
9. Zhang, W., Liu, H., Liu, W., Liu, Y. & Xu, J. Polycomb-mediated loss of microRNA let-7c determines inflammatory macrophage polarization via PAK1-dependent NF- κ B pathway. *Cell Death Differ.* **22**, 287–297 (2015).
10. Glazer, R. I., Knode, M. C., Tseng, C. K. H., Haines, D. R. & Marquez, V. E. 3-deazaneplanocin A: A new inhibitor of S-adenosylhomocysteine synthesis and its effects in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 4523–4527 (1986).
11. Baugé, C., Bazille, C., Girard, N., Lhuissier, E. & Boumédiène, K. Histone methylases as novel drug targets: developing inhibitors of EZH2. *Future Med. Chem.* **6**, 1943–1965 (2014).
12. Lui, J. C. *et al.* EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy. *Nat. Commun.* **7**, 13685 (2016).
13. Chen, L. *et al.* The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/ β -catenin pathway. *Sci. Rep.* **6**, 29176 (2016).
14. Leong, D. J. *et al.* Physiological loading of joints prevents cartilage degradation through CITED2. *FASEB J.* **25**, 182–191 (2011).
15. Yokota, H., Goldring, M. B. & Sun, H. B. CITED2-mediated Regulation of MMP-1 and MMP-13 in Human Chondrocytes under Flow Shear. *J. Biol. Chem.* **278**, 47275–47280 (2003).
16. Leong, D. J. *et al.* The chondroprotective role of CITED2 in post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, S304–S305 (2013).
17. Spaapen, F. *et al.* The Immediate Early Gene Product EGR1 and Polycomb Group Proteins Interact in Epigenetic Programming during Chondrogenesis. *PLoS ONE* **8** (2013).
18. Baugé, C. *et al.* Interleukin-1 β impairment of transforming growth factor β 1 signaling by down-regulation of transforming growth factor β receptor type II and up-regulation of Smad7 in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **56**, 3020–3032 (2007).
19. Baugé, C. *et al.* Interleukin-1 β up-regulation of Smad7 via NF- κ B activation in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **58**, 221–226 (2008).
20. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).

Acknowledgements

We thank Julien PONTIN and Marion BERTHELOT (BioConnecT, Unicaen, Caen, France) for technical assistance. This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-15-CE14-0002-01], Région Normandie, European Union [FEDER/FSE 2014-2020 – 16E00779/16P03685] and the Société Française de Rhumatologie (SFR). J.A.L. was the recipient of a fellowship from Région Basse-Normandie and Agence Nationale de la Recherche.

Author Contributions

J.A.L., K.B. and C. Baugé contributed to conception and design of the study. S.L. and C. Bazille provided study materials. J.A.L., C. Bazille, L.A., S.B. collected the data. J.A.L., C. Bazille, L.A., S.B., K.B., and C. Baugé analyzed and interpreted the data. J.A.L. and C.C. did statistical analysis. J.A.L. and C. Baugé drafted the article. All authors reviewed the manuscript. C. Baugé obtained the fundings.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-06913-6

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Antiproliferative effect of the histone demethylase inhibitor GSK-J4 in chondrosarcomas

Eva Lhuissier | Juliette Aury-Landas | Lyess Allas | Martine Boittin |
Karim Boumediene | Catherine Baugé 

Normandie Univ, UNICAEN, EA7451
BioConnecT, Caen, France

Correspondence

Catherine Baugé, EA7451 BioConnecT,
Université de Caen Normandie, 14032
CAEN, France.
Email: catherine.bauge@unicaen.fr

Funding information

Ministère de la Recherche/Université de
Caen; European Union, Grant/Award
Number: FEDER/FSE 2014-2020 –
16E00779/16P03685; Agence Nationale de
la Recherche, Grant/Award Number: ANR-
15-CE14-0002-01

Abstract

Chondrosarcoma (CS) is the second most common malignant bone sarcoma. Its treatment remains an issue, because this tumor is radio- and chemo-resistant. In the present study, we investigated the antitumoral potential of GSK-J4, a small molecule described as an inhibitor of histone demethylases UTX and JMJD3 (KDM6A and KDM6B), alone or in combination with cisplatin in CSs. Human CS-derived cell lines were treated with GSK-J4 in the presence or not of cisplatin. Survival curves were established and cell proliferation and cycle were evaluated by flow cytometry using dividing cell tracking technique utilizing carboxyfluorescein succinimidyl ester labeling, or DNA staining by propidium iodide. Apoptosis and senescence were also investigated. GSK-J4 decreased proliferation of CS cells. Additionally, it induced apoptosis in CH2879 and JJ012 cells, but not in SW1353 CSs. In addition, its association with cisplatin decreased cell proliferation more than drugs alone, whereas it did not increase apoptosis compared to cisplatin alone. Interestingly, GSK-J4 alone as well as in association with cisplatin did not affect chondrocyte survival or proliferation. In conclusion, this study suggests that demethylase inhibitors may be useful in improving therapy for CS in reducing its proliferation.

KEYWORDS

apoptosis, cell death, chondrosarcoma, histone demethylase, senescence

Abbreviations: α -KH, α -ketoglutarate; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; CS, chondrosarcoma; D-2HG, D-2 hydroxyglutarate; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS, fetal bovine serum; H3K27me3, Histone H3 (tri methyl K27); HAC, human articular chondrocytes; IDH, isocitrate dehydrogenase 1; IP, propidium iodide; JMJD3, Jumonji Domain-Containing Protein 3; KDM6A, Lysine (K)-Specific Demethylase 6A; KDM6B, Lysine (K)-Specific Demethylase 6B; KDM6B, Lysine (K)-Specific Demethylase 6B; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, Polymerase chain reaction; PVDF, polyvinylidene difluoride; RPMI, Roswell Park Memorial Institute 1640's medium; UTX, Ubiquitously transcribed tetratricopeptide Repeat X-linked Protein.

© 2019 International Union of Biochemistry and Molecular Biology

1 | INTRODUCTION

Chondrosarcoma (CS) is a rare bone tumor characterized by the production of a cartilage-like matrix, occurring most often in pelvis and long bones, and affects mainly adults. The treatment has very little changed over the past 40 years because this tumor is resistant to chemotherapy and radiotherapy¹. It consists of surgical tumor resection². The identification of new therapies is therefore urgently required.

Recently KDM6 family members (KDM6A/UTX and KDM6B/JMJD3) have been identified as histone demethylases

playing important roles in tumoral processes, and their inhibition has been reported to reduce tumoral cell proliferation^{3,4}. Thereby, these genes could potentially represent novel candidate targets for intervention in CSs.

KDM6A, also called ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X-linked protein (UTX) is an ubiquitously expressed protein that controls basal levels of H3K27me3^{5,6}. It regulates the induction of ectoderm and mesoderm differentiation^{7,8} and is essential for reprogramming⁹. KDM6B, also called Jumonji D3 (JMJD3), is the second enzyme able to demethylate H3K27me3. Its expression is induced upon inflammation¹⁰, viral and oncogenic stimuli^{10–12}. It controls neuronal and epidermal differentiation^{13,14} and inhibits reprogramming¹⁵.

Interestingly, the treatment of cells with GSK-J4, a pharmacologic inhibitor of UTX and JMJD3, reduces cell viability and increases apoptosis in pediatric brain stem glioma³, acute lymphoblastic leukemia⁴, and B-cell lymphoma¹⁶. It is a small-molecule catalytic site inhibitor that is selective for the H3K27me3-specific JMJD subfamily, which acts by mimicking α -ketoglutarate binding at active site of JMJD3 and UTX¹⁷.

In the present study, we evaluated the impact of GSK-J4 in CSs and their associated normal cells, namely chondrocytes. We used three different cell lines (SW1353, JJ012, and CH2879) with different genetic profiles, namely concerning IDH genes, in order to take into account the genetic diversity of CSs. Indeed, it has been previously shown that IDH mutations inhibit DNA and histone demethylation that could affect cell response to GSK-J4.

Herein, we showed that GSK-J4 reduces proliferation in CS cells. It also induces apoptosis in CH2879 and JJ012, but not in SW1353 cells. Whereas its association to cisplatin reduces CS proliferation, it was not able to induce more apoptosis than drugs alone. In chondrocytes, GSK-J4 treatment has no effect on proliferation or survival of these normal cells, suggesting that this pharmacological drug may be an efficient treatment to reduce progression of CSs.

2 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1 | Drugs

GSK-J4 and cisplatin were provided by Clinisciences (MedChemExpress Europe, Sweden) and by Sigma (St Quentin Fallavier, France), respectively, and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO).

2.2 | Cell culture

Human CS cell line SW1353 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The human JJ012 cell lines were kindly provided by Dr. Joel A. Block (Rush University medical center)^{18,19}. They were cultured in Dulbecco's

Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and antibiotics. The cell line CH2879 was kindly provided by Pr. A. Llombart-Bosch (University of Valencia, Spain), cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640's medium (Lonza AG, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS (Invitrogen) and antibiotics²⁰. Chondrocytes were obtained and cultured as previously described²¹. They were cultured in DMEM, supplemented with 10% FBS and antibiotics. All cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell cultures were regularly tested for mycoplasma contamination by polymerase chain reaction (PCR).

2.3 | Cell viability assay

Cells were seeded in 6-well plates, at 10,000 cells per well, and cultured in the presence of GSK-J4 and/or cisplatin. Relative numbers of viable cells were determined by cell count after excluding trypan blue staining. Each count was performed twice, and independent experiments were done three times.

2.4 | Cell proliferation assay

Cell proliferation was assessed through dividing cell tracking technique utilizing carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining. Cells were labeled with 20 μ M CFSE (Affymetrix eBioscience) for 20 min at room temperature, allowing its diffusion into cells, and its binding to intracellular proteins. Five volumes of cold completed medium were then added to stop the staining reaction. The cells were then washed three times with PBS to remove the excess of the staining. Then, cells were treated with GSK-J4 and/or cisplatin. After 72 hr, samples were detached and analyzed by a Gallios cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR 146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen, France) with a FL1 (FITC) detector. The CFSE monitors the distinct generations of the proliferating cells by dye dilution resulting in a decrease of green fluorescence. Consequently, every generation of cells appears as a different peak of decreasing fluorescent intensity on a flow cytometric histogram.

2.5 | Cell cycle analysis

Cells were washed with PBS, treated with trypsin-EDTA (Lonza AG, Verviers, Belgium) and fixed with 70% ethanol at -20°C and conserved at 4°C. For analysis, cells were washed twice with PBS and resuspended in 10 μ g/mL RNase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 50 μ g/ μ L propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) to label DNA. Fluorescence (DNA content) was measured using Gallios (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR 146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen,

France). A minimum of 10,000 events were analyzed using Kaluza 1.5a software.

2.6 | Apoptosis assay

Treated and control cells were immunostained with APO2.7-PE conjugated antibody, as described by the manufacturer (Beckman Coulter), and analyzed by cytometer. Apo2.7 specifically detects the Mr 38,000 mitochondrial membrane antigen 7A6, which is exclusively exposed on the cell membrane of apoptotic cells and can therefore be used as a late apoptotic marker in nonpermeabilized cells. A minimum of 10,000 events were analyzed using Kaluza 1.5a software.

2.7 | Caspase activation

Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) was used. Briefly, 50 μ L reagent was added to treated or control cells in 100 μ L of culture medium. After 30 min incubation at room temperature, luminescence was measured using a Varioskan LUX plate reader (ThermoScientific).

2.8 | Senescence analysis

Cellular Senescence Assay kit (Meck Millipore) was used according to the manufacturer protocol. Briefly, cells were fixed with 1 mL of fixative solution for 15 min at room temperature and incubated with SA- β -Gal staining solution at 37°C without CO₂. The SA- β -Gal positive cells were detected under a microscope (Scope.A1 Zeiss) and considered positive when blue staining was evident in cytoplasm.

2.9 | Protein extraction and western blot

Total proteins were extracted using a RIPA lysis buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; IGEPAL 1%; NaCl 150 mM; EGTA 1 mM; NaF 1 mM) supplemented with a cocktail of phosphatase (NA₃VO₄ 10 μ L/mL) and protease inhibitors (leupeptin 1 μ L/mL, aprotinin 1 μ L/mL, pepstatin 1 μ L/mL, and phenylmethylsulfonyl fluoride 4 μ L/mL). Thirty microgram of proteins extracts were resolved by 12% SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). After probing with primary antibodies, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, and signals visualized by Western Lightning[®] Plus-ECL (Perkin Elmer) using ChemiDoc XRS+ system with Image Lab software v5.2 (Bio-Rad). Antibodies specific for p21 (sc-397) and β -actin (sc-47778) were provided by Santa Cruz Biotechnology.

2.10 | Statistical analysis

For each analysis, three different experiments were performed. The values are means \pm SEM. Statistical significance was determined with Student test. *p*-values were considered as statistically significant when less than 0.05.

3 | RESULTS

3.1 | GSK-J4 reduced survival in chondrosarcomas but not in chondrocytes

First, we investigated cell growth in three CS cell lines (CH2879, SW1353, JJ012) cultured in the presence of GSK-J4 (10 μ M) for 6 days. These cells have a strong genetic heterogeneity (Figure S1). Treatment clearly reduced the growth of CSs (Figure 1a). However, the number of cells decreased, compared to Day 0, only for two cell lines (CH2879 and JJ012), suggesting that GSK-J4 induced death in these both cell lines. In SW1353, the number of cells was lower in GSK-J4 treated cells than untreated cells, but it was not reduced compared to Day 0, suggesting that GSK-J4 may impair proliferation in these cells, without inducing death. Next, we treated CS cells and chondrocytes (HAC) with GSK-J4 for 4 days. The treatment reduced cell number in all CS cells but not in normal chondrocytes (Figure 1b).

3.2 | GSK-J4 reduced cell proliferation in chondrosarcomas

To study the GSK-J4 effect on cell proliferation, we labeled cells with CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidyl ester) before incubating them with GSK-J4 for 3 days. CFSE fluorescence is stable for a long time allowing the study of cell proliferation by observation of dye diffusion. Indeed, covalently bound CFSE to intracellular proteins is divided equally between daughter cells, allowing discrimination of successive rounds of cell division.

In each CS cell line, we observed that CFSE fluorescence was higher in GSK-J4 treated-cells than in untreated cells (Figure 2a) and consequently the dye dilution was lower in treated cells (Figure 2b), indicating that GSK-J4 reduced cell division number, and consequently proliferation.

Next, we analyzed cells for DNA content. GSK-J4 induced a blockage of the S-phase in CH2879 and JJ012 CS cell lines. Similar effect was observed in SW1353 cells, but the difference was not statistically significant (Figure 2c).

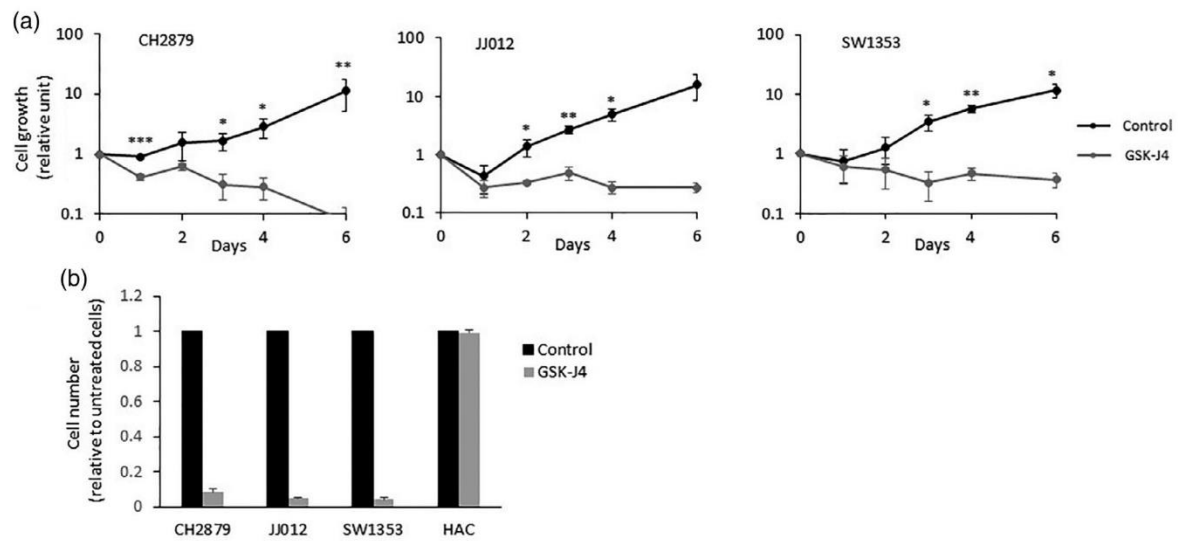


FIGURE 1 GSK-J4 decreased cell survival in chondrosarcoma cells. (a) CH2879, JJ012, and SW1353 chondrosarcoma cells were treated with GSK-J4 (10 μ M) for 6 days. Viable cells were regularly counted. Values were normalized to day 0. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). (b) Chondrosarcoma cells and human articular chondrocytes (HAC) were treated with GSK-J4 (10 μ M) for 4 days. At the end of treatment, adherent cells were counted after trypan blue exclusion of dead cells. Values are normalized to untreated cells. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$)

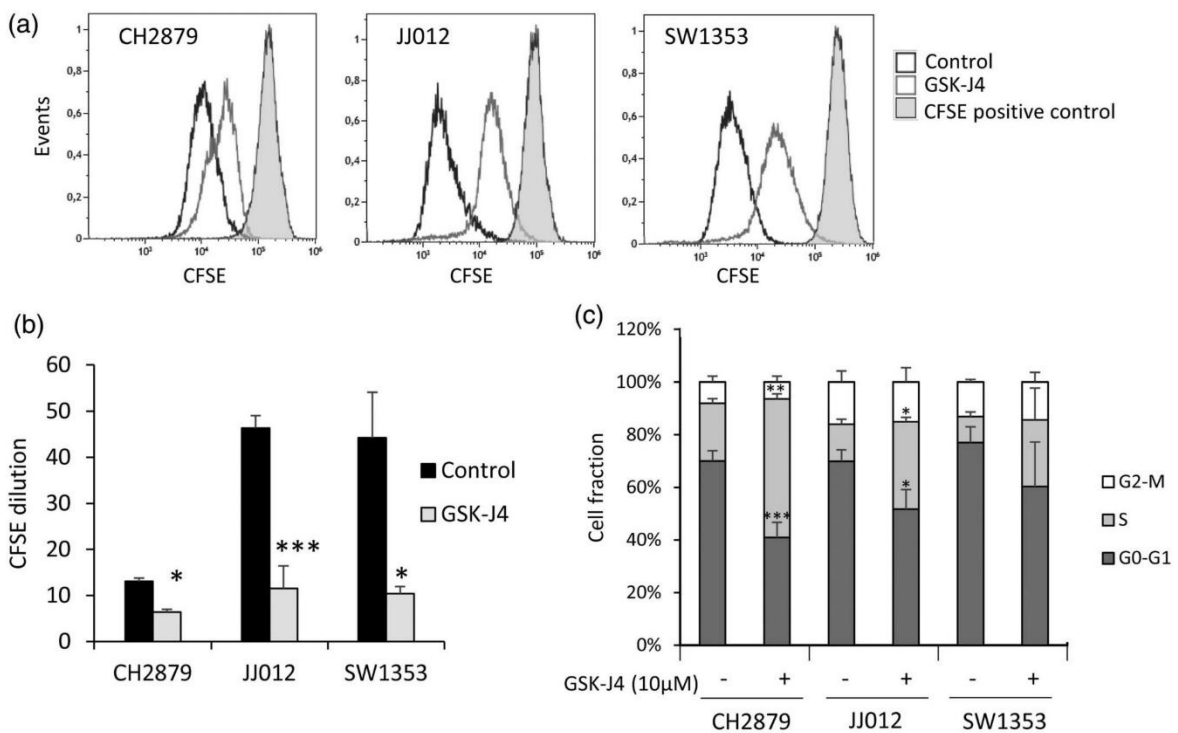


FIGURE 2 GSK-J4 reduced cell proliferation in chondrosarcomas. (a,b) Cells were labeled with CFSE, and then treated with GSK-J4 (10 μ M) for 3 days. CFSE fluorescence were tracked by flow cytometry (a). Dye dilution was calculated for each experiments and showed in histograms. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$) (b). (c) Cells were treated with 10 μ M GSK-J4 for 4 days. Then, DNA content was stained by propidium iodide, and cell cycle determined by flow cytometry. Histograms represent G0-G1, S, and G2-M phase percentages. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$)

3.3 | GSK-J4 induced apoptosis and (rarely) senescence in CH2879 and JJ012 cells, but not in SW1353

To elucidate whether GSK-J4 induced cell death, we analyzed apoptosis and senescence.

First, we observed a significant increase of apoptosis demonstrated by the activation of caspases, the increase of sub-G1 cell fraction and Apo2.7 staining, in CH2879 and JJ012 cells, but not in SW1353 CSs (Figure 3a–c).

Furthermore, GSK-J4 is able to induce senescence in CH2879 and JJ012 cells, because we could observe some SA- β -gal positive cells (which appeared blue upon microscopic observation) after GSK-J4 incubation (Figure 3d). However, it seems to be a marginal process because less than 2% were senescent in our culture condition (GSK-J4

10 μ M, 4 days). Additionally, GSK-J4 increased p21 expression in CH2879 (Figure 3e). At contrary, no SA- β -gal positive-cells or increase of p21 expression could be observed in SW1353, suggesting the absence of GSK-J4-induced senescence in this cell line.

3.4 | GSK-J4/cisplatin combination reduced cell proliferation but did not induce more apoptosis than drugs alone in chondrosarcomas

Furthermore, we investigated whether GSK-J4 is able to increase cytotoxicity of standard drugs, such as cisplatin. CSs and chondrocytes were treated with GSK-J4 or/and cisplatin for 3 days before assaying cell survival, proliferation, and apoptosis.

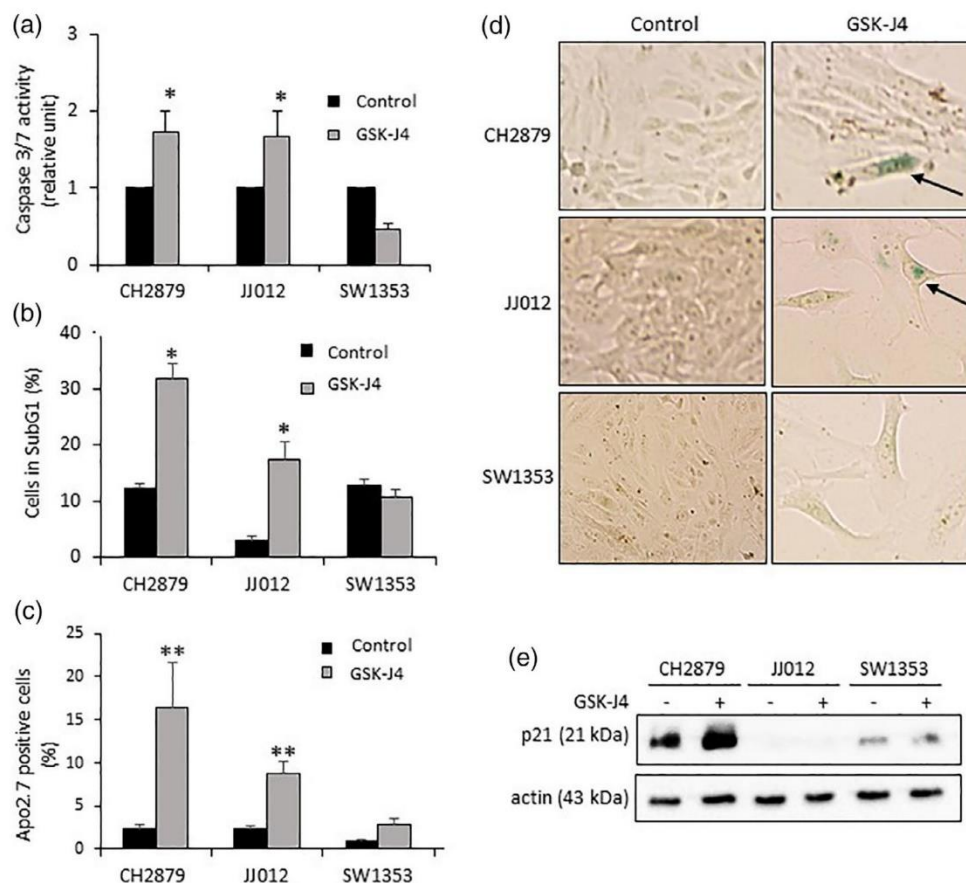


FIGURE 3 GSK-J4 induced cell death in CH2879 and JJ012 cells, but not in SW1353. (a) Chondrosarcomas were treated with 10 μ M GSK-J4 for 2 days. Then, caspase-3 and -7 activities were measured. Histograms represent activity relative to untreated cells. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 5$). (b) Cells were treated with 10 μ M GSK-J4 for 4 days. Then, cells were fixed and cell cycle determined by flow cytometry. Histograms represent fraction of cells in Sub-G1 phase. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). (c) Cells were treated as previously. Then, they were stained with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin and analyzed by flow cytometry ($n = 3$). (d) After treatment, senescent cells were stained with SA- β -gal. Representative pictures are shown. Magnification: $\times 20$ ($n = 3$). (e) p21 expression was evaluated by western blot

GSK-J4 combined to cisplatin decreased cell number more than each drug alone in CS cells (Figure 4a). It reduced their proliferation (Figure 4b) without inducing more apoptosis than cisplatin alone (Figure 5). In chondrocytes, GSK-J4 led no reduction of cell number or apoptosis, even in the presence of cisplatin.

4 | DISCUSSION

CS treatment is challenging because this bone tumor is resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy. In the present study, we show that GSK-J4, alone as well as in association with cisplatin, reduces CS proliferation. In

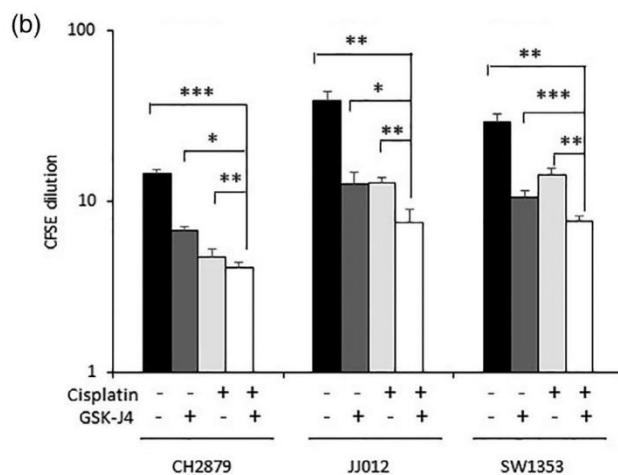
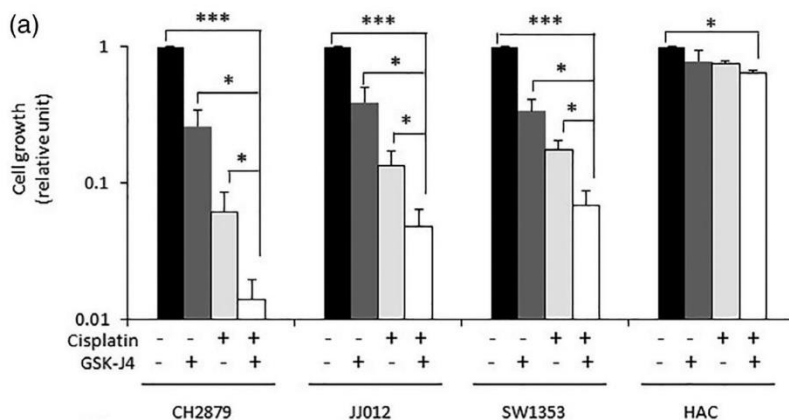


FIGURE 4 Association GSK-J4/cisplatin decreased cell growth and proliferation more than drugs alone in chondrosarcoma cells. Cells were treated with GSK-J4 (10 μM) or/and cisplatin (5 μM) for 3 days. (a) Viable cells were counted. Data normalized to untreated condition are expressed as means ± SEM (*n* = 3). (b) Cells were stained with CFSE, then treated as previously. Dye dilution was analyzed by flow cytometry (*n* = 3)

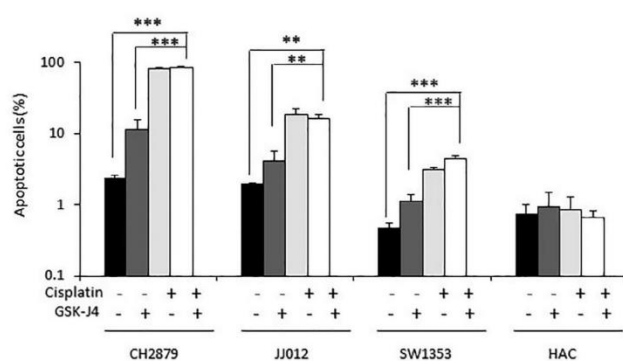


FIGURE 5 GSK-J4 in combination with cisplatin did not increase apoptosis more than cisplatin alone in chondrosarcoma cells. Cells were treated with GSK-J4 (10 μM) or/and cisplatin (5 μM) for 3 days, then stained with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin and analyzed by flow cytometry. APO2.7+ cells were considered as apoptotic (*n* = 3)



addition, this inhibitor of histone demethylases is able to induce cell death in some CS cells.

First, we demonstrated that in chondrosarcomas but not in normal chondrocytes, GSK-J4 decreases cell proliferation. This is in agreement with antiproliferative effect of this inhibitor observed in other tumoral cells, such as pediatric brainstem glioma³, acute lymphoblastic leukemia⁴, and B-cell lymphoma¹⁶. Associated to this reduction of proliferation, we observed an accumulation of cells in S-phase. These effects were consistent with the literature because GSK-J4 has been previously showed to reduce proliferation and induce accumulation of cells in S-phase in differentiating embryoid body²². Additionally, other treatments such as taurine, epigallocatechin gallate, or genistein has been reported to inhibit proliferation while increasing the percentage of cells in S-phase²³.

Whereas the drug-induced death by apoptosis and more moderately the senescence in some CSs (JJ012 and CH2879), it could not induce apoptosis in SW1353, even in the presence of cisplatin. This was surprising because GSK-J4 was previously described to be able to induce death in chemo-resistant tumoral cells, and to sensitize cells to standard chemotherapy agents in vitro and in vivo^{16,24}.

Interestingly, we could observe a correlation between the response to cisplatin and GSK-J4. Indeed, no apoptosis could be detected after treatment with both drugs in SW1353, whereas cell death was observed in JJ012 and CH2879 cells after GSK-J4 as well as cisplatin treatment. In addition, we did not observe more apoptosis in cells treated with the combination of GSK-J4 and cisplatin than with cisplatin alone. Together, these observations suggest that death mechanisms induced by cisplatin and GSK-J4 might be similar in CSs.

GSK-J4 was initially described as a specific JMJD3 and UTX inhibitor¹⁷. However, the antitumoral effect of this drug is likely due to its ability to inhibit JMJD3 (but not UTX) activity. Indeed, in acute lymphoblastic leukemia, only JMJD3 knockdown leads to a reduction of tumoral cell viability, while UTX silencing enhances cell proliferation, showing that both proteins with similar enzymatic function can play opposing roles in the context of the same disease⁴. Also, UTX has been described as a tumor suppressor in several solid tumors^{25–29}. In addition, a recent study of GSK-J4 activity indicated that histone demethylase KDM5B (JARID1B), which removes H3K4me3 marks is also a target of GSK-J4, although with a lower affinity³⁰.

GSK-J4 inhibits histone demethylases through interaction with α -ketoglutarate (α -KG) binding at active site of these histone demethylases¹⁷. Consequently, IDH1 or IDH2 mutants, which have been found in more than half of CS samples³¹, might affect GSK-J4 sensibility in CS. Indeed, IDH1/2 mutants robustly modulate the status of α -KG by

catalyzing α -KG to D-2 hydroxyglutarate (D-2HG), an antagonist of α -KG³². Thus, increased levels of D-2HG have been found in cartilage tumors with an IDH mutation³³, and are able to competitively inhibit α -KG dependent histone demethylases³², affecting trimethylation of the H3K27 as well as H3K4^{34–36}. However, no difference in levels of H3K27 and H3K4 trimethylation was observed between IDH mutant and IDH wildtype CSs³¹. Additionally, previous studies and sequencing performed in the lab showed that CH2879 harbors IDH1/2 wild-type, JJ012 IDH1-mutant (p.Arg132Gly), and SW1353 IDH2-mutant (p.Arg172Ser), while the current study show effective induction of apoptosis in CH2879 and JJ012 by GSK-J4, but not in SW1353. These results demonstrated that IDH1/2 or α -KG status did not affect the effectiveness of GSK-J4, indicating that there should be another mechanism (not interaction with α -KG) in inhibition of cell proliferation by the drug. Consequently, the molecular mechanism of GSK-J4 responsible for the reduction of CS survival need further analysis, and its understanding may allow the development of new drugs with higher efficiency.

In conclusion, this study shows that GSK-J4 reduce cell proliferation in CSs and is able to induce death in some of them in vitro, suggesting that this pharmacological drug may be an efficient treatment to reduce progression of CSs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joel Block (Rush University Medical Center, Chicago, USA) and Antonio Llobart-Bosh (Universitat de València, Valencia, Spain) for gracious CS gift. We also thank Marion Berthelot (BioConnecT, Unicaen, Caen, France) and Marilyne Guillamin (SFR 146 ICORE, Unicaen, Caen) for technical assistance for in vitro experiments and flow cytometry, respectively.

Juliette Aury-Landas was recipient of a fellowship from Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0002-01), Région Normandie, and European Union (FEDER/FSE 2014-2020 – 16E00779/16P03685). Eva Lhuissier and Lyess Allas were recipient of Ph.D. stipends from Ministère de la Recherche/Université de Caen.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Catherine Baugé  <https://orcid.org/0000-0001-5642-998X>

REFERENCES

- Rosenberg AE, Nielsen GP, Keel SB, et al. Chondrosarcoma of the base of the skull: A clinicopathologic study of 200 cases with emphasis on its distinction from chordoma. *Am J Surg Pathol*. 1999;23:1370–1378.
- Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90:364–370.
- Hashizume R, Andor N, Ihara Y, et al. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med*. 2014;20:1394–1396.
- Ntziachristos P, Tsirogos A, Welstead G, et al. Contrasting roles for histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukemia. *Nature*. 2014;514:513–517.
- Hübner MR, Spector DL. Role of H3K27 demethylases Jmjd3 and UTX in transcriptional regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2010;75:43–49.
- Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:297–311.
- Torres CM, Laugesen A, Helin K. Utx is required for proper induction of ectoderm and mesoderm during differentiation of embryonic stem cells. *PLOS One*. 2013;8:e60020.
- Wang C, Lee J-E, Cho Y-W, et al. UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:15324–15329.
- Mansour AA, Gafni O, Weinberger L, et al. The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic programming. *Nature*. 2012;488:409–413.
- Santa FD, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 Lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. 2007;130:1083–1094.
- Agger K, Cloos PAC, Rudkjær L, et al. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A–ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev*. 2009;23:1171–1176.
- Barradas M, Anderton E, Acosta JC, et al. Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev*. 2009;23:1177–1182.
- Sen GL, Webster DE, Barragan DI, Chang HY, Khavari PA. Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. *Genes Dev*. 2008;22:1865–1870.
- Jepsen K, Solum D, Zhou T, et al. SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. *Nature*. 2007;450:415–419.
- Zhao W, Li Q, Ayers S, et al. Jmjd3 negatively regulates reprogramming through histone Demethylase activity- dependent and -independent pathways. *Cell*. 2013;152:1037–1050.
- Mathur R, Sehgal L, Havranek O, et al. Inhibition of demethylase KDM6B sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to chemotherapeutic drugs. *Haematologica*. 2017;102:373–380.
- Kruidenier L, Chung C, Cheng Z, et al. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature*. 2012;488:404–408.
- Jagasia AA, Block JA, Diaz MO, et al. Partial deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in a myxoid chondrosarcoma. *Cancer Lett*. 1996;105:77–90.
- Scully SP, Berend KR, Toth A, Qi WN, Qi Z, Block JA. Marshall Urist award. Interstitial collagenase gene expression correlates with in vitro invasion in human chondrosarcoma. *Clin. Orthop*. 2000;376:291–303.
- Gil-Benso R, Lopez-Gines C, López-Guerrero JA, et al. Establishment and characterization of a continuous human chondrosarcoma cell line, ch-2879: Comparative histologic and genetic studies with its tumor of origin. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2003;83:877–887.
- Duval E, Bigot N, Hervieu M, et al. Asporin expression is highly regulated in human chondrocytes. *Mol Med*. 2011;17:816–823.
- Mandal C, Kim SH, Kang SC, et al. GSK-J4-mediated transcriptomic alterations in differentiating embryoid bodies. *Mol Cells*. 2017;40:737–751.
- Luo Y, Huo Y, Song P, Zhang X, Liao M. Validation and functional analysis of the critical proteins in combination with taurine, epigallocatechin gallate and genistein against liver fibrosis in rats. *Biomed Pharmacother*. 2019;115:108975.
- Dalvi MP, Wang L, Zhong R, et al. Taxane-Platin-resistant lung cancers co-develop hypersensitivity to JumonjiC Demethylase inhibitors. *Cell Rep*. 2017;19:1669–1684.
- Thieme S, Gyárfás T, Richter C, et al. The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. *Blood*. 2013;121:2462–2473.
- Mar B, Bullinger L, Basu E, et al. Sequencing histone modifying enzymes identifies UTX mutations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26:1881–1883.
- Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*. 2011;118:3932–3941.
- Wang JK, Tsai M-C, Poulin G, et al. The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control. *Genes Dev*. 2010;24:327–332.
- van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase, UTX, in human cancer. *Nat Genet*. 2009;41:521–523.
- Heinemann B, Nielsen JM, Hudlebusch HR, et al. Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. *Nature*. 2014;514:E1–E2.
- Cleven AHG, Suijker J, Agrogiannis G, et al. IDH1 or –2 mutations do not predict outcome and do not cause loss of 5-hydroxymethylcytosine or altered histone modifications in central chondrosarcomas. *Clin Sarcoma Res*. 2017;7:8. <https://doi.org/10.1186/s13569-017-0074-6>.
- Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19:17–30.
- Amary MF, Damato S, Halai D, et al. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat Genet*. 2011;43:1262–1265.
- Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, et al. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*. 2012;488:656–659.
- Koch CM, Andrews RM, Flicek P, et al. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res*. 2007;17:691–707.



36. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129:823–837.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Lhuissier E, Aury-Landas J, Allas L, Boittin M, Boumediene K, Baugé C. Antiproliferative effect of the histone demethylase inhibitor GSK-J4 in chondrosarcomas. *IUBMB Life*. 2019;1–9. <https://doi.org/10.1002/iub.2110>

Méthylation de H3K27 : régulation et rôle dans le cartilage articulaire

L'arthrose est la maladie rhumatologique la plus répandue et une des causes majeures de douleur et de handicap. Au cours de ce travail nous avons étudié le rôle et la régulation de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) dans l'arthrose et la chondrogenèse.

Dans une première partie, nous avons montré que l'inhibition de la méthylase EZH2 par l'EPZ-6438 atténue l'inflammation et la libération de métalloprotéases par les chondrocytes traités à l'IL-1 β . L'inhibition d'EZH2 réduit également l'hypertrophie des chondrocytes induite par le TGF- β 1. L'EPZ-6438 atténue aussi la dégradation du cartilage *in vivo* dans un modèle d'arthrose murin. De plus, l'inhibition d'EZH2 diminue le handicap locomoteur chez la souris et réduit l'expression du NGF dans les chondrocytes.

Dans une deuxième partie, nous avons mis en évidence que les déméthylases JMJD3 et UTX favorisent la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses. D'autre part, la surexpression de JMJD3 et UTX favorise la formation de cartilage et la production de collagène de type II des cellules souches mésenchymateuses après différenciation et implantation *in vivo*.

Notre étude a montré l'importance de la marque H3K27me3 dans le cartilage. Alors qu'EZH2 est impliquée dans l'inflammation, l'hypertrophie des chondrocytes et la destruction du cartilage, JMJD3 et UTX favorisent la chondrogenèse, la formation du cartilage et la production de collagène.

Mots clés : Arthrose, chondrogenèse, épigénétique, H3K27me3, cartilage

H3K27 methylation: regulation and role in articular cartilage

Osteoarthritis is the most widespread rheumatological disease and one of the main causes of pain and disability. This work aimed to study the role and regulation of the lysine 27 histone H3 tri-methylation (H3K27me3) during osteoarthritis and chondrogenesis.

In the first part of the study, we showed that EZH2 inhibition by EPZ-6438 attenuates inflammation and metalloproteases release induced by IL-1 β . EZH2 inhibition also reduces TGF- β 1-mediated chondrocytes hypertrophy. EPZ-6438 attenuates *in vivo* cartilage degradation in osteoarthritis mice model. Furthermore, EZH2 inhibition ameliorates locomotor disability in mice and reduces NGF expression in chondrocytes.

In the second part of the study, we highlighted that JMJD3 and UTX enhance mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. In addition, JMJD3 and UTX overexpression promotes cartilage formation and type II collagen production of mesenchymal stem cells after *in vivo* implantation.

Our study demonstrated the importance of H3K27me3 in cartilage. While EZH2 is involved in inflammation, chondrocyte hypertrophy and cartilage degradation, JMJD3 and UTX enhance chondrogenesis, cartilage formation, and collagen production.

Key words: Osteoarthritis, chondrogenesis, epigenetic, H3K27me3, cartilage