



HAL
open science

Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition génomique et transcriptionnelle du TNF-[alpha] par une approche de type oligonucléotidique

Joseph Paquet

► **To cite this version:**

Joseph Paquet. Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition génomique et transcriptionnelle du TNF-[alpha] par une approche de type oligonucléotidique. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10067 . tel-01746334

HAL Id: tel-01746334

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746334>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE « Biologie Santé Environnement »

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Joseph PAQUET**

Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition génomique et transcriptionnelle du TNF alpha par une approche de type oligonucléotidique

Soutenue le 15 Novembre 2010 devant le jury composé de :

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme SCHMID-ANTOMARCHI Heidy

DR CNRS, U638, Nice

Mr PETITE Hervé

DR INSERM, UMR 7052, Paris

Examineurs :

Mr MAQUART François-Xavier

PU-PH, UMR 6237, Reims

Mr POUREL Jacques

PU-PH, CHU Nancy, directeur de thèse

Mr LOEUILLE Damien
directeur de thèse

PU-PH, CHU Nancy-UMR 7561, Nancy, co-

Mr GROSSIN Laurent

CR1 CNRS, UMR 7561, Nancy, co-encadrant

Membres invités :

Mme CHARY-VALCKENAERE Isabelle

PU-PH, CHU Nancy, UMR 7561, Nancy

Mr GILLET Pierre

PU-PH, UMR 7561, Nancy

Ecole Doctorale BioSE « Biologie Santé Environnement »

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Joseph PAQUET**

Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition génomique et transcriptionnelle du TNF alpha par une approche de type oligonucléotidique

Soutenue le 15 Novembre 2010 devant le jury composé de :

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme SCHMID-ANTOMARCHI Heidy

DR CNRS, U638, Nice

Mr PETITE Hervé

DR INSERM, UMR 7052, Paris

Examineurs :

Mr MAQUART François-Xavier

PU-PH, UMR 6237, Reims

Mr POUREL Jacques

PU-PH, CHU Nancy, directeur de thèse

Mr LOEUILLE Damien
directeur de thèse

PU-PH, CHU Nancy-UMR 7561, Nancy, co-

Mr GROSSIN Laurent

CR1 CNRS, UMR 7561, Nancy, co-encadrant

Membres invités :

Mme CHARY-VALCKENAERE Isabelle

PU-PH, CHU Nancy, UMR 7561, Nancy

Mr GILLET Pierre

PU-PH, UMR 7561, Nancy

REMERCIEMENTS

Remerciements

Je tiens à remercier Messieurs les Professeurs Patrick NETTER et Jacques MAGDALOU, qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans l'UMR 7561. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je tiens ensuite à remercier Monsieur le Docteur Laurent GROSSIN, pour la confiance qu'il m'a témoignée, le soutien qu'il m'a apporté, pour son encadrement et sa rigueur, ses nombreux conseils scientifiques, sa disponibilité et sa gentillesse. Je lui exprime ma profonde gratitude et mon profond respect.

Je remercie également Monsieur le Professeur Pierre GILLET, pour son aide et ses conseils scientifiques, son soutien, sa disponibilité, la confiance qu'il m'a témoignée et son encadrement tout au long de cette thèse. Je lui adresse mes vifs remerciements et mon profond respect.

Je remercie Messieurs les Professeurs Jacques POUREL et Damien LOEUILLE ainsi que Madame le Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE pour leur aide, leur encadrement, leur sympathie et le temps qu'ils m'ont consacré. Je leur en suis profondément reconnaissant.

Je remercie Madame le Docteur Heidy SCHMID-ANTOMARCHI et Monsieur le Docteur Hervé PETITE de l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant d'être rapporteurs de ce travail. Je leur suis reconnaissant de m'accorder une partie de leur temps pour évaluer ce travail.

Je suis également très honoré que Monsieur le Professeur François-Xavier MAQUART ait accepté d'être examinateur de cette thèse. Je l'en remercie tout particulièrement.

Je remercie Madame le Professeur Eliane TAILLANDIER et son équipe (Université Paris XIII) qui ont mis au point le TFO « anti-TNF ». Les données préliminaires de faisabilité de ce travail ont été obtenues par Monsieur Amr ABID.

Ce travail a bénéficié de financements du CHU de Nancy (CPRC 2007 UF 9661), du laboratoire AMGEN[®], et de l'ANR (ANR-07-BLAN-0302-02).

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU pour son aide et son sens critique qui m'ont beaucoup apportés lorsque nous avons eu à travailler ensemble. Je lui témoigne mon profond respect et ma reconnaissance.

Je remercie Mesdames les Docteur Christel HENRIONNET et Astrid PINZANO pour leur soutien scientifique et amical, leur gentillesse, leur bonne humeur et leur disponibilité.

Je remercie Monsieur Michel THIERY pour les soins prodigués aux animaux, pour son soutien et sa bonne humeur quotidienne.

Merci à Thomas LELU, Alice BRION et YuanYuan pour leur participation active à ce travail.

Je remercie David MOULIN, Jean-Baptiste VINCOURT, Frédéric CAILLOTTO et Hervé ZILLE pour leur contribution à ce travail, leur soutien et surtout leur amitié.

« Merci ! » à toutes les personnes du laboratoire qui m'ont apporté leur soutien scientifique et/ou humain, pour la transmission de leur savoir, leur disponibilité, leur gentillesse et/ou leur compréhension.

Remerciements

Remerciements

*A mes parents,
Thierry et Maria*

*A mes grands parents,
Gérard, Suzanne, Pierre et Chantal*

*A mes frères et sœur,
Lucas, Loïc et Mathilde*

Pour votre amour, votre patience et votre soutien permanent.

A toute ma famille

A tous mes amis

Je dédie ce travail de thèse

PUBLICATIONS DE JOSEPH PAQUET

Paquet J, Maskali F, Poussier S, Pinzano A, Grossin L, Olivier P, Gillet P.

*Evaluation of a rat mono-arthritis model by micro positron emission tomography (PET).
Bio-medical materials and engineering. 2010 sous presse.*

Zille H, Paquet J, Henrionnet C, Scala-Bertola J, Leonard M, Six JL, Deschamp F, Netter P, Vergès J, Gillet P, Grossin L.

*Evaluation of intraarticular delivery of Hyaluronic Acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rats.
Bio-medical materials and engineering. 2010 sous presse.*

Paquet J, Henrionnet C, Pinzano A, Vincourt JB, Gillet P, Netter P, Chary-Valckenaere I, Loeuille D, Grossin L.

TNF- α gene targeting via triple-helix formation: could an anti-gene strategy be an alternative to anti TNF antibodies for arthritis?
PlosOne. Soumis.

COMMUNICATIONS

→ *Cytokines profiling by multiplex analysis in experimental arthritis:
Which pathophysiological relevance for articular versus systemic mediators?*

PAQUET J, GOEBEL JC, PINZANO A, GROSSIN L, COURNIL-HENRIONNET C, GILLET P, NETTER P, JOUZEAU JY, MOULIN D.

The European League against Rheumatism (EULAR), 2009, Copenhagen, Norway.

→ *Anti-inflammatory potentialities of TNF alpha inhibition by TFO in arthritis Models*
PAQUET J, GROSSIN L, COURNIL-HENRIONNET C, GILLET P, NETTER P, LOEUILLE D, POUREL J.

Pôle Lorrain d'ingénierie du Cartilage, (2009, 2010), Nancy, France.

→ *Evaluation of a rat mono-arthritis model by micro positron emission tomography (PET).
Biomaterial and Medical Engineering.*

Paquet J, Maskali F, Poussier S, Pinzano A, Grossin L, Olivier P, Gillet P.
Pôle Lorrain d'ingénierie du Cartilage, (2010), Nancy, France.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ATF	Activating Transcription Factor
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AS	Anti Sens
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
BEt	Bromure d'Ethidium
BMP	« Bone Morphogenetic Protein »
BSA	Albumine Sérique Bovine
BT	Bleu de Toluidine
COMP	Cartilage Oligo Matrix Protein
COX	Cyclo-Oxygénase
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CS	Sulfate de Chondroïtine
DMF	DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DNase	DésoxyriboNucléase
dNTP	désoxyNucléotides TriPhosphates
DS	Sulfate de Dermatanne
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
ERK	Extra-cellular Receptor Kinase
FADD	FAS-Associated via Death Domain
FAK	Focal Adhesion Kinase
FLS	Fibroblast Like Synoviocyte
GAG	GlycosAminoGlycanes
GAPDH	GlycerAldéhyde-3-Phosphate DéHydrogénase
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GM-CSF	Granocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPI	Glucose 6 Phosphate Isomérase
GRP	« Glucose Regulated Protein »
HA	Acide Hyaluronique
HES	Hématoxyline Eosine Safran
HLA	Human Leukocyte Antigen
HS	Sulfate d'Héparanne
HSP	Heat Shot Protein
IFN γ	Interféron Gamma

IL	InterLeukine
iNos	« inductible Nitric Oxyde Synthase »
JNK	Jun N-terminal Kinase
KS	Sulfate de Kéراتanne
LDH	Lactate DésHydrogénase
LPL	LipoProtéine Lipase
LPS	LipoPolySaccharide
LT	Lymphotoxine
<i>M.tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MMP	Métallo Protéase Matricielle
MTT	3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphényltétrazolium
NIK	NFκB Inducing Kinase
NO	« Nitric Oxyde »
ODN	OligoDeoxyNucleotide
PBS	Solution saline de phosphate
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PEI	PolyEthylénImine
PGE ₂	ProstaGlandine E2
PPAR	Récepteur Activateur de Proliférateur de Péroxysome
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
RANK	Receptor Activator of NFκB
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RS	Rouge Sirius
RT	Transcription inverse
siRNA	Small Interfering RNA
SDS	Sodium DodécylSulfate
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBE	Tris-Borate-EDTA
TFO	Triplex Forming Oligonucleotide
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TIMP Metalloprotease)	Inhibiteur Tissulaire des MétalloProtéases (Tissue Inhibitor
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain
TTP	TrisTétraProline
VEGF	Vascular Endothelial cell Growth Factor

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'articulation du genou, coupe sagittale.....	27
Figure 2 : Vue frontale des différents composants de l'articulation du genou.....	28
Figure 3 : Aspect histologique du cartilage hyalin.....	29
Figure 4 : Aspect histologique du fibrocartilage.....	30
Figure 5 : Aspect histologique du cartilage élastique.....	31
Figure 6 : Les différentes zones du cartilage articulaire.....	32
Figure 7 : Régulation de la différenciation des chondrocytes.....	34
Figure 8 : Principaux composants de la matrice cartilagineuse extracellulaire.....	36
Figure 9 : Hétérofibrille des collagènes II, IX et XI.....	38
Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation dans les fibrilles du cartilage.....	38
Figure 11 : Représentation schématique de la structure des protéoglycannes présent dans la matrice extracellulaire du cartilage articulaire et des enzymes impliqués dans leur biosynthèse.....	39
Figure 12 : Représentation schématique des principaux acteurs impliqués dans l'homéostasie articulaire et de leurs interactions potentielles.....	42
Figure 13 : Acteurs et mécanismes impliqués dans les pathologies articulaires.....	43
Figure 14 : Représentation schématique des affections et des mécanismes impliqués dans l'établissement de l'arthrose.....	50
Figure 15 : Représentation schématique des principaux symptômes de la polyarthrite rhumatoïde au niveau de l'articulaire.....	51
Figure 16 : Représentation schématique des domaines structuraux des métalloprotéinases.....	58
Figure 17 : Représentation schématique des effets des cytokines sur le cartilage.....	60
Figure 18 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression des MMPs.....	63
Figure 19 : Représentation schématique des acteurs cellulaires et médiateurs inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de la PR.....	66
Figure 20 : Phases de la pathogénie de la PR.....	67
Figure 21 : Schéma récapitulatif. En bleu : voies de signalisations activées par la protéine I/II et menant aux cytokines pro-inflammatoires.....	68
Figure 22 : Métabolisme cellulaire du fluorodéoxyglucose (FDG). N'étant pas métabolisable, le FDG-6phosphate s'accumule dans les cellules.....	71

Liste des illustrations

Figure 23 : Exemple d'image obtenue par TEP sur un rat arthritique ; vues sagittale, longitudinale et latérale ou l'on remarque une accumulation marquée de ¹⁸ F-FDG dans le genou arthritique.	72
Figure 24 : structure cristalline du TNF alpha sous sa forme native homotrimérique.	74
Figure 25 : Représentation schématique de la voie de sécrétion du TNF- α . Passage du TNF- α du réticulum endoplasmique à la surface membranaire.	75
Figure 26 : Représentation schématique des différentes étapes menant à la biosynthèse et au relargage du TNF alpha par les monocytes suite à une activation par le LPS.	76
Figure 27 : Complexe de reconnaissance du LPS et protéines adaptatrices impliquées dans la voie de signalisation des TLRs.	77
Figure 28 : Représentation schématique des 2 voies d'activation de NF-kB.	78
Figure 29 : Voie des MPAKs, facteurs d'activation et réponses cellulaires inductibles.	79
Figure 30 : Régulation du facteur de transcription AP-1 par la voie des MAP kinases.	79
Figure 31 : Schéma illustrant l'ambivalence du TNF- α suivant les voies de signalisation intracellulaires activées.	80
Figure 32 : Représentation de la structure des deux types de récepteurs au TNF alpha. Les récepteurs de type I et II ont un poids moléculaire de 55 et 75kDa respectivement.	81
Figure 33 : Représentation schématique de la forme trimérique du récepteur au TNF alpha.	82
Figure 34 : Représentation schématique des interactions entre le TNF alpha et ses récepteurs.	82
Figure 35 : Principales voies de signalisation modulées par les récepteurs au TNF- α	83
Figure 36 : Activités biologiques du TNF alpha impliquées dans la polyarthrite rhumatoïde.	85
Figure 37 : Représentation schématique du cluster du gène du TNF alpha humain.	86
Figure 38 : Exemple de régulation post transcriptionnelle du TNF alpha via les ARE.	87
Figure 39 : Diversité des séquences ARE et des AUBP avec lesquelles elles interagissent.	89
Figure 40 : Localisation des ARNm dans divers granules cytoplasmiques.	91
Figure 41 : Modèle de la cinétique d'action de l'ARE du TNF en réponse à l'activation de la voie MAP-kinase p38.	93
Figure 42 : représentation schématique de la synthèse et de l'activité des miRNA.	96
Figure 43 : Prise en charge thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde.	98
Figure 44 : Cytokines ciblées dans la polyarthrite rhumatoïde.	99
Figure 45 : Représentation schématique des 3 anti-TNF- α	101
Figure 46: Principe de l'ARN interférence.	104
Figure 47 : Complexes protéiques mis en place pour la dégradation des ARNm par les siRNA et les miRNA.	105
Figure 48 : Représentation schématique de la localisation d'un oligonucléotide TFO dans la double hélice d'ADN.	107
Figure 49 : Représentation schématique des liaisons de type Hoogsteen impliquées dans la formation de triples hélice.	107

Liste des illustrations

Figure 50 : Représentation schématique d'exemples d'utilisation de TFO pour moduler l'expression génique.	108
Figure 51 : Représentation des différentes modifications chimiques envisageables sur les TFO.	109
Figure 52 : Mécanisme de transfert de gènes dans les cellules eucaryotes par le système jetPEI™ ..	121
Figure 53 : A gauche : Chélation des résidus guluronates de l'alginate par le calcium, à droite : représentation schématique du model « boîte à œufs ».	127
Figure 54 : Représentation du vecteur d'expression pGL3-basic utilisé pour le clonage du promoteur du TNF- α	132
Figure 55 : Représentation du vecteur d'expression cDNA3.1+ utilisé pour le clonage des différentes régions codant pour l'ARNm du TNF- α	133
Figure 56 : PCRq par incorporation de SYBR Green.	140
Figure 57 : Vérification de la spécificité de l'amplification par PCRq par la détermination du Tm du produit de PCR amplifié du TNF alpha.	142
Figure 58 : Gamme étalon obtenue par dilutions successives (ng/ml) du produit de PCR amplifié du TNF alpha, après purification de celui-ci.	143
Figure 59 : Viabilité cellulaire (déterminée par test LDH) de chondrocytes en P1 transfectés par l'oligonucléotide TFO.	149
Figure 60 : Viabilité cellulaire de synoviocytes en P3 transfectés par l'oligonucléotide siRNA à des concentrations de 1, 10 et 100 nM.	150
Figure 61 : Cinétique d'expression des médiateurs inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNos et cox2 par des synoviocytes de rat en P3 suite à une stimulation par de l'interleukine-1 β 10ng/mL.	151
Figure 62 : Cinétique d'expression des médiateurs inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNos et cox2 par des synoviocytes de rat en P3 suite à une stimulation par du LPS 10ng/mL.	152
Figure 63 : Représentation schématique de la démarche expérimentale suivie pour évaluer l'efficacité de l'inhibition de l'expression génique par les oligonucléotides TFO et siRNA.	153
Figure 64 : Efficacité comparée des oligonucléotides TFO non renforcé (Nu) et renforcé phosphorothioate (8Ph) sur l'inhibition de l'expression du TNF- α en ARNm dans des cultures de synoviocytes en P3.	154
Figure 65 : Dose réponse de l'inhibition de l'expression en TNF- α en fonction de la concentration en TFO 8Ph dans des synoviocytes en P3 de rat.	155
Figure 66 : Dose réponse de l'inhibition de l'expression en TNF- α en fonction de la concentration en TFO 8Ph dans des chondrocytes en P1 de rat.	156
Figure 67 : Dose réponse de l'inhibition de l'expression en TNF- α en fonction de la concentration en siRNA dans des synoviocytes en P3 (A) et des chondrocytes en P1 (B) de rat.	157
Figure 68 : Dose réponse comparée de l'efficacité du TFO et du siRNA sur l'inhibition de l'expression du TNF- α dans des synoviocytes en P3 de rat.	158
Figure 69 : Vérification de l'indépendance des effets observés vis-à-vis du stimulus inflammatoire. Des synoviocytes en P3 sont transfectés soit par le TFO soit par le siRNA anti-TNF- α puis sont soumis à une stimulation de 4 heures par l'IL-1 β ou le LPS 10 ng/mL.	158

Liste des illustrations

Figure 70 : Inhibition de la synthèse de TNF alpha par les oligonucléotides anti-TNF- α TFO et siRNA dans des chondrocytes en P1 stimulés par du LPS.....	159
Figure 71 : Dosage de NO et de TNF- α dans le milieu extracellulaire de cultures synoviocytes en P3 après 24 heures de stimulation par de l'IL-1 β ou du LPS 10 ng/mL.....	160
Figure 72 : Test MTT sur des synoviocytes en P3 ayant été électroporés (cell + pulse) ou non (cell). Ce test effectué 24, 48 et 72 heures après l'électroporation des cellules.....	161
Figure 73 : Photographie de synoviocytes en P3 transfectés par de la GFP grâce à la technique d'électroporation (Grossissement x40).....	162
Figure 74 : Effet de l'oligonucléotide TFO anti-TNF- α sur l'expression du TNF alpha dans des synoviocytes P3 humains stimulés 4 heures par de l'il-1 β 10 ng/mL.	163
Figure 75 : effet de l'oligonucléotide TFO anti-TNF- α sur la sécrétion de médiateurs inflammatoires (TNF alpha et NO) par des synoviocytes en P3 humains après 24 heures de stimulation par de l'IL-1 β 10 ng/mL.	164
Figure 76 : Inhibition de l'expression en ARNm (TNF- α et IL-1 β après 4 heures de stimulation IL-1 β 10ng/mL) et en médiateurs sécrétés (TNF- α et NO après 24 heures de stimulation IL-1 β 10ng/mL) sur des synoviocytes en P3 humains transfectés préventivement par un siRNA anti-TNF- α aux concentrations de 75 et 100nM.	165
Figure 77 : Mesure de l'expression en ARNm des médiateurs inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNos et Cox2 dans des synoviocytes de rat en conditions inflammatoires (stimulation IL-1 β 10 ng/mL pendant 4 heures).....	167
Figure 78 : Numérisation sous éclairage UV par coloration au BEt de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits d'amplification -1146/+18 (gauche) et -1700/+18 (droite) du promoteur du gène du TNF alpha.....	169
Figure 79 : Numérisation sous éclairage UV par coloration au BEt de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits de digestion (par XhoI et MluI) de 5 μ g de minipréparation de 3 colonies -1146/+18 testées (plus le vecteur pGL3-basic vide).....	170
Figure 80 : Evolution de l'activité luciférase de synoviocytes en P3 transfectés par les vecteurs d'expression pGL3-basic ; pGL3-basic/-1146+18 ; pGL3-basic/ -1700+18 et pIL6 suite à une stimulation par de l'IL-1 β 10ng/mL.	171
Figure 81 : Evaluation de l'effet du TFO anti-TNF- α sur l'activité du promoteur de l'IL-6.	172
Figure 82 : Evolution de la stabilité des ARNm du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6 et d' iNos en présence de TFO anti-TNF- α suite à une stimulation par l'IL-1 β 10 ng/mL dans des synoviocytes de rat en 3 ^{eme} passage..	173
Figure 83 : Numérisation sous éclairage UV par coloration au BEt de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits d'amplification CDS (gauche) et 5'UTR-CDS (droite) de la partie codante du gène du TNF alpha.....	174
Figure 84 : Visualisation par une coloration au BET, sous éclairage UV, de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits d'amplification obtenus par PCR intra bacterienne sur les colonies CDS (haut gauche), 5'UTR-CDS (haut droite), 5'UTR-CDS-3'UTR (bas gauche) et CDS-3'UTR (bas droite).	175
Figure 85 : Test de fonctionnalité des différentes constructions par mesure de la surexpression en ARNm du TNF alpha.	176

Liste des illustrations

Figure 86 : Influence de la surexpression des différentes régions de l'ARNm du TNF- α sur l'expression de l'IL-1 β (A) et de l'IL-6 dans des synoviocytes en P3 de rat transfectés par le TFO à la concentration de 1 nM.	177
Figure 87 : Clichés relatant la biodistribution d'un oligonucléotide TFO Cy3' obtenus par microscopie confocale.	185
Figure 88 : Evolution de la taille de l'œdème suite à l'induction d'une mono-arthrite articulaire aiguë par injection de 600 μ g de parois de mycobactéries chez le rat..	187
Figure 89 : Pourcentage de répartition du poids des rats arthritiques sur leurs pattes postérieures. ...	187
Figure 90 : Evolution de la prise de poids par des rats atteints d'une mono-arthrite articulaire par injection de 600 μ g de parois de mycobactéries ayant reçu ou non une injection préventive de 10 μ g de TFO ou de siRNA.....	188
Figure 91 : Expression relative (par rapport à RP29) du TNF- α dans les membranes synoviales de rats arthritiques traités par une injection préventive de 10 μ g de TFO ou de siRNA.	189
Figure 92 : Expression relative (par rapport à RP29) de l'IL-1 β , d'iNos, de vEGF et de MMP13 dans les membranes synoviales de rats arthritiques traités par une injection préventive de 10 μ g de TFO ou de siRNA (24 heures après l'induction de l'arthrite).	189
Figure 93 : Concentrations en TNF alpha et en NO dans le liquide synovial de rats arthritiques.....	190
Figure 94 : Images des structures articulaires (genoux en coupe frontale et membranes synoviales) après coloration HES, et Safranine-O.	192
Figure 95 : Evaluation de la perte en biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de rats atteints d'une mono-arthrite articulaire aiguë par injection de parois de mycobactéries et traités ou non préventivement par injection intra-articulaire de 10 μ g de TFO ou de siRNA anti-TNF- α	193
Figure 96 : (a) Biodistribution du ¹⁸ F-FDG après analyse par TEP chez un rat arthritique (24 après l'induction). Les images représentent des coupes axiales, coronaires et sagittales du corps entier. (b) Représentation de l'accumulation du 18F-FDG dans 3 ROI correspondant au foie, au genou sain (injecté par du sérum physiologique) et au genou arthritique.	194
Figure 97 : (a) Biodistribution du ¹⁸ F-FDG après analyse par TEP chez le rat 1, 2, 3 et 7 jours après l'induction de l'arthrite. (b) Evolution de l'accumulation de ¹⁸ F-FDG dans le foie et les genoux sains et arthritiques au cours de l'établissement de l'arthrite. (c) Evolution de la taille de l'œdème du genou arthritique de l'établissement de l'arthrite.....	195
Figure 98 : (a) Macro-autoradiographie de coupes sagittales de genoux de rats arthritiques (48 heures après induction de l'arthrite) ayant préalablement reçu une injection de ¹⁸ F-FDG (coloration rouge) et de ^{99m} Tc-HDP (coloration verte). (b) Colorations histologiques de coupes sagittales de genoux de rats arthritiques 48 heures après l'induction de l'arthrite par injection de parois de mycobactéries.	196
Figure 99 : (a) Biodistribution du ¹⁸ F-FDG après analyse par TEP chez le rat 48 heures après l'induction de l'arthrite, traité ou non préventivement par 10 μ g de TFO anti-TNF- α . (b) Accumulation de ¹⁸ F-FDG dans les genoux sains, arthritiques et traités TFO 48 heures après induction de l'arthrite aux parois de Mtb.	197
Figure 100 : Macro-autoradiographie d'une coupe sagittale de genou de rat arthritique traité TFO (48 heures après induction de l'arthrite) ayant préalablement reçu une injection de ¹⁸ F-FDG (coloration rouge) et de ^{99m} Tc-HDP (coloration verte).	198

Liste des illustrations

Figure 101 : Démarche expérimentale suivie pour l'évaluation de l'efficacité du traitement local préventif par le TFO dans le modèle expérimental d'arthrite chronique à l'antigène (BSA méthylée : mBSA).....	199
Figure 102 : Evolution de la taille de l'œdème observé au niveau du genou de rats atteints d'une arthrite chronique par injection de mBSA et traités ou non préventivement par le TFO anti-TNF- α .	200
Figure 103 : Evolution de la répartition du poids des rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA sur leurs pattes postérieures et traités ou non préventivement par 10 μ g de TFO anti-TNF- α ..	201
Figure 104 : Images des structures articulaires (genoux en coupe sagittale à J7 et membranes synoviales à 24 heures) de rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA et traités ou non par une injection préventive de 10 μ g de TFO.....	203
Figure 105 : Evolution de l'activité locomotrice de rats atteints d'une arthrite par injection intra-articulaire de 600 μ g de parois de mycobactéries.	212
Figure 106 : Evolution de la température corporelle de rats atteints d'une arthrite par injection intra-articulaire de 600 μ g de parois de mycobactéries..	213
Figure 107 : Evolution de la perte en biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de genoux de rats arthritiques ou non.	215
Figure 108 : Evolution de la taille de l'œdème des genoux de rats après induction d'une mono-arthrite articulaire par injection de BSA méthylée sur une période de 14 jours.	219
Figure 109 : Effet de l'induction d'une arthrite à l'antigène sur l'évolution de la répartition du poids des rats sur leurs pattes postérieures.....	220
Figure 110 : Profil d'expression des médiateurs inflammatoires aux niveaux local et systémique pendant 14 jours après l'induction d'une arthrite à la mBSA..	223
Figure 111 : Profil d'expression des chémokines au cours d'une arthrite à la mBSA aux niveaux local et systémique.	224
Figure 112 : Profil d'expression des cytokines pro-inflammatoires au cours d'une arthrite à la mBSA aux niveaux local et systémique.....	225
Figure 113 : Profil d'expression des cytokines immuno-modulatrices au cours d'une arthrite à la mBSA aux niveaux local et systémique..	226
Figure 114 : Profil d'expression des interleukines 9 et 13 au cours de l'établissement d'un modèle de mono-arthrite articulaire à la mBSA. L.....	227
Figure 115 : Cinétique d'évolution de la biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de genoux de rats arthritiques ou non.	228
Figure 116 : Evolution des scores histologiques du tissu cartilagineux (a) et des structures osseuses (b) au niveau des genoux de rat, atteints ou non d'une arthrite à la mBSA, sur une période de 14 jours..	229
Figure 117 : Représentation schématique des corrélations (Spearman) existant entre le profil d'expression des médiateurs et les atteintes histologiques observées au cours de l'établissement d'une mono-arthrite chronique à la BSA méthylée.	232

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Critères d'évaluation du score histologique sur les tissus synoviaux des genoux de rat..	124
Tableau 2 : Critères d'évaluation du score histologique sur les tissus osseux et cartilagineux des genoux de rat.	125
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage du promoteur du TNF alpha et la région codant pour l'ARNm de ce même gène.	134
Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel.	141
Tableau 5 : Evolution de l'expression en ARNm des médiateurs inflammatoires dans des synoviocytes en P3 transfectés par un oligonucléotide anti-TNF- α (TFO ou siRNA) après 4 heures de stimulation par de l'IL-1 β 10 ng/mL.....	168
Tableau 6 : score histologique du tissu synovial issu de genoux de rats atteints d'une mono-arthrite articulaire aiguë et traités ou non préventivement.....	191
Tableau 7 : score histologique des structures osseuses et cartilagineuses issues de genoux de rats atteints d'une mono-arthrite articulaire aiguë traités ou non préventivement par injection intra-articulaire de 10 μ g de TFO ou de siRNA.....	193
Tableau 8 : Evolution de l'expression de 24 médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial de rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA et traités ou non préventivement par une injection intra-articulaire de 10 μ g de TFO anti-TNF- α	202
Tableau 9 : Score histologique des structures osseuses et cartilagineuses ainsi que des tissus synoviaux issus de genoux de rats atteints d'une arthrite chronique et traités ou non préventivement par injection intra-articulaire de 10 μ g de TFO.....	204
Tableau 10 : Taux d'induction des médiateurs TNF- α , IL-1 β , IL-6, vEGF et MMP13 dans les membranes synoviales de rats atteints d'une arthrite par injection de 600 μ g de parois de mycobactéries.....	214
Tableau 11 : Profil d'expression des médiateurs inflammatoires MCP-1, IL-1 β , vEGF, IL-6 et TNF- α dans les membranes synoviales de genoux de rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA.	221
Tableau 12 : Score histologique des membranes synoviales des genoux de rats arthritiques ou non.	230

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	25
I. L'articulation	27
A. Généralités.....	27
B. Le cartilage articulaire.....	28
1. Généralités.....	28
2. Structure et fonction.....	31
3. Les composants du cartilage articulaire.....	33
a. Les chondrocytes.....	33
b. La matrice extracellulaire.....	35
i. Les collagènes :.....	36
i.1. Structure générale.....	36
i.2. Les collagènes du cartilage articulaire.....	37
ii. Les protéoglycannes.....	39
iii. Protéines non collagéniques :.....	41
4. Homéostasie du cartilage articulaire.....	41
C. La membrane synoviale.....	43
1. Structure et ultrastructure.....	43
2. Histologie et histochimie.....	44
a. L'intima.....	44
b. La subintima.....	45
c. La subsynoviale.....	45
3. Physiologie.....	45
a. Rôle dans la trophicité de l'articulation.....	46
b. Barrière de filtration et d'échanges : constitution du liquide synovial.....	47
c. Rôle dans la défense contre les agressions extérieures.....	48
D. L'os sous chondral.....	48
II. Les pathologies articulaires inflammatoires	50
A. Introduction.....	50
B. Présentation de la PR et étiologie.....	52
1. Généralités.....	52
2. Etiologie.....	53
C. Inflammation de la membrane synoviale au cours de la PR (synovite rhumatoïde).....	55
1. Les cellules et les cytokines de la membrane synoviale inflammatoire.....	55
2. Les chondrocytes au cours de la polyarthrite rhumatoïde.....	56
D. Aspects biochimiques de la destruction articulaire au cours de la PR.....	57
1. Classification des métalloprotéinases.....	57
2. Métalloprotéinases et dégradation matricielle du cartilage.....	59
a. Contrôle de la régulation des métalloprotéinases.....	61
b. Contrôle de l'activation du pro-enzyme.....	61
c. Contrôle de l'expression des gènes codant les MMPs.....	61
d. Les inhibiteurs de métalloprotéinases matricielles.....	64
E. Médiateurs de l'inflammation et dégradation cartilagineuse au cours de la PR.....	65
F. Dégradation du cartilage et auto-immunité.....	66

Table des matières

G.	L'imagerie dans le diagnostic des pathologies inflammatoires articulaires.....	69
III.	Le facteur nécrosant de tumeur alpha (TNF-α) et son implication dans les arthropathies..	73
A.	Historique.....	73
B.	Structure et biosynthèse du TNF- α	73
1.	Structure du TNF.....	73
2.	Biosynthèse du TNF alpha	75
C.	Activité biologique et implication du TNF- α dans la PR.....	80
1.	Les récepteurs au TNF.....	81
2.	Le TNF dans la PR.....	84
D.	Expression et régulation du gène du TNF- α	86
1.	Expression du TNF alpha	86
2.	Régulation de l'expression du TNF alpha	87
a.	ARE et AUBP (Binding Protein)	87
b.	Les miRNA	94
i.	Biosynthèse des miRNA.....	95
ii.	Fonction.....	96
IV.	Thérapeutiques actuelles et stratégies d'inhibition génique.....	97
A.	Evolution des thérapeutiques de la PR.....	97
B.	Les biothérapies actuelles : Inhibition de l'expression au niveau protéique	100
C.	Inhibition au niveau traductionnel : l'ARN interférence.....	103
D.	Les triplex forming oligonucleotides (TFO)	106
1.	Découverte.....	106
2.	Définition et principe de fonctionnement des TFO.....	106
3.	Utilisation des TFO	108
	MATERIELS ET METHODES.....	115
I.	Expérimentation animale.....	117
A.	Préparation des animaux.....	117
B.	Modèles expérimentaux.....	117
1.	Modèle expérimental de mono-arthrite à l'interleukine-1 β	117
2.	Modèle expérimental de mono-arthrite articulaire par injection de parois de mycobactéries (281).....	117
3.	Modèle expérimental de mono-arthrite chronique par injection de mBSA.....	118
C.	Evaluation des paramètres cliniques.....	118
1.	Evaluation de la taille de l'œdème.....	118
2.	Suivi du poids des rats.....	118
3.	Incapacité, test de douleur.....	118
4.	Télémétrie.....	119
D.	Sacrifice et dissection.....	119
1.	Récupération des tissus pour une analyse de l'expression en ARNm.....	119
2.	Récupération du liquide synovial.....	119
E.	Oligonucléotide TFO marqué Cy3'	119
F.	Mise au point de la tomographie par émission de positons (TEP)	120
1.	Préparation des animaux.....	120
2.	TEP au ¹⁸ F-FDG.....	120
3.	Macro-autoradiographie, micro-imageur et analyse histologique.....	120
G.	Mode de transfection.....	121
II.	Histologie et microscopie.....	122

Table des matières

A. Préparation des échantillons.....	122
B. Différentes colorations utilisées	122
1. Hématoxyline-Eosine-Safran.	122
2. Rouge Sirius.	122
3. Bleu de toluidine.	123
4. Safranine O- Fast Green.	123
C. Score des structures articulaires.	123
1. De la membrane synoviale.	123
2. Du cartilage articulaire et de l'os sous-jacent.....	125
D. Microscopie confocale.	126
III. Culture cellulaire.....	126
A. Culture de chondrocytes et de synoviocytes de rat	126
1. Primoculture de chondrocytes.	126
2. Culture primaire de synoviocytes.	126
3. Entretien des cellules.....	127
B. Culture en système tridimensionnel.	127
C. Stratégie d'inhibition.....	128
1. Les oligonucléotides de type TFO.....	128
2. siRNA.....	128
D. Transfection transitoire.....	129
1. Cellules articulaires de rat.	129
a. Transfert du siRNA.	129
b. Transfert du TFO et vecteurs d'expression pcDNA3.1+ et pGL3-basic.	129
2. Cellules articulaires humaines.....	129
E. Conditions inflammatoires.	130
1. Exposition à l'IL-1 β	130
2. Exposition au LPS.	130
3. Blocage de la transcription par l'actinomycine D.	130
F. Tests de cytotoxicité.....	130
1. Mesure de l'activité dépendante de la succinate déshydrogénase mitochondriale.....	130
2. Mesure de l'activité dépendante de la lactate déshydrogénase	131
3. Dosage Hoechst de l'ADN.....	131
IV. Biologie moléculaire.....	132
A. Développement de vecteurs d'expression.....	132
1. Vecteurs d'expression.	132
2. Préparation des matrices (ADN g, ADNc).....	133
3. Amplification par PCR.....	133
4. Digestion enzymatique.....	134
5. Ligation / Transformation.....	135
6. Identification des clones recombinants.	135
B. Extraction des ARN totaux.....	136
1. A partir de cellules en monocouche.	136
2. A partir de cultures tridimensionnelles.....	137
3. A partir des prélèvements expérimentaux	137
a. Membranes synoviales	137
b. Cartilage	137
4. Vérification de l'intégrité des ARN totaux extraits.....	137
a. Dosage spectrophotométrique.	137
b. Migration sur gel d'agarose.....	138
C. Transcription inverse.....	138

Table des matières

1. Avec la reverse transcriptase M-MLV.....	138
2. Avec la transcriptase inverse iScript™.....	138
D. PCR quantitative en temps réel : PCRq.....	139
1. Principe.....	139
2. Protocole expérimental.....	140
3. Courbe de fusion.....	142
4. Analyse des résultats.....	142
V. Paramètres biochimiques.....	144
A. Mesure de la biosynthèse des protéoglycannes.....	144
B. Dosage du NO dans les surnageant cellulaires.....	144
C. Dosage ELISA.....	144
D. Dosage multiplex.....	145
IV. Analyse statistique.....	145
RESULTATS ET DISCUSSION.....	147
ETUDE IN VITRO.....	148
I. Mise au point des conditions expérimentales.....	149
A. Vérification de l'innocuité des oligonucléotides sur les cultures de cellules articulaires.....	149
1. Etude de l'effet du TFO sur les synoviocytes et chondrocytes articulaires.....	149
2. Etude de l'effet du siRNA.....	150
B. Mise au point des conditions d'étude de l'expression génique (ARNm et protéines).....	151
1. Cinétique d'induction des médiateurs inflammatoires par une stimulation à l'IL-1 β (10ng/mL).....	151
2. Cinétique d'induction par un traitement au LPS.....	152
C. Démarche expérimentale suivie.....	153
II. Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition de l'expression du TNF-α par une approche de type oligonucléotidique (TFO ou siRNA).....	154
A. Test des différents modes de renforcement de l'oligonucléotide TFO.....	154
B. Evaluation de la concentration optimale pour l'inhibition de l'expression du TNF- α	155
1. Sur les synoviocytes en P3.....	155
2. Effet sur les ChP1.....	156
C. Inhibition de l'expression du TNF- α par un siRNA.....	157
1. Effet du siRNA sur les cellules articulaires.....	157
2. Comparaison siRNA / TFO.....	157
D. Etude du potentiel inhibiteur des oligonucléotides TFO et siRNA sur les médiateurs protéiques.....	159
1. Inhibition de l'expression en TNF alpha.....	159
2. Effet sur la sécrétion de NO.....	160
III. Efficacité de la stratégie TFO sur des cellules articulaires humaines.....	161
A. Mise au point de la technique de transfection des cellules articulaires humaines.....	161
B. Potentiel inhibiteur des oligonucléotides TFO et siRNA sur des synoviocytes et chondrocytes humains.....	162
1. Effet du TFO humain.....	162
a. Inhibition de l'expression en ARNm du TNF alpha.....	162
b. Confirmation des effets au niveau protéique.....	164
2. Efficacité de la stratégie ARN interférence.....	164

IV. Effets collatéraux induits sur les médiateurs de l'inflammation par l'inhibition de l'expression du TNF-α.	167
A. Inhibitions parallèles observées sur les synoviocytes et chondrocytes.	167
B. Clonage du promoteur du TNF alpha.	169
C. Evolution de la stabilité des ARNm régulés négativement suite à l'inhibition du TNF- α	172
1. Mesure de l'expression de TTP (Tristétraproline)	172
2. Evaluation de la stabilité des ARNm.....	173
3. Clonage du mRNA du TNF-alpha et tests de surexpression.	174
a. Clonage des différentes régions de l'ARNm du TNF- α	174
b. Tests de surexpression des différentes régions de l'ARNm du TNF et évolution de la stabilité des messagers des autres médiateurs.	176
Faits marquants	178
Discussion :	179
ETUDES IN VIVO	183
I. Efficacité comparée des approches TFO et siRNA dans un modèle de mono-arthrite articulaire aiguë par injection de parois de mycobactéries.	184
A. Biodistribution d'un TFO marqué dans les tissus articulaires et démarche expérimentale.	184
1. Biodistribution du TFO Cy3'.	184
2. Démarche expérimentale suivie.	185
B. Effet des oligonucléotides TFO et siRNA sur l'évolution des paramètres cliniques dans un modèle de mono-arthrite articulaire aiguë.....	186
1. Evolution de la taille de l'œdème.	186
2. Test d'incapacitance et prise de poids.	187
C. Evolution de l'expression des médiateurs de l'inflammation au sein de l'articulation.	188
1. Expression des médiateurs en ARNm.	188
a. Dans les membranes synoviales.	189
b. Dans le cartilage articulaire.	190
2. Evolution des médiateurs sécrétés dans le liquide synovial.	190
D. Analyse histologique des tissus articulaires.	191
1. Analyse de la membrane synoviale.	191
2. Evolution des structures osseuses et cartilagineuses.	191
E. Evolution de la biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage articulaire.	193
F. Essai de quantification de l'efficacité du TFO dans un modèle d'arthrite aiguë par Tomographie par Emission de Positons (TEP).	194
1. Mise au point des paramètres d'étude.	194
a. Suivi de l'accumulation de ¹⁸ F-FDG au niveau des sites inflammatoires et quantification.	194
b. Macro-autoradiographie des tissus articulaire lésés.	195
2. Analyse de l'efficacité du TFO par TEP.....	196
II. Potentialités anti-arthritiques d'un TFO anti-TNF-α dans un modèle d'arthrite chronique chez le rat.	199
A. Effet du TFO sur l'évolution des paramètres cliniques.	200
1. Diminution de la taille de l'œdème suite à l'injection préventive de TFO.	200
2. Evolution de la répartition de la charge pondérale, test de douleur.....	200
C. Analyse histologique des lésions affectant les tissus articulaires.	203

ANNEXE I.....	209
Caractérisation d'un modèle de mono-arthrite articulaire par injection de parois de Mycobactéries .	211
I. Caractérisation du modèle de mono-arthrite articulaire par injection de parois de Mtb.....	211
A. Suivi des paramètres cliniques.....	211
B. Essai d'analyse par télémétrie.....	212
1. Mobilité.....	212
2. Température corporelle.....	212
II. Mesure de l'expression des médiateurs inflammatoires.....	213
A. Expression en ARNm dans les tissus articulaires.....	213
B. Sécrétion des médiateurs dans le liquide synovial.....	214
III. Suivi de la biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage articulaire.....	215
IV. Analyse histologique des tissus articulaires.....	215
ANNEXE II.....	217
Caractérisation du modèle de mono-arthrite articulaire chronique à la BSA méthylée.....	219
I. Caractérisation clinique du modèle d'arthrite à l'antigène.....	219
A. Evolution de la taille de l'œdème.....	219
B. Distribution de la charge pondérale sur les pattes postérieures.....	220
II. Evolution de l'expression des médiateurs inflammatoires.....	221
A. Cinétique d'expression en ARNm des médiateurs inflammatoires dans les tissus articulaires.	221
1. Dans la membrane synoviale.....	221
2. Dans le cartilage articulaire.....	222
B. Evolution de l'expression des médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial.....	222
1. Induction très précoce de l'expression locale des chémokines.....	223
2. Profil d'expression des cytokines pro-inflammatoires.....	224
3. Expression des cytokines immuno-modulatrices.....	226
4. Cinétique d'expression des facteurs de croissance.....	227
5. Cas particuliers : Profil d'expression de l'IL-9 et de l'IL-13.....	227
III. Caractérisation histologique des lésions articulaires.....	228
A. Perte de biosynthèse des protéoglycannes (PG) dans le cartilage articulaire.....	228
B. Analyse histologique des tissus articulaires.....	228
1. Analyse des tissus cartilagineux et osseux.....	228
2. Analyse du tissu synovial.....	229
IV. Conclusions et perspectives offertes par la caractérisation de ce modèle d'arthrite à la mBSA.....	231
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	235
TRAVAUX PUBLIES.....	239
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	241

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'articulation

A. Généralités

Les articulations auxquelles nous nous sommes intéressés au cours de cette étude sont les diarthroses, qui sont des articulations mobiles par opposition aux articulations dites immobiles telles que les sutures crâniennes (synarthroses), ou aux articulations peu mobiles telles que la symphyse pubienne (amphiarthroses). Les diarthroses sont les articulations le plus fréquemment retrouvées dans l'organisme. Elles sont constituées :

- de segments osseux présentant des surfaces articulaires, elles-mêmes recouvertes de cartilage articulaire, d'une capsule articulaire qui est une enveloppe fibreuse et élastique entourant l'articulation et permettant de maintenir en contact ses différents constituants.
- d'une membrane synoviale qui tapisse la paroi interne de cette capsule et sécrète le liquide synovial.
- de ligaments qui sont des tissus conjonctifs élastiques très résistants et joignent les segments osseux entre eux.
- de bourses séreuses qui sont fixées aux os à proximité des articulations et facilitent le glissement des structures (elles sont remplies de liquide synovial).
- de tendons qui sont des tissus fibreux reliant les muscles aux os.
- dans certains cas, les ménisques, qui sont de petites structures fibro-cartilagineuses présentes entre les deux surfaces articulaires, et qui assurent un rôle d'amortissement et de stabilisation au sein de l'articulation (1).

La **Figure 1** représente un exemple de diarthrose : l'articulation du genou.

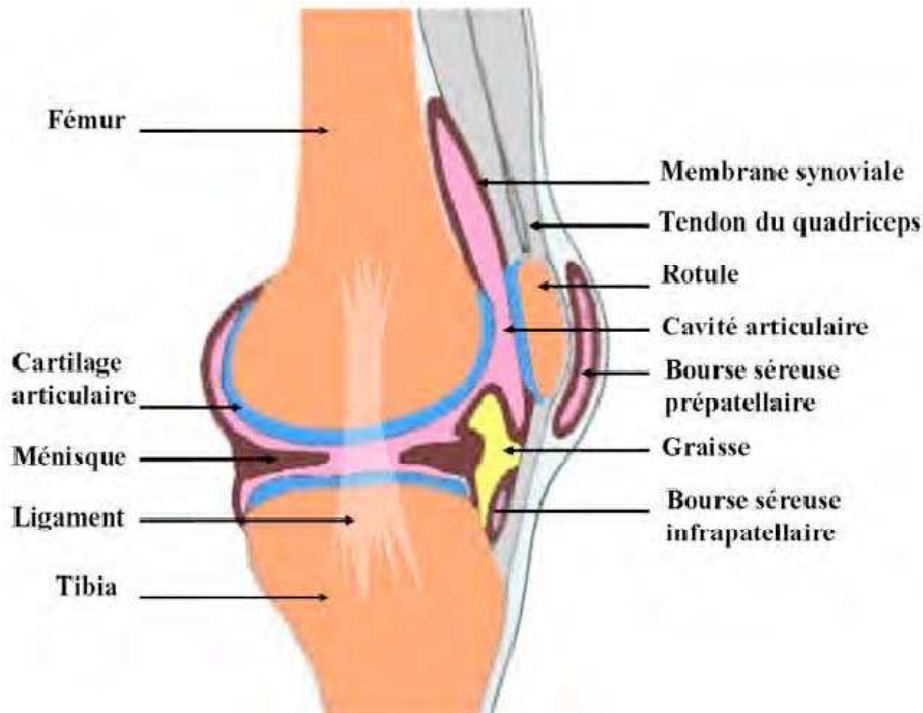


Figure 1 : Représentation schématique de l'articulation du genou, coupe sagittale. La cavité articulaire est en contact direct avec les structures cartilagineuses du fémur, du tibia et de la rotule.

<http://epsaps.unblog.fr/presentation-de-leps-au-college-f-leger/planches-anatomiques/>

L'articulation du genou met en présence trois extrémités osseuses recouvertes de cartilage (les surfaces articulaires), d'une part l'extrémité inférieure du fémur (les condyles fémoraux), d'autre part l'extrémité supérieure du tibia (les plateaux tibiaux) et enfin la face postérieure de la rotule (**Figure 1 & Figure 2**).

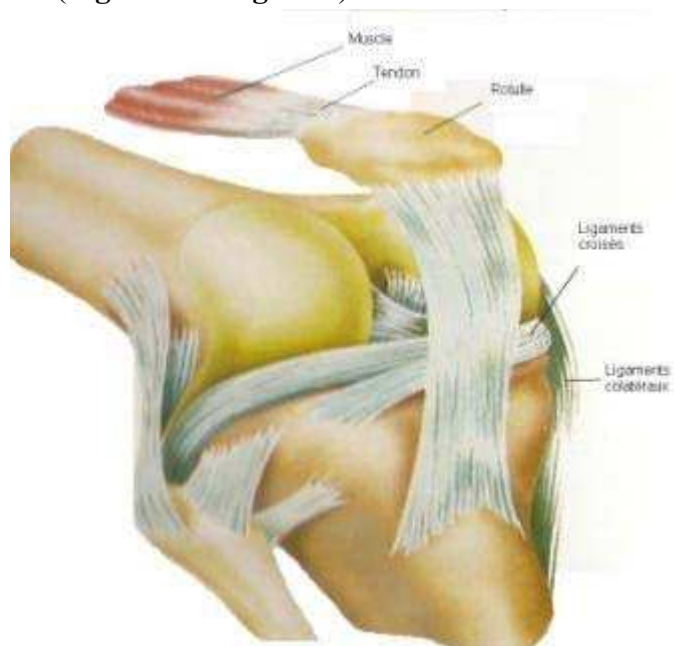


Figure 2 : Vue frontale des différents composants de l'articulation du genou. L'organisation des structures osseuses est maintenue grâce à la présence des ligaments latéraux et croisés, des tendons et des ménisques. <http://www.kneeanatomy.com/>

Le complexe articulaire du genou est composé de deux systèmes articulaires : l'articulation fémorotibiale et l'articulation fémoropatellaire. Il existe une organisation musculotendineuse qui va assurer la stabilité du genou dans ses différents mouvements. En avant, l'appareil extenseur du genou avec le quadriceps, la rotule et le tendon rotulien freinent le glissement des condyles fémoraux en avant lors de la flexion, assurant ainsi la stabilité du genou dans le plan sagittal. Les renforcements capsulaires et musculaires postérieurs internes/externes vont quant à eux assurer la stabilité rotatoire du genou dans les plans frontal et horizontal. À cette organisation musculaire, il faut ajouter un système informatif central très performant caractérisé par les ligaments croisés. Ses ligaments s'entrecroisent dans tous les plans et vont se déformer quels que soient les mouvements du genou. Cette organisation anatomique fonctionnelle permet à cette articulation de réaliser de grandes amplitudes de flexion/extension tout en restant stable.

B. Le cartilage articulaire

1. Généralités

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hautement spécialisé qui possède une double spécificité ; d'une part, il s'agit d'un tissu avasculaire et non innervé, d'autre part, ce tissu est composé d'un seul type de cellule, le chondrocyte. Le principal rôle de ces cellules est d'assurer la synthèse (le renouvellement et la dégradation) d'une matrice extracellulaire

Etude bibliographique

qui confère à ce tissu des propriétés mécaniques spécifiques. A l'âge adulte, le taux de renouvellement cellulaire des chondrocytes est réduit. Néanmoins, ils maintiennent la stabilité de la matrice extracellulaire en synthétisant à la fois les molécules composant celle-ci et les enzymes susceptibles de la dégrader.

Selon la composition de la matrice extracellulaire, on peut distinguer trois types de cartilage chez l'homme adulte (2), à savoir :

- Le cartilage hyalin (ou articulaire) (**Figure 3**); il se situe à la surface de l'os, en regard du liquide synovial. Il correspond à environ 5 à 10 % du cartilage total et se présente sous un aspect blanc tirant sur le bleu, donnant l'impression de verre fondu (d'où son nom de hyalin : verre). Le cartilage hyalin est constitué d'une importante matrice extracellulaire, riche en fibres de collagènes (de type II, IX et XI) ainsi qu'en protéoglycannes. Cette matrice est produite par un nombre relativement restreint de chondrocytes et sa composition biochimique rend compte des propriétés mécaniques du cartilage, à savoir la possibilité de transmettre, d'amortir et de distribuer des charges extrêmement importantes grâce à la forte pression osmotique (les protéoglycannes sont responsables de la pression osmotique du fait de leur charge négative, ils permettent à l'eau de pénétrer en permanence le cartilage qui se comporte comme une éponge). Enfin, il assure le glissement des pièces osseuses entre elles avec un coefficient de friction très faible. Ce type de cartilage se retrouve donc dans les articulations mais également à l'extrémité du nez et dans les côtes, permettant de les relier au sternum. Ce type de cartilage entre également dans la composition du larynx, de la trachée et des bronches (anneau cartilagineux). Enfin, avant la naissance, l'embryon est essentiellement constitué de tissu cartilagineux de nature hyaline. Après la naissance, chez l'enfant, il entre dans la composition du cartilage épiphysaire qui se trouve aux extrémités des os longs au niveau des zones de croissance, permettant ainsi leur allongement en longueur.

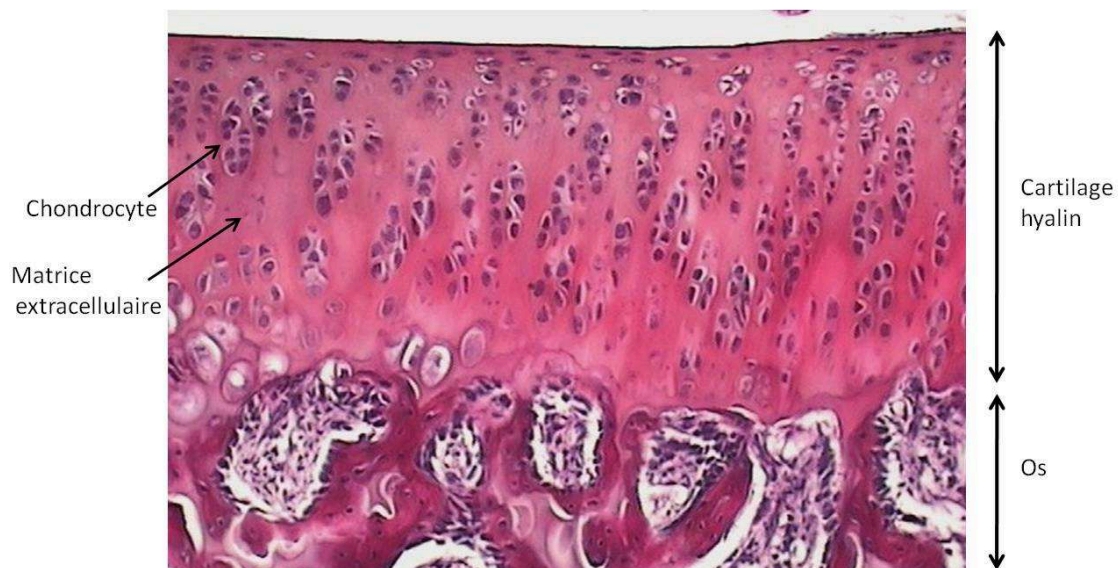


Figure 3 : Aspect histologique du cartilage hyalin (coloration HES, grossissement x20). Les chondrocytes ont un aspect et des propriétés différentes suivant la zone du cartilage considérée.

- Le fibrocartilage, qui est structurellement un intermédiaire entre un tissu conjonctif classique et un cartilage hyalin, il est très riche en fibres de collagène (**Figure 4**). Les chondrocytes qui le constituent sont réunis en rangées qui alternent avec des rangées épaisses de fibres de collagène. Ceci confère à ce type de cartilage de fortes capacités de compressibilité et une bonne résistance à la tension. Ces propriétés permettent au cartilage fibreux d'assurer le rôle de jonction entre le cartilage hyalin et un ligament ou un tendon. Le fibrocartilage entre également dans la composition des disques intervertébraux ainsi que dans le cartilage présent dans la composition des ménisques. Contrairement au cartilage hyalin, sa matrice extracellulaire contient d'épais faisceaux de fibres de collagène de type I. Ces fibres sont orientées le long des lignes de force (contraintes mécaniques que subit le tissu).

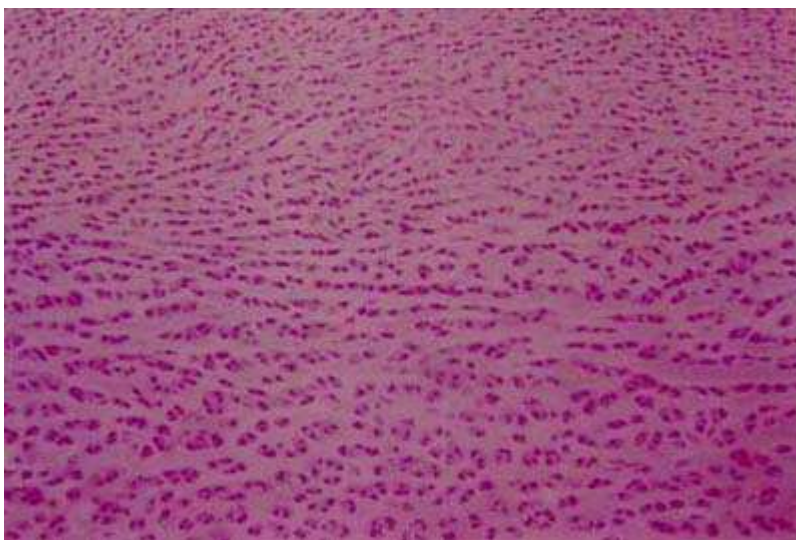


Figure 4 : Aspect histologique du fibrocartilage (coloration Resorcine- Fuchsiine, grossissement x20). Les chondrocytes s'organisent en travées. <http://www.histology-world.com/photomicrographs/fibrocartilage1.jpg>

- Le cartilage élastique, qui est proche du cartilage hyalin de par sa composition. Il se distingue néanmoins par une densité cellulaire beaucoup plus importante que les autres types de cartilage et par la présence de nombreuses fibres élastiques (**Figure 5**). Ces fibres élastiques sont disposées en un réseau tridimensionnel permettant leur déformation et la restitution de leur forme initiale, elles confèrent au cartilage une résistance accrue aux flexions (quand on plie un membre par exemple) répétées. Ce type de cartilage se rencontre dans les zones anatomiques de l'organisme où une certaine résistance est nécessaire, associée à une grande capacité d'extension. C'est le cas par exemple de l'oreille externe et de l'épiglotte qui est une structure en forme de rabat fermant l'orifice des voies respiratoires au moment de la déglutition de façon à empêcher la pénétration de corps étrangers (liquide, aliments) à l'intérieur des poumons.

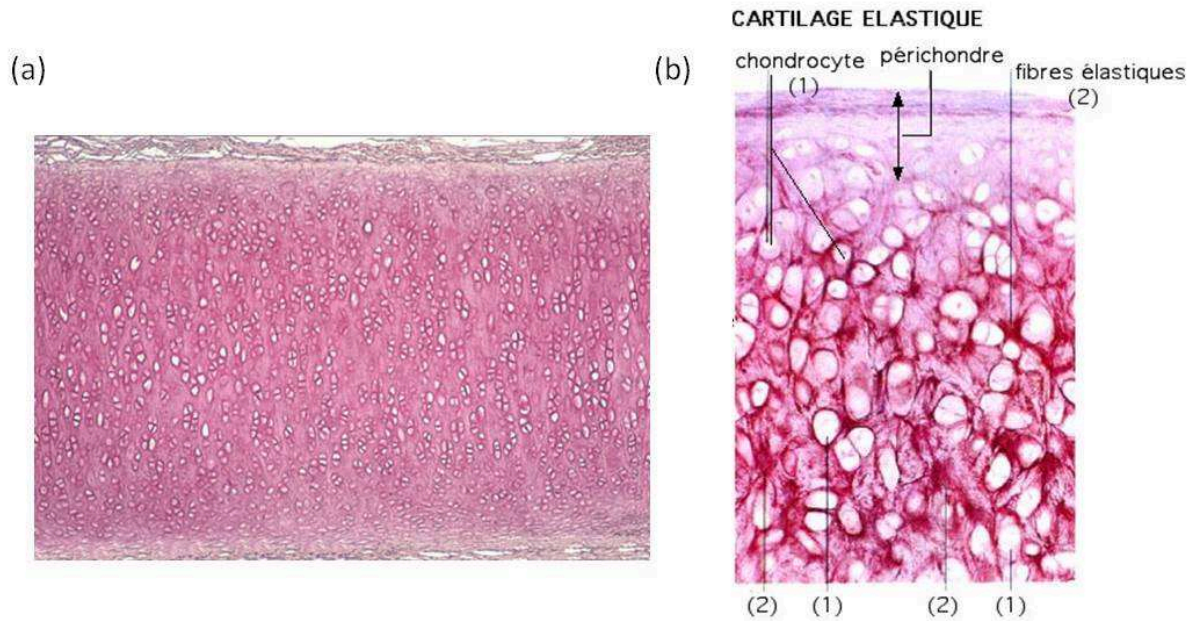


Figure 5 : Aspect histologique du cartilage élastique (grossissement x10 (a) et x40(b)). Le cartilage élastique a, mise à part du collagène de type II, des fibres élastiques qui rayonnent dans le périchondre. Ce type de cartilage est élastique à la pression ainsi qu'aux courbures. Coloration: Resorcine- Fuchsine.

<http://homepage.mac.com/danielbalas/HISTOLOGIE/HISTGENE/histgen1/histgen4/histgen41.jpg>

Compte tenu de l'objet du présent travail, il sera traité uniquement du cas du cartilage articulaire (ou hyalin) dans cette revue bibliographique.

2. Structure et fonction

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le cartilage articulaire recouvre les surfaces de frottement des articulations, il est très souple et présente une forte capacité de déformabilité. Ce tissu est composé d'un seul type de cellules, les chondrocytes, d'une matrice extracellulaire très dense et d'eau. Les chondrocytes ainsi que les collagènes, les protéoglycannes et d'autres protéines sont organisés dans un ordre défini. La matrice extracellulaire formant le cartilage change de composition et de propriétés en fonction de sa position par rapport à la surface articulaire. C'est ainsi que quatre zones peuvent être différenciées depuis la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral en fonction de leur composition, activité métabolique et propriétés biomécaniques (**Figure 6**). De même, les chondrocytes ont une forme, une taille et une orientation différente dans chaque zone articulaire. Des études histologiques et mécaniques (3, 4) ont montré que ces différentes zones successives sont fondamentales sur le plan fonctionnel car elles sont susceptibles de répondre différemment aux charges mécaniques. Les quatre zones du cartilage articulaire sont présentées sur la **Figure 6** ci-après.

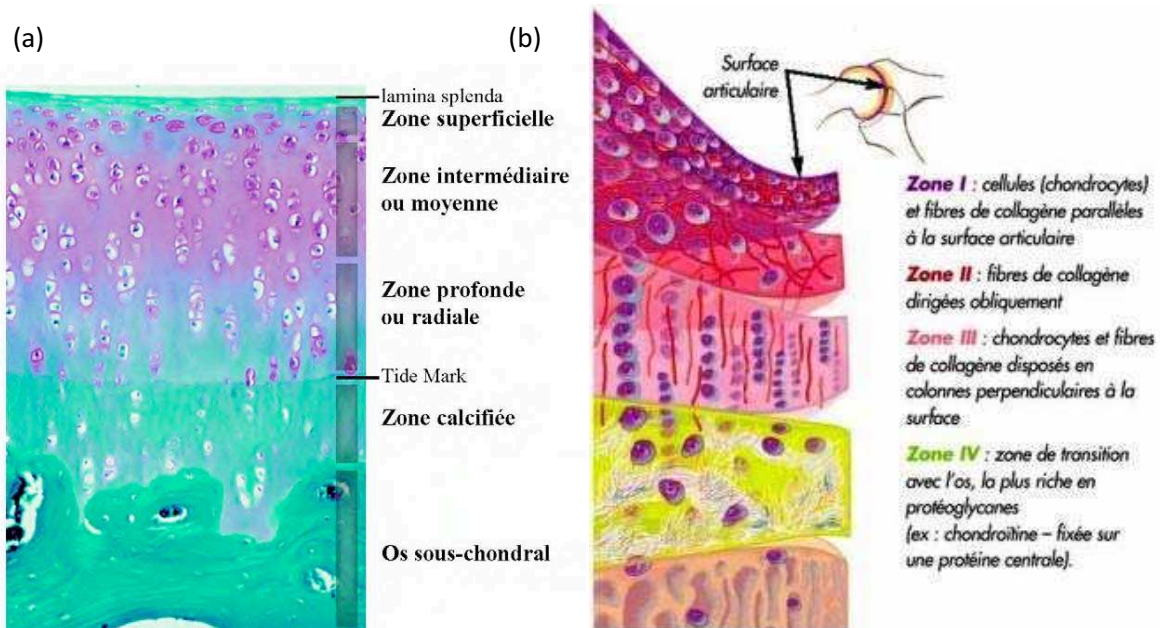


Figure 6 : Les différentes zones du cartilage articulaire : (a) coupe histologique (coloration safranine-O, grossissement x20) et (b) représentation schématique. Le cartilage peut être divisé en 4 zones : les zones superficielle, intermédiaires, profonde et calcifiée.

<http://www.labrha.com/images/sce/cartilage-sain-couches.jpg>

Il est ainsi possible de distinguer :

- La zone superficielle ou tangentielle : elle est en contact avec le liquide synovial et sert de surface de glissement. Elle représente environ 5 à 10 % de la hauteur totale du cartilage. Cette zone est séparée en deux couches : (1) la zone en contact avec le liquide synovial, qui est composée d'un film de microfibrilles avec peu de protéoglycannes et aucune cellule; (2) une zone plus profonde contenant des chondrocytes plats et ellipsoïdaux, disposés parallèlement à la surface articulaire. Ils synthétisent une plus forte quantité de collagène et une plus faible quantité de protéoglycannes que les chondrocytes des autres zones. Les concentrations en fibronectine et en eau sont plus élevées dans cette zone. Les chondrocytes synthétisent du collagène de type I et III. Les fibrilles de collagène sont orientées parallèlement à la surface articulaire ce qui contribue fortement aux propriétés mécaniques du tissu en apportant une plus grande résistance aux tensions et aux pressions que dans les zones plus profondes. La zone superficielle protège le cartilage sous-jacent des forces de déchirement générées lors de l'activité articulaire (5). La suppression de cette zone, chez l'animal, augmente la perméabilité du tissu et la charge supportée par la matrice extracellulaire sous-jacente durant la compression. La déchirure et le remodelage est le premier changement détectable dans l'induction expérimentale d'une ostéoarthrose (6). En outre, la surface articulaire limite l'accès du cartilage au système immunitaire en bloquant, entre autre, la pénétration des immunoglobulines. Une déchirure de cette zone peut donc exposer des constituants natifs ou dégradés du cartilage, stimuler le système immunitaire et induire à plus ou moins long terme une dégradation du cartilage.

- La zone de transition : elle constitue la deuxième couche du cartilage. Elle est formée de fibres de collagènes de type II, IX et XI qui s'entrecroisent obliquement en un réseau non orienté moins dense que celui de la surface articulaire. L'épaisseur de cette zone, la plus riche en protéoglycannes, représente environ 40 à 45 % de l'épaisseur totale du cartilage. La quantité d'eau y est plus faible que dans la zone superficielle. Les chondrocytes, de morphologie ronde, sont plus actifs dans cette zone que dans la zone supérieure, comme l'indique la taille supérieure de leur réticulum endoplasmique et de leur appareil de Golgi.
- La zone profonde du cartilage. Elle contient des fibres de collagènes de type II, IX et XI orientées de façon perpendiculaire à la surface et des chondrocytes sous forme de colonnes également perpendiculaires à la surface. Elle représente 40 à 45 % de l'épaisseur totale du cartilage. Cette zone contient la plus grande quantité de protéoglycannes et la plus faible proportion d'eau.
- La zone calcifiée. Elle est en contact avec la plaque osseuse sous-chondrale à laquelle elle amarre le cartilage et représente 5 à 10 % de l'épaisseur totale du cartilage. Dans cette zone, les chondrocytes sont de type hypertrophique et le cartilage est en voie de calcification (apatite). Cette zone est séparée de la zone profonde par une couche protéique basophile nommée "tide-mark", correspondant à un enchevêtrement extrêmement dense de fibres de collagène (7).

3. Les composants du cartilage articulaire

Nous nous attacherons à décrire successivement les principaux constituants du cartilage articulaire, à savoir, les chondrocytes, les protéoglycannes, les collagènes et diverses glycoprotéines.

a. Les chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules mésenchymateuses, très différenciées et hautement spécialisées. La différenciation des chondrocytes fait intervenir de nombreux facteurs (**Figure 7**) et fait l'objet de multiples études visant une meilleure compréhension de la physiopathologie des arthropathies (8, 9) notamment.

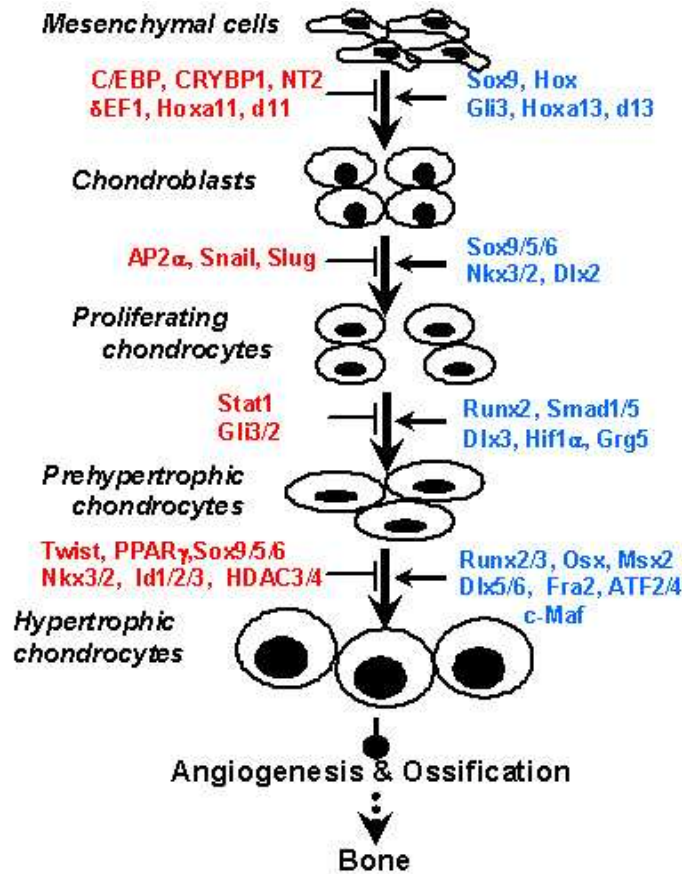


Figure 7 : Régulation de la différenciation des chondrocytes. Régulation transcriptionnelle positive et négative pendant le développement du cartilage. Ces facteurs de régulation de la différenciation sont étudiés dans le cadre des pathologies articulaires (Runx2, sox9).

<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://orthoresearch.wustl.edu/>

Selon l'âge de l'individu et le type d'articulation considéré, les chondrocytes représentent 1 à 10% du volume total du cartilage. La densité cellulaire et l'apparence des cellules varient selon la zone cartilagineuse considérée, la zone superficielle ayant la densité cellulaire la plus élevée. Ces cellules se divisent très peu dans le cartilage sain et n'ont aucune mobilité. Il semblerait qu'il existe un nombre fixe de chondrocytes qui décroît à partir de 20 ans chez l'homme. Cette densité cellulaire est variable à la fois en fonction de l'individu et du type d'articulation considéré.

La plupart du temps, les chondrocytes ont un aspect sphérique, de 30 à 40 μ m de diamètre. Ils possèdent un noyau central assez développé, ils sont riches en lysosomes, en mitochondries et en vacuoles de glycogène et lysosomiales. Les chondrocytes utilisent essentiellement le glucose comme substrat énergétique. De plus, la synthèse de protéoglycannes nécessite la conversion de glucose en glucosamine, d'où une consommation importante de glucose par les chondrocytes (10).

En raison du caractère avasculaire du cartilage, il reçoit peu d'oxygène et doit donc privilégier la voie de la glycolyse anaérobie (11), ce tissu fonctionne donc en hypoxie (12). Néanmoins, cette particularité varie selon la zone du cartilage considérée. En effet, en surface,

les chondrocytes peuvent fonctionner en aérobie partielle par diffusion de l'oxygène présent dans le liquide synovial (13).

La principale fonction des chondrocytes est de synthétiser les constituants de la matrice extracellulaire, afin de maintenir l'homéostasie du cartilage. Ainsi, ils produisent et organisent très minutieusement la structure du cartilage en fibres de collagènes, protéoglycannes, et molécules non collagéniques. Il est important de souligner que les chondrocytes sont non seulement capables de produire la matrice extracellulaire mais également les enzymes capables de la dégrader: dans des cas pathologiques, il peut aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité des métalloprotéinases (14), de hyaluronidases (15) et d'agrécannases. Leur activité métabolique diffère selon les zones du cartilage et selon les stimuli mécaniques, électriques et physicochimiques transmis par la matrice extracellulaire (16).

Les chondrocytes sont séparés de la matrice extracellulaire de type cartilage par un espace péricellulaire particulier. Cet espace n'est pas une lacune comme cela était précédemment supposé mais un espace clef où le pH est plus acide (pH 6,1) que dans le reste du tissu (pH 7,4). Les enzymes lysosomiales (cathepsines B) qui y sont libérées, étant activées par le pH acide, peuvent donc dégrader la matrice extracellulaire (17). De plus, dans cet espace péricellulaire, les protéoglycannes et les collagènes présents, comme par exemple le collagène de type VI (18), sont utilisés pour réaliser l'ancrage des chondrocytes à la matrice par l'intermédiaire de protéines membranaires. L'anchoringe CII est une protéine d'attachement qui interagit avec le collagène de type II (19). Des protéoglycannes insérés dans la membrane plasmique des chondrocytes, peuvent aussi servir de lien entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ces protéoglycannes sont composés d'un sulfate d'héparanne et d'une protéine axiale appartenant à la famille des syndécanes (20) ou des biglycannes.

Une particularité des chondrocytes est que leur métabolisme est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques qui règnent dans cet espace péricellulaire (21, 22). Ainsi, l'application cyclique de forces sur des fragments de cartilage se répercute sur le pH qui règne dans cet espace mais également sur la forme des chondrocytes. Il en résulte une modification des microfilaments d'actine du cytosquelette qui peut induire ou modifier l'expression de certains gènes. Il existe donc un lien direct entre les conditions physiques et physico-chimiques qui règnent autour du chondrocyte et son activité métabolique (23).

b. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire peut être assimilée à un gel renforcé par des fibres. Elle se compose de 70 à 80 % d'eau, 20 à 30 % de macromolécules, ainsi que de petites protéines, de gaz, d'électrolytes dissous et de métabolites. Elle peut être divisée en trois zones suivant sa proximité vis-à-vis du chondrocyte, on retrouve ainsi la matrice péricellulaire puis la matrice territoriale et enfin la matrice interterritoriale, en s'éloignant des cellules. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, chaque chondrocyte est entouré par une matrice péricellulaire, qui assure la protection hydrodynamique du chondrocyte. La cellule entourée de ce microenvironnement se nomme le chondron. Cette zone, d'un pH acide facilitant

l'activité enzymatique péricellulaire, est très riche en protéoglycannes sulfatés, acide hyaluronique, biglycannes, collagènes de type VI, et molécules non collagéniques telles que l'anchoring ou la fibronectine. Les matrices, territoriale et interterritoriale, de pH physiologique, sont constituées principalement de collagènes et de protéoglycannes (**Figure 8**). La matrice extracellulaire territoriale retrouvée principalement dans les couches superficielle, intermédiaire et profonde du cartilage, est constituée de fibres de collagènes de large diamètre et de forte concentration de protéoglycannes riches en chondroïtine sulfate. La matrice interterritoriale contient des protéoglycannes particulièrement riches en kératane sulfate, et des collagènes, majoritairement retrouvés sous forme de fibres de gros diamètre (24).

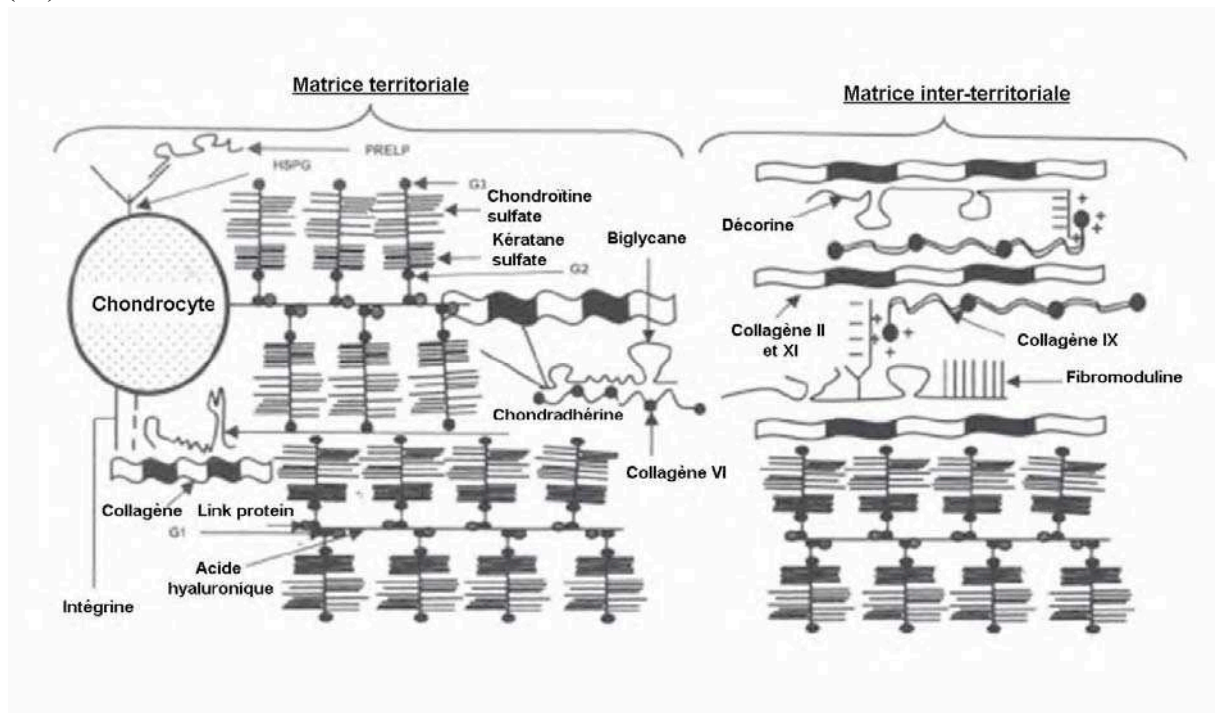


Figure 8 : Principaux composants de la matrice cartilagineuse extracellulaire.

Composition des matrices, territoriale (proche des chondrocytes) et interterritoriale (plus distante des cellules). (25)

i. Les collagènes :

i.1. Structure générale

Les fibres de collagène sont composées de trois chaînes α polypeptidiques formant une triple hélice. Elles sont secrétées par la cellule sous forme de pro-collagènes. Chacune de ces trois chaînes est formée de plusieurs domaines collagéniques (répétition d'un triplet d'acides aminés : Glycine - X -Y, X et Y étant un tiers du temps proline et hydroxyproline) et non collagéniques. Cette structure primaire a pour conséquence la formation d'une hélice gauche de type polyproline. L'association avec deux autres chaînes conduit à la formation d'une superhélice droite. Cette structure dans sa forme native (structure tertiaire « coiled-coil ») est extrêmement résistante à la protéolyse, excepté lorsque celle-ci implique des collagénases (enzymes de la famille des métalloprotéinases). Pas moins de 35 chaînes α ont été rapportées et codées chacune par un seul et unique gène. Ces chaînes se combinent soit avec elle-même

pour former un homotrimère soit avec au moins une chaîne différente pour former un hétérotrimère. Dans des conditions physiologiques, les collagènes de type I, II, III, V et XI, s'organisent pour former des fibrilles, lesquelles s'associent entre elles pour former des fibres. Les collagènes sont sécrétés sous la forme de pro-collagènes. Les extrémités NH₂ et COOH-terminales de ces pro-collagènes présentent des domaines appelés pro-peptides. Ces domaines sont clivés par des protéases spécifiques lors de la sécrétion des collagènes afin de former les fibrilles de collagènes (26). Après l'élimination des pro-peptides, il subsiste de courtes extensions non collageniques (NC) aux extrémités des collagènes, ce sont les télépeptides, ils sont composés de 10 à 15 acides aminés. Ces domaines représentent également les principaux sites antigéniques des collagènes. Contrairement aux portions hélicoïdales, les domaines NC et les chaînes dénaturées sont sensibles à la dégradation par diverses enzymes (par exemple pepsine ou trypsine).

Il existe d'autres types de collagènes, qui diffèrent des collagènes fibrillaires par la présence de larges domaines NC à l'une ou aux deux extrémités NH₂ et COOH terminales ainsi que de courts domaines NC susceptibles d'interrompre la triple hélice. Les collagènes sont classés en fonction de la structure quaternaire qu'ils peuvent former: les collagènes de type IX, XII et XIV sont étroitement associés à des fibrilles de collagène. Ces collagènes sont donc appelés des collagènes FACIT (Fibre-Associated Collagens with Interrupted Triple hélices). Le collagène de type VI forme des tétramères qui s'associent en filaments perlés. Les molécules de collagène de type X s'associent entre elles pour former des réseaux hexagonaux.

i.2. Les collagènes du cartilage articulaire.

Il en existe différents types qui se distinguent par leur structure interne, leur aspect fibrillaire ou non fibrillaire, leur diamètre et leur orientation. Cinq collagènes (II, VI, IX, X, XI) ont été identifiés dans le cartilage articulaire en quantité suffisante pour permettre leur isolement de ce tissu ou à partir de milieux de culture de chondrocytes. Le collagène de type II est à la base de l'architecture du cartilage, il lui confère notamment ses propriétés de résistance à la compression. Etant caractéristique du cartilage, il représente un marqueur de chondrocyte sain, et témoigne de son caractère différencié en culture cellulaire. Il existe deux catégories de collagènes de type II, la forme II-A, exprimée par le chondrocyte en cours de développement, et la forme II-B, exprimée par les chondrocytes du cartilage adulte. Cependant, le collagène de type II n'est pas spécifique du cartilage, car il est également retrouvé dans d'autres tissus. Bien qu'il représente à lui seul 80 à 90 % des collagènes totaux, d'autres types sont également présents. C'est le cas du collagène de type VI qui serait impliqué dans l'adhésion du chondrocyte à la matrice extracellulaire. Le collagène de type IX représente quand à lui 1 % des collagènes. Il est lié de façon covalente aux fibres de collagène de type II, et favoriserait les interactions fibrilles-fibrilles ou fibrilles-protéoglycannes. Le collagène de type X est également retrouvé. C'est le seul collagène totalement spécifique du cartilage articulaire (dans la zone de cartilage hypertrophié et minéralisé). Il est présent autour des chondrocytes hypertrophiques et dans la zone calcifiée du cartilage articulaire. Il serait impliqué dans le processus de minéralisation. Enfin, le collagène de type XI représente 2 à 3 % des collagènes totaux, et est souvent retrouvé près du collagène de type II. Il a été démontré que les collagènes de type II et XI étaient réticulés dans le cartilage et qu'avec le collagène de

type IX ils formaient des fibrilles hétérotypiques chez le rat. De plus, le collagène de type XI apparaît, chez le bovin, au cœur des fibres de collagène de type II et le collagène de type IX à leur surface (27). Les **Figure 9 & Figure 10** représentent l'hétérofibrille formée par les collagènes de type II, IX et XI.

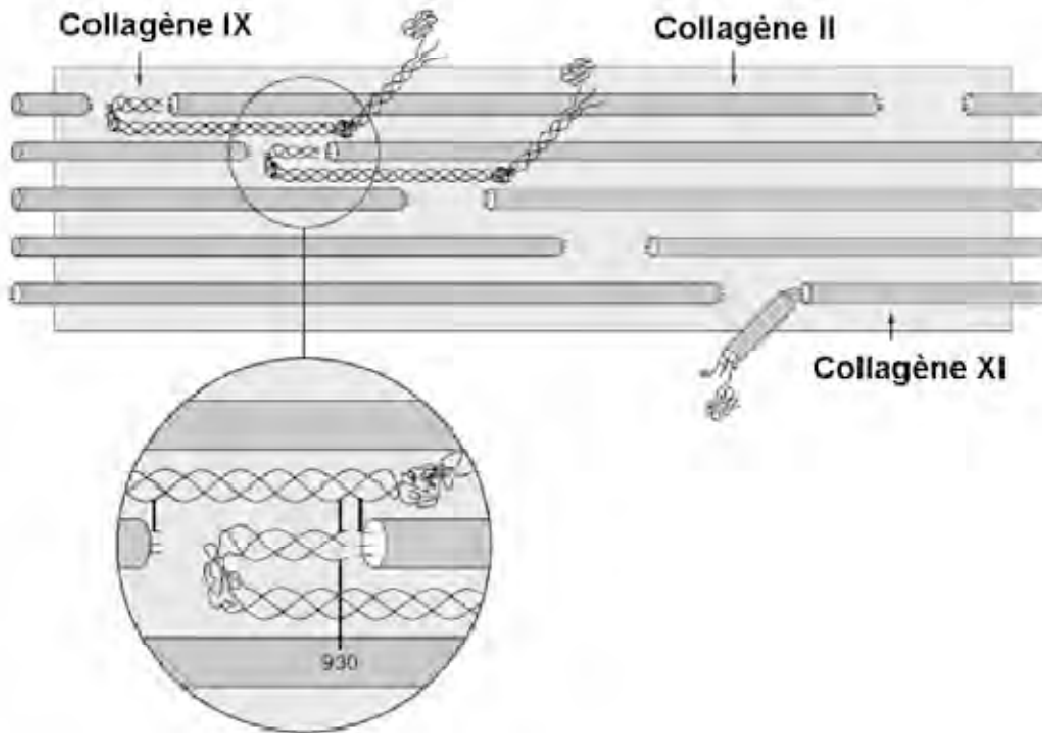


Figure 9 : Hétérofibrille des collagènes II, IX et XI.

Modèle moléculaire d'interaction entre les fibres de collagènes de type II, et les collagènes de type IX et XI (28).

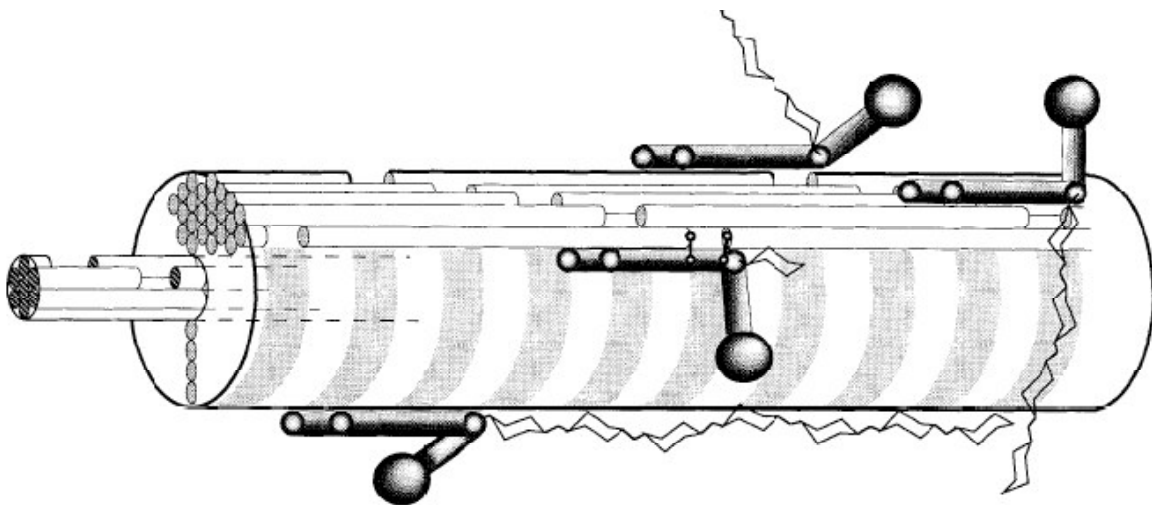


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation dans les fibrilles du cartilage. (D'après Eyre D *et al*, (28))

Une protéine core de 4 molécules de collagènes XI est entourée de molécules de collagènes II. Les collagènes de type IX sont attachés à la surface de la fibrille de manière antiparallèle. Les régions triple hélices des collagènes sont désignées par des cylindres avec une largeur très exagérée. Les domaines non-hélicoïdaux des collagènes de type IX sont représentés par des sphères ombrées. Le domaine N-terminal, non-hélicoïdal (NC4) correspond aux plus grosses sphères. Les pointillés désignent les liaisons dérivées de l'hydroxylysine entre les collagènes de type IX et de type II. Les chaînes chondroïtine-sulfates de longueur variable sont attachées au second domaine non-hélicoïdal de l'extrémité N-terminale (NC3) (29).

ii. Les protéoglycannes :

Les protéoglycannes sont composés d'une protéine axiale ou porteuse (core protein) et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAG). Les GAG sont des polysaccharides composés d'une répétition de disaccharides contenant un sucre amine (hexosamine) et un sucre de type hexuronique (ou galactose dans le cas du sulfate de kératane) (30). Ces sucres forment un polysaccharide non branché chargé négativement par le groupement carboxylique ou par le groupement sulfate qui repousse les charges négatives environnantes et attire les cations tels que Ca^{2+} et Na^+ (Figure 11).

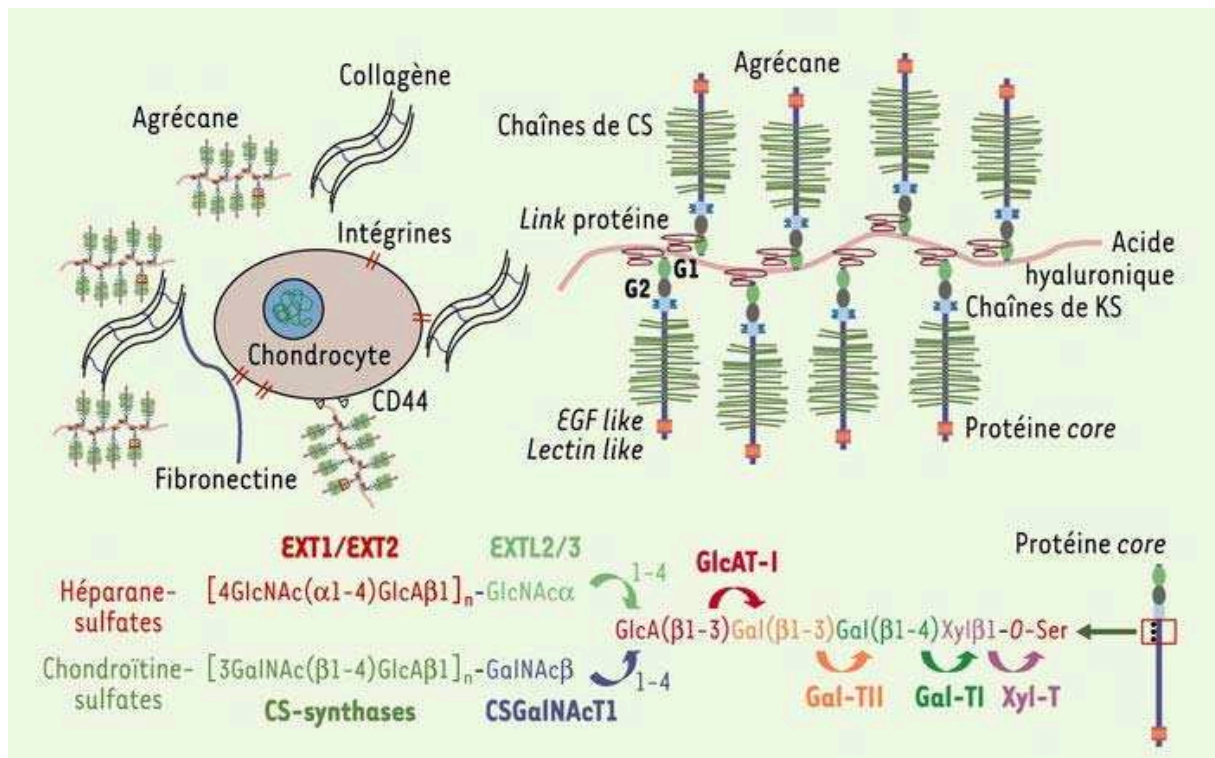


Figure 11 : Représentation schématique de la structure des protéoglycannes présent dans la matrice extracellulaire du cartilage artériel et des enzymes impliquées dans leur biosynthèse.

http://www.edk.fr/reserve/print/e-docs/00/00/07/4C/media_2.gif

Cette propriété est à l'origine de la capacité des protéoglycannes à attirer les molécules d'eau. Cette propriété permet aux protéoglycannes de créer une pression osmotique et d'assurer l'hydratation du cartilage, entraînant ainsi la tension des fibres de collagènes, à

l'origine des propriétés fibro-élastiques du cartilage articulaire. Il existe 5 types de chaînes de glycosaminoglycanes: les sulfates de chondroïtine (CS), le sulfate de dermatane (DS), le sulfate d'héparane (HS), le sulfate de kératane (KS) et l'acide hyaluronique (HA). Il est à noter que le HA est le seul GAG ne possédant pas de groupement SO_4^{2-} et n'étant pas lié à une chaîne protéique. Tous ces GAG sont retrouvés dans le cartilage en concentration variable en fonction de la zone du cartilage considérée. Il est possible de distinguer deux classes de protéoglycannes dans le cartilage articulaire : d'une part les protéoglycannes de masse molaire élevée (en particulier l'agrécan) qui représentent 90 % des protéoglycannes totaux, et d'autre part les protéoglycannes de faible masse molaire. Les agrécannes sont constituées d'une protéine core de 220 kDa, sur laquelle sont fixées de manière covalente des chaînes de chondroïtine sulfate (environ 100) et de kératane sulfate (environ 30). Cette protéine se lie à l'acide hyaluronique de façon non covalente par sa région N-terminale. Une petite glycoprotéine (« link protein ») stabilise cette liaison en se fixant simultanément à l'acide hyaluronique et à la protéine core. Cependant, la composition des agrécannes dépend également de l'âge et de la zone du cartilage. Plus de 300 molécules d'agrécanes peuvent s'associer autour d'un squelette d'HA et constituer un ensemble pouvant atteindre 10 micromètres et créant de larges domaines hydrodynamiques entre les fibres de collagène. Du fait de leur taille, ces protéoglycannes sont retenus dans la matrice extracellulaire durant les déformations subies par le cartilage.

La perte de ces macromolécules conduit à la disparition des propriétés mécaniques du tissu et est observée lors de l'arthrose. Au cours du vieillissement, il se produit une diminution de la quantité de ces macromolécules du fait du ralentissement du métabolisme des cellules et d'un taux de renouvellement plus court des protéoglycannes (1 à 3 ans suivant les articulations) (31) que du collagène (400 ans). De ce fait, les propriétés mécaniques du cartilage se détériorent ce qui peut expliquer la dégénérescence arthrosique survenant avec le vieillissement. Les fibres de collagènes interagissent avec les régions riches en kératane sulfate de la plupart des agrécannes. L'acide hyaluronique qui lie les molécules d'agrécanes, est également relié aux fibres de collagènes. Il est synthétisé par les chondrocytes et est tout particulièrement abondant dans la zone intermédiaire du cartilage. La matrice extracellulaire comprend également des protéoglycannes de forte masse molaire, non agrégés, qui pourraient provenir de la dégradation d'agrécanes.

Les petits protéoglycannes ne représentent que 3 % environ du tissu cartilagineux. Généralement, ils ne sont pas spécifiques du cartilage mais participent à la formation de la matrice extracellulaire. Parmi eux, la décorine, le biglycane et la fibromoduline interagissent avec les fibres de collagène (32). A noter que le collagène de type IX est considéré comme un protéoglycane car il peut porter une chaîne de GAG de type chondroïtine sulfate. La décorine et la fibromoduline ont été décrites comme régulant le diamètre des fibrilles de collagène durant la fibrillogénèse (33). De plus, la décorine comporte un site de liaison spécifique avec un facteur de croissance: le TGF- β (Transforming Growth Factor β) (34) et ainsi peut agir sur le métabolisme et la prolifération des chondrocytes. La fonction du biglycane n'est pas très bien connue. Il est principalement localisé dans la région péricellulaire des chondrocytes et peut interagir avec le collagène de type VI (32). D'un point de vue général, ces molécules se lient aux autres macromolécules et influencent probablement

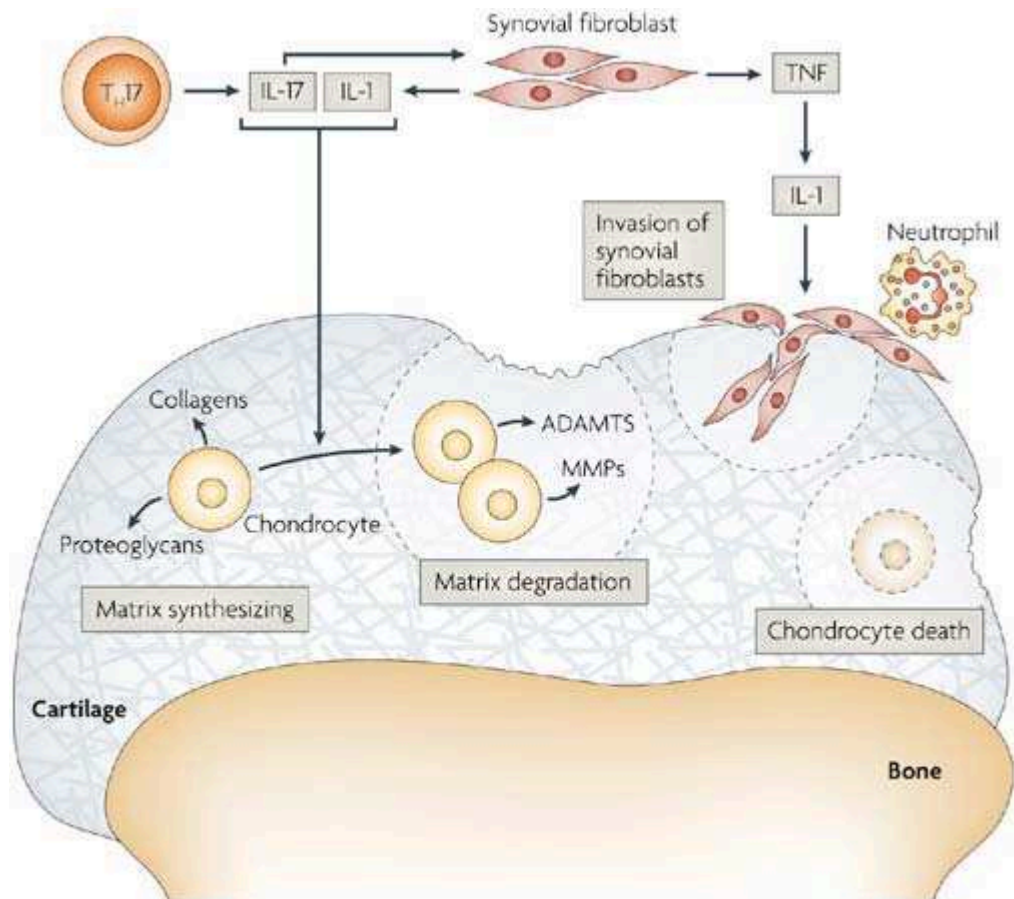
l'organisation de la matrice extracellulaire et la fonction des chondrocytes (1), les petits protéoglycannes pouvant influencer l'activité des cytokines dans le cartilage (35).

iii. Protéines non collagéniques :

Les protéines non collagéniques du cartilage ont été moins étudiées que les collagènes. Elles semblent intervenir, pour la plupart, dans le maintien et la stabilisation de la structure de la matrice extracellulaire. Les protéines actuellement décrites appartiennent à la famille des protéines d'adhérence comprenant, entre autres, l'annexine V, l'anchoring CII présente à la surface des chondrocytes, la COMP (cartilage oligo matrix protein) qui a valeur de marqueur du renouvellement et de la dégénération de la matrice extracellulaire, la trombospondine, la tétranectine, la ténascine et la fibronectine. Ces deux dernières interagissent également avec les chondrocytes et la matrice. Dans un cartilage normal, la synthèse de ces protéines est modeste mais peut considérablement augmenter dans diverses situations pathologiques. Ces protéines jouent un rôle important dans les interactions entre les chondrocytes et la matrice extracellulaire et donc dans les phénomènes d'adhésion et de migration des chondrocytes. La liaison avec les chondrocytes se réalise par des protéines transmembranaires, les intégrines. Ces protéines sont reliées au cytosquelette par leur côté cytosolique et peuvent induire des mécanismes de transduction du signal et activer des gènes.

4. Homéostasie du cartilage articulaire

L'homéostasie du cartilage représente l'équilibre entre la biosynthèse et la dégradation des constituants matriciels. Elle est retrouvée dans des conditions physiologiques dites normales, c'est-à-dire chez le patient sain. Les chondrocytes et les synoviocytes vont être stimulés par des cytokines (interleukines, interférons, TNF et facteurs de croissance) anti-inflammatoires et pro-inflammatoires, mais également par des stress mécaniques ou électriques, des contacts intercellulaires, ou des contacts cellule-matrice, grâce à différents récepteurs à la surface des cellules (24) (**Figure 12**). Ces stimuli vont entraîner l'activation ou l'inactivation de l'expression de plusieurs gènes codant pour les différents acteurs du maintien de l'homéostasie du cartilage, les macromolécules de la matrice, les protéases matricielles, mais également les cytokines, elles mêmes. Il existe quatre principales catégories d'enzymes protéolytiques : aspartique, cystéine, sérine et métalloprotéases (MMPs). Les MMPs sont une famille d'endoprotéinases qui dégradent tous les composants matriciels. Elles comprennent au moins trois collagénases MMP-1, MMP-8 et MMP-13 qui détruisent les fibres de collagènes. Ces MMPs sont hautement régulées, notamment par des inhibiteurs de métalloprotéases, les TIMPs.



Nature Reviews | Immunology

Figure 12 : Représentation schématique des principaux acteurs impliqués dans l'homéostasie articulaire et de leurs interactions potentielles.

<http://www.nature.com/nri/journal/v7/n6/images/nri2094-f5.jpg>

Parmi les métalloprotéases, il existe également des agrécanases telle que ADAMTS-1, ADAMTS-2 et ADAMTS-5 qui font partie des ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs); sous famille des ADAM avec un motif thrombospondine (36). Dans certaines pathologies ostéoarticulaires, telles que l'arthrose ou l'arthrite, des cytokines pro-inflammatoires vont perturber l'homéostasie du cartilage et la faire évoluer vers une dégradation progressive des macromolécules de la matrice extracellulaire. Dans ce cas, les protéoglycannes, en particulier l'agrécane, vont être rapidement détériorés suite au stimulus inflammatoire, mais ils peuvent rapidement être remplacés, si ce stimulus s'arrête. Les collagènes vont être plus résistants à la dégradation, mais également plus difficiles à remplacer (37).

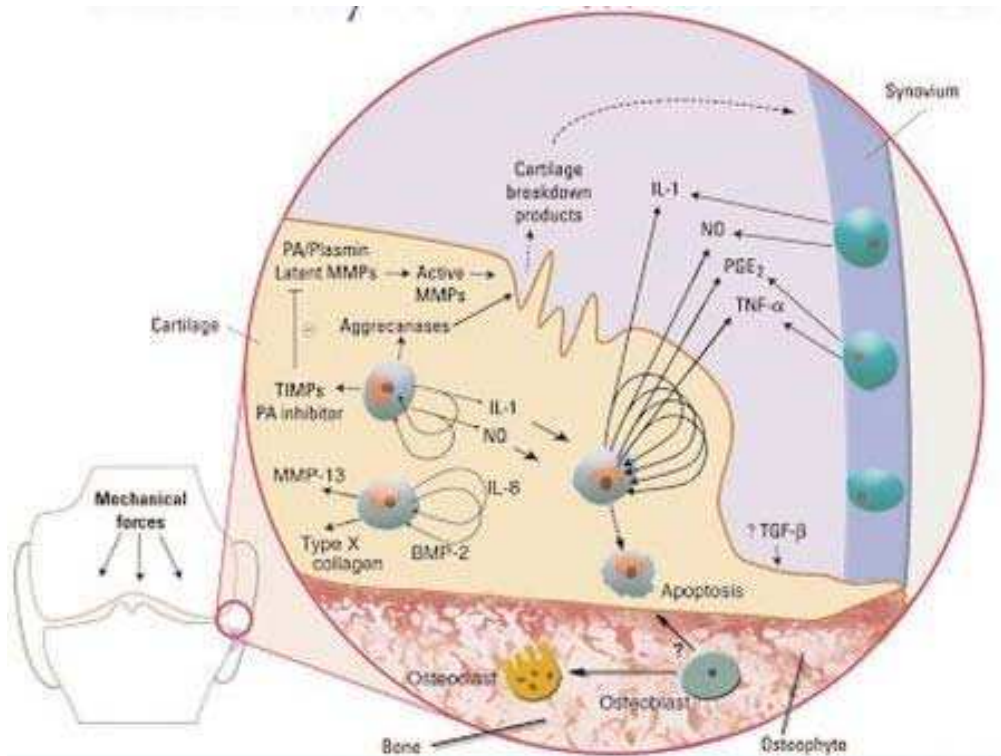


Figure 13 : Acteurs et mécanismes impliqués dans les pathologies articulaires. Le chondrocyte occupe un rôle central tant par les médiateurs qu'il produit que par ses réponses aux stimulations externes. <http://www.inflammation.dk/iir/12deg/images/12oa2.gif>

Sur la **Figure 13** sont représentés les principaux médiateurs impliqués dans la perturbation de l'homéostasie articulaire. La réponse des chondrocytes aux stimuli extérieurs, leur (dé)différenciation et les médiateurs qu'ils sécrètent peuvent aboutir à la destruction des structures osseuses et cartilagineuses de l'articulation.

C. La membrane synoviale

La synoviale est une membrane qui tapisse la face interne d'une diarthrose. La synoviale joue un rôle prépondérant dans la trophicité (apport en nutriments) des composants articulaires par l'intermédiaire de la production de liquide synovial. Il a été montré que les rapports sont très étroits entre espace articulaire, synoviale, cartilage et os sous-chondral.

1. Structure et ultrastructure

L'articulation synoviale ou diarthrose est constituée des extrémités des pièces osseuses recouvertes de cartilage. La synoviale est une membrane qui délimite la cavité articulaire, elle se réfléchit sur les pièces osseuses en formant des récessus et s'insère à la limite de la transition os-revêtement cartilagineux, elle couvre toutes les structures intra articulaires à l'exception du cartilage et de petites surfaces osseuses exposées en bordure. C'est un tissu conjonctif spécialisé d'une épaisseur inférieure à 100µm dans les conditions physiologiques normales avec une « bordure » synoviale composée de une à trois couches de cellules (synoviocytes de type A : dérivées de macrophages et synoviocytes de type B : dérivés de fibroblastes). Il n'y a pas de membrane basale. Dans cette couche de cellules on trouve une

vascularisation importante avec seules quelques cellules mononuclées qui s'insèrent. Elle sécrète le liquide synovial à l'intérieur de l'articulation et elle est bordée à l'extérieur par la capsule articulaire et les formations ligamentaires. La synoviale s'organise en replis ou « franges », surtout dans les zones où les influences mécaniques sont les plus restreintes.

Au cours de ces dernières années, l'étude de la synoviale a bénéficié de nouvelles techniques d'investigation comme l'arthroscopie. L'arthroscopie des grosses articulations (celle du genou en particulier) est proposée à visée diagnostique, mais aussi à visée thérapeutique (synovectomie) dans les rhumatismes inflammatoires chroniques.

2. Histologie et histochimie

La membrane synoviale est un tissu conjonctif lâche différencié qui s'organise en deux couches de l'extérieur vers l'intérieur.

- la couche sous-intimale (subintima), en contact avec la capsule articulaire.
- la couche bordante (intima) en contact avec la cavité articulaire.

Les deux couches sont séparées de la capsule par la subsynoviale, tissu conjonctif paucicellulaire essentiellement constitué de substance intercellulaire.

Histologiquement, la démarcation entre ces différentes couches n'est souvent pas très nette, et par endroits l'intima ne se compose que de synoviocytes isolés au sein d'une subintima très développée.

a. L'intima

Elle a une épaisseur qui varie entre 20 et 40 μm selon le type de synoviale. Les cellules de l'intima sont appelées synoviocytes, celles-ci sont disposées en une à trois couches dans une articulation dite « saine ». Elles sont endothéliiformes et ont parfois des prolongements cytoplasmiques dirigés vers la lumière articulaire. Elles sont riches en enzymes oxydatives (enzyme de la glycolyse, du cycle de Krebs, du circuit pentose-phosphate), en enzymes hydrolytiques (phosphatase acide, catheptase...) et en adénosine 5-triphosphatase. La substance intercellulaire contient de grandes quantités d'acide hyaluronique.

Les synoviocytes sont classiquement décrits comme pouvant appartenir à deux types que l'on peut distinguer en microscopie électronique:

- les ***synoviocytes de type A*** sont les plus nombreux. Ils dérivent de cellules souches sanguines mononuclées, ils ne sont pas fixés et représentent les cellules macrophagiques. Les synoviocytes de type A sont généralement de morphologie ronde et situés à la surface de l'intima. La surface de ces cellules est couverte de microvillosités et de microplis qui sont des structures caractéristiques des macrophages. Elles ont une structure riche en lysosomes, de larges vacuoles et des vésicules pinocytaires situées principalement à proximité de la cavité articulaire. Elles possèdent un appareil de Golgi très développé mais un petit réticulum endoplasmique granuleux. Dans des conditions physiologiques normales, les cellules de type A peuvent absorber et dégrader les constituants extracellulaires, les débris cellulaires, les microorganismes et les antigènes dans le liquide synovial ou dans la matrice de l'intima grâce

à leurs systèmes vésiculaire et lysosomal très développés. Elles expriment également les molécules du système majeur d'histocompatibilité de classe II et jouent un rôle prépondérant dans la présentation de l'antigène et les phases primaires de la réponse immunitaire.

- les ***synoviocytes de type B*** sont moins nombreux et représentent les cellules de type fibroblastique. Ils ont une forme plus massive, et peu de prolongements cytoplasmiques. Les synoviocytes de type B sont des cellules possédant un noyau relativement volumineux. Contrairement aux cellules de type A, elles présentent peu de vacuoles et de vésicules, et possèdent un appareil de Golgi nettement moins développé. En revanche, l'ergastoplasme est particulièrement développé, porteur de ribonucléoprotéines, ce qui témoigne de l'importance de leur fonction de biosynthèse protéique. Les synoviocytes de type B présentent à la surface de leur membrane plasmique de petites alvéoles. De plus, elles développent des microfilaments et filaments de manière longitudinale, au niveau de leur cytoplasme. Les cellules de type B sécrètent des collagènes et de la fibronectine, de l'acide hyaluronique et d'autres GAG dans l'espace interstitiel de l'intima et dans la cavité articulaire, et sont donc impliquées directement et indirectement dans le contrôle de la composition protéique du liquide synovial (38).

Un troisième type de cellules intimaux, intermédiaire entre les types A et B, a cependant été décrit. Il est constitué de cellules dendritiques et représente moins de 1% des cellules intimaux (39).

b. La subintima

La subintima est une partie fibreuse, riche en cellules et beaucoup plus vascularisée que l'intima. Elle comprend pour moitié des fibroblastes, des histiocytes, des mastocytes, des adipocytes et des fibres collagènes. Elle contient aussi de très nombreux capillaires dans la partie la plus superficielle, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques. En cas d'inflammation, il se produit une modification des veinules postcapillaires et une hypertrophie des cellules endothéliales qui contribuent à une augmentation de la perméabilité vasculaire. La substance fondamentale comprend essentiellement des mucopolysaccharides. La zone subintimale forme l'axe des villosités synoviales qui se greffent à la surface des franges.

c. La subsynoviale

Dans les couches superficielles, les cellules sont des cellules conjonctives banales. La substance fondamentale contient des mucopolysaccharides et des fibres collagènes lâches. Dans les couches plus profondes, on distingue des cellules adipeuses qui infiltrent le tissu conjonctif. Dans les synoviales de type fibreux, la subsynoviale se confond souvent avec les éléments capsuloligamentaires sous-jacents.

3. Physiologie

La synoviale remplit plusieurs fonctions :

- elle a un rôle de trophicité vis-à-vis de l'articulation. Elle participe à ses propriétés mécaniques et à sa stabilité.

- elle constitue une barrière de filtrations et d'échanges ; elle participe à la formation du liquide synovial.
- elle joue un rôle de défense contre les agressions extérieures et peut être considérée comme un organe immunitaire.

a. Rôle dans la trophicité de l'articulation

L'acide hyaluronique est synthétisé par les synoviocytes. Il contribue à la lubrification de l'articulation et à la trophicité du cartilage et des structures ligamentocapsulaires. L'acide hyaluronique est un mucopolysaccharide de haut poids moléculaire composé d'une longue chaîne disaccharidique : acide glycuronique et N-acétylglucosamine, en unités répétées. Ce polysaccharide est trouvé dans le liquide synovial sous forme de hyaluronate de sodium. L'acide hyaluronique est largement distribué dans la matrice extracellulaire de nombreux tissus dont la membrane synoviale et le cartilage. Dans la membrane synoviale, la concentration en acide hyaluronique est très importante dans la couche intimale où il est synthétisé. Ses propriétés chimiques ou physiques dépendent directement de son poids moléculaire qui peut être variable ainsi que de sa concentration dans le liquide synovial, lui conférant plusieurs propriétés :

- Propriétés viscoélastiques du liquide synovial: l'acide hyaluronique forme avec l'eau un gel déformable qui devient élastique si les forces de cisaillement appliquées sont plus marquées. Il joue donc un rôle de lubrification et d'absorption des chocs. Dans l'arthrose, la concentration en acide hyaluronique dans le liquide synovial est plus faible et son poids moléculaire est moins important. Ceci entraîne une diminution de sa viscosité. Une partie de ces modifications est imputable à la dépolymérisation des longues chaînes polysaccharidiques par des radicaux libres produits par les leucocytes et à l'épanchement articulaire qui diminue la concentration en acide hyaluronique. La « viscosupplémentation » consiste à injecter dans la cavité articulaire de l'acide hyaluronique de poids moléculaires variables. Elle est utilisée dans le traitement de l'arthrose.
- Propriétés antalgiques et anti-inflammatoires: l'acide hyaluronique inhibe la production des prostaglandines E2 dans le liquide synovial humain et régule de nombreuses activités cellulaires : inhibition du chimiotactisme, de la migration des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes, inhibition de la phagocytose par les macrophages. Il diminue la production de radicaux libres dans le liquide synovial.
- Propriétés chondroprotectrices: l'acide hyaluronique augmente l'activité métabolique du chondrocyte et du fibroblaste synovial. Un déficit en acide hyaluronique provoque des modifications de la matrice cartilagineuse avec dégradation des protéoglycannes. L'acide hyaluronique a donc un effet chondroprotecteur.
- Propriétés sur la cicatrisation: l'acide hyaluronique module la production fibroblastique et stimule la formation du tissu de granulation. Il jouerait un rôle dans le transport de facteurs de croissance dans le tissu néoformé, favorisant ainsi

les processus de cicatrisation.

b. Barrière de filtration et d'échanges : constitution du liquide synovial

La synoviale, et en particulier les cellules de l'intima, élaborent et également résorbent le liquide articulaire, qui est en faible quantité à l'état physiologique. Celui-ci est un dialysat de plasma sanguin auquel s'ajoute l'acide hyaluronique, on parle de liquide synovial ou de synovie. Il est présent dans l'espace articulaire délimité par la capsule articulaire, il provient essentiellement du sang en empruntant les capillaires présent dans la membrane synoviale. Cette même membrane synoviale sécrète, grâce aux cellules qui la composent, l'acide hyaluronique, conférant ainsi au liquide synovial une consistance visqueuse et des propriétés viscoélastiques. Sa composition dépend de la bonne santé de l'articulation. Le liquide synovial est un liquide qui joue un rôle de lubrifiant dans l'articulation et celui de liquide nourricier du cartilage.

Les échanges entre le sang et la cavité articulaire se font dans les deux sens à travers la barrière synoviale, sous l'effet des pressions hydrostatiques et osmotiques d'une part, et sous l'effet de barrières capillaires et interstitielles propres à la membrane synoviale d'autre part. Les cellules intimes, les macrophages et même les autres cellules mononucléées de la subsynoviale contrôlent également le transport de substances d'un compartiment à l'autre par pinocytose ou phagocytose.

La concentration en électrolytes est sensiblement identique dans le sang et le liquide synovial. La concentration en sucres du liquide synovial est plus faible (glucose, galactose, fructose), ainsi que celle des lipides. Trois fois moins de protéines sont trouvées dans le liquide synovial, ce sont les protéines de haut poids moléculaire qui semblent ne pas pouvoir franchir les différentes barrières.

Dans des conditions physiologiques normales, le liquide synovial comprend de l'acide hyaluronique, des protéines, principalement de l'albumine et de la γ -globuline, et de très faibles quantités de protéines de haut poids moléculaire, tels que le fibrinogène, les IgM, les inhibiteurs de metalloprotéases, et l' α_2 -macroglobuline. Il est constitué, par ailleurs, de cytokines, de collagènes, d'enzymes, de protéoglycannes et de ficonectines en faibles concentrations, d'électrolytes (NA^+ et Cl^-), de petites molécules comme l'urée et le glucose, et contient des lipides en très faibles quantités. Les constituants cellulaires du liquide synovial sont les leucocytes : lymphocytes, monocytes, synoviocytes de type A et polynucléaires.

Dans des conditions physiopathologiques, le liquide synovial présente des modifications de sa composition avec une diminution du poids moléculaire et de la concentration en acide hyaluronique (ce qui entraîne une baisse de la viscosité et de son élasticité), une augmentation de son contenu en protéines et en lipides avec notamment une hausse de la quantité de cholestérol estérifié, et une apparition de triglycérides. Une augmentation de ses constituants cellulaires est également retrouvée. Lors de pathologies articulaires, il est courant que la synovie soit produite trop abondamment, ce qui provoque un gonflement. L'épanchement synovial se caractérise par ce gonflement ou l'augmentation de volume du genou. Dans ce cas, il s'agit d'épanchement liquidien. L'épanchement synovial peut

être dû à un traumatisme, tel qu'une fracture ou une entorse, à la suite duquel le liquide peut devenir un mélange de synovie et de sang car en cas de rupture de ligament ou de fracture, les petits vaisseaux qui ont vascularisé le ligament et l'os saignent dans l'articulation. Ce phénomène s'appelle alors hémarthrose.

L'examen du liquide synovial se révèle être un bon outil de diagnostic des pathologies ostéo-articulaires. C'est pourquoi il peut être prélevé au cours d'analyses cliniques, en cas de suspicion d'atteinte de l'articulation. Plusieurs paramètres seront alors évalués : sa couleur, sa limpidité, sa viscosité, son contenu en protéines, sa cytologie (40), ainsi qu'un examen bactériologique.

c. Rôle dans la défense contre les agressions extérieures

Les synoviocytes de type A ont des caractères communs avec les cellules macrophagiques : elles contiennent un appareil de Golgi développé, des lysosomes ainsi que de nombreuses vésicules de pinocytose, suggérant une activité macrophagique vis-à-vis de petites particules ou des débris cellulaires et bactériens. Les cellules A sont renouvelées constamment. Les synoviocytes portent à leur surface des antigènes qui sont directement impliqués dans les processus pathologiques tels que la synovite rhumatoïde :

- antigènes HLA de classe II
- antigènes associés à la lignée leucocytaire et macrophagique : CD11b (CR3), CD13, CD14, CD16 (FcRIII), CD18, CD32 (FcRII), CD45 (« leucocyte common antigen »), CD54 (ICAM-1), CD64 (FcRI), CD68 et CD71 (récepteur de la transferrine)
- récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines : CD64, CD32, CD16
- molécules d'adhésion ICAM-1...

Ce rôle de défense contre les agressions extérieures joué par la membrane synoviale lui vaut de pouvoir être considéré comme un organe immunitaire (41).

D. L'os sous chondral

D'un point de vue biomécanique, l'os sous chondral constitue une zone de transition entre le tissu cartilagineux et l'os trabéculaire et joue ainsi un rôle primordial dans l'amortissement des chocs en minimisant le stress mécanique du tissu cartilagineux (50 % de l'amortissement articulaire). Il permet au même titre que le cartilage calcifié de transformer les forces de cisaillement en des forces de pression. L'os sous chondral est similaire à un os lamellaire tout en étant moins rigide. Sa force et sa rigidité croissent exponentiellement avec la densité du contenu minéral. L'épaisseur de l'os sous chondral varie entre 0,1 et 2mm et peut atteindre jusqu'à 3 mm dans les régions à fortes contraintes mécaniques (plateau tibial). Cette épaisseur varie d'une espèce à une autre, en fonction de l'âge, du poids, et de la localisation au sein même d'une articulation. Contrairement au tissu cartilagineux, l'os sous chondral est innervé et vascularisé. Si la vascularisation de l'os sous chondral semble jouer un rôle nutritif pour les couches profondes du cartilage et pendant la croissance, il est en revanche absent chez l'adulte. Le remodelage de l'os sous chondral diminue en cas d'activité physique et dans les

Etude bibliographique

zones à fortes contraintes mécaniques. En revanche, dans la maladie arthrosique, le remodelage osseux s'accélère avec une ostéoformation qui augmenterait au cours de la phase précoce de la maladie arthrosique pour diminuer ensuite à un stade plus avancé. L'augmentation du turn-over au cours des phases précoces, entraînerait une augmentation d'os osteoïde et une réduction de la minéralisation osseuse qui favoriseraient la diminution du module élastique.

II. Les pathologies articulaires inflammatoires

A. Introduction

Le cartilage articulaire et plus globalement les articulations, de par leur fonction, sont soumises à de nombreuses contraintes et sont par conséquent sujettes à diverses détériorations et pathologies. Ainsi, des facteurs mécaniques ou chimiques peuvent accélérer le processus de dégradation des structures articulaires. Il existe différentes pathologies susceptibles de les affecter, les principales étant l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde. Les principales atteintes arthrosiques sont représentées sur la **Figure 14**.

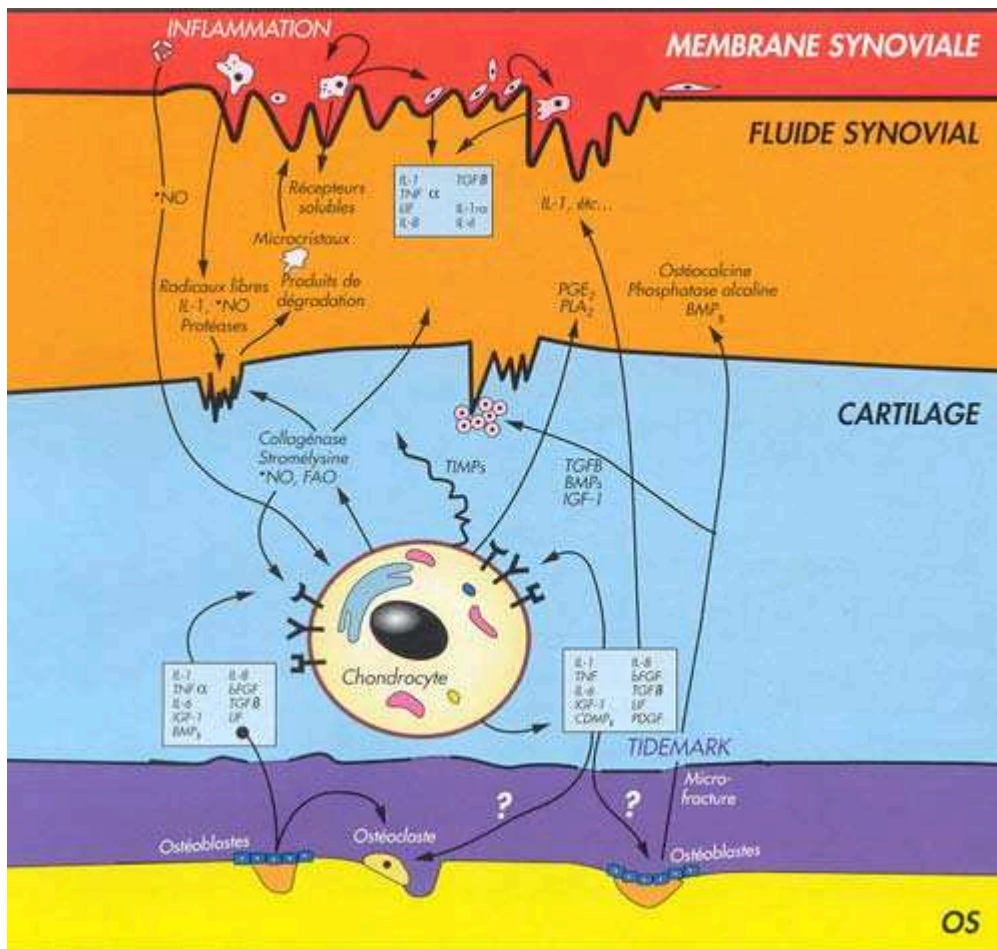


Figure 14 : Représentation schématique des affections et des mécanismes impliqués dans l'établissement de l'arthrose. <http://www.bcr.uilg.ac.be/images/boucles.png>

L'arthrose est une maladie articulaire dégénérative d'évolution chronique. Les atteintes arthrosiques sont consécutives à divers facteurs, les principaux pouvant être d'origine systémiques (génétique, âge, sexe, appartenance ethnique, état hormonal, densité osseuse, et facteurs métaboliques et nutritionnels) ou biomécaniques (obésité, déformation ou altération de l'articulation, faiblesse musculaire, activité physique intense). Il est important de noter que le rôle de la composante inflammatoire dans l'établissement et l'entretien de cette pathologie n'est pas clairement établi.

La polyarthrite rhumatoïde est pour sa part une affection inflammatoire articulaire (connectivite) qui se caractérise par sa capacité à détruire le cartilage, contrairement à la majorité des autres connectivites. Cette destruction touche à la fois le cartilage articulaire et l'os, se manifestant respectivement et cliniquement par un pincement articulaire (atteinte du cartilage articulaire) et des érosions osseuses. L'inflammation synoviale chronique est un des points clés de l'évolution de cette pathologie. Histologiquement, la dégradation articulaire s'initie lorsque le pannus synovial, prolifération pseudo-tumorale du tissu synovial, rentre en contact avec le cartilage et l'os au sein de l'articulation, comme en témoignent de nombreuses études (42). Celles-ci mettent en évidence une invasion du pannus dans les couches superficielles du cartilage articulaire. Les différents types cellulaires présents à cette interface pannus/cartilage comportent des fibroblastes, macrophages, mastocytes et polynucléaires neutrophiles. La place exacte de ces différentes cellules dans les mécanismes de dégradation du cartilage reste encore mal comprise. Les chondrocytes eux-aussi sont des acteurs de ce processus puisque la dégradation du cartilage peut se dérouler même en l'absence de pannus (43, 44). Leur activité métabolique est accélérée, mais sans doute beaucoup moins qu'au cours du processus arthrosique. Une représentation schématique des acteurs impliqués dans la physiopathologie de la PR est donnée sur la **Figure 15** ci-après.

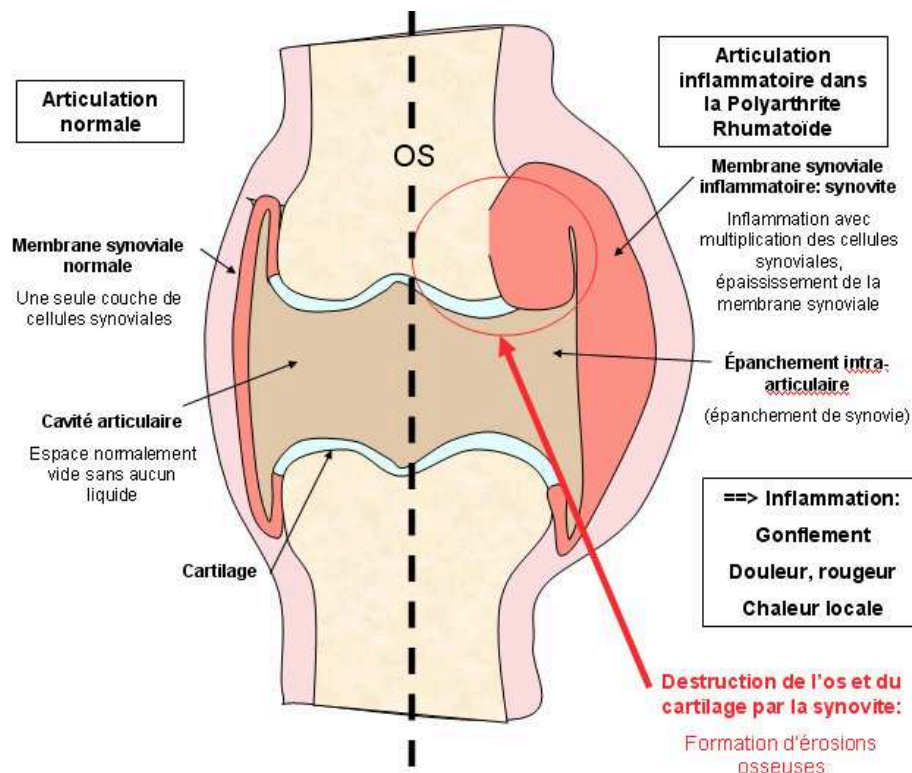


Figure 15 : Représentation schématique des principaux symptômes de la polyarthrite rhumatoïde au niveau de l'articulation (affection de la membrane synoviale et des structures cartilagineuses et osseuses). <http://www.rhumatologie-therapeutique-montpellier.fr/PR1.jpg>

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés essentiellement à la polyarthrite rhumatoïde (PR) étant donné le rôle central occupé par l'inflammation (et particulièrement le

TNF- α (45)) dans l'établissement de cette pathologie. C'est pourquoi nous ne traiterons que de la PR dans cette étude bibliographique.

B. Présentation de la PR et étiologie

1. Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est actuellement considérée comme le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires (prévalence = 0,4% de la population européenne et environ 150 000 à 250 000 malades en France). Elle se caractérise par une atteinte articulaire chronique, destructrice et déformante. La cavité synoviale est le siège d'une réaction inflammatoire excessive qui touche plus particulièrement la membrane synoviale composée de nombreuses cellules inflammatoires et de synoviocytes « fibroblast-like » (FLSs). Il se produit ce que l'on nomme communément un épanchement synovial qui s'accompagne d'une prolifération anormale des cellules de la membrane synoviale qui l'épaississent, on parle de « pannus synovial ». Les premiers signes avant-coureurs sont la douleur, la tuméfaction, la chaleur, la rougeur, la raideur matinale et la sensibilisation de certaines articulations. L'inflammation réduit la mobilité et peut se manifester de manière progressive ou brutale sous la forme de crises aiguës, puis de périodes de rémission.

D'une manière générale, on distingue 3 phases dans l'établissement de cette pathologie :

- La phase de début ; impliquant essentiellement l'immunité innée et multifactorielle. Il semble exister des facteurs :
 - **hormonaux** : 4 femmes pour 1 homme
 - **génétique** favorisant avec
 - un épitope partagé
 - un groupe tissulaire HLA de classe 2
 - **environnementaux**
 - infection
 - stress
 - alimentation
 - tabac

Une infection commune sur un terrain génétique prédisposé pourrait déclencher la maladie par mimétisme moléculaire de certains composants de ces agents infectieux avec des composants de l'articulation.

- La phase inflammatoire :

Cette phase est liée à la formation du pannus synovial. Lors de cette phase, l'immunité acquise occupe un rôle central en impliquant un complexe tricellulaire :

- **les cellules présentant l'antigène (CPA)**
 - lymphocytes B
 - macrophages
 - cellules dendritiques
- **les lymphocytes T**
- **les synoviocytes**

Au cours de cette phase, les cytokines pro-inflammatoires occupent une place centrale en tant que médiateur de la réponse inflammatoire. De très nombreuses cytokines sont impliquées, néanmoins jusqu'à présent, l'IL-1 β et le TNF- α semblent être les deux médiateurs pivot de ce processus inflammatoire.

- La phase de destruction articulaire :

Cette phase est secondaire à l'action de ces cytokines, et à la prolifération pseudo tumorale des synoviocytes. Il existe un défaut d'apoptose et production :

- de métalloprotéinases
- de cathepsine
- de collagénases

2. Etiologie

La synovite rhumatoïde est une pathologie inflammatoire d'étiologie variable et mal connue. Néanmoins on l'intègre dans la grande famille des maladies auto-immunes. Elle semble mettre en jeu des facteurs hormonaux et environnementaux (infections), sur terrain génétique prédisposé, la part de ce dernier dépassant vraisemblablement les 50% (46).

Facteurs hormonaux

La plus grande incidence de la PR chez la femme, avec un sex-ratio de un homme pour quatre femmes, suggère une implication des hormones dans le déclenchement de la PR. Les études épidémiologiques se sont intéressées à l'influence de la grossesse, de l'allaitement et des facteurs hormonaux endogènes ou exogènes comme facteurs de risques de la PR. Pendant la grossesse, le risque de développer une PR est faible, tandis que dans l'année qui suit le post-partum ce risque est nettement plus élevé (47). L'allaitement a été incriminé comme étant un facteur de risque, responsable de l'incidence plus élevée dans le post-partum. En effet, une étude portant sur 187 femmes qui avaient développé une PR après la première grossesse montre que celles qui avaient allaité leur enfant ont un risque cinq fois supérieur d'avoir une PR (48). Cette implication des facteurs hormonaux endogènes est soulignée par certaines études qui ont montré une hypoandrogénie relative chez les femmes mais aussi chez les hommes atteints de PR, avec des taux de testostérone et de déhydroépiandrostérone plus bas. Les hormones exogènes, que ce soit la pilule contraceptive ou le traitement hormonal substitutif, ne modifient pas l'incidence de la PR mais semblent retarder son début et sa sévérité (49).

Facteurs génétiques

Au départ, le principal argument pour une prédisposition génétique était l'agrégation familiale de cas de polyarthrite rhumatoïde. De plus, le taux de concordance pour la PR chez les jumeaux homozygotes atteints est en moyenne de 13 %. L'association génétique la plus forte est observée avec les gènes codant pour les molécules *human leukocyte antigen* (HLA) de classe II qui sont surtout exprimées à la surface membranaire des cellules présentant l'antigène (CPA). Ces molécules ont une structure dimérique composée de chaînes peptidiques α et β , avec un site de liaison pour les peptides antigéniques. Dans nos populations, la PR est associée aux allèles HLA-DRB1*0401, DRB1*0404 et DRB1*0101

dans 60% des cas. La présence d'une mutation sur le gène PTPN22 qui code une tyrosine phosphatase double également le risque de développer la maladie qui est parfois plus grave (50). Une mutation du gène TRAF1-C5 situé sur le chromosome 9 est également corrélée avec une forme plus sévère de la polyarthrite rhumatoïde (avec présence d'anticorps anti-CCP : cyclic citrullinated peptide) (51, 52).

Les molécules HLA codées par les allèles précédemment cités se caractérisent par une séquence commune d'acides aminés (QKRAA), située entre les positions 70 et 74 de la chaîne β et qui correspond également au site impliqué dans la reconnaissance antigénique (53). Cette séquence commune, appelée aussi « épitope partagé », pourrait être au cœur de la réaction auto-immune médiée par les lymphocytes T. Trois principaux modèles ont été proposés :

- l'épitope partagé pourrait reconnaître un peptide du soi et favoriser dans le thymus la persistance d'un clone de lymphocytes T autoréactifs par sélection clonale positive ; ce clone T autoréactif pourrait dans certaines conditions être activé et déclencher une réponse immunitaire spécifique contre ce peptide du soi.

- l'épitope partagé se lierait spécifiquement avec l'antigène responsable de la PR ; une étude récente a montré une affinité de l'épitope partagé pour les peptides citrullinés qui représentent un groupe de peptides candidats à l'initiation de la PR (54).

- l'épitope partagé interagirait avec un peptide antigénique exogène mais ayant une structure voisine à un peptide du soi. Cette théorie dite du « mimétisme moléculaire » a été observée pour une glycoprotéine du virus Epstein-Barr (la gp110), mais aussi pour la protéine ADN-J d'*Escherichia coli* et les protéines de choc thermique (*heat shock proteins* : HSP).

L'implication des allèles HLA-DRB1*04 et DRB1*01 dans la PR est également soulignée par l'association étroite entre ces allèles et la sévérité de la maladie. L'allèle DRB1*04 est pratiquement constamment retrouvé dans les PR agressives, avec des dégradations ostéo-articulaires plus précoces (55, 56) et plus importantes. L'allèle HLA-DRB1*01 semble également associé aux PR sévères, mais plus faiblement (57, 58). Le nombre d'allèles à risque dans le génotype du patient est corrélé avec la sévérité de la PR. La notion d'effet dose a été développée par les travaux de Weyand qui montrent que les patients homozygotes pour DRB1*04 ont un risque de développer une PR plus sévère que les sujets hétérozygotes pour cet allèle (57). D'autres polymorphismes génétiques ont été décrits pour des gènes impliqués dans la présentation antigénique comme HLADM, ou le récepteur FCcRIII des immunoglobulines (59), (60, 61) mais aussi pour des gènes codant pour des cytokines comme le tumor necrosis factor alpha (TNF- α), les interleukines (IL) 1 β , 4 et 10 (62-65). Ces polymorphismes génétiques représentent des facteurs pronostiques de sévérité. Ainsi, le polymorphisme du gène codant pour l'IL-1 β est associé à des PR plus érosives tandis que le polymorphisme du gène codant pour l'IL-4 est associé à des PR moins destructrices (64, 65).

Facteurs environnementaux

Les agents infectieux viraux (Epstein-Barr), bactériens (*E. coli*) et mycobactériens ont été incriminés dans le déclenchement de la PR. Une infection commune sur un terrain génétiquement prédisposé pourrait déclencher la maladie par mimétisme moléculaire de certains composants de ces agents infectieux avec des composants de l'articulation. La

protéine de choc thermique HSP65 a une structure voisine avec une protéine présente dans le cytoplasme des cellules de la couche bordante. L'HSP 70 d'*E. coli* est reconnue par l'épitope partagé de la molécule HLA-DR. Les souris immunisées avec *Mycobacterium tuberculosis* produisent des anticorps dirigés contre les HSP. Une réaction immunitaire croisée pourrait donc déclencher la réaction inflammatoire observée dans la PR. Les agents infectieux peuvent induire une réponse immunitaire innée par activation des *toll like receptors* (TLR) (66). Ces TLR reconnaissent des molécules exprimées par les micro-organismes : TLR4 est activée par les composants lipopolysaccharidiques de la membrane bactérienne et TLR9 interagit avec l'oligonucléotide CpG présent dans l'ADN bactérien.

D'autres facteurs environnementaux, comme le statut social, la vie urbaine par rapport au mode de vie rural, le régime alimentaire, ont été incriminés dans le déclenchement de la PR, mais sans que cela soit formellement prouvé. En revanche, deux études longitudinales confirmées par une étude sur les jumeaux ont montré un risque plus élevé de développer une PR chez les fumeurs (67).

Il apparaît donc ici que le déclenchement de la PR peut être d'origine multifactoriel. Cependant, les mécanismes immunologiques effecteurs impliqués dans l'établissement de cette pathologie sont constants, on retrouve ainsi :

- stimulation des lymphocytes T CD₄⁺,
- stimulation des lymphocytes B et différenciation en plasmocytes, responsables entre autres de sécrétion de facteurs rhumatoïdes et autres auto-anticorps
- sécrétion de cytokines pro-inflammatoires intra-articulaire, principalement le TNF- α , à l'origine des synovites et des érosions articulaires.

C. Inflammation de la membrane synoviale au cours de la PR (synovite rhumatoïde)

L'établissement de la polyarthrite rhumatoïde s'associe à une inflammation de la membrane synoviale, appelée synovite rhumatoïde, aboutissant secondairement à la destruction du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral.

1. Les cellules et les cytokines de la membrane synoviale inflammatoire.

Au cours de la PR, la membrane synoviale hyperplasique prend le nom de pannus. Ce tissu est le siège d'une intense infiltration cellulaire. Ainsi, on y retrouve les principales cellules de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ce pannus synoviale se caractérise également par la prolifération et l'hyperactivité des synoviocytes macrophagiques et fibroblastiques, traduisant un excès de cytokines pro-inflammatoires, au premier rang desquelles l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α).

Dans la PR, les synoviocytes macrophagiques (ou synoviocytes de type A) jouent un rôle central par leur fonction de phagocytose et de présentation des antigènes. Ainsi, le taux

de synoviocytes macrophagiques est directement corrélé avec la destruction articulaire. Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires en particulier de l'IL-1 β , qui inhibe la synthèse de protéoglycannes par le chondrocyte et induit la production de métalloprotéases, ainsi que du TNF- α , qui est à l'origine de la cascade cytokinique de l'inflammation. Les synoviocytes fibroblastiques (ou synoviocytes de type B) subissent une transformation phénotypique sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires, conduisant à l'expression de molécules d'adhésion, de métalloprotéases (MMP-1 et MMP-3 notamment), de nombreux proto-oncogènes inhibant l'apoptose et de médiateurs cytokiniques secondaires prolongeant l'inflammation. Le facteur de transcription NF κ -B semble occuper un rôle pivot dans ce phénomène en étant impliqué dans toutes ces voies de médiateurs secondaires, il est induit par l'IL-1 β et le TNF- α . Les synoviocytes fibroblastiques activent par ailleurs l'angiogenèse grâce à de multiples cytokines dont le TGF- β , l'IL-8 et le VEGF.

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, le profil cytokinique des lymphocytes T CD4+ (ou lymphocytes T auxiliaires) présents dans la membrane synoviale est essentiellement de type Th1 : forte production d'IFN- γ et de TNF- α et faible production d'IL-4 et d'IL-10. Les lymphocytes T CD4+ de type Th1 sont impliqués dans la réponse à médiation cellulaire par l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, l'activation des macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ils jouent par ailleurs un rôle dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et l'activation des ostéoclastes via une production abondante d'IL-17. L'orientation de la réponse lymphocytaire T CD4+ vers un profil de type Th1 est favorisée par les cytokines macrophagiques (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-15 et IL-18). Le rôle des lymphocytes B semble être aussi important que celui des lymphocytes T. La contribution du lymphocyte B implique notamment la fonction de présentation de l'antigène au lymphocyte T CD4+ induisant l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4+. Elle implique par ailleurs la production de facteurs rhumatoïdes par les plasmocytes infiltrant la membrane synoviale, pouvant induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, via la fixation des facteurs rhumatoïdes sur les récepteurs activateurs au fragment Fc des immunoglobulines exprimés par les cellules macrophagiques.

2. Les chondrocytes au cours de la polyarthrite rhumatoïde.

Dans des conditions physiologiques, les chondrocytes constituent l'unique type cellulaire du cartilage et assurent le renouvellement de la matrice cartilagineuse par sécrétion de collagène et de protéoglycannes. Dans la PR, l'hyperplasie et l'activation des chondrocytes par l'IL-1 β et le TNF- α produits au niveau du pannus synovial conduit à la sécrétion de prostaglandines (PGE2), de collagénase-1 (MMP-1), de stromélysine (MMP-3) clivant les protéoglycannes, de NO et de radicaux libres qui aboutissent à la destruction cartilagineuse, notamment caractérisée par une augmentation des lacunes péri-chondrocytaires.

3. Les ostéoclastes au cours de la polyarthrite rhumatoïde.

Au cours de la PR, les ostéoclastes sont les pivots de la destruction osseuse. Leur hyperactivité est induite par le TNF- α , l'IL-1 et les prostaglandines, via le système RANK/RANK ligand. Le TNF- α peut activer l'ostéoclaste soit directement, soit par induction de l'expression de RANK ligand (RANKL) sur la membrane des lymphocytes T activés, des synoviocytes, des ostéoblastes et des macrophages, qui se fixe au récepteur membranaire ostéoclastique RANK et entraîne l'activation cellulaire par l'intermédiaire du NF κ -B.

D. Aspects biochimiques de la destruction articulaire au cours de la PR

La dégradation du cartilage dépend de l'existence d'enzymes protéolytiques dont la synthèse et l'expression sont régulées par différents médiateurs locaux tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les prostaglandines, les produits de dégradation de la matrice, le complément, les dérivés oxygénés ainsi que les neuropeptides. Les enzymes protéolytiques se distinguent entre elles selon qu'elles agissent à pH acide ou neutre et selon leur site d'action intra ou extra cellulaire. Les aspartates protéases et les cystéines protéases sont actives à pH acide et ont une activité protéasique intracellulaire. Les métalloprotéases et les sérines protéases quant à elles sont actives à un pH neutre et dans le milieu extracellulaire (68).

1. Classification des métalloprotéinases

La famille des métalloprotéinases est composée de plus d'une vingtaine de protéines classées en cinq catégories qui sont : les collagénases, les stromélysines, les gélatinases, les métalloprotéinases membranaires (MT-MMPs) et les agrécannases. Les quatre premières constituent les métalloprotéinases matricielles (MMPs) tandis que les agrécannases font partie de la famille ADAMTSs (a disintegrin and a metalloprotease with thrombospondin motifs). Toutes ces enzymes ont un ou plusieurs substrats, et aucune n'est spécifique du cartilage : elles jouent un rôle important en effet dans le développement embryonnaire, la reproduction, la dissémination métastatique et le remodelage de nombreux tissus conjonctifs (69). On distingue trois domaines structuraux communs à toutes les métalloprotéinases matricielles (**Figure 16**):

- un pré-domaine, nécessaire à la maturation et à la sécrétion de l'enzyme hors de la cellule.
- un pro-domaine, qui, en contact avec le domaine catalytique, maintient l'enzyme dans un état inactif. Sa suppression est un pré-requis pour l'activation de l'enzyme ;
- un domaine catalytique, qui possède un atome zinc et est responsable de l'activité enzymatique.

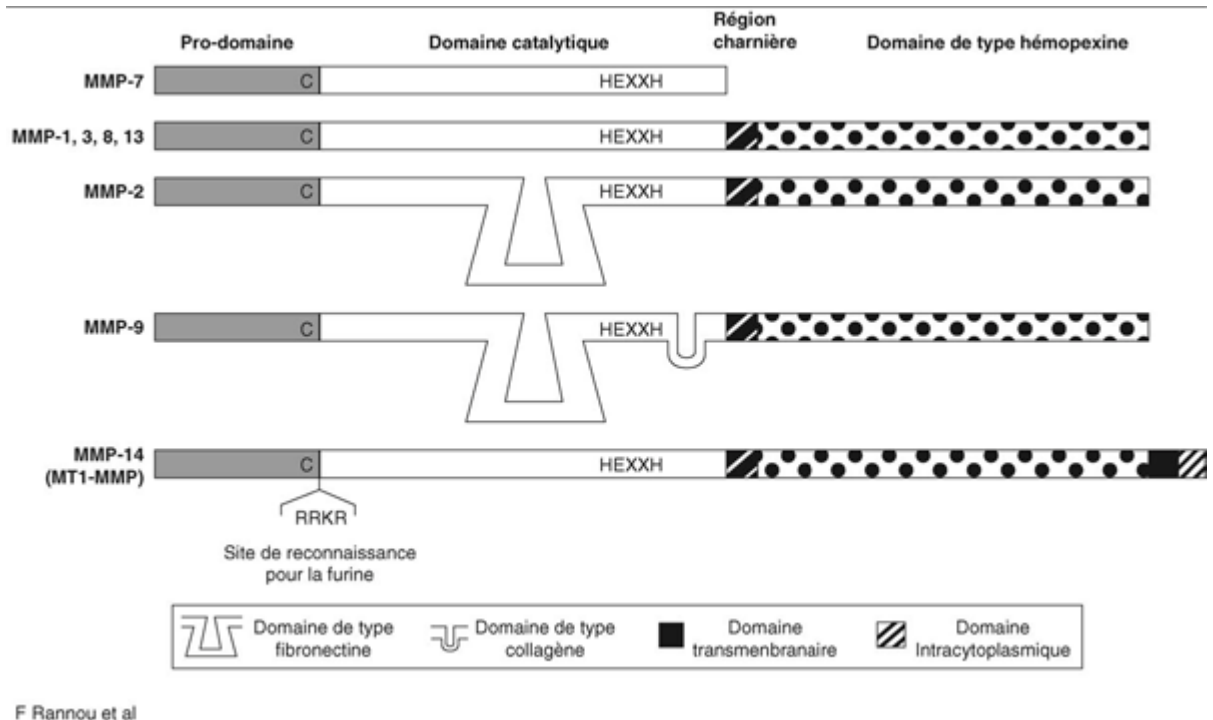


Figure 16 : Représentation schématique des domaines structuraux des métalloprotéinases (d'après Mort et al 2001 (70)). On distingue trois domaines structuraux communs à toutes les métalloprotéinases matricielles : Un pré-domaine, nécessaire à la maturation et à la sécrétion de l'enzyme hors de la cellule. Un prodomaine, qui, en contact avec le domaine catalytique, maintient l'enzyme dans un état inactif. Sa suppression est un pré-requis pour l'activation de l'enzyme. Un domaine catalytique, qui possède un atome zinc et est responsable de l'activité enzymatique.

L'organisation en domaine diffère selon les MMPs. De la région N terminale vers la région C terminale se trouvent : un pro-domaine qui doit être clivé pour l'activation de l'enzyme ; un domaine catalytique qui contient un atome de Zinc ; une région charnière, puis un domaine de type hémopexine présent uniquement chez certaines MMPs. La séquence HEXXH est retrouvée dans le domaine catalytique de toutes les MMPs de cette famille. Les MMPs-1, -8, et -13 sont les collagénases 1, 2 et 3. La MMP-3 est la stromélysine 1. Les MMP-2 et 9 sont les gélatinases A et B. La MMP-7 est la matrilysine. La MMP-14 est la métalloprotéase membranaire de type 1.

Il existe enfin un domaine C-terminal qui diffère selon les enzymes. Il est présent chez toutes les MMPs excepté les MMP-7 et MMP-26. Il présente une forte homologie avec une protéine sérique : l'hémopexine. Ce domaine variable confère des propriétés supplémentaires à la MMP : liaison transmembranaire (MT-MMPs) si un domaine hydrophobe est présent, ou interaction protéine-protéine, notamment lors de la liaison au substrat ou à des inhibiteurs naturels (71-73).

Les collagénases interstitielles (MMP-1,-8,-13) sont capables de dégrader les collagènes I, II, III, IV, et VII. Le collagène ainsi dénaturé par ces enzymes devient un substrat pour les gélatinases. Les stromélysines (MMP-3,-10,-11) se caractérisent par une moins grande spécificité car leurs substrats sont plus divers : protéoglycannes, gélatine,

fibronectine et collagène de type IX (69). Les gélatinases (MMP-2, et -9) dégradent le collagène interstitiel dénaturé et les collagènes de type IV et V. En outre de récents travaux ont montré une capacité des MMP-1,-3, et-13 à pouvoir dégrader également les PG. Ce clivage porte en particulier sur la partie C-terminale de l'agrécan et génère des monomères d'agrécanes déficient en chondroïtine-sulfate (74). Ce phénomène provoque donc un déroulement des agrégats et une élimination des glycosaminoglycanes dans l'articulation, contribuant ainsi à augmenter la réponse inflammatoire.

La caractéristique structurale de ces enzymes est de présenter un motif de trois séquences peptidiques répétitives analogue au motif de la fibronectine dans leur domaine catalytique. Les métalloprotéinases transmembranaires (MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25) peuvent se lier à la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un site hydrophobe. En dehors d'une gamme de substrat variée, ces MT-MMPs se caractérisent par leur capacité à activer d'autres MMPs. Par exemple, la MT-MMP-1 est capable d'activer les pro-MMP-2, -13.

2. Métalloprotéinases et dégradation matricielle du cartilage

L'implication des métalloprotéinases dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans la polyarthrite est fondamentale car elles sont capables de dégrader le collagène de type II et les agrégats (**Figure 17**). La dégradation du collagène de type II est un événement précoce et majeur. Elle survient le plus souvent dans la couche superficielle du cartilage et dans l'espace péri-cellulaire du chondrocyte (75, 76), et est un phénomène irréversible. Cette protéolyse permettrait le relargage de protéoglycannes qui seraient alors accessibles à leur tour à différentes protéases (75).

Le collagène fibrillaire de type II est dégradé dans un premier temps par les collagénases 1 (MMP-1) et 3 (MMP-13) (75, 77-79) qui sont exprimées à un taux élevé (80-82). Si la collagénase 2 (MMP-8) est exprimée *in vitro* par des chondrocytes stimulés par de l'IL-1 β , son implication *in vivo* reste débattue (83-85). Les MMP-1 et -13 ont des affinités différentes pour le collagène de type II et se distribuent différemment au sein de la matrice cartilagineuse : ainsi, les MMP- 1 et -8 sont exprimées essentiellement au niveau de la couche superficielle du cartilage alors que la MMP-13 est surtout retrouvée dans les couches profondes du cartilage (86, 87).

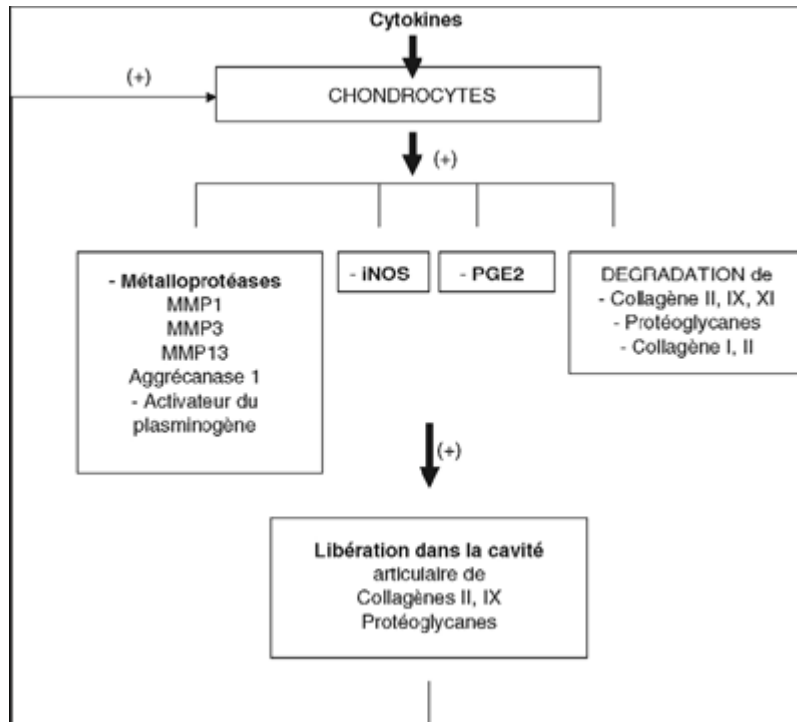


Figure 17 : Représentation schématique des effets des cytokines sur le cartilage.

Sous l'effet de cytokines, les chondrocytes expriment et synthétisent de nombreux médiateurs protéiques (protéases, iNOS) et lipidiques (prostaglandines -PGE2-) qui sont en partie à l'origine de la dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, la synthèse des protéines matricielles (collagène II et protéoglycannes) des chondrocytes est diminuée. La libération dans la cavité articulaire de fragments de matrice dégradée, est à l'origine d'une nouvelle stimulation chondrocytaire.

<http://www.rhumatologie.asso.fr/images/Pub-select/img-72-322-330.gif>

Cette dernière est la collagénase ayant la plus forte affinité pour le collagène de type II (88). Ces différences de localisation, d'activité et d'affinité pour le substrat suggèrent un rôle différent mais actuellement mal connu pour chacune de ces MMPs (80).

Une fois la protéolyse et la dénaturation achevée par ces trois MMPs, la triple hélice de collagène se désolidarise et les deux fragments résultants sont à leur tour les substrats d'autres MMPs, en particulier des gélatinases (79) dont deux types sont exprimés dans les chondrocytes : une forme inductible, la gélatinase B ou MMP-9 et une forme constitutive, la gélatinase A ou MMP-2 (89).

Des trois stromélysines connues (MMP-3, -10, et -11), seule MMP3 apparaît impliquée dans la dégradation de la matrice cartilagineuse (90).

Les métalloprotéines membranaires au nombre de quatre ont la particularité de posséder un domaine C terminal transmembranaire. Elles sont de découverte plus récente et leur rôle précis dans le cartilage n'est pas encore parfaitement bien connu. La MT1-MMP est exprimée par les chondrocytes articulaires et possède une activité collagénolytique mais qui ne semble pas différente dans un cartilage normal ou pathologique (91). Les MMPs membranaires 1 et 2 ont la particularité de pouvoir former un complexe trimoléculaire avec le

TIMP2 et la progélatinaseA ou la proMMP13, ce qui aboutit à l'activation de ces deux dernières MMPs (92).

En plus de l'activité collagénolytique, la protéolyse des agrécans est un événement fondamental. Cette dégradation des PG pourrait de plus faciliter la dénaturation du collagène de type II (93). De nombreuses enzymes ont la capacité de dégrader l'agrécane. Deux sites de clivage ont été identifiés dans le domaine IGD de la protéine core. Le premier est situé entre les acides aminés Asn341 et Phe342 et le second entre les acides aminés Glu373 et Ala374. Le premier site peut être clivé par des MMPs et en particulier les MMP-1, -3 et -13 (74) ainsi que par la cathépsine B (70).

Le deuxième site est caractéristique de l'activité protéolytique de deux enzymes connues depuis une dizaine d'années, mais qui n'ont été clonées que récemment : les agrécannases 1 (ADAMTS-4) et agrécannases 2 (ADAMTS-5) (94, 95). Les ADAMTS représentent un sous-groupe de la famille des ADAMs (pour A Disintegrin And Metalloproteinase) qui se caractérise par la présence, en plus des domaines communs à toutes les ADAMs, d'un domaine de répétition du motif thrombospondine de type 1 (TSP-1) (96). Ces deux agrécannases ont des profils d'expression différents puisque ADAMTS-5 est constitutive, tandis qu'ADAMTS-4 est inductible et est présente dans les chondrocytes arthrosiques, ce qui suggère ici un rôle différent pour ces deux protéases (95-97).

a. Contrôle de la régulation des métalloprotéinases

Le contrôle de la régulation de ces métalloprotéinases dans le cartilage peut se faire à trois niveaux : l'activation des proenzymes, le contrôle de la synthèse (transcription), l'inhibition des formes actives par des antagonistes naturels (TIMPs) :

b. Contrôle de l'activation du pro-enzyme

L'activation des MMPs, qui nécessite le clivage du prodomaine, est un mécanisme important contrôlant l'activité des MMPs dans le cartilage (98). Cette étape d'activation de la pro-enzyme peut être réalisée par de nombreuses molécules, incluant les MMPs elles-mêmes: par exemple, la MMP- 3 peut activer les proMMP-1, -8 et -13 et la MT1-MMP en association avec la MMP-2 peut cliver la proMMP-13 (99). Les molécules qui semblent les plus impliquées dans ces activations sont le système plasminogène/plasmine avec ces activateurs et ses inhibiteurs.

c. Contrôle de l'expression des gènes codant les MMPs

L'activation des MMPs est en grande partie sous le contrôle positif de cytokines, et parmi elles, l'IL-1b et le TNF α . Ces cytokines après fixation à leur récepteur membranaire sont à l'origine du recrutement de cascades de signalisation (100): très en amont du signal, se produit l'activation de TAK-1 (TGF β activating kinase), une kinase située au carrefour des deux grandes voies de transduction du signal : la voie I κ -B kinase qui induit l'activation de NF κ B et la voie des MAP kinases (mitogen activated protein kinase) (101, 102) qui aboutira à l'activation d'AP-1(**Figure 18**).

La voie MAPkinase. L'activation chondrocytaire

TAK-1 par l'IL-1 β ou le TNF- α va être à l'origine d'une cascade de phosphorylation de différentes kinases (103) : l'activation de MAPK kinase kinases (MAPKKKs) va induire la phosphorylation de MAPK kinases qui, en retour, vont activer le complexe MAPkinase composé de JNKs (C-Jun N terminal Kinase), ERKs (extrasignal regulated kinase) et de p38 kinases. Ce complexe, une fois activé, est transloqué dans le noyau puis permet la phosphorylation et l'activation de différents facteurs transcriptionnels tels que AP-1 ou C/EBP (104). Les trois voies MAPK, JNK, ERK1/2 et p38 MAPK peuvent être activées par l'IL-1 β dans les chondrocytes (105, 106). Les voies JNK et p38MAPK interviennent dans l'activation de la MMP-13, alors que l'expression de la MMP-1 passe par les voies p38 et probablement ERK (79, 107).

La voie I κ B Kinase.

Une autre voie majeure de signalisation des cytokines, et en particulier de l'IL-1 β , implique la translocation des membres de la famille NF κ B (Nuclear Factor- κ B) du cytoplasme vers le noyau. Après liaison à son récepteur, l'IL-1 β active la TAK-1, qui, à son tour, va activer NIK (NF κ B inducing kinase) qui sera à l'origine de la phosphorylation et de l'activation de l'inhibiteur de κ B (I κ B) (100, 108) via l'activation de IKK (NF κ B inducing kinase). L'activation de NF κ B résulte d'une maturation progressive par protéolyse de la protéine p105 en sous-unité p50 et de la protéine inhibitrice I κ B. À l'état basal, I κ B se lie au facteur transcriptionnel NF κ B, composé classiquement des sous-unités p105 et p65 (109). La phosphorylation de I κ B induit son ubiquitinylation, et donc sa dégradation dans le protéasome, dans le même temps p105 est protéolysé en p50. Ces deux événements permettent la libération du complexe NF κ B (p50/p65) et sa translocation dans le noyau où il pourra activer ses gènes cibles. Dans les chondrocytes, cette voie est nécessaire pour l'expression de la MMP-13 et est aussi impliquée pour la transcription de la MMP-1 (79, 104, 110, 111).

La voie AP-1

Les facteurs de transcription Activator Protein-1 (AP-1) sont issus de la combinaison entre les homo et les hétérodimères des membres de la famille Fos et de la famille Jun. Les membres de ces deux familles sont d'une abondance variable en fonction des tissus, ce qui conditionne la nature de leurs interactions avec les autres régulateurs transcriptionnels. L'activité d'AP-1 et ces interactions avec d'autres signaux dépendent du rapport spécifique de Jun/Fos et cela quel que soit le type cellulaire. Une telle complexité, implique donc que les associations entre les différents membres des familles Jun et Fos possèdent des fonctions opposées ou bien au contraire des fonctions redondantes. AP-1 participe à de nombreuses régulations comme la prolifération, la différenciation, la réponse immunitaire, ou bien la réponse à un stimulus d'un stress ou d'un agent génotoxique. (Pour revue (112)). À chacune de ces situations physiologique ou physiopathologique correspond donc une combinaison des membres des familles Jun et Fos, ce qui détermine une partie de la réponse cellulaire. AP-1 est composé des membres de la famille Jun (c-Jun, JunB, et JunD) qui peuvent former des homo- ou hétérodimères entre eux. Jun peut également se dimériser avec des membres de la famille Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2). Enfin Jun et Fos peuvent interagir avec d'autres

facteurs de transcription comme ATF : activating transcription factor) (113) ou MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma) (114). Les deux familles de protéines Jun et Fos appartiennent à la famille des facteurs de transcription de type « basic leucine-zipper » (bZIP) c'est-à-dire, que leurs domaines de liaison à l'ADN est caractérisé par de fortes charges basiques. Pour se lier à l'ADN, la dimérisation est nécessaire, et permet la reconnaissance d'un motif nucléotidique palindromique de type : TGAC/GTCA (115). Les différents dimères AP-1 présentent une spécificité de liaison identique à l'ADN, mais varient dans leur efficacité de transactivation (116).

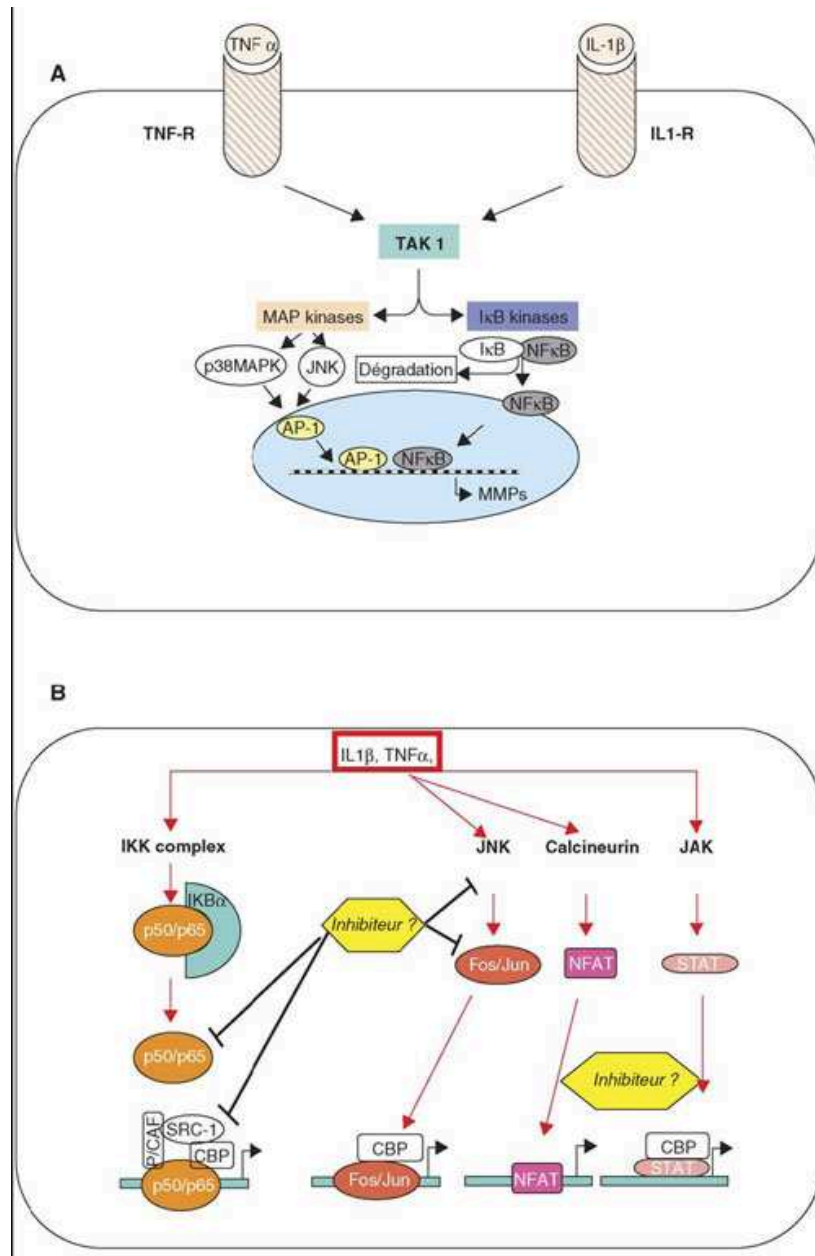


Figure 18 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression des MMPs.

A. Sous l'effet de l'IL-1β et/ou du TNF-α, les complexes multiprotéiques des récepteurs à ces deux cytokines vont activer TAK-1 qui en retour, va activer les deux grandes voies de signalisation IκB kinase et MAPKinase. Cette activation va aboutir aux recrutements nucléaires de différents facteurs

transcriptionnels comme AP-1 ou NF κ B qui vont réguler positivement la transcription des gènes MMPs. B. Sites potentiels d'inhibition des voies de signalisation AP-1, NF κ B, STAT et NFAT. (Modifié d'après Delerive P 2001 (117)). Une meilleure connaissance des voies de signalisation intracellulaires aboutissant à la synthèse et à l'activation des enzymes dégradant le cartilage devrait permettre de trouver de nouveaux inhibiteurs.

Le premier élément de réponse caractérisé pour AP-1 est situé dans le promoteur de la métallothionéine I. Il correspond à un élément de réponse pour un ester de phorbol (le 12-Otétracyclodécanylphorbol-13-acétate ou TPA), il a donc été nommé TPA responsive element (TRE) (118, 119). L'activité de liaison d'AP-1 à ce TRE est fortement induite par des facteurs de croissance, mais également par des cytokines. L'implication directe d'AP-1 a été mise en évidence lors de la transcription des MMP-1, -3, et -13 soit par des facteurs de croissance comme le « basic fibroblast growth factor » (FGF2) (120), soit par des cytokines comme l'IL-1 ou l'IL-17 (121). Un travail de Uria *et al.* (1998) (122) montre que chez l'Homme, il existe une similarité de structure dans la région proximale des promoteurs de la MMP-1 et de la MMP-13, dans laquelle se situe au même niveau, un site AP-1 de -66 à -72 pour la MMP-1 et de -44 à -50 pour la MMP-13. Ces sites correspondent en fait à des séquences ADN composites, PPRE/AP1, pouvant lier le facteur AP-1 mais aussi d'autres facteurs de transcription tels que les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyssomes (PPARs). Un travail récent montre que des activateurs synthétiques de haute affinité pour PPAR γ (rosiglitazone) inhibent la dégradation des protéines matricielles induite par IL-1 β dans les chondrocytes *in vitro*. Cet effet est lié à l'inhibition de l'expression des MMP-1, -3 et -13 par PPAR γ qui entre en compétition avec le facteur AP-1 sur le promoteur des MMPs (123). PPAR γ est donc un bon exemple de facteur, présent dans le cartilage, pouvant s'opposer à la dégradation des protéines matricielles, en agissant au niveau d'une des voies de signalisation principales des cytokines [revue dans (117)] (**Figure 18**).

d. Les inhibiteurs de métalloprotéinases matricielles

Il existe physiologiquement plusieurs molécules antagonistes qui sont aussi impliquées dans la fibrinolyse. Ce sont l' α -2 macroglobuline, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, l' α -2 antiplasmine et l' α -1 antitrypsine (124). La capacité d'inactivation des MMPs par ces inhibiteurs est cependant limitée. Les inhibiteurs spécifiques des métalloprotéinases sont les TIMPs au nombre de quatre : TIMP-1, -2, -3, -4. Ils forment un complexe équimolaire avec les formes actives des MMPs. Dans ces complexes, le domaine amino-terminal des TIMPs se lie au domaine catalytique des MMPs et, de ce fait, bloque l'accès à la poche contenant l'atome de zinc (125). Ces complexes sont stables et irréversibles. Tous les TIMPs sont capables d'inhiber l'activité des MMPs mais avec un certain degré de spécificité : par exemple le TIMP2 mais pas le TIMP1, inhibe la MT1-MMP. De plus, ils sont capables de lier des pro-MMPs : par exemple, les TIMP2, 3, 4 peuvent lier la pro-gélatinase A, les TIMP 1 et 3 la pro-gélatinase B (126, 127).

Dans le cartilage pathologique, il existe une augmentation d'expression des TIMPs 1, 3 et 4 (127-130) mais qui ne parviennent cependant pas à bloquer complètement l'augmentation des activités protéasiques. Il existe en effet un déséquilibre entre l'activité des TIMPs et l'activité

des MMPs au profit de cette dernière (128, 131, 132). Le TIMP2 a une expression constitutive dans les chondrocytes (133) et ne peut donc pas jouer de rôle important dans une situation d'hypercatabolisme. L'utilisation de TIMP1 et/ou du TIMP2 *in vitro* sur des chondrocytes en culture ou sur des explants cartilagineux n'a pas toujours mis en évidence la capacité de ces inhibiteurs à s'opposer aux effets de l'IL-1 β sur la dégradation de la matrice (134). De plus, il a récemment été montré que la surexpression de TIMP1 par thérapie génique dans un modèle d'arthrite au collagène pouvait avoir des effets opposés à ceux attendus (135).

E. Médiateurs de l'inflammation et dégradation cartilagineuse au cours de la PR.

Les relations entre inflammation et dégradation articulaire restent encore mal comprises. Les constatations cliniques de PR avec destruction articulaire sans signes inflammatoires locaux et de PR très inflammatoires sans aucune destruction ne sont pas si rares et posent la question des rapports entre médiateurs de l'inflammation et médiateurs de la dégradation. C'est ainsi qu'expérimentalement l'interleukine-1 beta (IL-1 β) semble plutôt lié à la dégradation articulaire et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) plutôt à l'inflammation. Cette notion est confirmée expérimentalement puisqu'un traitement par un antagoniste de l'IL-1 β , l'IL-1RA, dans un modèle murin de polyarthrite inhibe la dégradation du cartilage en diminuant l'activité métalloprotéase sans pour autant modifier les paramètres de l'inflammation (136). Cependant, les biothérapies anti-TNF- α actuelles mettent en évidence un effet significatif de ces traitements sur la dégradation articulaire (137-139). Ces résultats suggèrent que tous ces médiateurs agissent en réseau, l'inhibition de l'un d'entre eux pouvant avoir des conséquences sur l'ensemble du réseau, le TNF- α se trouvant en amont de cette cascade cytokinique.

Il en va très certainement de même pour les éicosanoïdes, dérivés lipidiques issus des acides gras à 20 atomes de carbone, qui s'organisent aussi en un réseau encore moins bien élucidé aujourd'hui que le réseau cytokinique. Certains éicosanoïdes ont des propriétés pro-inflammatoires alors que d'autres possèdent une activité anti-inflammatoire. Leur effet sur la dégradation articulaire reste obscur, sauf pour la PGE2 (prostaglandine E2) qui paraît bien être un médiateur impliqué dans ce processus. Des souris génétiquement délétées pour l'un des récepteurs membranaires à la PGE2 (EP4) deviennent insensibles à l'arthrite au collagène (140). Cet effet pourrait être médié par la prostaglandine E synthétase microsomale (mPGES-1), enzyme participant à la dernière étape de la synthèse de la PGE2. En effet, les souris génétiquement délétées en mPGES-1 ne développent plus d'arthrite au collagène (141). Une voie de recherche intéressante concerne les effets anti-MMPs des ligands de haute affinité de PPAR γ (thiazolidinediones) sur les chondrocytes *in vitro*, alors que ces molécules n'ont pas d'effets anti-inflammatoires (123). Les études actuelles sont orientées vers la recherche du(es) ligand(s) naturels de ces facteurs (117).

Les principaux médiateurs inflammatoires impliqués dans la communication intercellulaire au cours de la PR sont représentés sur la **Figure 19**.

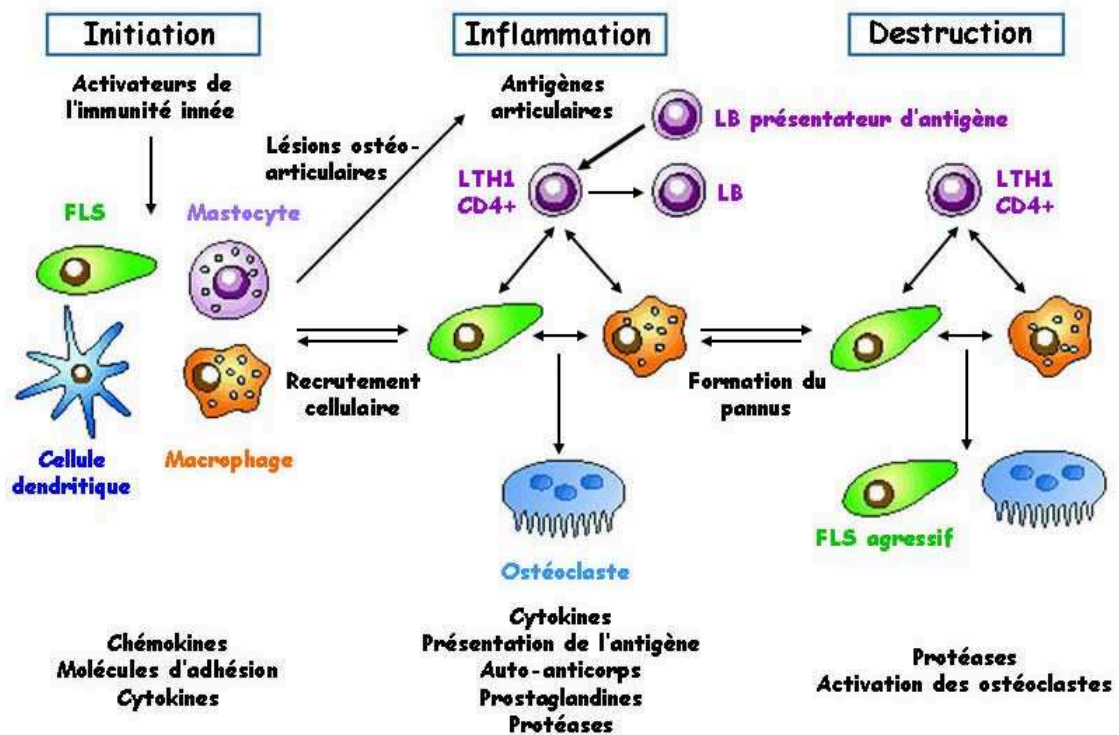


Figure 20 : Phases de la pathogénie de la PR (d'après Firestein et Zvaifler 2003 (143, 144)).

Les différents processus ne s'excluent pas mutuellement. L'activation de l'immunité innée et adaptative peut avoir lieu en parallèle (flèches bidirectionnelles).

Nous nous intéressons ici au rôle que pourrait jouer l'immunité innée dans l'initiation et la pérennisation de la réaction inflammatoire articulaire observée au cours de la PR. Comme cela est suggéré sur la figure précédente, le déclenchement de la polyarthrite rhumatoïde passe par une activation des synoviocytes « fibroblast-like ».

De nombreux constituants bactériens ou PAMPs (pathogen associated molecular patterns) ont été identifiés dans la cavité synoviale. En interagissant avec différents PRRs (pattern-recognition receptors), ils pourraient contribuer à la réponse inflammatoire synoviale. Il a récemment été étudié dans quelle mesure la stimulation des FLSs rhumatoïdes par un PAMP présent à la surface de streptocoques oraux (la protéine I/II) pourrait intervenir dans l'acquisition du phénotype « agressif » de ces cellules résidentes de la membrane synoviale qui jouent un rôle essentiel dans l'étiopathogénie de la PR.

Il a été montré que la stimulation des FLSs par la protéine I/II induit la synthèse et la libération de cytokines telles l'IL-6 et l'IL-8 qui sont impliquées dans l'activation et le recrutement cellulaire. Les FLSs ainsi activés ne libèrent pas de TNF- α ni d'IL-1 β , cytokines qui jouent un rôle fondamental dans la PR. Il a également été montré que bien que la protéine I/II induit l'ARNm de l'IL-18 dans ces cellules, les FLSs ne produisent ni ne libèrent cette cytokine du fait de la non traduction de cet ARNm en pro-IL-18. Ces résultats ont été confirmés dans une étude plus globale de la réponse des FLSs de patients polyarthritiques, réalisée par cDNA array. La protéine I/II stimule en outre l'expression de plusieurs gènes pouvant contribuer au caractère agressif des FLSs de patients atteints de PR, notamment

l'expression et la libération de métalloprotéase (MMP) 3, enzyme clé de la destruction du cartilage (**Figure 21**). Il est ainsi démontré que même si la réponse des FLSs à la protéine I/II est restreinte comparée à celle obtenue avec des macrophages, la stimulation de ces cellules par des composants bactériens présents dans la cavité articulaire pourrait contribuer aux deux phénomènes pathogéniques de la PR, l'inflammation et la destruction articulaire.

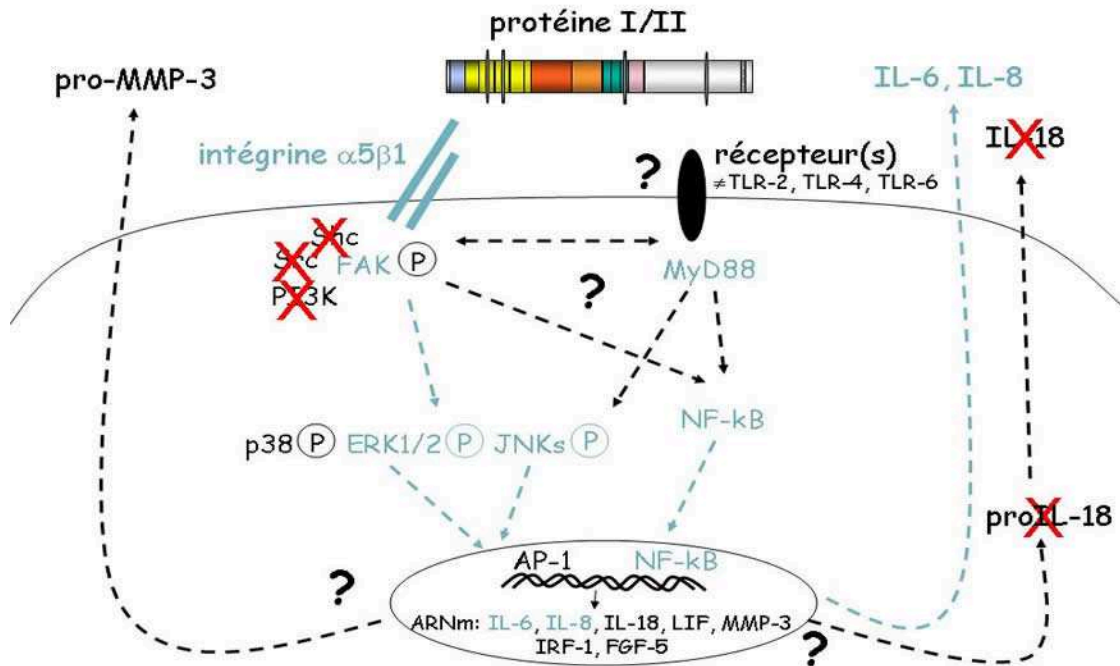


Figure 21 : Schéma récapitulatif. En bleu : voies de signalisations activées par la protéine I/II et menant aux cytokines pro-inflammatoires.

http://www.gremi.asso.fr/_/Prix%20GREMI%202005.htm

Par l'étude des voies de signalisation activées par la protéine I/II dans les FLSs rhumatoïdes, il a été mis en évidence que l'intégrine $\alpha5\beta1$ est un récepteur de la protéine I/II à la surface des FLSs. De plus, la FAK (focal adhesion kinase) joue un rôle clé dans les voies de signalisation conduisant à la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 induite par la protéine I/II. Cette synthèse fait également intervenir les MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ERK1/2 et JNKs, une augmentation de l'activité de liaison d'AP-1 et la translocation nucléaire de NF- κ B. La FAK qui jusqu'à présent était surtout associée à des fonctions telles l'adhésion, la différenciation cellulaire et l'apoptose jouerait donc également un rôle important dans la réponse inflammatoire. Il a également été montré que MyD88, protéine adaptatrice essentielle de la voie des TLRs (Toll-like receptors), est impliquée dans la synthèse de cytokines induites par la protéine I/II.

Cytokines induite par la protéine I/II.

Il apparaît donc que des interactions PAMPs-PRRs variées pourraient contribuer à l'activation in situ des FLSs et constituer un événement majeur dans l'initiation de l'inflammation synoviale et de sa réactivation chez des personnes présentant des

prédispositions génétiques à développer une PR. Cette hypothèse implique donc non pas un antigène spécifique mais une variété d'antigènes qui favoriseraient par stimulation de l'immunité innée le recrutement, l'activation des LT et la rupture de la tolérance au soi.

La description récente d'un modèle murin d'arthrite induite par des immunoglobulines pathogènes reconnaissant l'enzyme ubiquitaire glucose-6-phosphate isomérase (GPI), le modèle K/BxN, a ouvert une nouvelle hypothèse concernant la dégradation du cartilage au cours de la PR (145, 146). Dans ce modèle, la GPI se dépose en grande quantité à la surface du cartilage et se colocalise avec des IgG et du complément C3. Ainsi, l'hypothèse proposée serait que des complexes GPI-anti-GPI se formeraient à la surface du cartilage, initiant une cascade inflammatoire par l'intermédiaire de la cascade du complément. Les cellules ainsi accumulées au contact du cartilage produiraient les médiateurs décrits dans le chapitre précédent (147). En fait, plusieurs travaux antérieurs suggéraient déjà fortement un rôle pathogène d'autres anticorps dirigés contre différents antigènes issus du cartilage, comme le collagène de type II (148) ou YKL-39 (149).

Il apparaît donc que les lésions engendrées par cette pathologie affectent tous les tissus articulaires. Il semble qu'une prise en charge efficace de cette affection nécessite des outils diagnostiques permettant d'évaluer l'état d'avancement de la pathologie de manière précise et précoce. Pour ce faire la Tomographie par émission de positons (TEP) est une technologie émergente et prometteuse dans le domaine des pathologies inflammatoires(150).

G. L'imagerie dans le diagnostic des pathologies inflammatoires articulaires.

1. Explorations radiologiques devant une suspicion de PR débutante.

L'imagerie occupe une place essentielle dans le diagnostic et la prise en charge de la plupart des affections rencontrées en rhumatologie. À l'heure actuelle, différentes méthodes de diagnostic par l'image permettent d'évaluer les processus inflammatoires et infectieux. Dans le cadre des affections articulaires, sont utilisées principalement l'imagerie par rayons X, l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec produit de contraste et la tomodensitométrie. Devant une suspicion de PR, les premiers examens réalisés sont des radiographies des mains, des poignets et des pieds ainsi qu'une radiographie de thorax.

Ces examens sont réalisés dans le but d'éliminer d'autres diagnostics (recherche d'adénopathies sur la radiographie de thorax pouvant faire évoquer une sarcoïdose, lésion de chondrocalcinose, etc.), de rechercher la présence d'érosions caractéristiques des articulations des mains et des pieds et de servir de référence pour la surveillance évolutive ultérieure. L'utilisation de l'échographie des mains ou des pieds et de l'IRM se développe actuellement dans le but de confirmer ou de montrer précocement l'existence d'une synovite ainsi que l'absence ou la présence d'érosions articulaires. Les signes caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde apparaissent souvent après 6 mois à un an d'évolution. La radiographie normale ne permet donc pas d'écarter le diagnostic, surtout au stade précoce. Il faut donc systématiquement et régulièrement pratiquer des radiographies des mains, des poignets et des

pieds. Les signes élémentaires caractéristiques sont l'apparition d'érosion périarticulaire au niveau des zones de réflexion de la synoviale puis l'apparition de géodes intraosseuses juxta-articulaires. Secondairement, apparaît un pincement articulaire consécutif à la destruction cartilagineuse.

Ces lésions sont, de façon caractéristique, retrouvées de façon initiale aux pieds (tout particulièrement la 5^{ème} tête métatarsienne), aux mains et aux poignets. L'association érosion-géode (qui tendent à s'aggraver rapidement au début de la maladie) et pincement articulaire fait tout le pronostic de la polyarthrite, traduisant la destruction articulaire. L'évolution radiographique est relativement linéaire mais progresse très rapidement pendant les deux ou trois premières années. L'exploration radiographique standard doit être effectuée au diagnostic puis de façon régulière : il s'agit d'un élément pronostique et de suivi évolutif.

Si la radiographie standard reste l'examen de base du suivi pour détecter une érosion constituée ou un pincement articulaire, elle ne suffit aujourd'hui plus. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) apparaît comme un outil plus précis d'évaluation de la progression de la maladie que la radiographie standard ou les signes cliniques. Selon la société française de rhumatologie, l'IRM peut être utile au cours de la polyarthrite rhumatoïde dans certaines circonstances particulières (début de la maladie, doute sur une évolutivité inflammatoire). Cette technique permet de voir l'inflammation et des lésions assez caractéristiques de la maladie non visibles sur les radiographies classiques. Une IRM peut aussi parfois être réalisée dans les rares cas où existe un doute sur une évolutivité inflammatoire pour conclure définitivement avant de renforcer le traitement le cas échéant. Des conclusions étayées par plusieurs études tant pour le diagnostic précoce que le suivi des traitements.

Si l'imagerie conventionnelle permet désormais une visualisation anatomique précise des lésions, il lui reste très difficile de discriminer les lésions évolutives « actives » des lésions séquellaires. Le couplage d'une information anatomique et d'une information métabolique fonctionnelle est désormais possible grâce à l'imagerie par émission de positons (TEP).

2. La tomographie par émission de positons.

Outre les indications oncologiques pour lesquelles elle est essentiellement utilisée (151-153), la TEP au ¹⁸F-FDG pourrait avoir un intérêt tout particulier dans l'exploration des pathologies infectieuses et inflammatoires, notamment dans les vascularites (154) et les pathologies articulaires inflammatoires (155, 156).

Mécanismes de captation du ¹⁸F-FDG dans les phénomènes inflammatoires et infectieux

Les phénomènes inflammatoires sont dits aigus ou chroniques en fonction de leur durée. Ces deux phases présentent des différences microscopiques en termes de changements tissulaires. Dans l'inflammation aiguë, on constate une réponse vasculaire précoce avec vasodilatation et exsudat de protéines plasmatiques résultant de la lésion produite sur l'endothélium. Cette augmentation de la perméabilité de l'endothélium permet aux leucocytes (essentiellement des neutrophiles et certains monocytes) de s'échapper du milieu vasculaire vers le parenchyme tissulaire. Cette migration est facilitée par l'existence de facteurs chimiotactiques liés à des

bactéries ou à du tissu nécrotique. Lorsque les cellules phagocytaires (essentiellement des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes) sont soumises à certains stimuli, elles commencent à métaboliser une grande quantité de glucose par glycolyse aérobie ou anaérobie. Il se produit alors une « activation » de ces cellules (certaines publications nomment ce phénomène l'« explosion respiratoire ») et les mécanismes de défense cellulaires se déclenchent : migration, production de microbicides et phagocytose. Cette réaction a pour conséquence l'augmentation de la captation cellulaire de ^{18}F -FDG, par ailleurs facilitée par l'augmentation de l'affinité des transporteurs pour le glucose sous l'effet de cytokines et de facteurs de croissance (157). Il n'y a pas de différence essentielle entre les mécanismes de captation et de piégeage métabolique du ^{18}F -FDG dans les cellules inflammatoires ou néoplasiques (158). L'accumulation du radiopharmaceutique au sein des cellules est due, dans les deux cas, à l'augmentation du nombre de transporteurs membranaires, à la consommation élevée d'énergie cellulaire et à l'impossibilité de métaboliser le glucose fluoré.

La captation du FDG s'appuie donc sur le fait que les cellules mononucléaires et les granulocytes (cellules impliquées dans les réactions inflammatoires) utilisent de grandes quantités de glucose au travers de la voie des pentoses phosphates. De plus, le ^{18}F -FDG a la particularité de s'accumuler dans les cellules du fait de son métabolisme cellulaire (**Figure 22**).

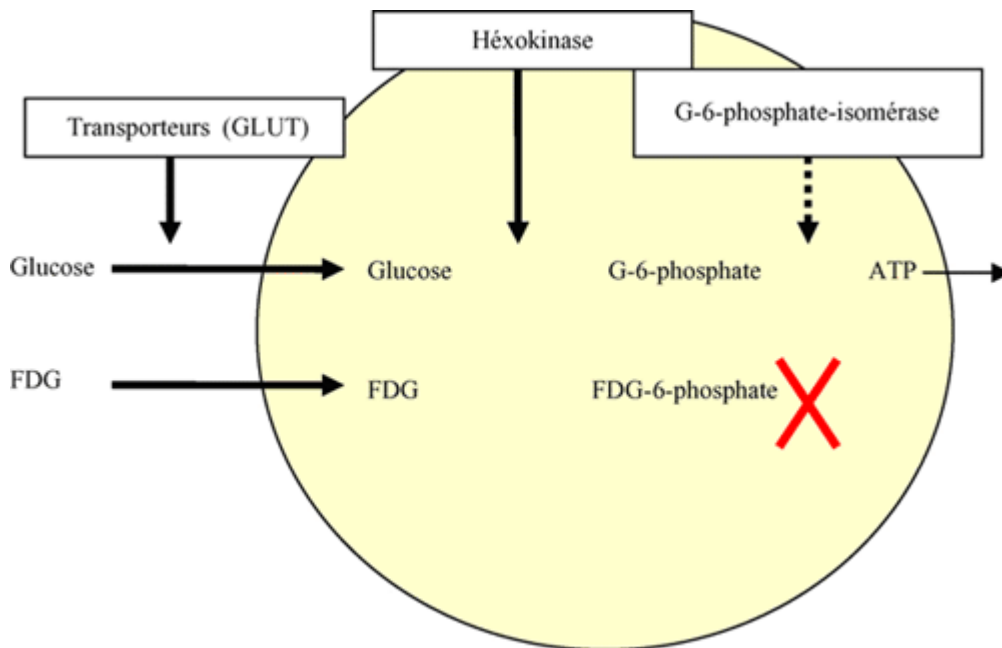


Figure 22 : Métabolisme cellulaire du fluorodéoxyglucose (FDG). N'étant pas métabolisable, le FDG-6-phosphate s'accumule dans les cellules.

À l'instar de son analogue, le 2-déoxyglucose, le ^{18}F -FDG franchit la membrane cellulaire par diffusion facilitée à l'aide d'un transporteur. Il est ensuite phosphorylé en ^{18}F -FDG-6-phosphate (^{18}F -FDG-6-P) par l'hexokinase. Cependant, contrairement au glucose-6-phosphate, le ^{18}F -FDG-6-P ne peut pas servir de substrat à la glucose-6-phosphate isomérase

et ne peut donc pas être impliqué dans les étapes suivantes de la glycolyse ou de la néoglycogénèse (Figure). L'accumulation du ^{18}F -FDG-6-P dans la cellule est ainsi un reflet de la captation de glucose et de l'activation du métabolisme glucidique.

La TEP au ^{18}F -FDG se révèle donc être un outil diagnostique prometteur dans l'évaluation des pathologies inflammatoires, où elle est efficace pour établir l'étendue de la maladie et/ou la réponse à un traitement. Cette technique permet d'obtenir des images de haute résolution avec une forte sensibilité (**Figure 23**). De plus, l'utilisation de techniques hybrides (comme la tomographie par émission de positons associée à la tomodensitométrie) permet d'améliorer la spécificité et la localisation anatomique des lésions (156).

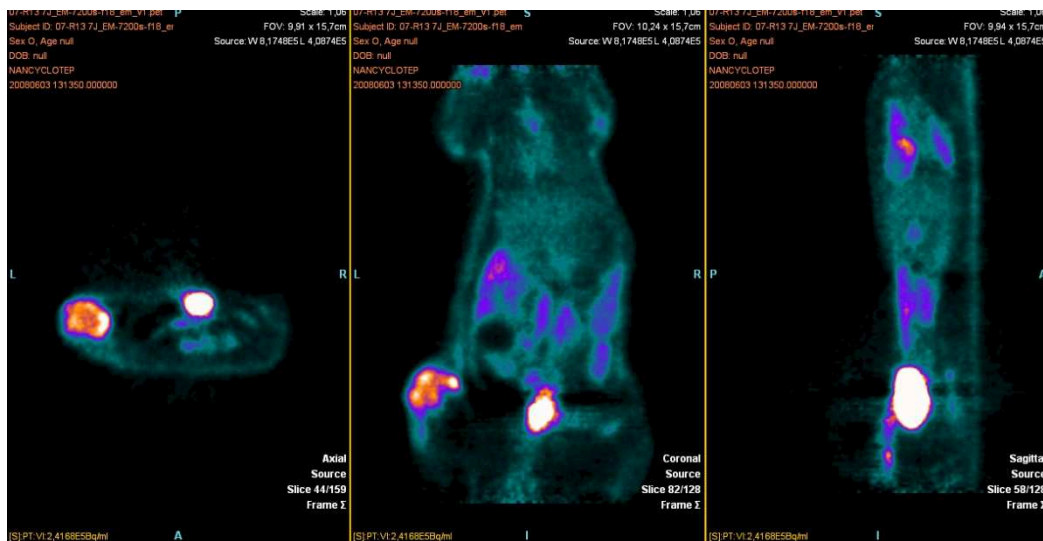


Figure 23 : Exemple d'image obtenue par TEP sur un rat arthritique ; vues sagittale, longitudinale et latérale ou l'on remarque une accumulation marquée de ^{18}F -FDG dans le genou arthritique.

Pour toutes ces raisons, il est peu surprenant de voir l'intérêt croissant que suscite la TEP au ^{18}F -FDG, dans la détection des inflammations et des infections ostéoarticulaires.

Un challenge reste en cours quant à la quantification de l'accumulation de ^{18}F -FDG, et la corrélation entre cette accumulation avec les atteintes histologiques observées.

III. *Le facteur nécrosant de tumeur alpha (TNF- α) et son implication dans les arthropathies.*

A. Historique.

Dés la fin du 18^{ème} siècle, des médecins ont remarqués qu'occasionnellement, chez certains patients atteints d'un cancer et étant passé par une infection sévère, une contraction voir même une élimination de leur tumeur était observée. A la fin de ce siècle, un médecin et chercheur du New-York Cancer Hospital, Guillaume B. Coley, en se basant sur ces observations mais également sur un cas clinique de son propre hôpital, a introduit dans le traitement de ses patients cancéreux des préparations dérivées de bactéries Gram (-) et Gram (+) (désormais connu sous le nom de toxines de Coley). Bien que cette mise à l'essai clinique ait abouti à un certain nombre de rémissions, particulièrement chez des patients avec des cancers sévères voir en phase terminale, ce travail fut marginalisé à l'époque du fait de l'émergence des traitements par radiologie et par radiation. Néanmoins, ses découvertes ont mené à des recherches fondamentales sur des modèles animaux. En 1975, le docteur Lloyd Old et ses collaborateurs au Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de New York, ont étudié la « nécrose hémorragique » de tumeur produites par des endotoxines. Ils mirent en évidence que le traitement de souris ou lapin par le « bacille de Calmette-Guérin » (BCG) pendant 10 à 14 jours, suivit par une injection de lipopolysaccharides (LPS) conduisait au relargage dans la circulation d'une substance mimant l'action de nécrose de tumeur de l'endotoxine elle-même. Partant du fait que l'endotoxine ne peut pas tuer les tumeurs, ils en conclurent en une action indirecte menant l'hôte à relarguer une substance qu'ils nommèrent : Tumor Necrosis Factor (TNF) (159). Plus tard, le TNF a été décrit comme étant un produit de macrophages activés par le LPS (160) et a été purifié en suivant sa capacité à lyser des cellules de fibrosarcome de souris (L-929).

En 1985, Anthony Cerami et ses collaborateurs ont notifié qu'un haut degré d'homologie existait entre la séquence N-terminale de la cachectine et la séquence N-terminale du TNF (160). De plus, la cachectine et le TNF ont tous les deux montré une importante activité de suppression de l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL) et de lyse des cellules transformées prédisposées (161). En conséquence de ces recherches, le TNF a souvent été appelé cachectine.

En outre, un second facteur avec des activités cytotoxiques similaires a été isolé dans les surnageants de Lymphocytes T et désignés Lymphotoxine α (LT- α). La purification et le clonage de cette protéine a révélé une ressemblance forte et une homologie avec le TNF et a été nommé TNF- β (162). Plus généralement, le TNF- α est reconnu comme le membre phare d'une large famille de cytokines : la famille des ligands du TNF.

B. Structure et biosynthèse du TNF- α

1. Structure du TNF.

Le TNF- α a été identifié dans un premier temps comme une protéine sécrétée de 17kDa mais par la suite les recherches ont montré que cette protéine existe sous une forme

transmembranaire de 26kDa dans sa forme non clivée. Le TNF- α humain est donc synthétisé sous la forme d'un précurseur de 26 kDa contenant 233 acides aminés. La forme de TNF- α sécrétée résulte du clivage du pro-TNF- α entre l'alanine 76 et la valine 77 par une métalloprotéinase, l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE). L'action de la TACE donne ainsi naissance à une protéine sécrétée de 17kDa contenant 157 acides aminés. L'activité de cette enzyme joue un rôle important dans la régulation de l'expression de cette cytokine. Le TNF- α est une protéine non glycosylée, peu hydrophobe qui possède un point isoélectrique compris entre 4.7 et 5.3, il est biologiquement actif sous forme trimérique (**Figure 24**).

Le TNF- α sous sa forme native est un homotrimère d'une masse moléculaire de 52kDa (163) (**Figure 24**). Chaque sous-unité est composée de deux feuillets β antiparallèles. Ces sous-unités sont reliées de manière « tête-bêche ». Le feuillet β accessible (partie externe) est riche en résidus hydrophiles alors que le feuillet interne est lui hydrophobe et contient le segment C-terminal localisé à proximité de l'axe central du trimère (164). Les acides aminés impliqués dans la fixation aux récepteurs se situent des deux cotés de chaque « crevasse » présente entre les sous-unités. Cette structure suggère que le TNF- α fonctionne par fixation de 3 molécules réceptrices (163).

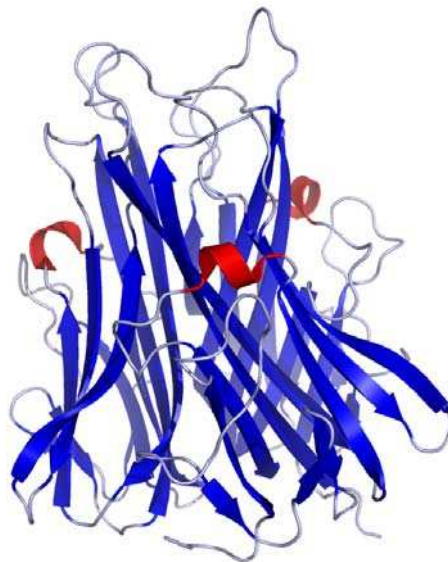


Figure 24 : structure cristalline du TNF alpha sous sa forme native homotrimérique.

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3b/TNFa_Crystal_Structure.rsh.png

Il a été démontré que ces trimères sont déjà assemblés lors du transport du TNF- α à la surface cellulaire (165) (**Figure 25**). Ce trimère soluble tend à se dissocier à des concentrations inférieures au nano molaire, perdant alors son activité biologique (164).

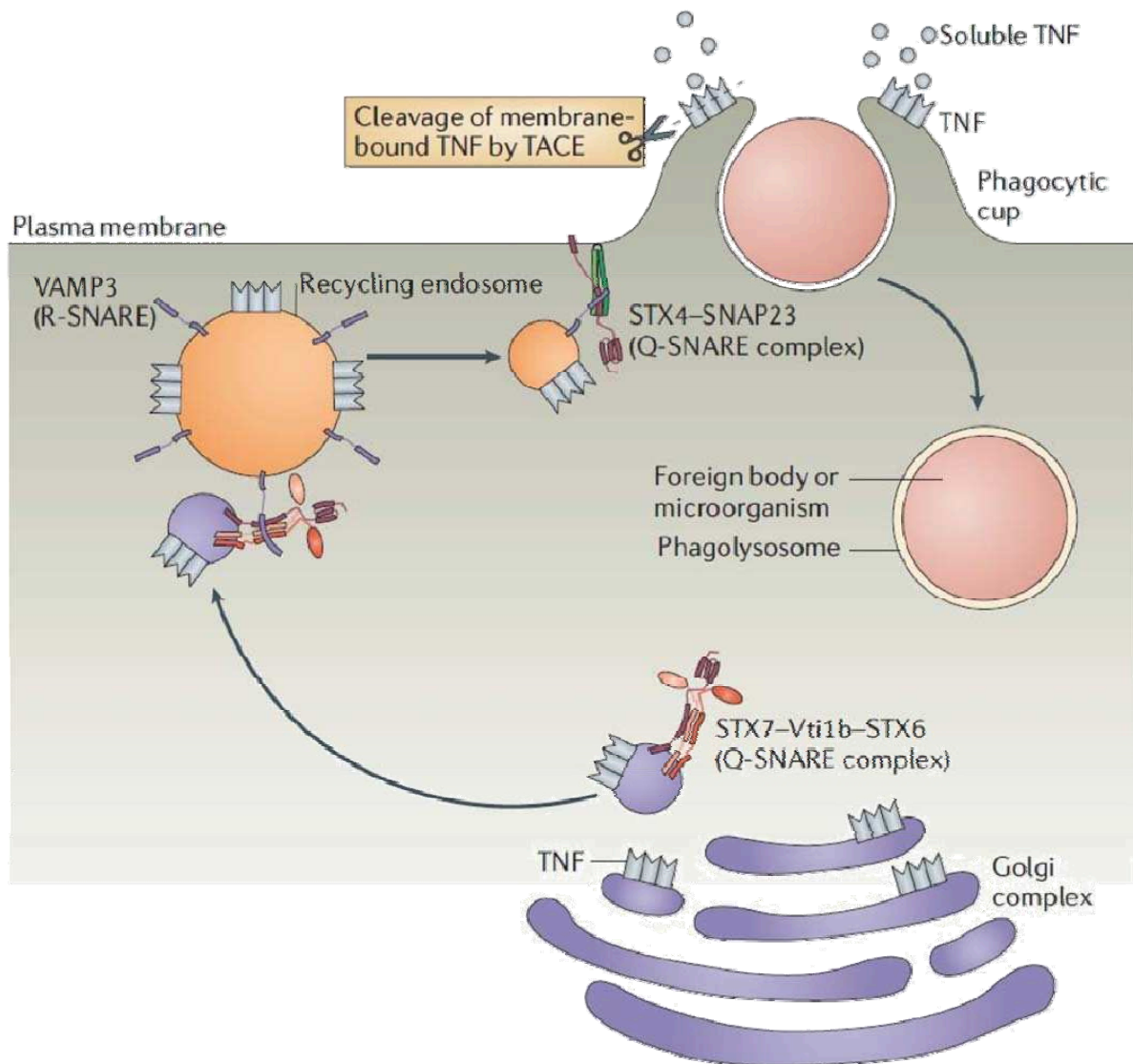


Figure 25 : Représentation schématique de la voie de sécrétion du TNF- α . Passage du TNF- α du réticulum endoplasmique à la surface membranaire. (D'après (165))

Le TNF- α est transporté jusqu'à la surface membranaire où il peut être clivé par l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE) pour être libéré sous sa forme soluble.

2. Biosynthèse du TNF alpha

Le TNF- α est principalement produit par les macrophages mais également par un large spectre de types cellulaires tels que les cellules lymphoïdes, les fibroblastes ou les cellules du tissu neuronal. De grandes quantités de TNF sont produites en réponse à la stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) (**Figure 26**) ou par d'autres produits bactériens comme l'enterotoxine B. La biosynthèse de TNF est également modulée par les médiateurs de l'inflammation, notamment l'IL-1 et l'IL-2, le TNF- α lui-même, le GM-CSF, M-CSF ainsi que de nombreux autres médiateurs (164, 166).

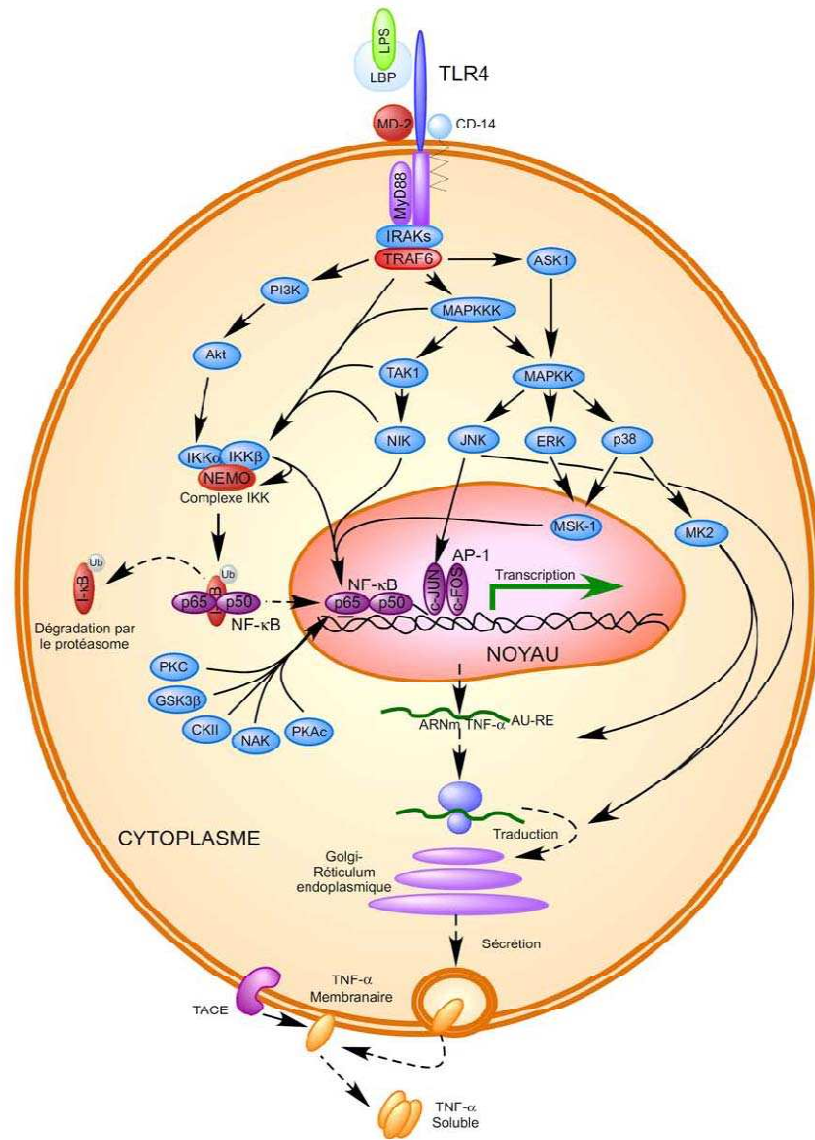


Figure 26 : Représentation schématique des différentes étapes menant à la biosynthèse et au relargage du TNF alpha par les monocytes suite à une activation par le LPS. D'après Pinna G.: *Analyse des mécanismes d'action de composés inhibiteurs de l'expression de cytokines inflammatoires. Identification de composés d'intérêt thérapeutique.* Thèse ULP Strasbourg I, 2003)

L'induction de l'expression du TNF- α par le LPS est très puissante et a fait l'objet de nombreuses études. Il a ainsi été possible d'identifier et de décrire le complexe de reconnaissance au LPS (**Figure 27**). Le récepteur impliqué dans cette transduction de signal est le Toll-like Receptor 4 (TLR4), un membre de la grande famille des récepteurs TLRs (167, 168), qui sont impliqués dans l'immunité innée.

Le récepteur TLR4 reconnaît un complexe LPS-LBP-CD14 (**Figure 27**) qui va ensuite activer les voies de signalisation intracellulaires menant à la biosynthèse de TNF (169, 170).

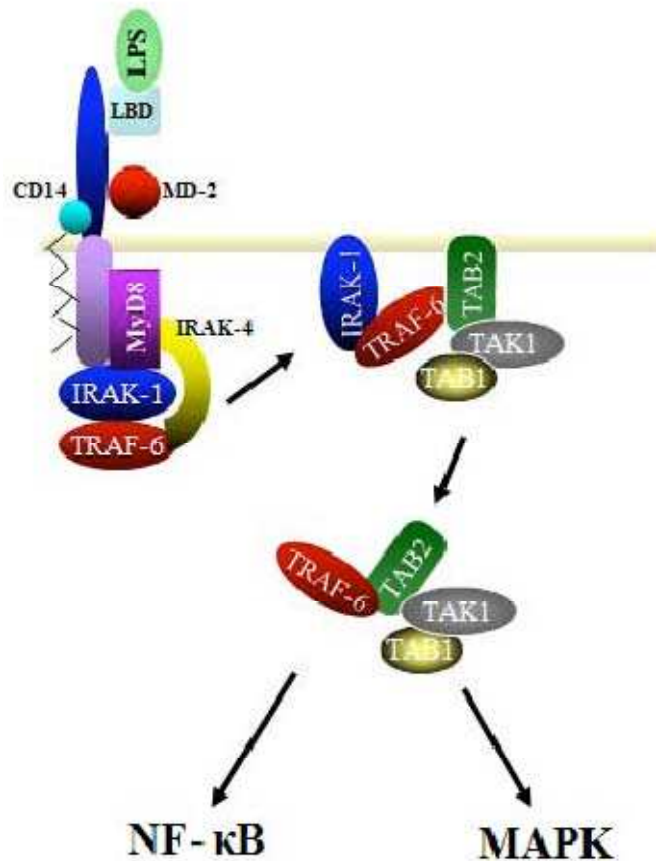


Figure 27 : Complexe de reconnaissance du LPS et protéines adaptatrices impliquées dans la voie de signalisation des TLRs. LPB : LPS Binding Protein (d'après Akira S, 2003 (166))

Les voies NFκB et MAPK vont mener à l'activation de la transcription du gène du TNF.

Voies de signalisation cellulaire activées :

NFκB, au même titre que AP-1, est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux composants du système immunitaire (171). NFκB peut se décomposer en sous-unités, on retrouve p50, p65 et les protéines Rel (172). NFκB sous sa forme inactive se trouve au niveau cytoplasmique associé à IκB. Il existe deux voies de signalisation menant à l'activation de NFκB qui sont décrites ci-dessous (**Figure 28**).

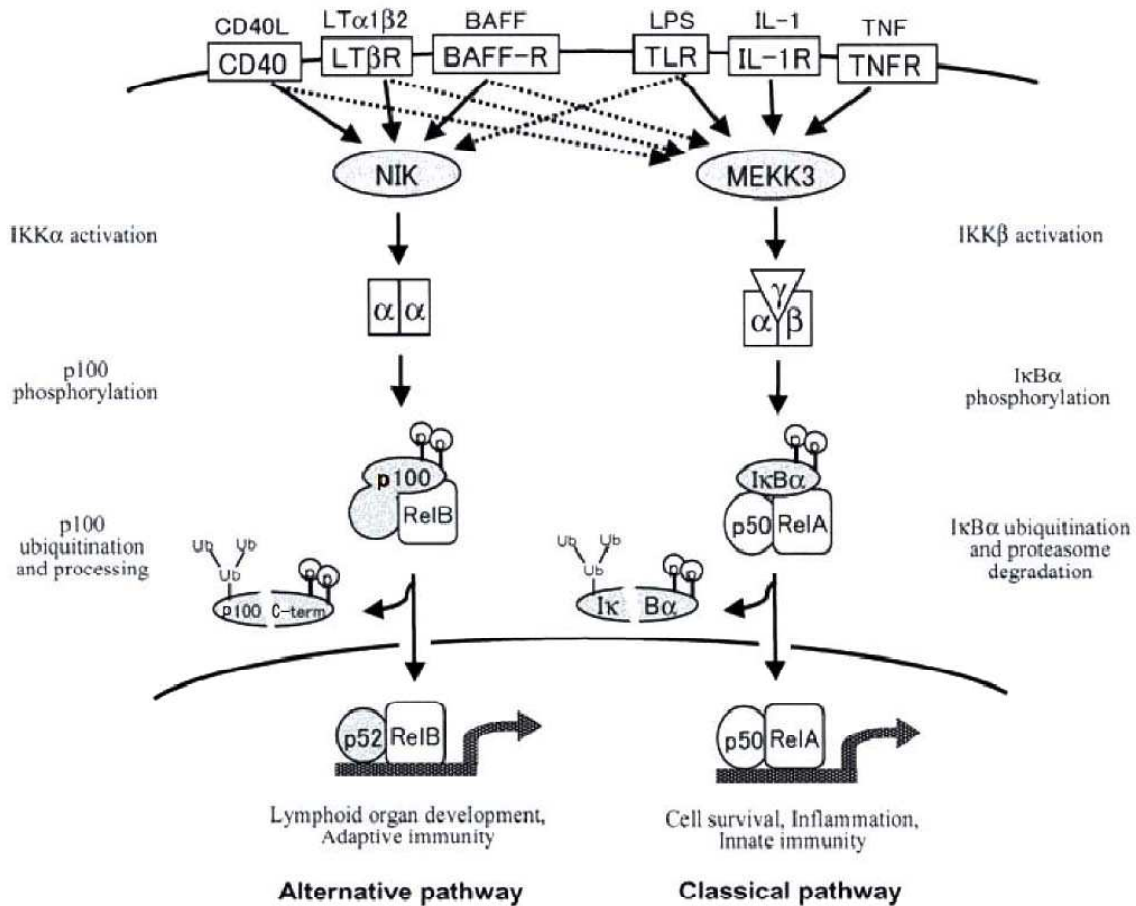


Figure 28 : Représentation schématique des 2 voies d'activation de NF- κ B. (D'après Nishikori M, 2005 (173))

L'activation de NF κ B est un phénomène transitoire et cyclique en raison de la perpétuelle dégradation et re-synthèse de I κ B (174).

Une seconde voie très importante dans le signaling intracellulaire du TNF est la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases). Ces protéines sont des sérine/thréonine kinases activées par phosphorylation en réponse à un stimulus extracellulaire. La voie des MAPK implique de nombreux intermédiaires qui eux aussi sont successivement activés par phosphorylation (**Figure 29**).

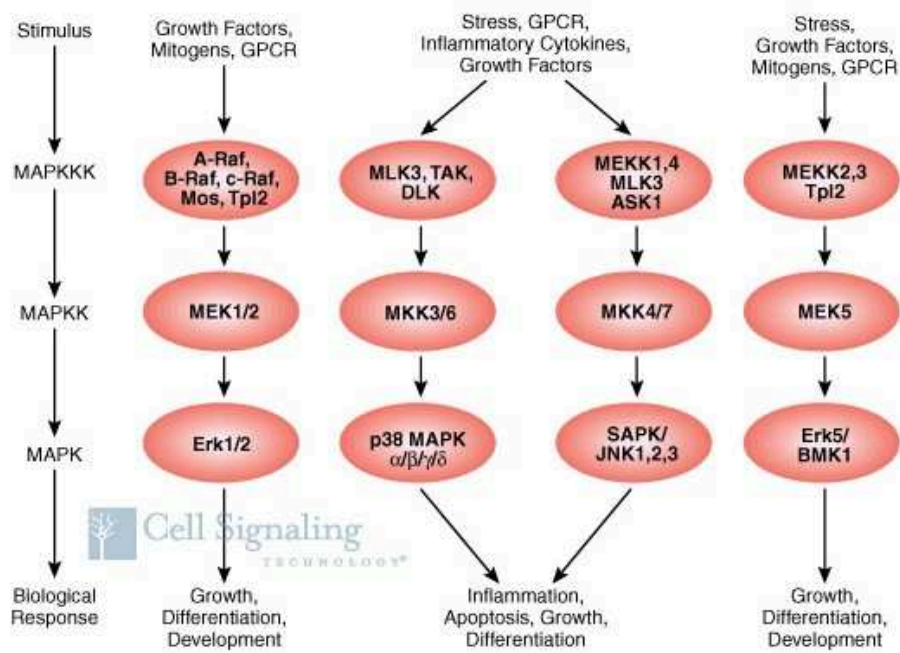


Figure 29 : Voie des MPAKs, facteurs d'activation et réponses cellulaires inducibles.

http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/MAPK_Cascades.jpg

Parmi les kinases impliquées dans ces voies de signalisation, la protéine p38 semble occuper un rôle central dans la biosynthèse du TNF- α (175, 176), nous pourrions également citer les voies JNK et ERK (177, 178) (**Figure 30**). Ces voies signalisation intracellulaires aboutissent à l'activation de facteurs de transcription au niveau du gène du TNF.

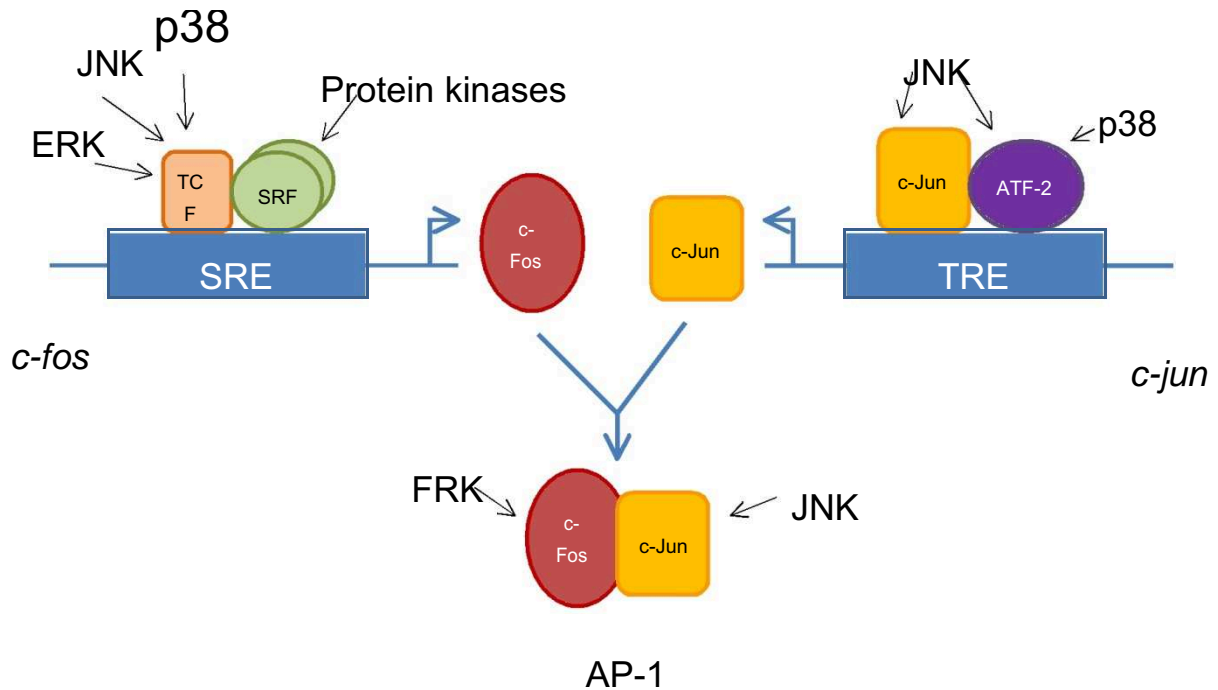


Figure 30 : Régulation du facteur de transcription AP-1 par la voie des MAP kinases. (d'après Whitmarsh A.J. *et al*, 1996, (179))

Nous pouvons également signaler que la voie PI3K est impliquée dans ces voies de signalisation.

Ces voies de signalisation hautement régulées soulignent la complexité de la régulation de l'expression du TNF ainsi que la pluralité des réponses cellulaires inducible par ce médiateur.

C. Activité biologique et implication du TNF- α dans la PR.

Le TNF- α présente un large spectre d'activités biologiques. Il provoque par exemple la nécrose de tumeurs, la fièvre, la douleur et l'anorexie. Il induit également l'expression d'autres cytokines et molécules immunorégulatrices, ainsi que la prolifération, la différenciation et l'apoptose de divers types de cellules. Le TNF- α est également impliqué dans la dérégulation de la synthèse de la matrice extracellulaire par les chondrocytes au niveau du cartilage articulaire (180).

Ces différentes activités biologiques résultent de la fixation de cette cytokine sur des récepteurs cellulaires (**Figure 31**).

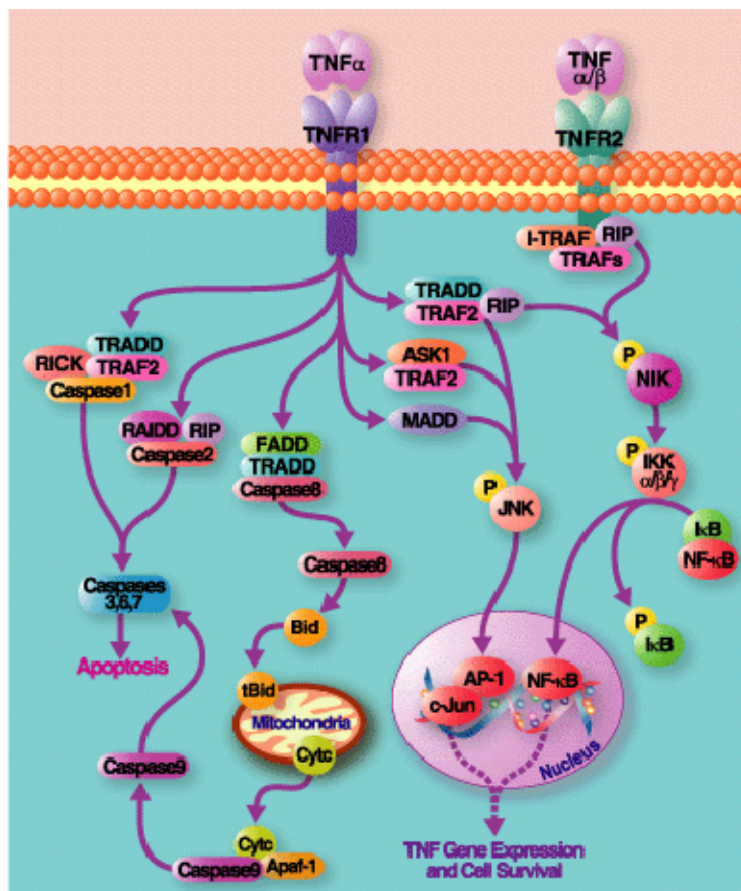


Figure 31 : Schéma illustrant l'ambivalence du TNF- α suivant les voies de signalisation intracellulaires activées. <http://www.biotechjournal.com/Journal/jan%202002/janArticle6text.htm>

La majorité des effets biologiques médiés par le TNF est attribuée à la forme soluble de ce médiateur, qui peut avoir une action locale par les voies autocrine et paracrine mais également un effet systémique par liaison à ses récepteurs.

1. Les récepteurs au TNF.

Le TNF- α se lie de manière spécifique à deux récepteurs membranaires (181). Ces deux récepteurs ont une masse moléculaire de 55 à 60 kDa et de 75 à 80 kDa, et sont appelés selon leur poids moléculaire ; TNF-R55 et TNF-R75 (**Figure 32**) ou TNF-R1 et TNF-R2 respectivement. Les gènes codant pour ces récepteurs se trouvent sur les chromosomes 12p13 (TNF-R1) et 1p36 (TNF-R2). Ces deux récepteurs sont co-exprimés dans la plupart des tissus, néanmoins, si TNF-R1 est exprimé constitutivement, l'expression de TNF-R2 est régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel (182).

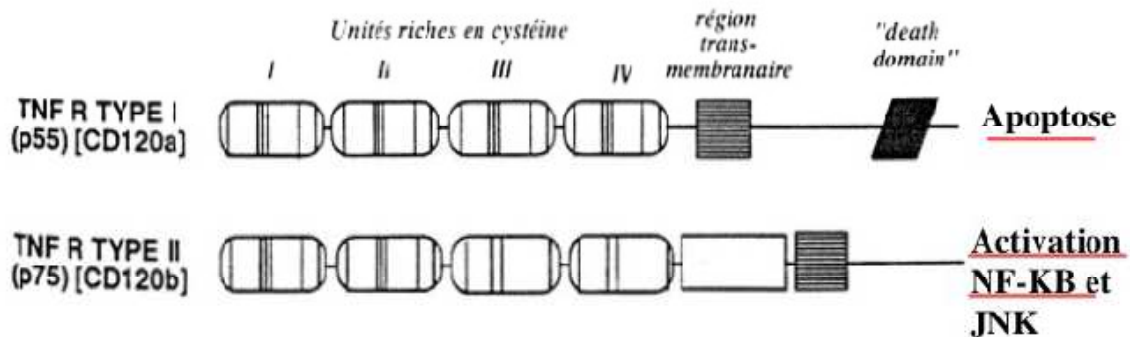


Figure 32 : Représentation de la structure des deux types de récepteurs au TNF alpha. Les récepteurs de type I et II ont un poids moléculaire de 55 et 75kDa respectivement.

Ces deux récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I (extrémité N-terminale extracellulaire) et leurs domaines extracellulaires présentent 28% d'homologie. Il y a une absence complète d'homologie entre les domaines intracellulaires de ces deux récepteurs, ce qui suggère l'activation de voies intracellulaires distinctes (183). Les deux types de récepteur apparaissent activement impliqués dans la transduction du signal. Ces récepteurs ont été mis en évidence dans une grande variété de cellules. Dans les chondrocytes arthrosiques et les fibroblastes synoviaux, une surexpression de l'expression de ces récepteurs a été démontrée, particulièrement sur les membranes des synoviocytes provenant de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (184). Chacun des deux récepteurs a été montré comme inducteur spécifique d'activités du TNF- α . TNF-R55 et TNF-R75 se présentent sous une forme trimérique stabilisée par des ponts disulfure intra-cystéines (**Figure 33**).

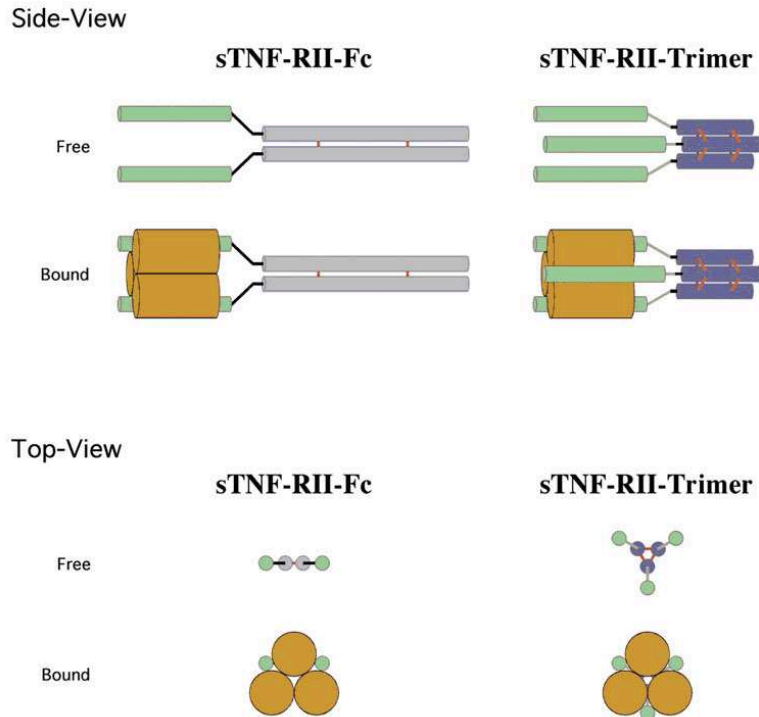


Figure 33 : Représentation schématique de la forme trimérique du récepteur au TNF alpha.

http://www.genhunter.com/data/news_pictures/1189549571/picture2.jpg

Cependant, il n'est toujours pas clairement établi que la trimérisation du récepteur au TNF- α soit nécessaire à l'activation (**Figure 34**). Ces récepteurs peuvent subir un clivage protéolytique générant leur forme soluble.

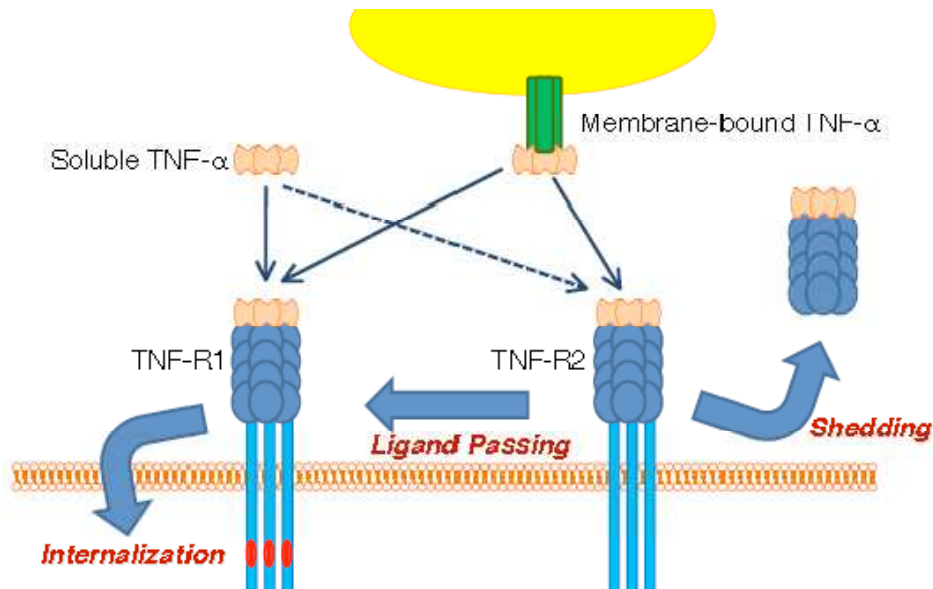


Figure 34 : Représentation schématique des interactions entre le TNF alpha et ses récepteurs.

(D'après MacEwan D.J, 2002(185)). Les interactions TNF- α / récepteurs au TNF- α peuvent se réaliser entre les formes solubles et les formes membranaires.

Diverses interactions entre le TNF- α sous sa forme soluble ou membranaire et chacun de ses récepteurs, solubles ou membranaires également, sont donc envisageables et ouvrent de nombreuses possibilités de réponses cellulaires (186).

- TNF-R1

TNF-R1 est une protéine de 55kDa contenant 455 acides aminés (190 résidus pour la partie extra-cellulaire, 25 pour la partie transmembranaires et 220 pour le domaine cytoplasmique) (187). Ce récepteur est exprimé à la surface de nombreuses cellules dont les monocytes et neutrophiles (188) ainsi que les cellules endothéliales (189). Bien que ce récepteur soit retrouvé à la surface cellulaire, de grandes quantités sont également retrouvées au niveau de l'appareil de Golgi (périnucléaire) (185).

TNF-R1 est considéré comme le récepteur le plus important dans l'initiation des activités biologiques du TNF- α . Ce récepteur peut être activé aussi bien par les formes solubles et membranaires du TNF- α . La voie de signalisation cellulaire induisant l'apoptose est liée à la présence d'un « death domain » (DD) sur ce récepteur, ce DD est associée à un répresseur (silencer of death domain : SODD) temps que le récepteur n'est pas activé. Il existe 3 principales protéines adaptatrices liées à ce récepteur : TRADD, FADD et TRAF2 (**Figure 35**). Celles-ci sont à la base des voies de signalisation intracellulaires responsables des différentes activités biologiques du TNF.

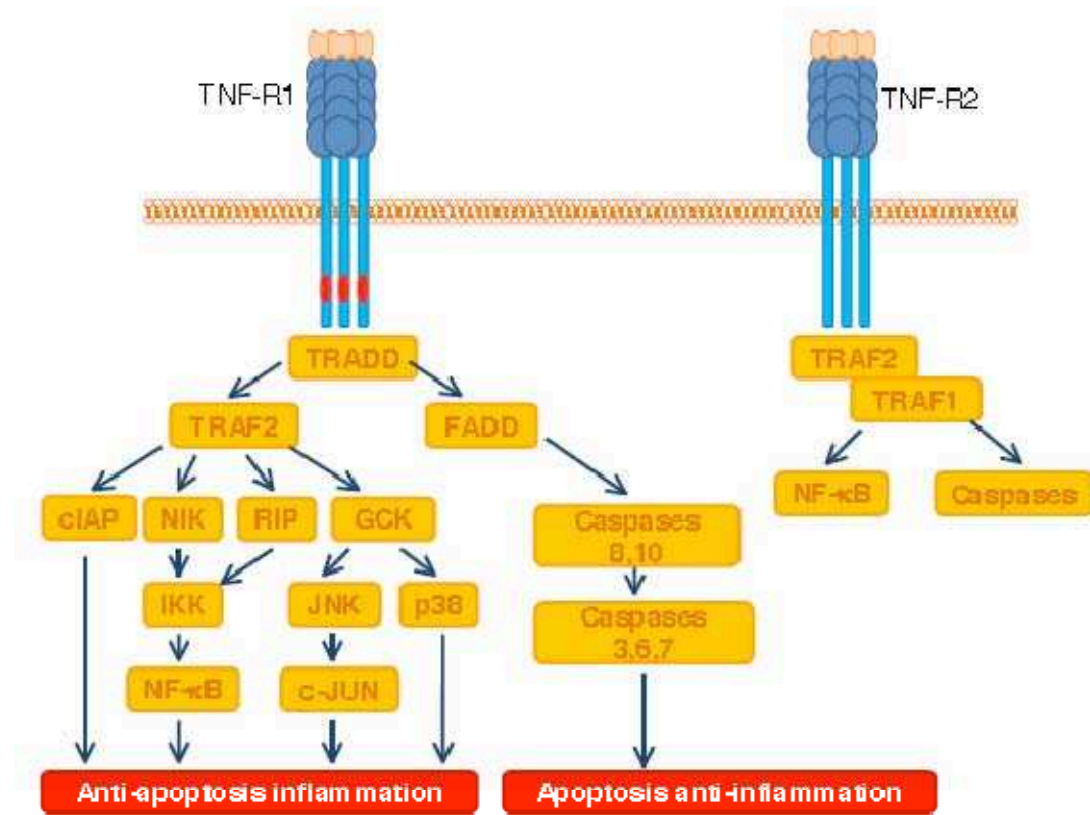


Figure 35 : Principales voies de signalisation modulées par les récepteurs au TNF- α .
(D'après MacEwan D.J, 2002 (185))

FADD recrute les caspases 8 et 10 et initie par conséquent la voie de l'apoptose. TRAF2 recrute les protéines inhibitrices d'apoptose 1 et 2 (cIAP-1 et cIAP-2) qui bloquent l'activation de la caspase 8. RIP est une protéine occupant un rôle majeur dans l'activation de NF κ B.

L'équilibre fragile existant entre ces différentes protéines adaptatrices et les réponses cellulaires qu'elles sont susceptibles d'engendrer soulignent l'importance du TNF- α dans la mise en place et l'entretien des réactions inflammatoires.

- TNF-R2

TNF-R2 est une protéine de 75kDa contenant 461 acides aminés (240 résidus pour le domaine extracellulaire, 27 pour la partie transmembranaire et 173 pour le domaine intracellulaire (190, 191)). Comme pour le TNF-R1, ce récepteur est retrouvé à la surface d'un vaste panel de cellules dont les monocytes, les cellules endothéliales, les cellules de Langerhans (192) et les macrophages (193). Le TNF-R2 possède une affinité pour le TNF- α 20 fois plus faible que le TNF-R1 et il est majoritairement activé par la forme membranaire de cette cytokine (182).

Contrairement au TNF-R1, il ne possède pas de DD mais il est capable de recruter les protéines adaptatrices TRAF1 et TRAF2 qui mènent à l'activation des voies NF κ B et JNK (194).

Il apparaît donc que le TNF- α possède une activité biologique pléiotropique et son implication dans les pathologies inflammatoires est aujourd'hui largement démontrée.

2. Le TNF dans la PR.

Comme cela est décrit dans la partie précédente, le TNF- α , via ses récepteurs, provoque au niveau intracellulaire l'activation de facteurs de transcription, dont NF κ B et AP-1. Ces derniers participent à l'induction de la cyclo-oxygénase 2 (responsable de la surproduction des prostaglandines) et d'un certain nombre de cytokines et de protéases (**Figure 36**). Certaines de ces protéases, notamment les métalloprotéinases (MMP1, 2, 3 et 9), sont impliquées dans la destruction ostéo-cartilagineuse au cours de la polyarthrite rhumatoïde ou de la spondylarthrite (195) (**Figure 36**). Les cytokines participent également aux dégradations articulaires ayant cours lors de la PR.

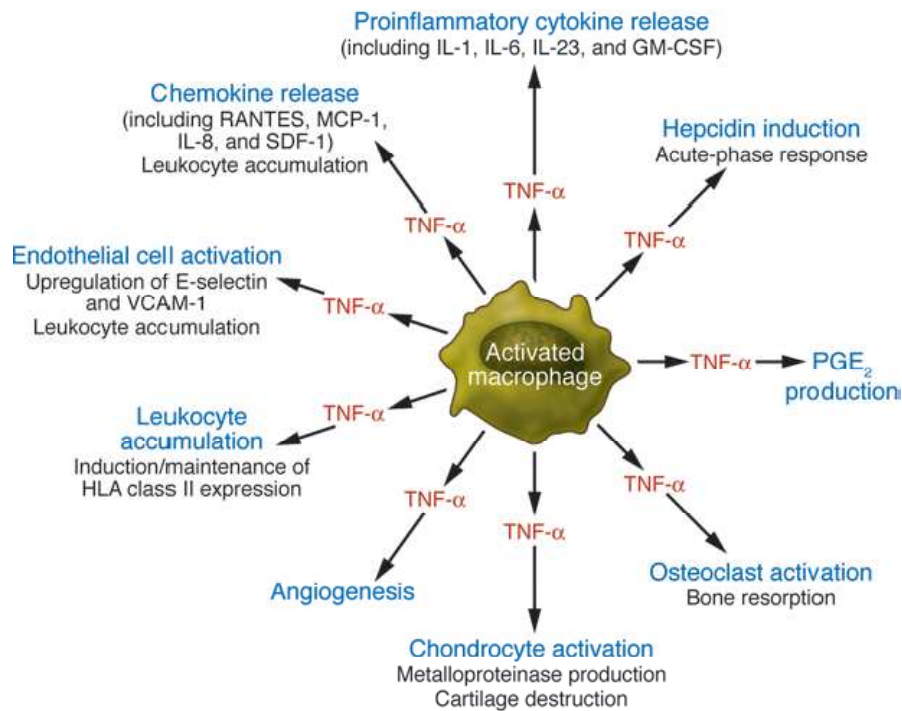


Figure 36 : Activités biologiques du TNF- α impliquées dans la polyarthrite rhumatoïde.

Cette figure illustre les activités biologiques du TNF- α , qui est principalement produit par les macrophages activés de la membrane synoviale de patients atteints de PR. Les actions du TNF- α perçues comme importantes dans la pathogénèse de la PR incluent sa faculté à induire la production de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 ainsi que son pouvoir d'induction de la production et du relargage de chemokines qui ont un rôle dans le chemotactisme des leucocytes sanguins vers le tissu synovial. Ce phénomène est facilité par la surexpression d'intégrines clés et de molécules d'adhésion telles que le selectin-E et VCAM-1 sur l'endothélium. Finalement, la destruction du cartilage articulaire et de l'os sous chondral est initiée par l'induction d'enzymes protéolytiques et de métalloprotéases ainsi que par l'activité ostéoclastique.

Il est également à noter que le clivage protéolytique du domaine extracellulaire de chaque récepteur au TNF- α produit deux récepteurs solubles, TNF-sR55 et TNF-sR75, sans modification de leur affinité pour le TNF- α (196). Ces complexes récepteurs solubles/cytokines ne sont pas biologiquement actifs. Par conséquent, les récepteurs solubles contribuent à la modulation des activités biologiques dépendantes du TNF- α en diminuant le nombre de molécules de TNF- α susceptibles de se fixer sur les récepteurs cellulaires. Dans les cellules du tissu articulaire, TNF-R55 semble être le récepteur dominant responsable de la médiation de l'activité du TNF alpha. Les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes arthrosiques libèrent une quantité significativement importante de TNF-sR75. Un ratio plus élevé du taux TNF-sR75/TNF-sR55 est observé dans les cas de PR les plus sévères. A de faibles concentrations, les récepteurs solubles semblent stabiliser la structure trimérique du TNF- α , augmentant par la même la demi vie du TNF- α bioactif, alors qu'à de fortes concentrations, les récepteurs solubles diminuent l'activité biologique du TNF- α par compétition pour la fixation du TNF- α sur les récepteurs cellulaires membranaires.

Cependant, l'affinité des récepteurs solubles pour le TNF- α étant la même que celle des récepteurs membranaires, l'inhibition de l'activité biologique du TNF- α nécessite de fortes quantités de ces derniers.

Nous voyons ici, comme cela était également souligné dans la partie sur la physiopathologie de la PR, que le TNF- α occupe un rôle prépondérant dans cette pathologie articulaire.

D. Expression et régulation du gène du TNF- α

1. Expression du TNF alpha

Le gène codant pour le TNF- α humain est situé sur le chromosome 6 à l'intérieur du complexe majeur d'histocompatibilité (**Figure 37**).

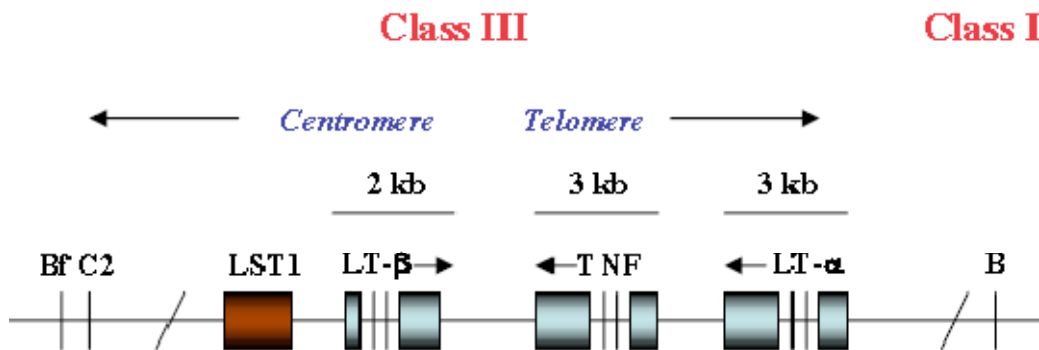


Figure 37 : Représentation schématique du cluster du gène du TNF alpha humain.
(d'après Makhatadze N.J, 1998(197))

Le gène TNF- α , comme certains gènes impliqués dans les premières phases de la réaction inflammatoire, est un gène précoce. Plusieurs éléments de réponse génique ont été caractérisés dans le promoteur de ce gène et ils contribuent à sa régulation transcriptionnelle. Sont ainsi retrouvés les éléments de réponse géniques au facteur nucléaire κB (NF κB), au facteur nucléaire IL6, à l'AMPc, au facteur d'activation de la transcription et aux protéines activatrices 1 (AP-1) (198). Ces facteurs transcriptionnels sont activés par des processus complexes de phosphorylation. Parmi les kinases impliquées dans ces processus apparaissent les trois membres de la famille MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), ERK (Extracellular Responsive Kinase), JNK (c-JUN N-terminal Kinase) et la protéine 38 (p38). Les protéines kinases (PK) A et C sont également impliquées dans les processus d'activation de ces facteurs transcriptionnels (199). Nous reviendrons dans la suite de cet exposé sur ces voies d'activation.

2. Régulation de l'expression du TNF alpha

Nous nous intéressons ici aux mécanismes de régulation post-transcriptionnelle permettant de médier la biosynthèse du TNF- α . Les deux principaux mécanismes font intervenir les ARE (AU-rich Element) et les miRNA (plus récemment décrit).

a. ARE et AUBP (Binding Protein)

Des séquences consensus pentamériques AUUUA et octamérique UUAUUUAAU sont retrouvées dans la région 3' non traduite de l'ARNm du TNF- α (région 3'UTR). Ces séquences ARE (AU-rich Element) interviennent dans la stabilité des ARNm (200), par la fixation de protéines stabilisatrices ou déstabilisatrices telles que HuR, tristetraprolin (TTP) (201), AUF1, TIA-1 ou TIAR (202, 203). L'équilibre entre ces protéines est régulé par des kinases, notamment la protéine p38 (204) (**Figure 38**). Ce type de régulation post-transcriptionnel des ARNm via les ARE est un mécanisme communément retrouvé pour les cytokines inflammatoires (205).

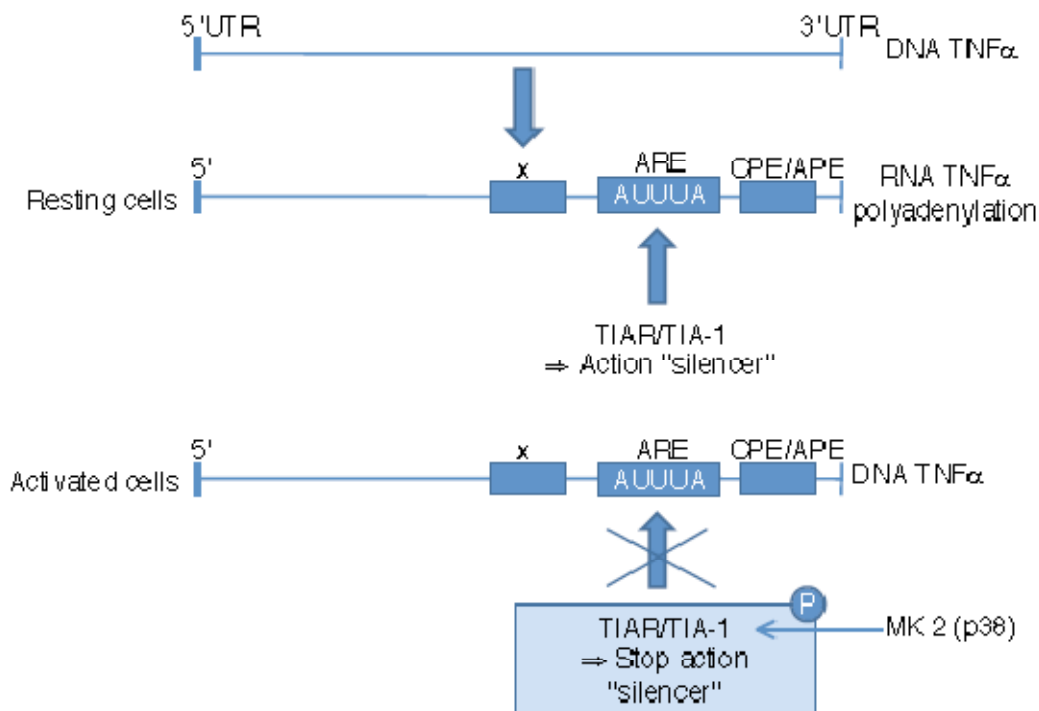


Figure 38 : Exemple de régulation post transcriptionnelle du TNF alpha via les ARE.
(d'après Sibilia J., Wachsmann D, 2002 (206))

Principe de fonctionnement des ARE et AUBP

Les ARNm n'ont pas tous la même durée de vie (quelques minutes à plusieurs jours), celle-ci étant dépendante de leur stabilité. La durée de vie de l'ARNm conditionne la fenêtre de temps durant laquelle il peut être traduit et détermine ainsi le niveau d'expression du gène correspondant (207, 208). Le motif d'instabilité le plus étudié dans les cellules de mammifères est l'ARE, une séquence riche en adénines et uridines présente dans la région 3'

non codante (3' UTR) de l'ARN. Découvert il y a vingt ans par Shaw et Kamen dans l'ARN d'un facteur de croissance, le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (209), cet élément a depuis été identifié par analyse bioinformatique dans environ 8 % des ARNm codants (210). Plusieurs classes d'ARE ont été décrites, selon que l'ARE contient ou non le pentamère AUUUA au sein d'une séquence riche en adénines et uridines (**Figure 39**). L'absence ou la présence du pentamère AUUUA, isolé ou réitéré, chevauchant ou non, a permis une première classification des ARE en trois catégories (211). Ultérieurement, l'analyse bioinformatique des régions 3'UTR, fondée sur la recherche du motif WWWU(AUUUA)UWWW (W = A ou U), a permis de subdiviser la catégorie II, contenant 2 pentamères ou plus, en 4 groupes selon le nombre de pentamères présents. L'ARE, un élément conservé chez la levure (212), n'agit pas seul mais en interaction avec des protéines, les AUBP (*AU binding proteins*) (213-215). On trouve les orthologues de ces protéines chez la drosophile (216), ce qui suggère une conservation de la fonction régulatrice des ARE à travers l'évolution.

Principalement nucléaires, les AUBP font néanmoins la navette entre le noyau et le cytoplasme et participent ainsi à différents aspects de la vie d'un ARN à ARE : transport nucléo-cytoplasmique, contrôle de sa stabilité ou de sa traduction dans le cytoplasme. Certaines AUBP, comme celles de la famille ELAV/Hu, préservent l'ARN à ARE de la dégradation ; d'autres, telles que KSRP, TTP ou les protéines apparentées BRF (*butyrate response factor*), provoquent sa dégradation. D'autres, comme TIA-1 ou TIAR, ne semblent pas intervenir directement dans la (dé)stabilisation des ARN à ARE mais régulent leur traductibilité. Enfin, certaines comme AUF1/hnRNPd ont un double, voire même un triple jeu, car elles accélèrent ou inhibent la dégradation et contrôlent la traduction de certains ARN (217). Toutes ces protéines peuvent, en théorie, se fixer à une même séquence ARE et ainsi agir en synergie ou en compétition les unes avec les autres (217, 218) (**Figure 39**).

bodies (*P bodies*), caractérisés par des enzymes qui coupent la coiffe en 5' de l'ARNm (DCP1/DCP2), l'exoribonucléase 5' → 3' XRN1 et également des composants clefs de la machinerie de dégradation associée aux microARN, le complexe RISC (*RNA induced silencing complex*) (revue dans (224)). Ces *P bodies* partagent un certain nombre d'acteurs avec les granules de stress (SG), d'autres structures cytoplasmiques qui apparaissent, comme leur nom l'indique, en condition de stress (225). Par exemple, TTP, une AUBP déstabilisante, favoriserait transitoirement leur association physique. Ainsi, en fonction de l'état de la cellule, les ARNm à ARE pourraient être stockés dans différents compartiments cellulaires, dégradés par l'une ou l'autre de leurs extrémités ou dirigés, après « réhabillage », vers les polysomes pour y être traduits (**Figure 40**). Une illustration de cette hypothèse est donnée par l'étude du gène *CAT1* (*cationic amino acid transporter 1*) dans une lignée cellulaire d'hépatome humain. Lorsque ces cellules subissent un stress (par exemple la privation en acides aminés), la synthèse de *CAT1* est considérablement accrue, essentiellement du fait d'une augmentation de la traduction de l'ARNm *CAT1*. Sans stress, cet ARNm à ARE est normalement adressé aux *P bodies* grâce à son association à un petit ARN non codant, miR122, complémentaire de sa région 3' UTR. Mais lorsque la cellule est stressée, l'ARNm *CAT1* est exclu des *P bodies* et activement traduit (226) (**Figure 40**). Ce changement pourrait être expliqué par une relocalisation, en réponse au stress, de l'AUBP stabilisante HuR du noyau vers le cytoplasme. Cette étude renforce l'hypothèse, initialement émise par Jing *et al.*, de l'implication conjointe d'AUBP et de miARN dans le contrôle du métabolisme des ARNm à ARE (220). Dans leur travail réalisé sur des cellules de drosophile, les auteurs montraient ainsi que TTP, en interagissant avec des protéines clefs du système miARN/ARNi, recrute un petit ARN, miR16, complémentaire de la séquence ARE du TNF- α (*tumour necrosis factor*), permettant ainsi la dégradation de l'ARNm rapporteur contenant cet ARE.

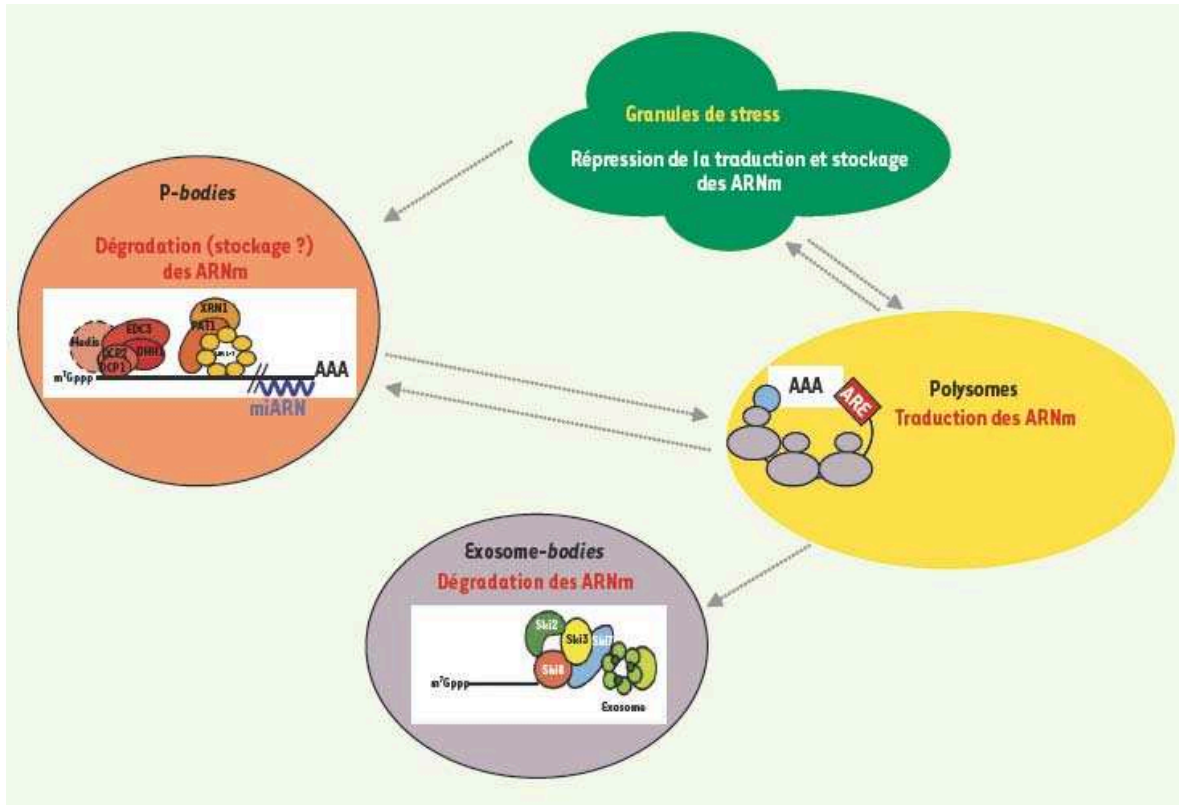


Figure 40 : Localisation des ARNm dans divers granules cytoplasmiques.

Les ARNm sont localisés dans différentes structures cytoplasmiques où ils sont stockés (granules de stress et *P bodies*) ou dégradés (exosomes *bodies* et *P bodies*). En fonction du stimulus cellulaire, les ARNm associés à différentes protéines peuvent être libérés de ces granules et activement traduits dans les polysomes (d'après (224, 226)).

Les transgressions

Quelles que soient les incertitudes sur les lieux et la farandole des acteurs de la dégradation, on imagine bien que l'altération des ARE ou un changement dans le niveau d'expression des AUBP, de leur localisation sub-cellulaire ou de leur capacité effective à fixer l'ARE, puisse modifier la stabilité/traduction de l'ARN qui les porte et ainsi promouvoir le développement de maladies. Il s'est ainsi avéré que ce type de mécanisme concernant le proto-oncogène *c-myc* contribue à l'apparition de cancers (227). Ce qui nous intéresse plus est l'exemple de la cytokine pro-inflammatoire *TNF- α* dont l'altération de la région 3' UTR du gène est impliquée dans l'apparition de pathologies inflammatoires.

AUBP, ARE et maladies inflammatoires

La plupart des cytokines et chimiokines produites au cours de la réponse immunitaire sont codées par des ARN très instables qui contiennent dans leur région 3' UTR un ARE caractérisé par la répétition de l'heptamère A/UAUUUAA/U (**Figure 39**). C'est le cas par exemple des cytokines pro-inflammatoires *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* et *GM-CSF*, des médiateurs de l'inflammation tels que *Cox2*, et des cytokines anti-inflammatoires *IL-10*, dont la synthèse est requise pour contrecarrer l'effet pathogène à long terme des cytokines pro-

inflammatoires. Cela explique pourquoi l'ARE et les AUBP jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes de la réponse inflammatoire (228). Très peu de données sont disponibles sur des mutations/délétions naturelles de leurs ARE à l'origine de pathologies inflammatoires. Cependant, la délétion expérimentale chez la souris de l'ARE du TNF- α atteste de son importance *in vivo*. En effet, les macrophages des souris TNF- $\alpha^{\Delta ARE}$, dans lesquelles l'ARE a été délétée par mutagenèse dirigée, expriment un ARNm TNF- α constitutivement stable entraînant une production spontanée de TNF- α . Les souris porteuses de cette mutation développent une arthrite chronique inflammatoire et une inflammation intestinale (IBD) qui ressemble à la maladie de Crohn chez l'homme (229). De manière remarquable, les souris mutantes (KO) qui n'expriment pas l'AUBP TTP développent les mêmes symptômes - cachexie, arthrite et dermatite accompagnées de la synthèse d'auto-anticorps - que les souris TNF- $\alpha^{\Delta ARE}$ (230). Cela s'explique très bien par le fait que la cible principale de TTP, l'ARN TNF- α , n'est plus dégradée, entraînant une expression constitutive de la protéine TNF- α par les macrophages. Il est probable que la stabilisation d'ARNm codant d'autres cytokines, telles que le GM-CSF, dont l'ARE fixe également TTP (231), contribue à l'hyperplasie myéloïde caractéristique des souris *TTP*^{-/-} (232). Cette hypothèse est confortée par l'observation d'une prolifération anormale et létale de macrophages et de granulocytes dans des embryons transgéniques exprimant un allèle *GM-CSF*^{DARE} dépourvu de l'ARE et ne fixant donc plus TTP (233).

La comparaison des phénotypes observés dans les souris KO pour TTP et dans les souris dans lesquelles d'autres AUBP ont été expérimentalement inactivées par recombinaison homologue est très enrichissante car elle révèle la spécificité des interactions *cis/trans*. En effet, alors que l'ARN TNF- α peut fixer *in vitro* de nombreuses AUBP, telles que HuR, TTP, AUF1, KSRP, TIA-1 et TIAR (**Figure 39**), seule l'inactivation de TTP provoque une réaction inflammatoire constitutive. L'inactivation d'AUF1 est normalement sans effet mais lorsque la réaction inflammatoire est expérimentalement stimulée (par exemple par traitement des souris avec du LPS qui mime une infection bactérienne à Gram⁻), les souris KO *AUF1*^{-/-} font un choc endotoxique létal accompagné d'une surproduction de TNF- α et d'IL-1 β due à la stabilisation de leurs ARN à ARE (234). De la même manière, les souris *TIA-1*^{-/-} ne développent pas spontanément de maladie. Mais, lorsque leurs macrophages péritonéaux sont traités *in vitro* par le LPS, la synthèse de TNF- α et de Cox2 est accrue. Cependant, dans ce cas, il n'y a pas de modification du niveau d'expression des ARNm correspondants, suggérant que TIA-1 n'agit pas au niveau de la stabilité des ARNm, comme le fait TTP, mais de leur traduction (235). L'action conjointe de TTP et de TIA-1 sur le niveau d'expression de cytokines inflammatoires est démontrée *in vivo* par l'analyse comparative des souris simples ou doubles KO pour ces deux gènes : les souris *TTP*^{-/-} développent une arthrite plus sévère que les souris *TIA-1*^{-/-} mais moins sévère que celle que l'on observe dans les souris doubles mutantes *TTP*^{-/-} et *TIA*^{-/-} (203). Un autre exemple, tiré cette fois-ci de l'analyse de souris transgéniques surexprimant la protéine HuR, confirme le rôle et la complexité de la régulation des cytokines par les AUBP. Comme on s'y attend compte tenu de la fonction stabilisante de cette AUBP, il y a bien une augmentation de la stabilité des ARN TNF- α et Cox2 dans les cellules myéloïdes qui surexpriment le transgène. Cependant, la réponse

inflammatoire n'est pas activée car cette surexpression, en synergie avec la protéine TIA-1, inhibe la traduction de ces ARNm (236).

Des modifications post-traductionnelles d'AUBP aux maladies

On connaît depuis longtemps l'importance de l'activation de voies de signalisation dans la régulation post-transcriptionnelle de la biosynthèse des cytokines en réponse au stress (237). L'implication précise de la voie MAPK p38 dans l'induction de l'expression du TNF- α a été mise en évidence par l'utilisation de souris dans lesquelles une des kinases activées par la kinase p38 est inactivée, les souris *MK2*^{-/-} (**Figure 41**).

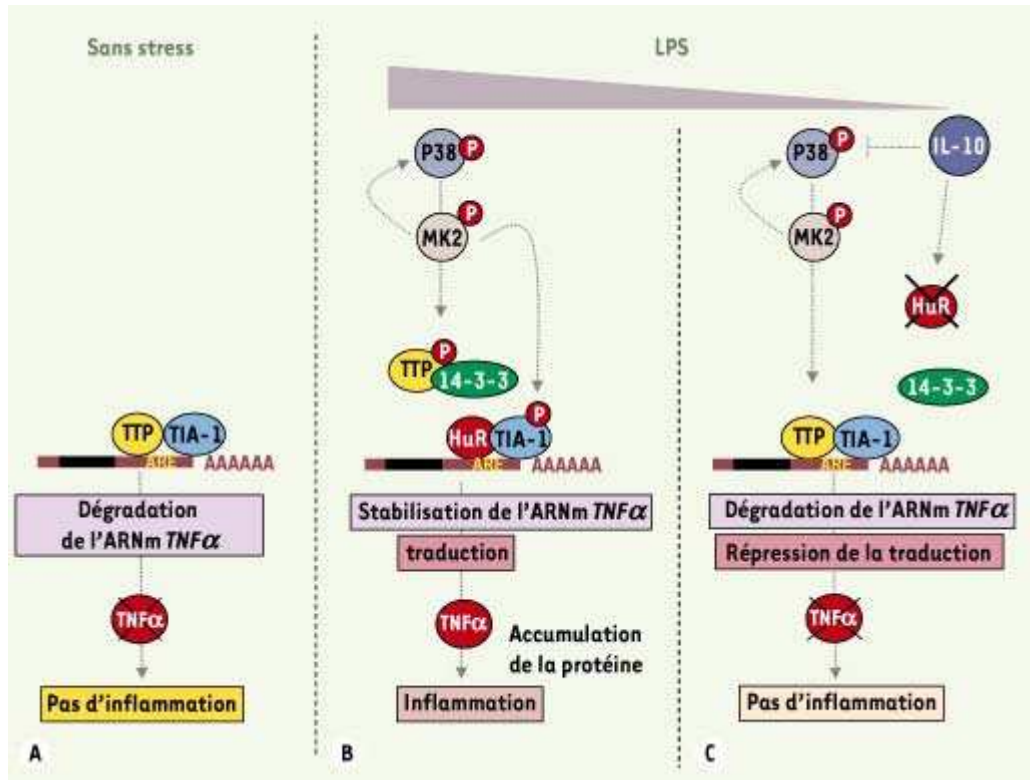


Figure 41 : Modèle de la cinétique d'action de l'ARE du TNF α en réponse à l'activation de la voie MAP-kinase p38. **A.** Dans des conditions normales, l'AUBP déstabilisante TTP se fixe sur l'ARE du TNF- α ce qui provoque sa dégradation. **B.** L'activation de la voie p38 entraîne une phosphorylation de TTP qui « libère » l'ARE du TNF- α , le rendant éventuellement accessible à des protéines stabilisantes comme HuR. Les transcrits accumulés sont activement traduits, ce qui présuppose la levée de l'inhibition traductionnelle exercée par TIA-1/TIAR. L'activation de p38 pourrait favoriser la phosphorylation de TIA-1/TIAR. Bien que sa phosphorylation n'altère pas sa liaison à l'ARE (235), elle pourrait modifier sa capacité à inhiber la traduction. Alternativement TIA-1/TIAR pourrait être en quantité trop faible pour réprimer la traduction de l'ensemble des molécules d'ARNm TNF- α synthétisées lors de la stimulation des cellules par le LPS (lipopolysaccharide). Lorsque l'activation de la voie s'estompe, le stock de TTP -préservé de la dégradation par sa liaison à la protéine 14-3-3- est déphosphorylé et peut à nouveau fixer l'ARE entraînant une dégradation de l'ARN. La quantité de l'ARN est alors diminuée rétablissant ainsi l'équilibre stœchiométrique entre TIA-1/TIAR et sa cible ARN. **C.** Parallèlement à l'activation de la voie p38, IL-10, un inhibiteur clé de la réponse inflammatoire, est synthétisé. Elle exerce un effet négatif sur la traduction du TNF α en diminuant la synthèse d'HuR (238).

Le traitement des souris *MK2^{-/-}* par le LPS ne provoque pas de réponse inflammatoire car il n'y a pas de synthèse de TNF- α . TTP est faiblement exprimé dans leurs macrophages et, contrairement à ce qu'on observe dans les souris sauvages, il n'est pas phosphorylé. Le modèle proposé est que l'activation de la voie p38, *via* la kinase MK2, provoque la phosphorylation de TTP, favorisant ainsi à la fois sa stabilisation, sa liaison à la protéine 14-3-3 et la réduction de son affinité pour l'ARE. Il en résulte une accumulation transitoire, tant que perdure l'activation de la voie de signalisation, des ARN TNF- α (239). Dans les souris *MK2^{-/-}*, la faible expression de TTP entraîne bien une accumulation des transcrits TNF- α , mais ils ne sont pas traduits. Ces résultats suggèrent que la voie p38 a deux effets sur l'expression de TNF- α qui reposent tous les deux sur la présence de l'ARE : un rôle sur l'accumulation des transcrits *via* la modulation de l'interaction ARE/TTP, et un rôle sur leur traduction *via* un (ou des) facteur(s) qu'il reste à caractériser. Un de ces facteurs pourrait être l'inhibiteur traductionnel TIA-1 puisque son ablation génétique provoque la traduction de l'ARN *TNF-a* sans affecter son abondance (**Figure 41**).

L'implication des voies de signalisation dans la régulation de l'activité des AUBP ne se limite certainement pas au contrôle de l'homéostasie du système immunitaire. En effet, la découverte récente qu'AUF1 a pour partenaire une kinase oncogénique suggère que des modifications post-traductionnelles d'AUBP puissent également être impliquées dans l'apparition de cancers (240). Les auteurs montrent dans cette étude qu'AUF1 s'associe à la tyrosine kinase NMP-ALK caractéristique des lymphomes anaplasiques à grandes cellules et que son hyperphosphorylation s'accompagne d'une augmentation de la stabilisation d'ARNm à ARE, tels que ceux codant pour c-Myc et les cyclines D1, A2 et B1. AUF1 se trouve associé avec la tyrosine kinase oncogénique dans des granules cytoplasmiques. Ces granules pourraient, à l'instar des *P bodies* et des granules de stress, jouer un rôle dans le contrôle de la dégradation et/ou du stockage des ARNm et ainsi contribuer au phénotype tumoral des cellules exprimant la kinase oncogénique. Ainsi non seulement le niveau d'expression des AUBP, mais également leur localisation sub-cellulaire et leurs modifications post-traductionnelles, déterminent leur capacité à interagir avec l'ARE et à moduler la stabilité de l'ARN qui le porte.

Pour conclure, nous pouvons dire que l'importance des modifications post-traductionnelles dans la régulation de l'expression des ARN à ARE au cours de processus physiologiques apparaît aujourd'hui de plus en plus évidente. La découverte que la stabilité et la traduction de nombreux ARNm sont fréquemment dérégulées dans des cancers et maladies inflammatoires ouvre de nombreuses perspectives tant du point de vue fondamental que thérapeutique.

b. Les miRNA

La régulation de l'expression génique se réalise également grâce à de petits ARN nommés miRNA qui vont permettre de réguler la dégradation spécifique de certains ARNm (241). Les micro ARN (miRNA) sont des ARN simple-brin longs d'environ 21 à 24 nucléotides. Il existe plusieurs centaines de gènes de microARN dans le génome de la plupart des organismes pluricellulaires. Les miRNA sont des répresseurs post-transcriptionnels : en

s'appariant à des ARN messagers, ils guident leur dégradation, ou la répression de leur traduction en protéine.

i. Biosynthèse des miRNA

Les gènes de miRNA sont transcrits sous la forme de longs précurseurs appelés « pri-miRNA ». Ces précurseurs sont clivés dans le noyau par un complexe nommé Microprocesseur, et formé par les enzymes Drosha et DGCR8 (Di George Critical Region 8 ou Pasha) (chez les animaux); par une enzyme de la famille Dicer (chez les plantes); en un produit intermédiaire appelé « pre-miRNA ». Le pre-miRNA est un ARN long d'environ 70 nucléotides, replié en tige-boucle imparfaite par complémentarité de bases entre la première moitié et la deuxième moitié de sa séquence. Ce pre-miRNA est transporté du noyau au cytosol par transport actif GTP-dépendant grâce à une interaction avec l'exportine 5 (chez les animaux).

Le pre-miRNA est ensuite clivé par une enzyme de la famille Dicer qui permet l'hydrolyse de la structure boucle (chez les animaux, cette réaction se déroule dans le cytoplasme ; elle est nucléaire chez les plantes), pour libérer un petit ARN double-brin appelé « miRNA » (**Figure 42**). Ce miRNAdb (db=double brin) interagit alors avec une protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) pour former le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex). Ce complexe d'environ 160kDa a été décrit comme étant suffisant à l'activité de « silencing » des miRNAs, cependant d'autres protéines telles la Geminine peuvent s'y ajouter pour former des complexes allant jusqu'à 550kDa. Au cours de la formation du RISC il y a passage d'un miRNAdb à un miRNA sb (sb=simple brin). Seul le brin spécifique de l'ARNm cible du miRNA est gardé (réaction thermodynamique) au sein du complexe.

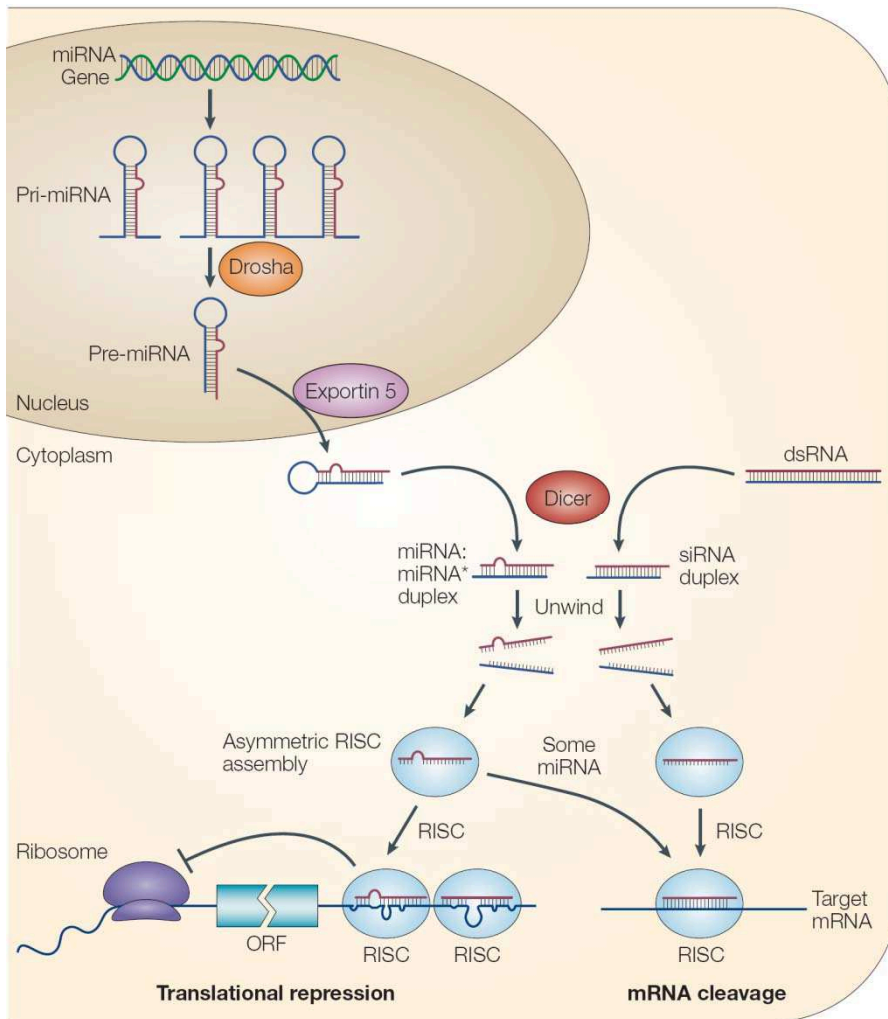


Figure 42 : représentation schématique de la synthèse et de l'activité des miRNA.

<http://www.microrna.ic.cz/obr/image003.png>

L'ARNm cible est alors chargé au sein du complexe RISC. Deux voies de "Silencing" sont alors possibles, soit la dégradation de l'ARNm cible si le complexe contient la protéine Ago2, soit la répression de la traduction de ce dernier si le complexe contient la protéine Ago1. Les enzymes Dicer sont également responsables de la production de petits ARN interférents (ou siRNA) à partir de longs ARN double-brin, au cours du processus d'interférence à ARN. Ce processus a été décrit chez la plante comme pouvant être une défense antivirale.

ii. Fonction

Les miRNAs ont été montrés comme étant impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques essentielles telles la croissance cellulaire, l'apoptose, le métabolisme, etc. Cependant depuis quelques années, ces miRNAs ont été décrits comme dérégulés dans un grand nombre de tumeurs. Certains sont même directement impliqués dans les mécanismes de carcinogénèse et communément dénommés "oncomiR" (242).

Un des challenges actuel est de pouvoir mieux identifier les gènes ciblés par ces miRNAs afin de mieux comprendre leur rôle et les conséquences de leur dérégulation dans les pathologies.

Concernant le TNF- α , il a récemment été démontré le rôle du miR-346 dans la régulation de l'expression de ce gène par une action indirecte. En effet, il apparait que ce miR, via la protéine BTK permet de réguler l'expression de TTP et donc la stabilité de l'ARNm du TNF alpha.

IV. Thérapeutiques actuelles et stratégies d'inhibition génique.

A. Evolution des thérapeutiques de la PR.

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie qui provoque des douleurs inflammatoires des articulations, le plus souvent des mains, des poignets et des pieds. Elle évolue par poussées non prévisibles et entraîne des déformations aboutissant à la destruction irréversible de l'articulation et à l'invalidité. Pour ne pas en arriver là, il convient de diagnostiquer cette affection et de la traiter le plus tôt possible.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant une rémission totale et systématique de la polyarthrite rhumatoïde, néanmoins la prise en charge de cette pathologie évolue de paire avec la compréhension de son établissement et donc des avancées scientifiques.

Le traitement de cette affection peut être envisagé sous 3 angles, indépendants ou concomitants :

- Calmer la douleur (traitement symptomatique): antalgiques, anti-inflammatoires, physiothérapie: ces mesures n'ont pas d'effet sur l'évolution de la polyarthrite.
- Limiter l'activité de la maladie (traitement de fond): aucun médicament ne guérit la maladie avec certitude, mais des rémissions complètes sont possibles. Le traitement de fond concerne la prise régulière de « médicaments » à long terme.
- Préserver la fonction articulaire (traitement conservateur): orthèses d'immobilisation articulaire, rééducation, réparation chirurgicale des déformations, ou au contraire blocage de l'articulation (arthrodèse).

Les sels d'or sont historiquement le premier traitement de fond de la PR (1929). Jusque dans les années 50, les traitements étaient uniquement symptomatiques. Ils ont l'avantage d'agir rapidement sur la douleur et l'inflammation et de calmer ainsi les poussées et les insomnies inhérentes à la douleur. En revanche, leur action est brève et ils génèrent des effets secondaires. Ils sont donc prescrits sur une courte durée et à des posologies relativement faibles. La cortisone a transformé le confort de vie des polyarthritiques dans les années 50, au prix d'effets indésirables non négligeables.

A partir des années 60, les progrès les plus spectaculaires sont venus de la chirurgie: les prothèses articulaires ont redonné une autonomie à de nombreux patients. D'autres médicaments de fond sont venus épauler les sels d'or, mais avec une efficacité inconstante, partielle, et une fréquence des effets indésirables qui les faisaient arrêter chez une majorité de

personnes traitées. L'émergence des traitements de fond date des années 80, avec l'arrivée du Méthotrexate. Ce médicament, efficace au bout de 6 semaines (contre 3 mois pour les autres traitements de fond), à prendre sur le long terme, agit sur le système immunitaire, il a un mécanisme d'action encore mal compris. Il permet d'éviter les lésions osseuses et de ralentir les détériorations articulaires. Plus de la moitié des personnes traitées continuent à en prendre au bout de 5 ans. Efficace et bien toléré, il est cependant encore parfois complété par un traitement symptomatique (**Figure 43**). Le léflunomide, plus récent (2000) est comparable en efficacité et en tolérance, bien que le méthotrexate reste le traitement de première ligne.

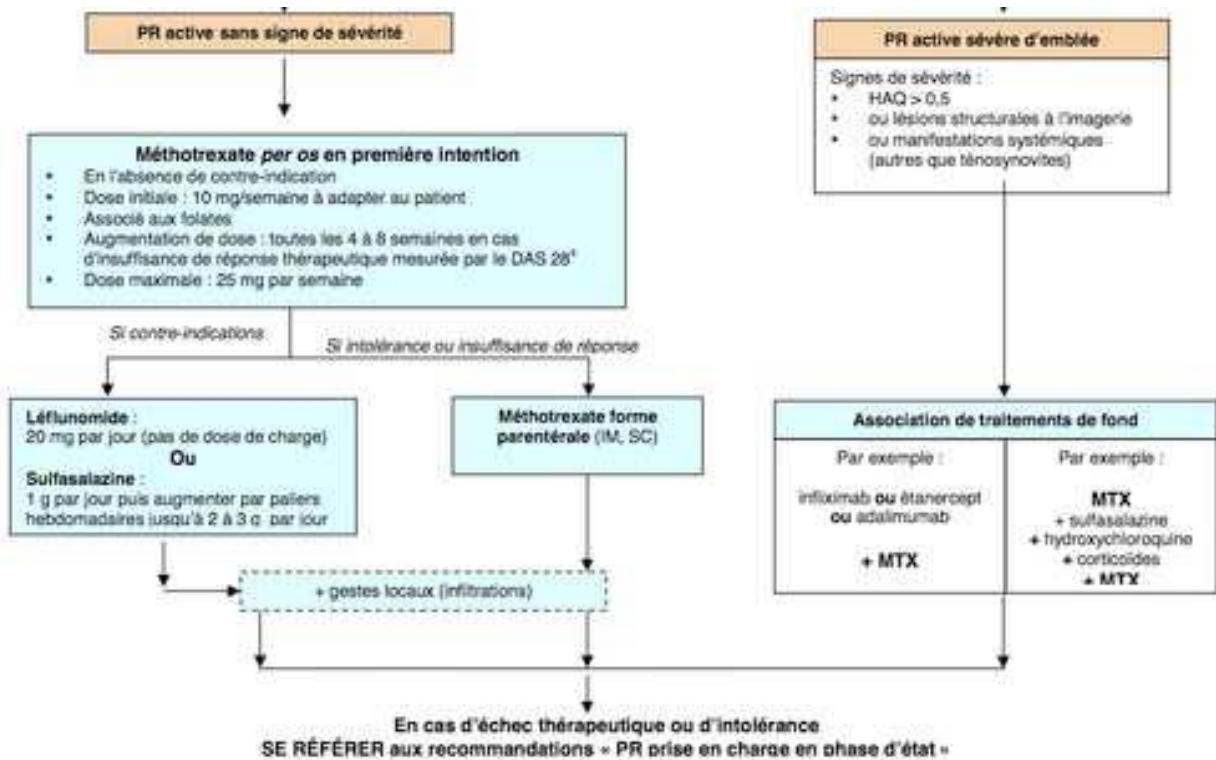


Figure 43 : Prise en charge thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde. <http://www.maitrise-orthop.com/viewPage.do?id=732>

L'amélioration des connaissances sur le mécanisme de la PR a permis le développement des biothérapies dans les années 2000. Ce terme désigne des médicaments issus du génie génétique et qui ont la propriété d'être très ciblés contre les protéines de l'inflammation. Il fut ainsi mis au point des médicaments ciblés contre une molécule-clé de l'inflammation rhumatismale, le TNF- α . Plusieurs anti-TNF- α sont actuellement disponibles, l'éta nercept, l'infliximab et l'adalimumab ayant été les premiers à être utilisés. Néanmoins, les anti-TNF- α sont très coûteux (environ 12.000€ ou par an par personne). Le méthotrexate est généralement administré en même temps que les anti-TNF- α afin d'éviter la formation d'anticorps contre ce médicament et l'apparition d'une résistance à son action. Reste que tous les malades ne répondent pas aux anti-TNF- α actuels. C'est pourquoi de nouvelles biothérapies sont continuellement proposées aux quelques 20 à 30% des sujets résistants aux anti-TNF- α .

Les avancées qui ont été faites dans le domaine de la compréhension des interactions entre les médiateurs de l'inflammation et la physiopathologie de l'arthrite ont permis le

développement de plusieurs stratégies visant à améliorer la prise en charge de cette pathologie. La **Figure 44** résume l'état actuel du développement de ces différentes stratégies. Celles-ci cherchent à s'opposer de plus en plus spécifiquement aux différentes cellules impliquées dans les processus de dégradation des articulations.

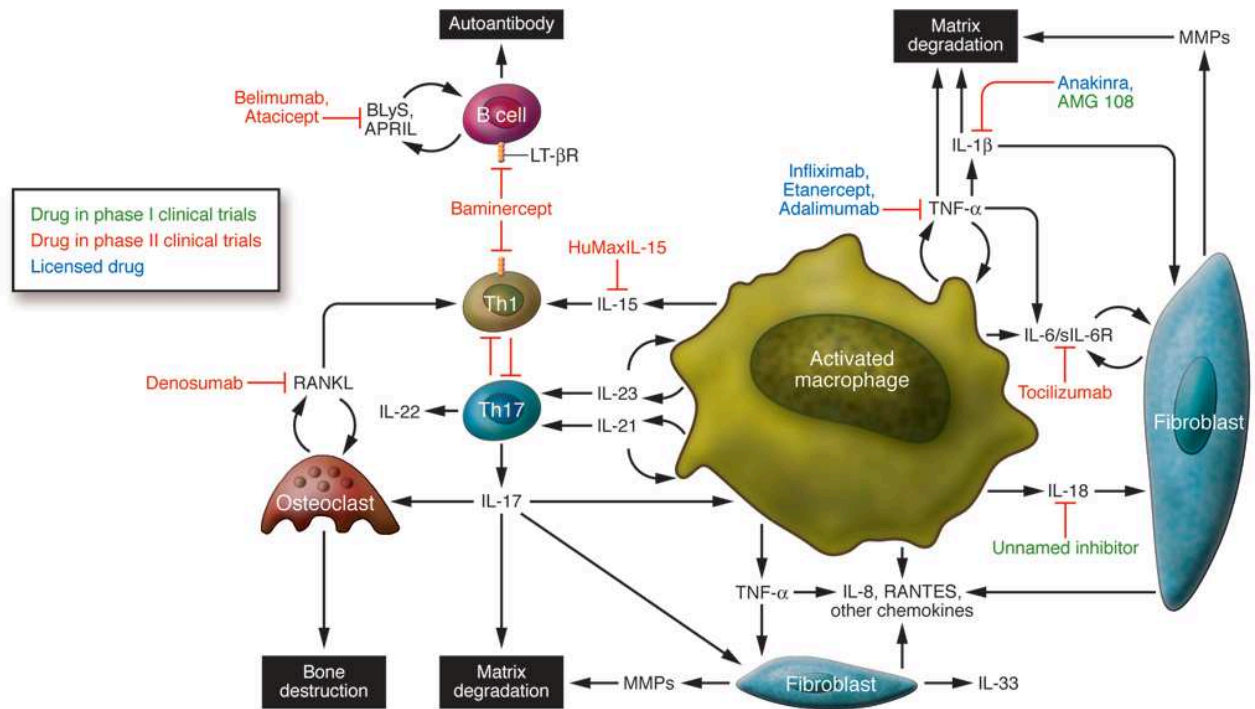


Figure 44 : Cytokines ciblées dans la polyarthrite rhumatoïde. Cette figure résume les interactions cellulaires étant supposées d'importance dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde et décrit les interactions existant entre les macrophages, lymphocytes B, lymphocytes T et cellules non hématopoïétiques (fibroblastes, os, cellules du tissu conjonctif). Ces interactions interviennent par le biais des cytokines sécrétées par les cellules activées, qui par des voies autocrine et paracrine, vont induire la production d'autres cytokines pro-inflammatoires contribuant à la pathogénèse de cette maladie. Les cytokines ayant un rôle pathogénique potentielle ont été identifiées et des thérapies les ciblant développées (bloquer leur action). Cette figure identifie ces modalités thérapeutiques et le stade de développement clinique des différentes approches (d'après Brennan *et al*, 2008 (243))

Le développement de ces biothérapies peut également être envisagé sous un autre angle. En effet, les traitements actuellement disponibles ont une cible protéique, or les avancées technologiques permettent aujourd'hui d'inhiber l'expression génique à un stade plus précoce. La stratégie d'inhibition génique peut être envisagée à différents niveaux. Il est possible d'inhiber cette expression à son origine, soit au niveau du gène lui-même (ciblage de l'ADN), soit en ciblant spécifiquement la dégradation des ARNm, il est également possible de cibler directement le messager sous sa forme protéique (biothérapies actuelles). La principale différence entre ces différentes approches réside dans le fait que le nombre de cibles potentielles varie.

B. Les biothérapies actuelles : Inhibition de l'expression au niveau protéique

Les traitements anti-TNF alpha actuellement disponible et utilisés en clinique ont une cible protéique. L'infliximab est un anticorps monoclonal chimérique (humain-murin) qui se fixe au facteur de nécrose tumoral humain, qu'il soit sous forme soluble ou membranaire et inhibe sa bioactivité. Il déclenche également une réponse cytotoxique vis-à-vis des cellules exprimant le TNF alpha membranaire. C'est donc un traitement immunomodulateur. Il s'administre en perfusions intraveineuse de 2 heures, à intervalles rapprochés en début de traitement (2 semaines puis 4 semaines) puis tous les deux mois. La dénomination commerciale de l'infliximab est Remicade[®]. En France, l'infliximab est indiqué pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, de la maladie de Crohn, de la rectocolite hémorragique, de la spondylarthrite ankylosante, du rhumatisme psoriasique, du psoriasis, son utilisation est également proposée pour d'autres maladies inflammatoires. Le Remicade[®] a eu des succès thérapeutiques majeurs, et encouragea le développement d'autres inhibiteurs du TNF- α tels que l'adalimumab (Humira[®]) et l'éta nercept (Enbrel[®]) (**Figure 45**). L'éta nercept est un inhibiteur du TNF- α . Il ne s'agit pas d'un anticorps monoclonal, mais d'une protéine de fusion associant la fraction P75 du récepteur soluble du TNF- α avec un fragment Fc d'une IgG1. Ce médicament est utilisé dans certains rhumatismes inflammatoires de l'adulte et de l'enfant ainsi que dans le traitement du psoriasis. Il est disponible en solution pour injection sous-cutanée (s.c.) hebdomadaire ou bi-hebdomadaire (selon l'indication). L'adalimumab, comme l'indique son suffixe *-mumab* est un anticorps intégralement humain capable de lier le TNF- α . En se complexant avec cette cytokine pro-inflammatoire, il empêche son interaction avec son récepteur, et module ainsi les processus TNF- α dépendants (solution pour injection sous-cutanée, bimensuelle ou hebdomadaire). Plus récemment, le Golimumab et certolizumab pégol ont été développés et récemment mis sur le marché au Canada et le seront dans les mois à venir en France.

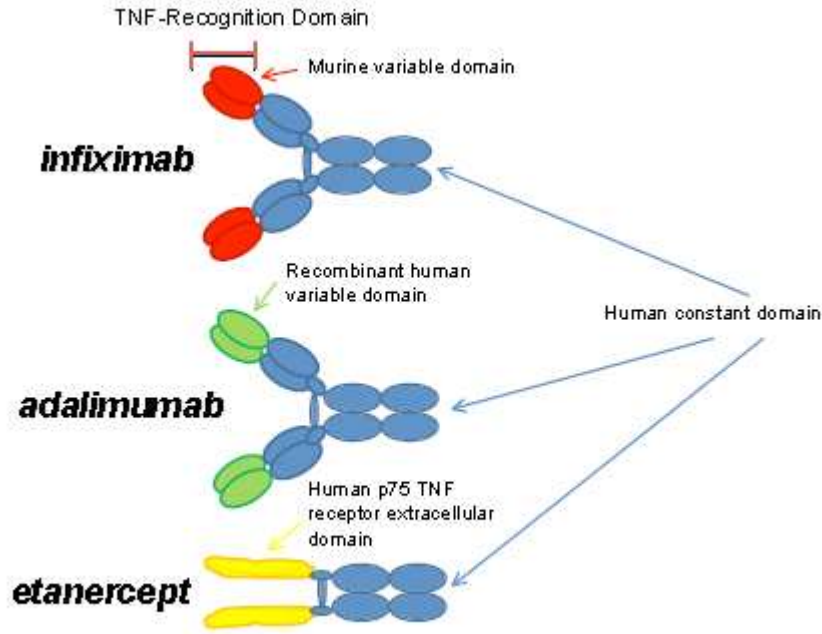


Figure 45 : Représentation schématique des 3 anti-TNF- α : Infliximab, Adalimumab et Etanercept.(d'après Fleischmann R *et al*, 2003 (244))

Ces traitements anti-TNF- α ont une efficacité significative sur l'évolution de la PR mais 1/3 environ des patients ne répondent pas à ceux-ci et des effets secondaires tels que les infections opportunistes (tuberculose) peuvent apparaître.

Effets indésirables des inhibiteurs du TNF- α

- Réactions à l'injection

Avec l'éтанercept, la rougeur cutanée est fréquente après l'injection sous cutanée : 20 à 40 % des cas. Cependant, ces réactions cutanées sont toujours bénignes, et le plus souvent sont présentes uniquement au début du traitement. Dans les deux grands essais cliniques ayant évalué l'infliximab : ATTRACT dans la PR et ACCENT I dans la maladie de Crohn, environ 25 % des patients ont présenté au moins une fois une réaction d'intolérance à la perfusion IV. Cependant, celles-ci étaient le plus souvent mineures : éruption cutanée, fièvre. Les réactions graves : érythrodermie, œdème laryngé, bronchospasme, hypotension, n'étaient présentes que chez 0,3 à 1 % des patients. Il est intéressant de constater que les réactions d'intolérance sont deux fois plus fréquentes dans l'étude ACCENT I, qui n'utilisait un immunosuppresseur associé que chez un quart des malades environ, par rapport à l'étude ATTRACT où le méthotrexate était systématiquement administré en association à l'infliximab. Ces réactions d'intolérance sont plus fréquentes en présence d'anticorps anti-infliximab, lesquels apparaissent plus souvent en l'absence de traitement immunosuppresseur associé.

- Infections

Infections bactériennes

Dans aucune des études cliniques évaluant l'infliximab, l'adalimumab ou l'éтанercept, il a été noté une augmentation statistiquement significative des infections bactériennes, qu'elles

soient bénignes ou graves. Il faut uniquement noter une augmentation non significative des infections des voies aériennes supérieures. Des infections bactériennes graves et inhabituelles ont été cependant signalées, notamment des épisodes de fasciites nécrosantes.

Tuberculose

Il s'agit actuellement du principal effet secondaire de l'infliximab. Depuis l'article du *New England Journal of Medicine* de septembre 2001 qui décrivait 70 cas (245), il est établi qu'il existe une augmentation de l'incidence de la tuberculose chez les patients traités par infliximab. Trois éléments caractérisent ces tuberculoses :

- une grande fréquence des formes extra pulmonaires (55 % des cas) ;
- une plus grande fréquence des tuberculoses en Europe alors que 80 % des malades traités sont aux États-Unis, 70 % des tuberculoses apparaissent hors des États-Unis et essentiellement en Europe.

- une rapidité d'apparition de la tuberculose après la mise en route de l'infliximab (72 % des cas dans les trois premières perfusions, 94 % des cas dans les 6 premières perfusions).

Le risque de tuberculose apparaît aussi augmenté avec l'autre anticorps monoclonal anti-TNF récemment disponible, l'adalimumab. Ce risque apparaît plus faible avec l'utilisation de l'éta nercept.

D'autres infections opportunistes telles que la pneumocystose, l'histoplasmosse, l'aspergillose ou la listériose ont été décrites de façon exceptionnelle avec l'infliximab.

- Apparition d'auto-anticorps et d'autres maladies auto-immunes

Lors de l'essai « ATTRACT » évaluant l'infliximab dans la PR, il fut noté l'apparition d'anticorps antinucléaires chez environ 60 % des malades et d'anticorps anti-ADN double brin chez 15 % d'entre eux (246). Les anticorps anti-ADN double brin apparaissent aussi chez des malades traités pour d'autres pathologies : 12 % dans ACCENT I (247) (maladie de Crohn) et environ 20 % chez des patients traités pour spondylarthropathie (248). L'apparition d'anticorps anti-ADN a également été rapportée chez 5 % des patients traités par éta nercept (249). Quelques cas de syndromes lupiques et de vascularite toujours réversibles à l'arrêt du traitement ont été décrits (250).

Une interprétation possible de ces faits est la suivante : l'inhibition du TNF- α entraîne une diminution des cytokines de type TH1 : IL-2 et IFN γ , ce qui favoriserait une augmentation des cytokines de type TH2 : IL-4 et IL-10, jouant un rôle dans le lupus et la sécrétion des anticorps anti-ADN double brin. Cela souligne bien la prudence qu'il convient d'avoir quand on modifie le système cytokinique. Compte tenu du fait que ces réactions sont purement biologiques et qu'elles apparaissent quelle que soit la pathologie concernée, la présence d'anticorps antinucléaires (observée dans 20 à 40 % des cas de PR) n'est pas une contre-indication à la mise sous anti-TNF α .

- Episodes de démyélinisation

Avec l'infliximab, quelques cas d'exacerbation de sclérose en plaques (une dizaine) ont été décrits (251). Une méningite aseptique a également été rapportée (252). Les observations de démyélinisation semblent plus fréquentes avec l'éta nercept : 17 cas rapportés. Aujourd'hui,

antécédent de sclérose en plaques ou de maladie démyélinisante du système nerveux central est une contre-indication à l'utilisation des anti-TNF- α .

Une explication de ces effets secondaires pourrait résider dans le fait que ces traitements sont réalisés sous forme d'injections consécutives et répétées. Ce problème attire l'attention sur des méthodes d'inhibition de l'expression génique en amont de la cible protéique. Les quantités à apporter seraient potentiellement plus faible.

C. Inhibition au niveau traductionnel : l'ARN interférence

Jusqu'à la découverte de l'ARN interférence en 1998 (253, 254), il était attribué un rôle peu séduisant aux ARN, celui d'un messenger passif, délivrant l'information génétique de l'ADN à la machinerie cellulaire élaborant les protéines.

En 1998, Andrew Z. Fire et Craig C. Mello ont montré que l'on pouvait réduire spécifiquement l'expression de protéines contenues dans des cellules du nématode *Caenorhabditis elegans* en introduisant de l'ARN double brin dans celles-ci. Ils observèrent que lorsque l'on introduit des ARN double brins longs chez *C. elegans*, de petits ARN doubles brins courts, de 21 à 25 paires de bases sont générés. Ce phénomène fut alors nommé ARN interférence. Leur idée fut ensuite d'introduire directement les siRNA dans les cellules de mammifères. Cette manipulation provoqua l'interférence ARN sans déclencher la réponse interféron non spécifique. Les fantastiques perspectives ouvertes par ces travaux ont conduit de très nombreux laboratoires à étudier ce mécanisme dont le principe général est maintenant élucidé. Ces deux chercheurs, par le biais des découvertes découlant de leurs travaux ont reçu le 2 octobre 2006 le prix Nobel de physiologie et de médecine.

Concept. Le principe de l'ARN interférence consiste en la destruction spécifique d'ARNm via de petits fragments d'ARN et la participation d'enzymes de dégradation (ribonucléases). Les siRNA pour Small Interfering RNA sont de petits ARN double brin de 21 à 23 nucléotides. La présence de longs ARN double brin dans une cellule représente un signal qui fait intervenir une ribonucléase nommée Dicer ou « éminceuse ». Cette ribonucléase de type III coupe les longs ARN double brin en petits fragments d'ARN double brin, les siRNAs (Small Interfering RNAs), de taille et de structure précise (254). Les "siRNA" à l'état de double brin sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique nommé RISC (pour RNA induce silencing complex). Celui-ci s'active en libérant le brin complémentaire de l'ARN ou brin sens. Ce complexe activé va reconnaître son transcrit cible, un ARN messagers, par complémentarité des bases nucléiques (**Figure 46**).

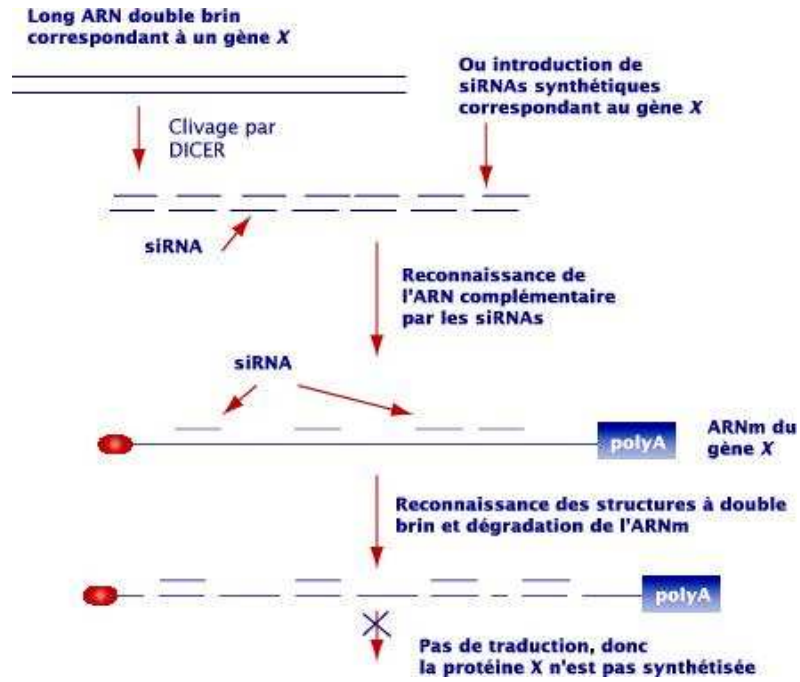


Figure 46: Principe de l'ARN interférence. (<http://www.biotech-medicine.com/archives/review27/actu>).

Ce système de reconnaissance assure la haute spécificité de ce mécanisme, en effet quelques bases non complémentaires suffisent pour empêcher le clivage. Dans certains cas, on peut choisir un siRNA capable de cliver un ARNm porteur d'une mutation ponctuelle sans affecter l'ARNm sauvage.

Une fois la cible liée, la protéine Ago, faisant partie du complexe RISC, va couper le transcrit au niveau du site de reconnaissance. Ago est donc une endonucléase. Les deux morceaux du transcrit clivé par Ago vont être rapidement dégradés via leurs extrémités par des exonucléases (Figure 47).

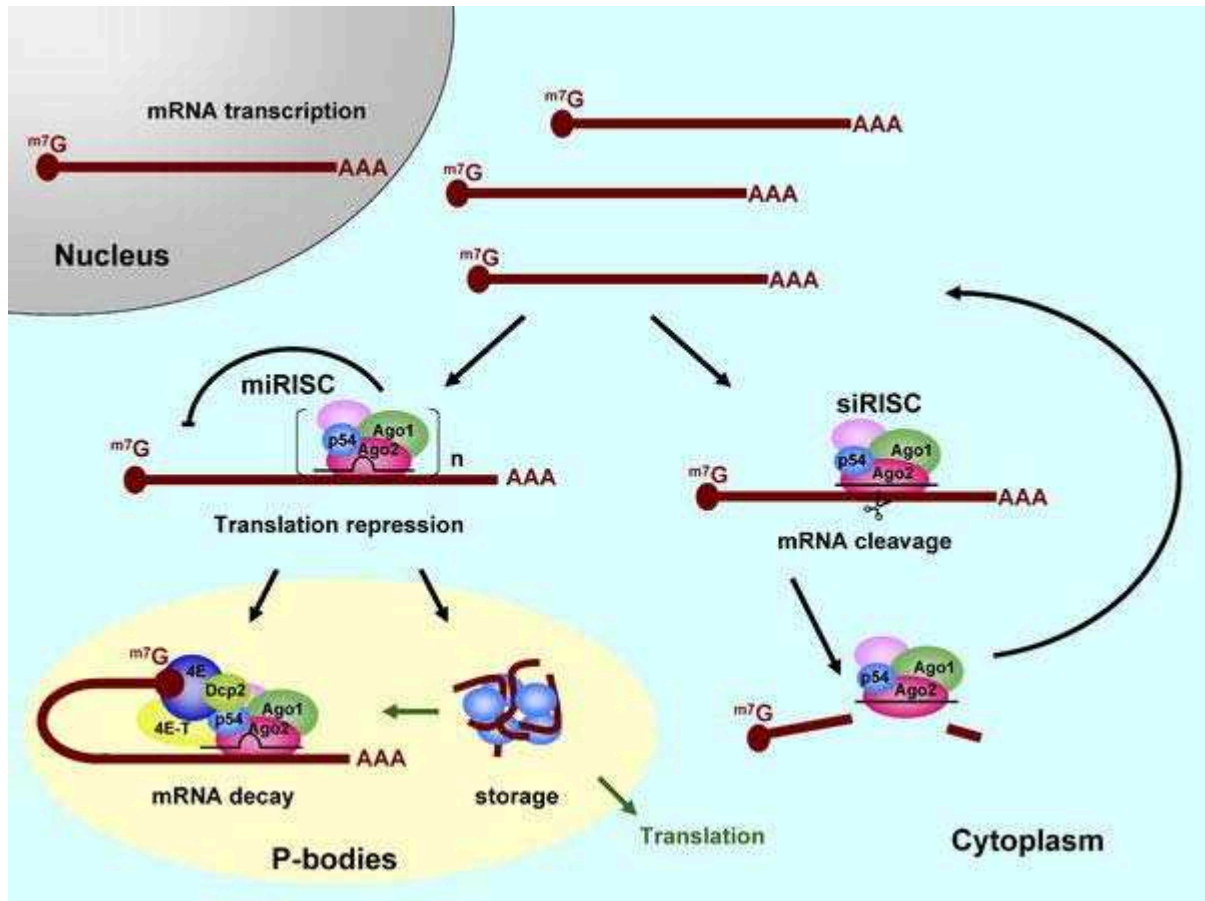


Figure 47 : Complexes protéiques mis en place pour la dégradation des ARNm par les siRNA et les miRNA. <http://scienceblogs.com/transcript/upload/2006/09/RNAi.jpg>

La découverte de ce mécanisme a ouvert l'utilisation de siRNAs synthétiques pour inhiber spécifiquement l'expression génique. En effet, la transfection de siRNA dans les cellules a pour conséquence directe la destruction spécifique des ARN messagers ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARN messagers. En résumé, les siRNA sont de petits ARN pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messagers et ainsi empêcher l'expression de gènes en clivant cet ARN.

Utilisations potentielles de l'approche ARN interférence. Il est possible de dégager deux grandes voies d'utilisation des siRNAs, d'une part, l'étude de la fonction d'un gène spécifique dans des systèmes vivants (255), et d'autre part l'utilisation de cette approche dans une optique thérapeutique : développement de thérapies anticancéreuses, antivirales (256) ou contre les dysfonctionnements neurologiques. En ce qui concerne les pathologies inflammatoires, il a été mis en évidence chez la souris que l'utilisation de siRNAs anti TNF- α dans le cas d'une arthrite induite au collagène permettait d'inhiber fortement l'inflammation articulaire (257). Cette technique permet d'obtenir des niveaux d'inhibition très élevés, atteignant 90%. Cette efficacité très marquée résulte notamment de la très bonne pénétration des siRNAs dans les cellules et de la stabilité des ARN double brin dans les cellules.

Depuis plusieurs années d'autres techniques destinées à inhiber l'expression d'un gène avaient été mises au point. Les plus connues utilisent des ARN antisens, des ribozymes, des aptamères, des oligonucléotides antisens. Par rapport à toutes ces techniques, l'ARN interférence s'est révélée tout à la fois plus efficace et beaucoup plus souple au niveau du choix de la séquence cible et techniquement simple à mettre en œuvre, ce qui explique sa très grande popularité. De nombreux gènes sont surexprimés ou exprimés au mauvais endroit ou au mauvais moment dans de nombreuses pathologies. La possibilité de pouvoir inhiber ces expressions pathologiques est un espoir important pour soigner ces nombreuses maladies, au premier rang desquelles on trouve les cancers. Ces découvertes ont rapidement mené à des essais cliniques chez l'homme. L'ARN interférence permet d'étudier la fonction des gènes, ouvre des perspectives thérapeutiques importantes et a de plus ouvert un immense champ de recherche sur les petits ARN dits non-codants. On sait aujourd'hui que 2% seulement de notre ADN est codant, et on connaissait la fonction de certaines régions non codantes de l'ADN comme les télomères aux extrémités des chromosomes, les centromères et les séquences permettant de réguler la transcription du gène (promoteur et « *enhancers* »). Les techniques utilisées pour identifier les ARN transcrits à partir de l'ADN avaient volontairement éliminé les petits ARN considérés comme des produits de dégradation ou des éléments peu intéressants.

Il est également possible d'inhiber l'expression d'une de manière plus précoce par l'intermédiaire de molécules interagissant directement avec le gène.

D. Les triplex forming oligonucleotides (TFO)

1. Découverte

En 1957, à peine 4 ans après la découverte de la structure de la double hélice d'ADN par Watson et Creek, la formation d'une structure d'acides nucléiques à trois brins fut observée quand Felsenfeld *et al.* (258) ont décrit la faculté de séquences d'ARN polyU et polyA à se fixer dans un ratio 2 :1. Trente ans plus tard, l'étude de la triple hélice a connu un nouvel essor, car il a été découvert, d'une part, que des séquences oligopyrimidine / oligopurine en double hélice pouvaient être reconnues spécifiquement par des oligonucléotides formant une triple hélice (259, 260), et, d'autre part, que des séquences oligopyrimidiques / oligopuriques en symétrie miroir pouvaient former, dans les plasmides surenroulés négativement, des triples hélices intra-moléculaires appelées ADN-H (261, 262). La perspective de pouvoir contrôler l'expression des gènes par la formation de la triple hélice a été le moteur de ces nouveaux élans dans les études de la triple hélice.

2. Définition et principe de fonctionnement des TFO

Les oligonucléotides triple hélice (TFO) sont des séquences nucléotidiques simple brin de 12 à 30 nucléotides capables de former des structures similaires à celles décrites par Felsenfeld *et al.* en se fixant au sillon majeur de la double hélice d'ADN au niveau de séquences polypurines/polypyrimidine (**Figure 48**). Ces molécules se fixent à l'ADN de manière spécifique dans une orientation soit parallèle soit antiparallèle.

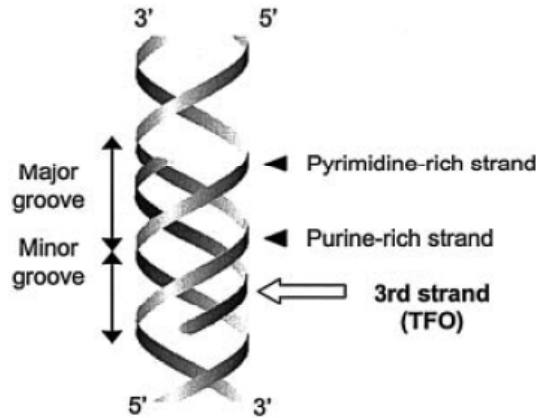


Figure 48 : Représentation schématique de la localisation d'un oligonucléotide TFO dans la double hélice d'ADN. http://www.isof.cnr.it/ppage/capob/dauno_file/image001.gif

Dans les motifs antiparallèles (purine), un TFO polypurique se lie via des liaisons hydrogènes Hoogsteen inverse (**Figure 49**) de manière antiparallèle à la séquence polypurique du double brin d'ADN. Dans les motifs parallèles (pyrimidine), un TFO polypyrimidique se lie via des liaisons hydrogènes Hoogsteen inverse de manière parallèle à la séquence polypurique du double brin d'ADN.

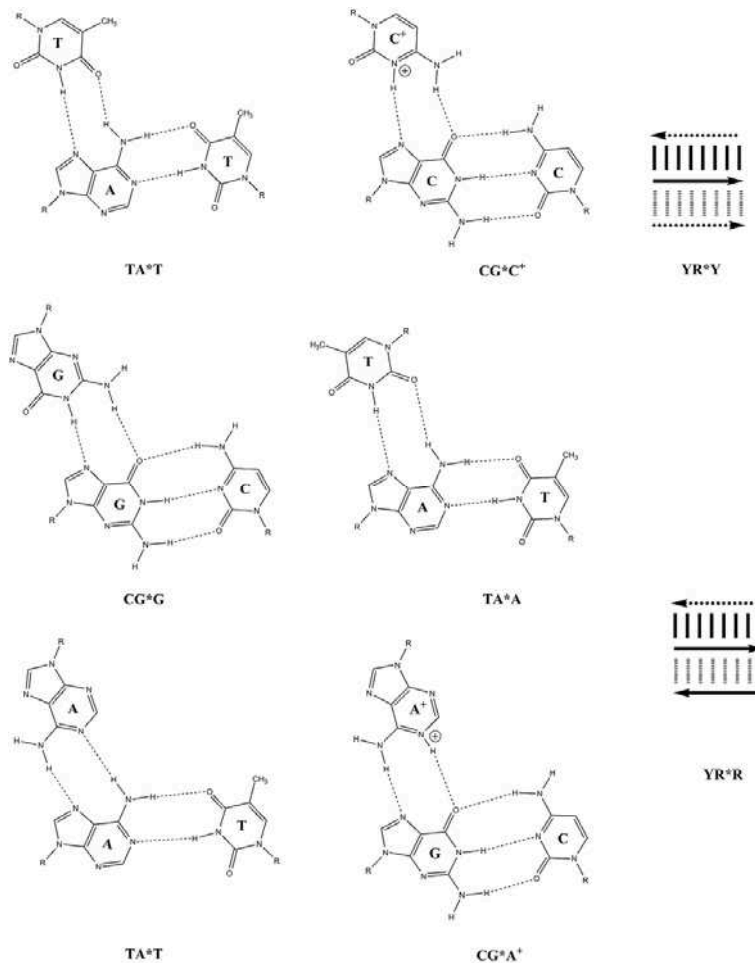


Figure 49 : Représentation schématique des liaisons de type Hoogsteen impliquées dans la formation de triples hélice. (D'après Hélène, C *et al.* (263))

Bien que la fixation de ces TFO ne puisse se réaliser qu'en présence de séquences polypurines/polypyrimidine, il a été démontré que ces sites putatifs de fixation sont très représentés dans le génome humain et tout particulièrement au niveau des régions promotrices des gènes (264, 265). Ces sites semblent avoir un rôle dans le positionnement correct des facteurs de transcription au niveau du promoteur (265). Ces découvertes ont ouvert des perspectives prometteuses quant à la modulation de l'expression génique. Le ciblage d'un gène par un oligonucléotide formant une triple hélice, en ayant pour objectif d'empêcher la transcription du gène est une solution séduisante et économique, en ce sens que le flux de l'information génétique est arrêté à sa première étape et que le nombre de cibles semble limité (266).

3. Utilisation des TFO

La spécificité de séquence a un rôle primordial dans l'efficacité du ciblage génétique. Grâce à cette spécificité, les gènes cibles peuvent être manipulés dans diverses orientations. Les TFO se fixent sur le sillon majeur du double brin d'ADN avec une grande spécificité et affinité. En s'appuyant sur ces caractéristiques, l'utilisation de TFO s'est imposée dans la modulation de l'expression génique (267). Ils ont par exemple été utilisés comme promoteur de mutations spécifiques de l'ADN dans le but de contrôler l'expression génique chez la souris (268, 269), comme des outils d'inhibition spécifique de la transcription génique (270-272), inhibiteurs de la fixation de protéines sur l'ADN, inhibiteurs de la réplication de l'ADN, inducteurs de mutagenèse (273), et favorisant la recombinaison dans les cibles chromosomales et épisomales. Une représentation schématique de ces différentes possibilités est donnée sur la figure ci-dessous (**Figure 50**).

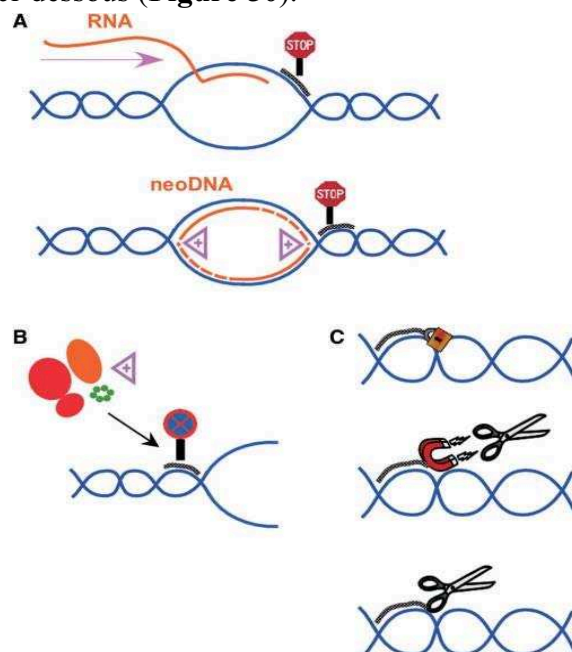


Figure 50 : Représentation schématique d'exemples d'utilisation de TFO pour moduler l'expression génique. (A) blocage physique de la transcription ou de l'élongation lors de la réplication, (B) inhibition par encombrement stérique de l'initiation de la transcription ou de la réplication, (C) clivage ou modification de l'ADN.

<http://homepages.strath.ac.uk/~bas96104/Msc/image011.GIF>

Etude bibliographique

Des TFO ont été utilisés dans une optique thérapeutique contre les tumeurs présentant une surexpression du PDGF- β . Un TFO spécifique d'une région du promoteur du gène codant le PDGF- β a été utilisé. Il permet de réguler l'expression de ce gène en empêchant les facteurs de transcription de se fixer (272). De même, il a été montré que cette stratégie pouvait être envisagée pour inhiber spécifiquement l'expression des gènes c-myc et Ets2 en se fixant au niveau du promoteur (274). Ces études témoignent de la possibilité d'utiliser cette approche pour inhiber spécifiquement l'expression d'un gène.

Cependant, bien que les TFO soient aujourd'hui bien caractérisés, il existe toujours de nombreux points d'achoppement en ce qui concerne l'utilisation de la technologie triplex *in vivo*. La fixation des TFO peut être inhibée par les conditions cellulaires telles que les concentrations en potassium et magnésium, et le pH cellulaire. Une diminution de la liaison peut également être observée lors d'une accessibilité réduite de la séquence cible suivant sa localisation dans la chromatine. Le déficit majeur concerne la rapide dégradation des oligonucléotides du fait de la présence de nucléases, ceci ayant pour conséquence une baisse d'activité des TFO. C'est pourquoi des modifications structurales ont été envisagées, celles-ci pouvant être réalisées à différents niveaux (**Figure 51**).

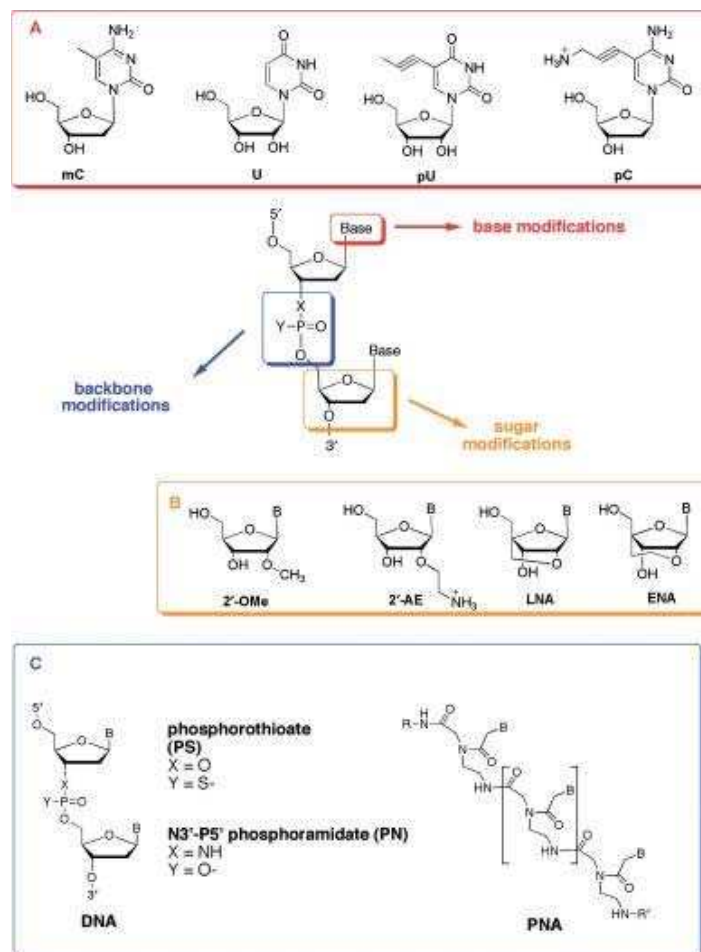


Figure 51 : Représentation des différentes modifications chimiques envisageables sur les TFO.

(a) modification de la base, (b) du sucre, (c) et des liaisons.

<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/triplexes/bases/modifications.gif>

Parmi les modifications de bases, l'utilisation de la 5-méthylcytosine est aujourd'hui ce qu'il y a de plus répandu pour améliorer les restrictions d'utilisation dues au pH (275). Des modifications au niveau du sucre ont également été développées avec la o-méthylation (276), les LNA (Locked Nucleic Acid) (277) et les morphilino (278) qui permettent de favoriser et de stabiliser la formation de triplex.

Il apparaît aujourd'hui qu'un renforcement des TFO par modification des liaisons s'avère efficace. L'utilisation des oligonucléotides phosphorotioates (remplacement d'un atome d'oxygène par un atome de soufre) a été envisagée pour leur capacité à résister plus efficacement aux nucléases intracellulaires et donc à avoir un temps de vie plus important que les oligonucléotides « nu » (liaison phosphodiester classique) comme l'ont démontré les travaux de Hélène et Saison-Behomaras (279). Il existe d'autres oligonucléotides non naturels qui sont résistants à la dégradation tels que les oligonucléotides d'anomérisation alpha, qui forment avec les ARNm un duplex non reconnu par la RNase H. Le duplex ainsi formé empêche par effet mécanique la fixation des facteurs d'initiation de la traduction.

Les oligonucléotides avec des liaisons méthylphosphonate (remplacement d'un O par un groupe méthyl) présentent également une résistance accrue aux nucléases cellulaires mais ils ont en plus l'avantage de pénétrer assez facilement dans les cellules du fait de leur neutralité (280).

Ces différentes modifications permettent aujourd'hui d'envisager une inhibition de l'expression génique efficace par le biais de TFO, avec les avantages précédemment cités d'une inhibition précoce même si l'importance de la vectorisation reste à souligner.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le TNF- α « Tumor Necrosis Factor » est une cytokine pro-inflammatoire qui module la croissance, la différenciation et la fonction d'un grand nombre de cellules. Il est impliqué dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques et plus particulièrement dans la polyarthrite rhumatoïde (PR). Dans cette pathologie, le TNF- α occupe un rôle central dans l'inflammation de la membrane synoviale et la destruction ostéocartilagineuse. Cette inflammation chronique entraîne chez les patients atteints de PR un handicap et une altération de la qualité de vie secondaires aux lésions cartilagineuses.

L'inhibition spécifique de la synthèse du TNF- α constitue l'un des objectifs majeurs tant dans une perspective thérapeutique lors des rhumatismes inflammatoires que pour la compréhension de la physiopathologie de cette affection. Une démonstration en a été fournie par les effets cliniques bénéfiques obtenus par l'administration des biothérapies (anticorps anti-TNF- α) chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde. D'autre part, il a été démontré expérimentalement chez le rat que la neutralisation ou l'inhibition de la production de TNF- α conduisait à une diminution de la production de l'IL-1 β et de l'IL-6 notamment. Cependant l'utilisation d'anticorps anti-TNF- α ne va pas sans poser quelques problèmes (biologiques et économiques) dans le traitement au long cours des rhumatismes inflammatoires.

De ce fait, le développement de méthodes d'inhibition spécifique de la synthèse de TNF alpha semble trouver naturellement sa place afin de renforcer l'arsenal thérapeutique actuellement disponible en clinique. De plus, l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques anti-TNF- α peut, si ces dernières démontrent leur efficacité, constituer de réelles alternatives et/ou des compléments aux thérapeutiques existantes dans d'autres pathologies où cette protéine joue un rôle central.

L'objectif premier de ce travail de thèse est d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de l'inhibition de l'expression du TNF- α par l'utilisation d'un oligonucléotide triple hélice (TFO : Triplex Forming Oligonucleotide) spécifique du promoteur de ce gène. La faisabilité de ce type d'approche est d'abord évaluée *in vitro* dans des cellules articulaires de rat (synoviocytes et chondrocytes) et humaines. Afin de démontrer l'intérêt de cibler le gène plutôt que les ARN messagers, nous avons comparé notre approche à une démarche plus conventionnelle d'inhibition de l'expression des gènes, la technique d'« ARN interference (siRNA) ».

Les différents types cellulaires sont transfectés avec les oligonucléotides (TFO et siRNA) puis stimulés par de l'IL-1 β , afin de mimer des conditions inflammatoires. Ceci nous permettra d'évaluer le potentiel d'inhibition de chaque système ainsi que son IC₅₀ sur les deux types cellulaires et de comparer leur efficacité respective.

La seconde étape de ce travail concernera l'évaluation *in vivo* de l'efficacité du TFO dans un modèle expérimental d'arthrite. Nous comparerons dans un premier temps l'efficacité d'un traitement préventif par le TFO au traitement par siRNA anti-TNF- α . Cette étude est menée dans un modèle d'arthrite aiguë permettant un screening rapide des potentialités anti-inflammatoires des deux approches : le modèle de mono-arthrite articulaire par injection de

parois de mycobactéries. L'approche présentant les effets les plus prononcés sur l'évolution de la pathologie, en l'occurrence le TFO anti-TNF- α , sera ensuite évaluée dans un modèle d'arthrite présentant une physiopathologie proche de celle de la PR humaine : le modèle d'arthrite chronique à l'antigène (la mBSA : sérum albumine bovine méthylée).

L'évaluation de l'efficacité de ces approches portera sur l'évolution des paramètres cliniques, biochimiques et histologiques ayant cours dans ces modèles d'arthrite.

MATERIELS ET METHODES

I. Expérimentation animale.

A. Préparation des animaux.

Toutes les études ont été réalisées chez les rats (Wistar Han, Charles River, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) mâles (150 - 175 g). Ils sont stabulés dans une animalerie thermo-régulée ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), dont l'air est renouvelé, et dans laquelle un rythme nyctéméral est respecté (cycles diurnes de 6 heures à 18 heures et nocturnes de 18 heures à 6 heures). Les rats sont placés dans des cages en plastiques par groupes de 3 à 5 suivant leur taille, avec accès à une nourriture standardisée et de l'eau *ad libitum*. Les expérimentations débutent après une période d'acclimatation d'une durée de 7 jours. Toutes les manipulations effectuées sur les rats sont réalisées sous anesthésie à l'isofluorane (AErraneTM - Baxter S.A., Branquart, Belgique).

B. Modèles expérimentaux.

1. Modèle expérimental de mono-arthrite à l'interleukine-1 β .

Une injection intra-articulaire (*ia*) d'interleukine 1 β (IL-1 β) (500ng dans 50 μL de NaCl 9‰, Tebubio) est réalisée dans le genou droit des rats. Celle-ci stimule une réponse inflammatoire mono-articulaire (au niveau du genou dans le cas de nos expériences). Une injection *ia* de 50 μL de NaCl 0,9 % est effectuée dans le genou gauche. Lors des expériences réalisées, nous avons comparé l'évolution de l'inflammation articulaire de 4 groupes de rats dans différentes conditions. Un premier groupe sert de témoin négatif avec une injection bilatérale de sérum physiologique au niveau des 2 genoux. Le second groupe reçoit une injection de 50 μL d'IL-1 β (10ng/ μL) comme précédemment mentionné, le troisième groupe de rats reçoit une injection *ia* préventive de 10 μg de TFO renforcé methylphosphonate (dans 50 μL de NaCl 0,9%) 24 heures avant l'injection d'IL-1 β et le dernier groupe reçoit uniquement l'injection préventive de TFO.

2. Modèle expérimental de mono-arthrite articulaire par injection de parois de mycobactéries (281).

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de l'injection de différentes doses de parois de mycobactéries (400, 500 et 600 μg de parois de mycobactéries diluées dans 50 μL de NaCl 0,9%) sur la physiologie de ce modèle d'arthrite aiguë. Ce modèle permet d'induire à la fois un handicap, une réaction fébrile et des lésions ostéocondrales avec un rôle central de l'inflammation synoviale (282). L'effet anti-inflammatoire des oligonucléotides anti-TNF- α est évalué suite à l'injection *ia* de 600 μg de parois de mycobactéries dans le genou droit des rats. Une injection *ia* de 50 μL de NaCl 0,9% est effectuée dans le genou gauche. Lors des expériences réalisées, nous avons comparé le comportement articulaire de 4 groupes de rats dans différentes conditions. Un premier groupe sert de témoin négatif avec une injection *ia* de 50 μL de sérum physiologique dans chaque genou, un second groupe reçoit une injection de 600 μg de parois de mycobactéries dans le genou droit et une injection de NaCl 0,9% dans le genou gauche, un troisième groupe reçoit une injection préventive d'oligonucléotide anti-TNF- α dans le genou droit et une injection de 50 μL de NaCl 0,9% à gauche et le dernier

groupe reçoit une injection préventive d'anti-TNF- α suivie d'une injection de 600 μ g de parois de mycobactéries (24 heures après) dans le genou droit ainsi qu'une injection de 50 μ L de NaCl 0,9% à gauche.

3. Modèle expérimental de mono-arthrite chronique par injection de mBSA

Les rats sont immunisés 21 jours et 14 jours avant l'induction de l'arthrite par une injection sous cutanée de 250 μ L d'une suspension contenant 0,5g de sérum albumine bovine méthylée (mBSA) (Sigma, Deisenhofen, Germany), dissoute dans 125 μ L de NaCl 9‰ et émulsifiée dans 125 μ L d'adjuvant complet de Freund (2mg/mL *Mycobacterium Tuberculosis*, DIFCO, USA). A J0, l'arthrite à l'antigène est induite par une injection intra articulaire de 0,5mg de mBSA (50 μ L d'une solution de mBSA à 10mg/mL dissoute dans du NaCl 0,9%) dans le genou droit (283, 284). 50 μ L de NaCl 0,9% sont injectés dans la cavité articulaire du genou gauche. Ce modèle expérimental est un modèle d'arthrite chronique à l'antigène (AIA= Antigene Induced Arthritis) (285). Les groupes de rats utilisés dans ce modèle sont les même que dans les modèles précédemment décrits.

C. Evaluation des paramètres cliniques.

1. Evaluation de la taille de l'œdème.

La taille de l'œdème au niveau des genoux des rats est évaluée quotidiennement à l'aide d'un CALIPER (Kroepflin Längenmesstechnik, Schlüchtern, Germany). La taille de l'œdème est mesurée dans sa largeur ainsi que dans sa hauteur. Les résultats sont exprimés en tant que circonférence de l'œdème, celle-ci est déterminée grâce à la formule mathématique donnant la circonférence d'une ellipse : circonférence (mm)= $2\pi \times \sqrt{a^2 + B^2}$ avec a= hauteur du genou et b= largeur du genou. Les résultats sont exprimés en mm.

2. Suivi du poids des rats.

Les rats sont pesés quotidiennement à partir de 2 jours avant l'induction de l'arthrite (ou la première immunisation des rats dans le cas du modèle d'arthrite chronique). Les résultats sont exprimés en tant que différence de poids entre la première pesée (to) et le moment où ils sont pesés. L'unité de mesure est le gramme (g).

3. Incapacitance, test de douleur.

Les rats sont soumis à un test d'incapacitance (Linton Instrumentation, Northflok, UK) relatant la répartition du poids des rats sur leurs pattes postérieures (286, 287). Les rats sont placés dans une chambre en plexiglas de telle sorte que leurs pattes postérieures soient placées sur deux capteurs mesurant le poids supporté par chaque patte. La mesure est effectuée sur une période de 5 secondes et chaque mesure est réalisée en triple. Ce test est le reflet de la douleur ressentie par l'animal. Une mesure quotidienne est effectuée pour chacun des rats. Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage de répartition du poids sur chacune des pattes postérieures des rats.

4. Télémétrie

Un suivi télémétrique des rats est réalisé grâce à l'implantation de puces télémétriques (Data Sciences International, St Paul, USA) (288). Il est ainsi possible de suivre l'évolution de la température corporelle et de l'activité locomotrice des rats suite à l'induction ou non de l'arthrite par injection de parois de mycobactéries.

D. Sacrifice et dissection.

Après anesthésie par injection intra-péritonéale d'un mélange d'hydrochlorure de kétamine (37,6 mg/kg) (Imalgene 500, Merial, Saint-Priest, France) et d'acépromazine (1,25 mg/kg) (Vetranquil, Ceva Santé Animale, Libourne, France) les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale.

1. Récupération des tissus pour une analyse de l'expression en ARNm.

Suite au sacrifice, les membranes synoviales des genoux des rats sont prélevées de manière stérile puis immédiatement congelées à -80°C avant l'extraction des ARN totaux de ces pièces opératoires. De même, les rotules sont également prélevées puis le cartilage articulaire est récupéré avant d'être congelé.

2. Récupération du liquide synovial.

Après le sacrifice, la cavité articulaire des genoux est ouverte latéralement, un papier filtre (Schleicher & Schuell, GmbH, Germany) (4mm²) y est alors introduit et le liquide synovial est récupéré par imbibition. Le papier filtre est ensuite déposé dans 150µL de sérum physiologique (NaCl 9‰) et laissé 24 heures à 4°C. Le contenu du liquide synovial se retrouve ainsi dilué dans le NaCl 0,9% et il est donc possible de doser par ELISA ou multiplex les médiateurs inflammatoires relargués dans le liquide synovial.

E. Oligonucléotide TFO marqué Cy3'

Afin d'étudier la biodistribution de notre oligonucléotide TFO anti-TNF- α dans l'articulation des rats, un marquage à la cyanine 3' (Cy3') de ce dernier est réalisé (séquence présentée en III.C.1). Suite à l'injection intra-articulaire du TFO marqué, les articulations complètes sont récupérées après sacrifice et des coupes histologiques sont réalisées à la fois sur les membranes synoviales, le cartilage rotulien ainsi que les cartilages fémorotibiaux.

F. Mise au point de la tomographie par émission de positons (TEP)

Nous avons étudié la potentielle utilisation de la tomographie par émission de positons au ^{18}F -FDG dans la quantification de l'intensité inflammatoire au niveau articulaire.

1. Préparation des animaux.

L'induction d'une mono-arthrite articulaire par injection de parois de mycobactéries est réalisée selon le même protocole que celui décrit en I.B.2. De la même manière, le score des atteintes articulaires ainsi que l'évaluation des paramètres cliniques suivent les protocoles précédemment décrits.

2. TEP au ^{18}F -FDG.

Les animaux sont mis à jeun 20 heures avant le début des expérimentations. Les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (1,5% v/v, AErraneTM, Baxter SA, Maurepas, France) tout au long de l'examen TEP. Après anesthésie, 74MBq de ^{18}F -FDG sont injectés par la veine pénienne. L'examen TEP débute 5 minutes après cette injection pour une période de 120 minutes, suivi par une transmission de 6 minutes avec le ^{57}Co comme point de source afin d'obtenir une carte d'atténuation et d'appliquer la correction de dispersion de l'émission pour la reconstruction de l'image. L'examen TEP est analysé grâce au logiciel Inveon Research Workplace (Siemens Medical, USA, Inc.). Les images sont reconstruites en 10 tranches de 2 minutes et 20 tranches de 5 minutes. Le procédé de reconstruction utilise un algorithme 3D OSEM permettant d'obtenir une taille de voxel de 0,8x0,8x0,8 mm. La résolution spatiale est inférieure à 1,5 mm.

Analyse visuelle : les résultats TEP sont analysés visuellement grâce à des coupes transversales, sagittales et coronales et des images en 3D quand cela est nécessaire.

3. Macro-autoradiographie, micro-imageur et analyse histologique

Les radiotraceurs sont injectés par la veine pénienne sous anesthésie générale. 0,3mL d'une solution contenant 148 MBq de $^{99\text{mTc}}$ -HDP et 0,2 mL d'une solution contenant 73MBq de ^{18}F -FDG sont injectés 30 minutes avant le sacrifice de l'animal. Après sacrifice, les genoux sont directement récupérés et congelés. Des coupes histologiques de 10 μm sont obtenues en utilisant un cryostat LEICA CM 3050S et montées sur lames. Pour la macro-autoradiographie, les coupes sont exposées 48 heures. On distingue la distribution des deux émetteurs grâce à leur décroissance : 108 minutes pour le ^{18}F et 6,02 heures pour le $^{99\text{mTc}}$ -HDP. Des fichiers distincts sont générés (le ^{18}F est coloré en rouge et le $^{99\text{mTc}}$ -HDP en vert).

Une analyse histologique des tissus articulaires (suivant le même protocole que celui décrit ci-après) est effectuée parallèlement afin d'y confronter les résultats d'autoradiographie obtenus.

G. Mode de transfection.

Afin de véhiculer nos oligonucléotides (siRNA et TFO) au sein de l'articulation, deux techniques de transfert ont été utilisées (dépendantes des caractéristiques physico chimiques des oligonucléotides). L'oligonucléotide TFO méthylphosphonate est injecté en intra articulaire dans 50µL de NaCl 9% sans agent de transfection, du fait de sa neutralité. Pour la transfection du siRNA, nous avons utilisé un système polyplexe : *in vivo* jetPEITM (Qbiogene, Illkirch, France). Cet agent est constitué de molécules linéaires de polyéthyléminine (PEI). Ces molécules portent une densité de charges cationiques élevée permettant un transfert de gène efficace. La **Figure 52** illustre le mécanisme de transfection des cellules eucaryotes par le PEI.

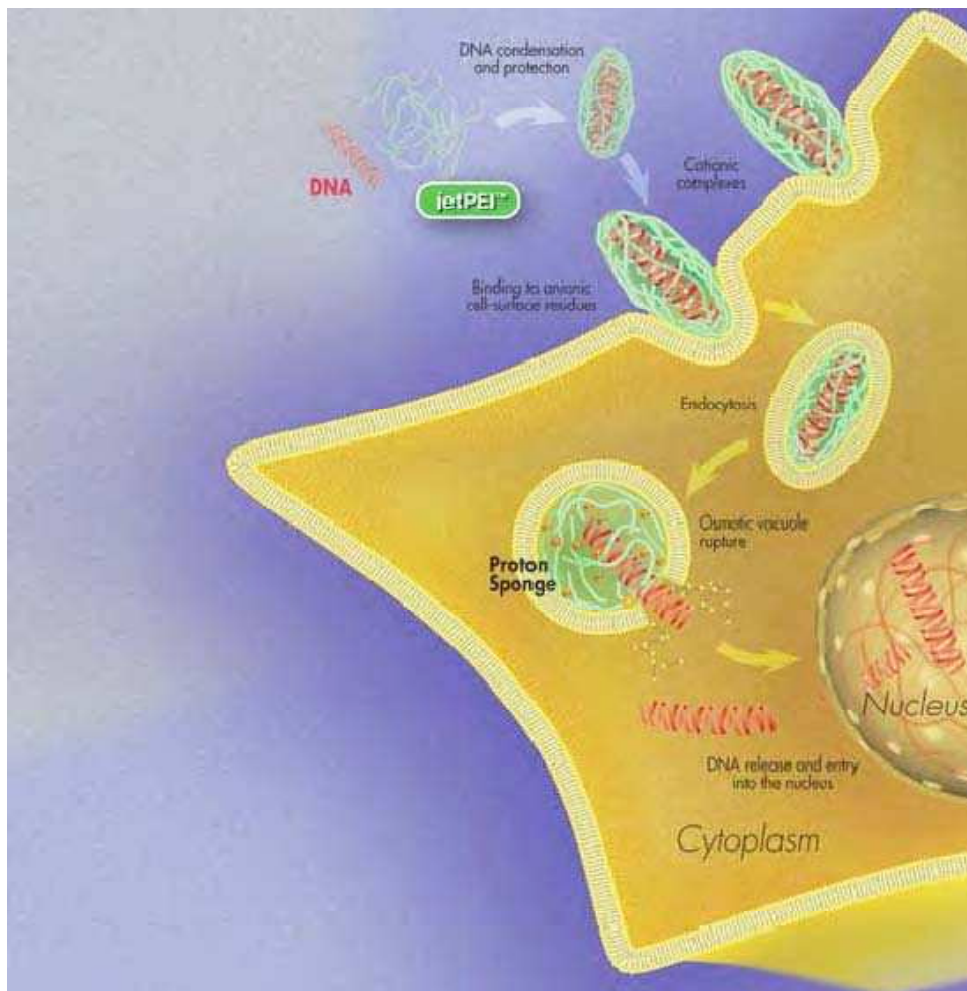


Figure 52 : Mécanisme de transfert de gènes dans les cellules eucaryotes par le système jetPEITM. (polyplus transfection).

Ainsi le PEI et les siRNA forment des micro-précipités, résultant de l'interaction des charges, qui vont pouvoir être endocytés par les cellules. Les siRNA sont dilués dans une solution de glucose à 5% à raison de 10 à 20 µg dans 25 µL, le mélange est homogénéisé avant d'être immédiatement vortexé après ajout de 25 µL de la solution contenant la quantité appropriée de jetPEI. Le mélange obtenu est incubé pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être injecté en intra-articulaire.

II. Histologie et microscopie.

A. Préparation des échantillons

L'articulation du genou est prélevée, puis les tissus sont fixés dans du paraformaldéhyde 4 % (v/v) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier) dans du PBS (pH=7,4), pendant 8 heures, décalcifiés (Rapide Décalcifiant Osseux, Eurobio) et déshydratés dans des bains d'alcool de concentrations croissantes. Les prélèvements sont ensuite inclus dans la paraffine, et des coupes histologiques de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome (LEICA RM 2135).

B. Différentes colorations utilisées

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont colorées de 4 façons différentes. Il s'agit d'une étude histologique réalisée sur les différents compartiments articulaires du genou du rat (rotule, gouttière inter-condylienne, condyle fémoraux et plateaux tibiaux) et la membrane synoviale. Des scores ont été établis, inspirés de ceux de Mankin (os et cartilage) et Rooney (membrane synoviale), pour définir le grade de l'atteinte articulaire. Après déparaffinage et réhydratation classiques, les coupes sont colorées de 4 façons différentes.

1. Hématoxyline-Eosine-Safran.

L'HES est une coloration standard, qui permet de visualiser les cellules ainsi que les constituants matriciels.

L'hématoxyline (0.5 %, 5 min) colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine (1 %, 5 min) se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme, fibres nerveuses, fibres élastiques et musculaires) et le Safran (1%, 5 min) se lie aux collagènes et à certaines protéines telle que la chondrine (coloration jaune). Les lames sont ensuite déshydratées et montées avec une résine synthétique (VOGEL, Bayer diagnostic, France).

2. Rouge Sirius.

Le rouge Sirius est un colorant anionique permettant la visualisation de l'organisation des fibres de collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène (289). La coloration au rouge Sirius est réalisée avec une solution saturée en acide picrique à 0,1% (290). Les lames sont alors rincées successivement dans un bain d'acide chlorhydrique 0.01N pendant 2 min puis dans une solution d'alcool à 95° et enfin dans de l'alcool absolu pendant 2 min. Elles sont ensuite déshydratées et montées avec la résine synthétique VOGEL (Bayer diagnostic, France).

Les lames colorées au rouge Sirius sont dans un premier temps observées en lumière classique puis en lumière polarisée en disposant les lames à 45° sous un microscope équipé de deux filtres spécifiques. La lumière polarisée permet de visualiser l'architecture du réseau collagénique.

3. Bleu de toluidine.

Le bleu de toluidine est une coloration métachromatique permettant la mise en évidence de glycosaminoglycannes (GAGs) carboxylés, sulfatés ou phosphatés (composés matriciels du cartilage). La coloration au bleu de toluidine nécessite une incubation de 5 min dans une solution à 1% (de bleu de toluidine). Les lames sont plongées dans l'acétone, dans l'alcool absolu puis déshydratées. Le montage des lames est réalisé avec la résine synthétique VOGEL (Bayer diagnostic, France).

4. Safranine O- Fast Green.

La Safranine O est une coloration spécifique des protéoglycannes (alternative au bleu de toluidine). Il existe une relation directe entre l'intensité de la coloration et la concentration en glycosaminoglycannes sulfatés dans le cartilage articulaire (291). Le Fast Green est une coloration bleue turquoise spécifique des collagènes.

C. Score des structures articulaires.

1. De la membrane synoviale.

Un score de la membrane synovial est établi afin d'évaluer l'évolution de la pathologie. Ce score est établi sur la base du score de Rooney (292). Le score est réalisé selon les critères présentés sur le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Critères d'évaluation du score histologique sur les tissus synoviaux des genoux de rat.

score histologique synoviale	grade
NOMBRE D'ASSISES CELLULAIRES	
1 assise (normal)	0
2 à 3 assises	1
4 à 5 assises	2
5 à 10 assises	3
> 10 assises	4
DEPOT DE FIBRINE	
Pas de dépôt	0
Faible	1
Moyen	2
Important	3
Sévère	4
FIBROSE	
< 10% surface/champ	0
10 -25 % surface/champ	1
26 -50 % surface/champ	2
51 -75 % surface/champ	3
> 75 % surface/champ	4
NOMBRE DE VAISSEAUX/CHAMP	
2 à 3	0
4 à 9	1
10 à 15	2
16 à 22	3
> 22	4
INFILTRATION PERIVASCULAIRE	
0%	0
1 à 25 %	1
26 à 50 %	2
51 à 75 %	3
> 75 %	4
INFILTRATION CELLULAIRE DIFFUSE	
0%	0
1 à 25 %	1
26 à 50 %	2
51 à 75 %	3
> 75 %	4

2. Du cartilage articulaire et de l'os sous-jacent.

Les structures cartilagineuses et osseuses articulaires sont évaluées selon les critères du score de Mankin (293). Ceux-ci sont détaillés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Critères d'évaluation du score histologique sur les tissus osseux et cartilagineux des genoux de rat.

HES	<u>Cartilage</u>	
	Structure (surface)	
	Normale	0
	Irrégulière avec pannus	1
	Fissures jusqu'à la zone de transition	2
	Fissures jusqu'à la zone radiale	3
	Fissures jusqu'à la zone calcifiée	4
	Désorganisation complète	5
	Cellules (répartition)	
	Normale	0
	Hypercellularité diffuse	1
	Clusters	2
	Hypocellularité	3
	Epaisseur de la couche de chondro hypertrophiques	
	Normale (2 à 3 couches)	0
	Diminution modérée	1
Diminution totale	2	
toluidine Safranine	Coloration au bleu de toluidine ou Safranine O	
	Homogène et intense (Normale)	0
	Décoloration faible	1
	Décoloration modérée	2
	Décoloration sévère	3
Rouge Sirius	Coloration des collagènes	
	Homogène et légèrement + intense en superficie (norm)	0
	Intensification de la coloration de la couche superficielle	1
	Intensification de la coloration jusqu'à la zone moyenne	2
	Intensification de la coloration jusqu'au cartilage calcifié	3
	Architecture des fb de collène en lumière polarisée	
	Homogène et légèrement + intense en superficie (norm)	0
	Intensification de la coloration de la couche superficielle	1
	Intensification de la coloration jusqu'à la zone moyenne	2
	Intensification de la coloration jusqu'au cartilage calcifié	3
HES	<u>Remaniements osseux</u>	
	Pas de remaniement	0
	Remaniement modéré	1
	Remaniement sévère	2
	Ostéolyse	
	Non	0
	Modérée	1
Sévère	2	

D. Microscopie confocale.

Les images confocales et les spectres d'émission ont été réalisés à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser SP2, dépourvu de filtre (Leica microsystems, France), équipé de lasers argon (raies 457nm, 476nm, 488nm, 514nm) et hélium-Néon (543nm et 633nm) et d'un objectif à immersion huile corrigé x 63 (HCX PL APO CS 63,0 x 1,32, code 506180 Leica). Le signal d'émission de fluorescence est recueilli de manière optimisée, pour chaque canal, après décomposition de la lumière de fluorescence sur un prisme (AOBS – Acoustical Optical Beam Splitter), et sélection d'une bande passante spécifique.

III. Culture cellulaire.

A. Culture de chondrocytes et de synoviocytes de rat

1. Primoculture de chondrocytes.

Les chondrocytes sont préparés à partir de cartilage articulaire de rats Wistar mâle (150-175g, Charles River Laboratories, France) par une double digestion à la pronase et à la collagénase.

Après anesthésie avec un mélange d'hydrochlorure de kétamine (37,6 mg/kg) (Rhône Mérieux, France) et d'acépromazine (1,25 mg/kg) (Sanofi Santé, France), les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis disséqués afin de faire apparaître le tissu cartilagineux. Le cartilage est prélevé au niveau de l'épiphyse des têtes fémorales. Il est lavé trois fois avec du NaCl 0,9 % supplémenté en gentamicine (10 mg/ml) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis soumis à une digestion par une solution de NaCl 0,9 % contenant 2 mg/ml de pronase (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) durant 2 h à 37°C sous 5% de CO₂. Après trois rinçages par du NaCl, le cartilage est soumis à une deuxième digestion par une solution de collagénase B (1,5 mg/ml) (Roche, Meylan, France) pendant une nuit à 37°C sous 5% de CO₂. La collagénase permet la libération de chondrocytes. Elle est reconstituée dans du milieu de culture DMEM/HAM F12 (Invitrogen) supplémenté en gentamicine. Les solutions sont filtrées sur filtre de 0,22 µm de diamètre (low binding protein, Costar, France). Cette suspension est ensuite prélevée et centrifugée à 300 g pendant 8 min. Le culot est récupéré et mis en culture dans des flacons de 75 cm² contenant du milieu complet DMEM/F12 supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (Invitrogen), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen) et 10 mg/ml de gentamicine.

2. Culture primaire de synoviocytes.

Les synoviocytes sont préparés à partir de membranes synoviales de genoux de rats sains. Après prélèvement, les membranes synoviales sont incubées dans une solution de collagénase / dispase (0,1 U/mL et 0,8 U/mL respectivement, Roche) pendant une nuit à 37°C. Les suspensions sont ensuite prélevées et centrifugées à 250g pendant 8 minutes. Le culot cellulaire est récupéré et mis en culture dans des flasques de 75 cm² avec du milieu complet à 10% de SVF. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

3. Entretien des cellules.

Les cellules se multiplient et sont transférées dans de nouvelles flasques une fois à confluence. Nous avons utilisé des chondrocytes en 1^{er} passage et des synoviocytes en 3^{ème} passage, pour limiter la dédifférenciation de ces types cellulaires. Pour chaque passage, les cellules à confluence sont lavées avec du PBS (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et récupérées suite à l'action d'un volume de trypsine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) pendant 5 minutes à 37°C et une neutralisation par du milieu complet. La solution de cellules est centrifugée, puis le culot cellulaire est repris par du milieu complet. Un comptage sur cellule de Malassez est réalisé afin de répartir les cellules dans les flasques ou dans des plaques de culture.

B. Culture en système tridimensionnel.

Le système de culture en système tridimensionnel a été utilisé pour les synoviocytes et chondrocytes humains transfectés par électroporation au préalable.

L'alginate (AA) en poudre (moyenne viscosité issu de *Macrocystis pyrifera*, Sigma Aldrich, France) est préalablement autoclavé à 120°C pendant 20 minutes avec un barreau magnétique dans des tubes en pyrex. La solution d'alginate à 20g/L est alors réalisée par ajout de NaCl 0,9% stérile (Braun, France). Il est nécessaire de mettre cette solution à agiter plusieurs heures pour avoir un hydrogel bien homogène. Le culot cellulaire est mélangé avec la solution alginique à raison de 3 millions de cellules par millilitre de polymère. Cette suspension cellulaire est prélevée à l'aide d'une seringue stérile (Terumo, Leuven, Belgique).

Les billes sont obtenues en faisant tomber le mélange polymère-cellules goutte à goutte à travers une aiguille de 18G (Terumo, Leuven, Belgique) dans une solution de CaCl₂ à 102mM (Sigma Aldrich, France). Les billes se forment par réticulation de l'alginate au contact des ions Ca²⁺ selon le modèle « boîte à œufs » (**Figure 53**).

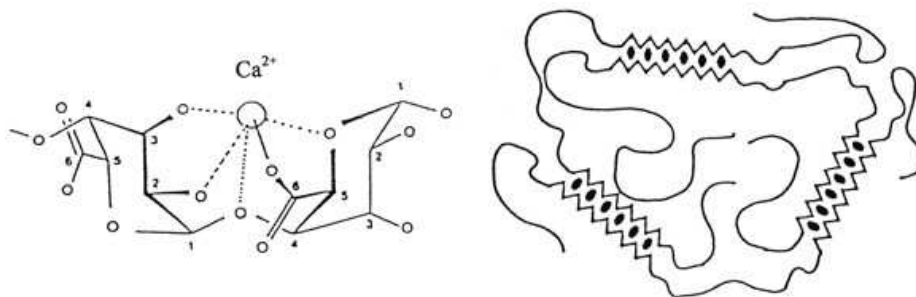


Figure 53 : A gauche : Chélation des résidus guluronates de l'alginate par le calcium, à droite : représentation schématique du modèle « boîte à œufs ». http://biochim-agro.univ-lille1.fr/polysaccharides/res/17_mp.png

Les billes sont incubées 10 minutes dans du CaCl₂ (102mM), temps nécessaire à une réticulation suffisante, puis sont rincées 3 fois pendant 5 min dans du sérum physiologique puis une fois avec le milieu de culture (DMEM F12, GibcoBRL, France) supplémenté de 10%

(v/v) SVF, 3 mM CaCl₂ (Sigma Aldrich, France), 1% (v/v) de pénicilline-streptomycine et 0,1% (v/v) d'amphotéricine B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)). Des billes « blanches », c'est-à-dire des billes sans cellules sont réalisées dans les mêmes conditions à titre de référence. Enfin, les billes avec ou sans cellules sont cultivées en incubateur à 37 °C sous 5% de CO₂ dans 10 ml de milieu complet supplémenté avec 1 mM de CaCl₂ (Sigma Aldrich, France)

A la fin des différents temps de l'étude, les cellules sont récupérées en solubilisant le biomatériau alginique. Pour se faire, les billes sont solubilisées pendant 5 minutes à 37 °C dans une solution de Citrate-EDTA à pH 6.8 (Citrate de sodium tribasique 55mM (Sigma) ; EDTA 50mM (Sigma)). L'ensemble est centrifugé, puis lavé 5 fois dans du PBS. Le culot final est congelé à sec à -80°C.

C. Stratégie d'inhibition.

1. Les oligonucléotides de type TFO.

Nous avons utilisé 3 types d'oligonucléotides TFO anti-TNF- α avec des liaisons chimiques différentes (Eurogentec, Seraing, Belgique). L'oligonucléotide dit « nu » ne possède aucun renforcement (liaisons phosphodiester classiques), l'oligonucléotide « 8Ph » possède des liaisons phosphorothioates et l'oligonucléotide « MePh » est renforcé par des liaisons méthylphosphonates. Les séquences oligonucléotidiques des TFO de rat et humain sont les suivantes :

Rat : 5'-TCG-AAA-AGG-GGT-GGG-AGA-AGG-3' nu, renforcé par des liaisons phosphorothioates ou méthylphosphonates (et marqué à la cyanine en 3').

Humain : 5'-AAG-AAA-GGG-GTG-GGA-GGa-GAG-3'

TFO control : 5'-CAT-GGA-GCC-ACA-TTC-ATG-ACC-3'

2. siRNA.

Trois siRNA spécifiques du TNF- α humain et 3 spécifiques du TNF- α de rat (Eurogentec, Seraing, Belgique) ont été testés dans un premier temps et celui présentant le meilleur potentiel inhibiteur a été retenu. Nous avons ainsi :

siRNA rat : 5'-GGA-GGA-GAA-GUU-CCC-AAA-U99-3'

5'-AUU-UGG-GAA-CUU-CUC-CUC-C99-3'

siRNA humain : 5'-GCA-GAU-GGG-CUG-UAC-CUU-A99-3'

5'-UAA-GGU-ACA-GCC-CAU-CUG-C99-3'

Le siRNA control utilisé est un scramble.

D. Transfection transitoire.

Cette technique a été utilisée pour la transfection des siRNA, TFO et vecteurs d'expression pcDNA3.1+ et pGL3-basic dans les cellules articulaires de rat. Nous avons utilisé comme agent de transfection de l'Exgen 500 (Euromedex, Mundolsheim, France) pour les TFO et vecteurs d'expression et le jetSI™ (QBIOgene, Illkirch, France) pour les siRNA. Pour une transfection optimale, les cellules en culture sont à environ 60 % de confluence.

Pour les cellules articulaires humaines, nous avons utilisé la technique d'électroporation pour transférer les siRNA et TFO anti-TNF- α humains.

1. Cellules articulaires de rat.

a. Transfert du siRNA.

Les siRNA anti-TNF- α de rats sont transfectés avec le jetSI™ (QBIOgene, Illkirch, France). Les différentes concentrations en siRNA utilisées sont préparées dans du milieu DMEM F12 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) sans sérum (50 μ L). Le volume de jetSI approprié à la quantité de siRNA à transférer (selon les recommandations du fournisseur) est préparé en parallèle dans du milieu de culture sans sérum également. Le mélange de ces deux préparations est ensuite vortexé 10 secondes puis laissé 30 minutes à température ambiante avant transfection des cellules. Quatre volumes de milieu de culture sans sérum sont ajoutés sur les cellules. L'ensemble est placé à 37°C sous 5 % de CO₂ pendant 2 h. Le mélange est ensuite éliminé et les chondrocytes et/ou synoviocytes sont placés dans du milieu de culture complet pendant 16 h avant le début de tout traitement.

b. Transfert du TFO et vecteurs d'expression pcDNA3.1+ et pGL3-basic.

La quantité de TFO et de plasmide ainsi que le volume d'Exgen 500 ont été déterminés pour chaque plaque de culture utilisée (500ng de plasmide / 10⁵ cellules ; 3 % (v/v) Exgen 500 dans 1 volume de NaCl 0,9 % (20, 100 et 200 μ l, respectivement pour les plaques de 96, 24 et 6 puits) selon les recommandations du fournisseur. Le mélange de transfection est homogénéisé dans un vortex pendant 15 s et incubé 10 min à température ambiante puis mis en contact avec les cellules. Il est très important de bien homogénéiser le mélange immédiatement après mise en contact de l'ADN avec l'Exgen 500 de façon à ne pas obtenir de trop volumineux complexes éventuellement toxiques pour les cellules car difficilement endocytés. Quatre volumes de milieu de culture complet sont ajoutés sur les cellules. L'ensemble est placé à 37°C sous 5 % de CO₂ pendant 2 h. Le mélange est ensuite éliminé et les chondrocytes et/ou synoviocytes sont placés dans du milieu de culture complet pendant 16 h avant le début de tout traitement.

2. Cellules articulaires humaines.

Les synoviocytes et chondrocytes humains sont transférés par électroporation (Nucleofector[®], Bâle, Suisse) selon les recommandations du fournisseur.

E. Conditions inflammatoires.

1. Exposition à l'IL-1 β .

Les cellules sont mises en contact avec une solution à 10ng/ μ L d'IL-1 β (Sigma Aldrich, France) dans du DMEM/F12 complet à 1% de SVF pendant 4 heures. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS et conservées par congélation à -80°C, en attendant d'être utilisées pour les extractions des ARN totaux et ou bien grattées en vue d'une extraction protéique.

2. Exposition au LPS.

Les cellules sont misent en contact avec une solution à 10ng/mL de LPS (Sigma Aldrich, France) dans du DMEM/F12 à 1% de SVF pendant 2 à 4 heures. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS et conservées par congélation à -80°C, en attendant d'être utilisées pour les extractions des ARN totaux ou bien grattées en vue d'une extraction protéique.

3. Blocage de la transcription par l'actinomycine D.

Afin d'étudier l'évolution de la stabilité des ARN messagers des cytokines pro inflammatoires, les cultures cellulaires ont été soumises à un traitement par un inhibiteur transcriptionnel, l'actinomycine D 4pg/mL (Sigma Aldrich, France). Les cellules sont transfectées par l'oligonucléotide TFO ou siRNA 18 heures avant la stimulation des cellules par l'IL-1 β 10 ng/mL. Une heure après le début de la stimulation de la réaction inflammatoire, l'actinomycine D (4pg/mL) est ajoutée au milieu. Les temps de contact des cellules avec ce milieu sont compris en 10 minutes et 4 heures, les cellules sont récupérées aux différents temps et les quantités en ARNm sont mesurées par RT-PCR quantitative en temps réel.

F. Tests de cytotoxicité.

1. Mesure de l'activité dépendante de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

Ce test repose sur la réduction du MTT (bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tétrazolium) par la succinate déshydrogénase mitochondriale conduisant à la formation de cristaux bleus de formazan. La diminution de cette activité est directement liée à l'apparition d'une toxicité.

Après avoir éliminé le surnageant de culture, un mélange contenant 100 μ l de milieu complet et 25 μ l de MTT (5 mg/ml dans du PBS) (Sigma) est mis en contact avec les chondrocytes pendant 3 h à 37 °C. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont lysées par un tampon SDS-DMF (80 g sodium dodécylsulfate, 200 ml diméthylformamide, 200 ml H₂O, pH 4.7) durant 24 h à 37 °C. Les plaques sont alors lues directement sur lecteur de plaques à 580 nm.

2. Mesure de l'activité dépendante de la lactate déshydrogénase

La mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) présente dans le surnageant de culture est réalisée à l'aide d'un kit (« Cytotoxicity Detection Kit », Roche).

La méthode est basée sur la réduction du NAD en NADH, H⁺, suite à la transformation par la LDH du lactate en pyruvate. La diaphorase transfère alors le H/H⁺ du NADH sur le sel de tétrazolium (chlorure de 2-[4-iodophényl]-5-phényltétrazolium) qui sera réduit en sel de formazan. L'augmentation de l'activité LDH est directement corrélée avec la formation de formazan. Ainsi, la coloration rouge qui se forme est proportionnelle au nombre de cellules dont la membrane cytoplasmique est altérée.

Le surnageant de culture (100 µl) est mélangé avec 100 µl d'une solution contenant du NAD⁺, du sel de tétrazolium et du lactate de sodium. L'ensemble est incubé 10 min à l'obscurité. La réaction est ensuite arrêtée par 50 µl de chlorure d'hydrogène (1N) et l'absorbance est lue à 490 nm (lecteur de plaques MR 5000 Dynatech, Guyancourt, France).

3. Dosage Hoechst de l'ADN.

Le dosage de l'ADN contenu dans chaque bille reflète la quantité exacte de cellules vivantes présentes dans le biomatériau. Ainsi, ce test nous permet de normaliser nos résultats (principalement les tests MTT) en fonction de la quantité d'ADN. Un agent fluorescent intercalant de l'ADN est utilisé (le Hoechst, Molecular Probes). Le réactif de Hoechst est reconstitué à 0,1 µg/mL dans un rampon Hoechst (Tris 10mM, 1mM EDTA, 0,1 M NaCl à pH 7,4). 3 billes d'alginate (n=3 pour chaque condition) sont lysées dans un tampon citrate-EDTA (55mM citrate, 50mM EDTA) pendant 10 minutes à 37°C puis centrifugées à 1500 tours/min pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est ensuite conservé à -20°C jusqu'au dosage. Les culots cellulaires sont repris chacun dans 100µL de tampon Hoechst et les cellules sont lysées par 3 séries de congélation / décongélation dans l'azote liquide. Pour le dosage, 2mL de solution Hoechst sont ajoutés à chaque échantillon. Une gamme étalon de 0 à 0,5µg/mL est établie à partir d'ADN de thymus de veau (Sigma, France). Le dosage est effectué à une longueur d'onde d'excitation de 356 nm et une longueur d'émission de 458 nm sur un spectrofluorimètre (Spectrophotomètre U-2001, Hitachi).

IV. Biologie moléculaire.

A. Développement de vecteurs d'expression.

1. Vecteurs d'expression.

Afin de cloner le promoteur du TNF alpha et la séquence codant pour l'ARN messager de ce gène, nous avons utilisé deux vecteurs d'expression : pGL3-basic (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) (**Figure 54**) pour le promoteur et pcDNA3.1+ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (**Figure 55**) pour l'ARNm du TNF- α .

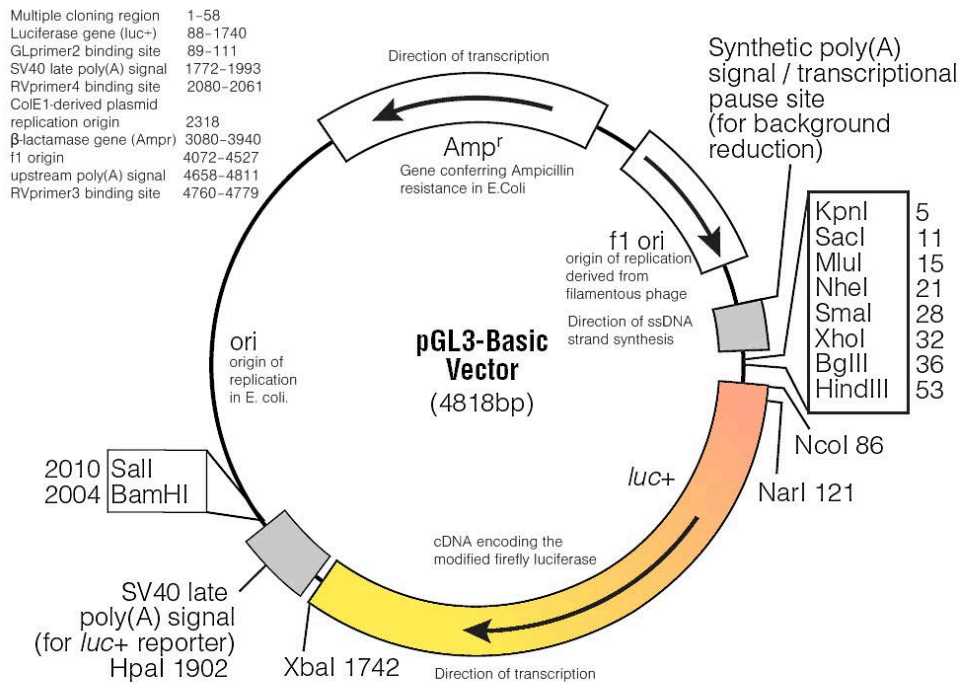


Figure 54 : Représentation du vecteur d'expression pGL3-basic utilisé pour le clonage du promoteur du TNF- α . (D'après le fournisseur)

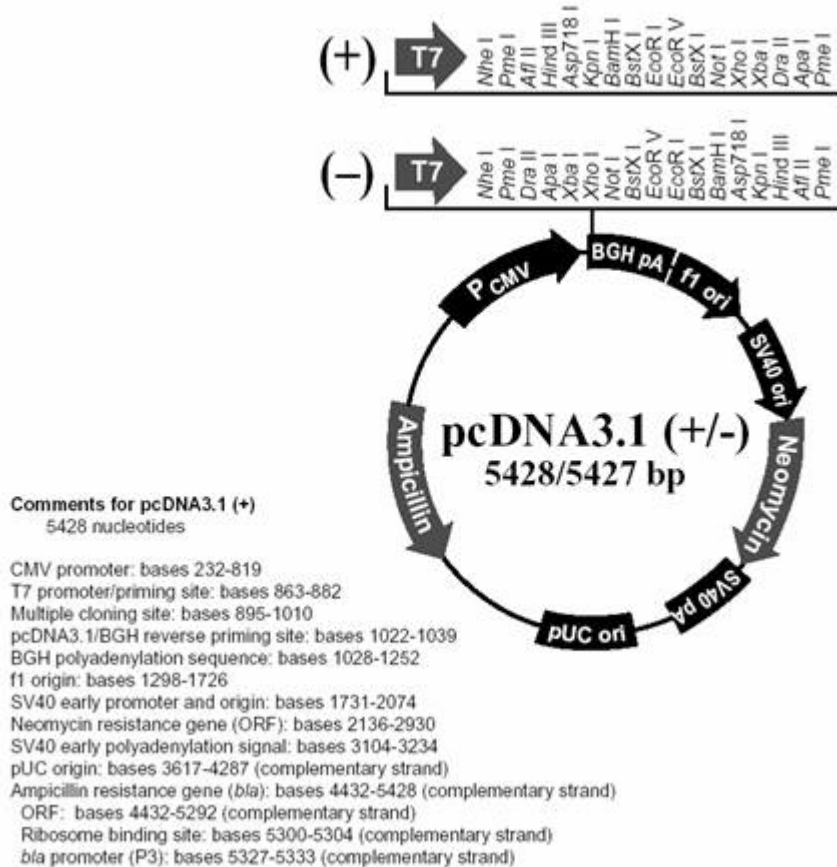


Figure 55 : Représentation du vecteur d'expression cDNA3.1+ utilisé pour le clonage des différentes régions codant pour l'ARNm du TNF- α . (D'après le fournisseur)

2. Préparation des matrices (ADNg, ADNc)

Pour le clonage du promoteur du TNF- α de rat, nous avons utilisé de l'ADNg génomique de synoviocytes de rats sains. Nous avons réalisé l'extraction de cet ADNg grâce au kit d'extraction QIAquick (QIAGEN, Courtaboeuf, France), puis nous en avons digéré 5 μ g par l'enzyme EcoRV (Ozyme, Saint Quentin, France) (2h à 37°C).

En ce qui concerne le clonage des différentes formes du mRNA du TNF alpha nous avons utilisé comme matrice des produits de RT issus d'ARNm de synoviocytes stimulés pendant 2 heures par de l'IL-1 β à 10ng/mL.

3. Amplification par PCR

Pour réaliser les clonages de la région promotrice (-1700 / +18, -1146 / +18) et de la séquence correspondant à l'ARN messager (5'UTR-CDS-3'UTR) du TNF-alpha de rat, nous avons utilisé une Taq DNA polymérase haute fidélité (High Fidelity Taq DNA polymerase, Roche), afin d'obtenir des séquences amplifiées. Deux mélanges réactionnels sont réalisés, le premier (Mix 1) contenant 1 μ l de dNTPs (10mM), 2 μ l de chaque amorces (300nM), 1 μ l de matrice (ADNg génomique, ADN complémentaire) et de l'eau ultra-pure (qsp 25 μ l) (Eppendorf, Le Pecq, France) et le second (Mix 2) contenant 5 μ l du tampon réactionnel

Expand High Fidelity (20mM Tris-HCl, 100mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.5% Nonidet P40, 0.5% Tween 20, 50% glycérol), 0.75 µl d'enzyme Expand High Fidelity (2.6 U / réaction) et 19.5 µl d'eau ultra-pure (Eppendorf). Les deux solutions sont mélangées et dispensées dans un tube PCR de 200 µl. Puis les tubes sont placés dans un thermocycleur afin de réaliser les cycles d'amplification, décrits ci-dessous:

- 1 cycle dénaturation initiale, 2 min à 94°C,
- 10 cycles {
 - Dénaturation, 94°C pendant 15 sec,
 - Hybridation, 60°C pendant 30sec,
 - Élongation, 72°C pendant 2 min.
- 15-20 cycles {
 - Dénaturation, 94°C pendant 15 sec,
 - Hybridation, 60°C pendant 30 sec,
 - Élongation, 72°C pendant 2 min + 5 sec supplémentaire par cycle,
- 1 cycle élongation finale, 72°C pendant 7 min.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage du promoteur du TNF alpha et la région codant pour l'ARNm de ce même gène.

Constructions	Amorces sens	Amorces antisens
Promoteur -1700 / +18	5' <u>CGACGCGTCGGGAG</u> -CTTTTGCTCTGTAGAAT3'	5' <u>CCGCTCGAGGATCATGC</u> -TTCCGTGCTCAT3'
Promoteur -1146 / +18	5' <u>CGACGCGTCGGGGA</u> -GTGAGGCAGGCTAAGT3'	5' <u>CCGCTCGAGGATCATGC</u> -TTCCGTGCTCAT3'
5'UTR-CDS-3'UTR	<u>GGAATTCCGGCAGAA</u> -CTCAGCGAGGACA	<u>GCTCTAGAGCCTCTCAAT</u> -GACCCGTAGGG
5'UTR-CDS	<u>GGAATTCCGGCAGAA</u> -CTCAGCGAGGACA	<u>GCTCTAGAGCTCACAGAG</u> -CAATGACTCAA
CDS	<u>GGAATTCCGCATGAG</u> -CACGGAAAGCATG	<u>GCTCTAGAGCTCACAGAG</u> -CAATGACTCAA
CDS-3'UTR	<u>GGAATTCCGCATGAG</u> -CACGGAAAGCATG	<u>GCTCTAGAGCCTCTCAATG</u> -ACCCGTAGGG

4. Digestion enzymatique.

La digestion est réalisée à l'aide d'une enzyme de restriction spécifique pour chaque construction donnée par le **Tableau 3**. XbaI et EcoRI (Ozyme, Saint Quentin, France) sont utilisées pour les séquences codant le messager du TNF-α et XhoI et MluI (Ozyme, Saint Quentin, France) pour le promoteur. Le mélange réactionnel composé de 2 µg de plasmide, 1µL d'enzyme (10 U/µl), 2 µL de tampon (10X) de l'enzyme, qsp 20 µL eau. Le mélange

réactionnel est incubé une heure à 37°C puis les produits issus de la digestion sont ensuite déposés sur gel d'agarose et séparés par électrophorèse. Un marqueur de taille a été utilisé pour connaître la taille des fragments obtenus.

5. Ligation / Transformation.

Ligation. Après digestion enzymatique et purification des vecteurs et des inserts, une réaction de ligation est réalisée afin d'insérer les différents produits (ADNc TNF alpha, région promotrice du TNF alpha) dans les plasmides appropriés. Pour cela, un mélange réactionnel est réalisé contenant le vecteur / produit de PCR (rapport 1/3 en molécules), 1 µl de tampon de ligation (40mM Tris·Cl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.5mM ATP, 50 µg/ml BSA) (Invitrogen), la T4 DNA ligase (3U) (Invitrogen) et de l'eau ultrapure DNase/RNase free (qsp 20 µl). La solution est incubée à 15 °C sur la nuit. La réaction de ligation est arrêtée par l'ajout de 2µl d'EDTA 0.5 M et le produit de ligation est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Transformation. La transformation des bactéries compétentes *E.coli* (One Shot® Top 10, Invitrogen) (50 µL) est effectuée, immédiatement après décongélation des bactéries, avec 2 µL de produit de ligation. L'ensemble a ensuite été incubé 30 minutes dans la glace puis un choc thermique de 30 secondes à 42°C est réalisé. L'ensemble est placé dans la glace 2 minutes. Les bactéries sont alors cultivées d'abord dans 250 µL de milieu SOC [950 µl, 2 g Bacto®-Tryptone, 0,5 g Bacto®-Yeast Extract, NaCl 1M, Mg²⁺ 2M, Glucose 2M (Invitrogen)] pendant une heure à 37°C et sous agitation douce. Elles sont ensuite ensemencées à 37°C durant la nuit, sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar stérilisé [10 g Bacto®-Tryptone, 5 g Bacto®-Yeast Extract, 5 g NaCl, 15 g agar, pH 7, à raison de 20 g/L dans de l'eau distillée (Sigma)] supplémenté en ampicilline (100µg/mL, Invitrogen). Seules les bactéries possédant le plasmide peuvent se développer sur un tel milieu gélosé puisque le vecteur possède le gène de résistance à l'antibiotique (ampicilline).

6. Identification des clones recombinants.

Afin de déterminer les bactéries possédant la construction plasmidique avec l'insert dans le bon sens, plusieurs clones bactériens sont récupérés sur le milieu gélosé (screening par PCR) mais également repiqués en milieu liquide (5 ml) LB Broth [Lennox L broth 35 g/L dans de l'eau distillée (Sigma)], supplémenté en ampicilline et cultivés à 37°C durant la nuit sous agitation (200 tours/min).

PCR classique. La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR est une technique développée par Saiki *et al.* (1985) qui permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN déterminé. Ici l'amplification se fait sur de l'ADN plasmidique.

Les amorces sont conçues pour hybrider de part et d'autre des sites d'insertion (RVP3/GLP2, PGL3 basic; T7/BGH, pcDNA3.1). La pointe d'une pipette est utilisée pour récupérer un aliquote de chaque clone bactérien isolé sur les boîtes de Pétri. Puis, un mélange réactionnel est réalisé (kit HotStarTaq Master Mix, Qiagen), contenant 25 µl de du mélange réactionnel HotStarTaq Master Mix (tampon de PCR, 1.5 µM MgCl₂, dNTPs 200 µM, 2.5 U de

HotStarTaq DNA Polymérase), 2 µl d'amorce sens (0.5 µM), 2 µl d'amorce anti-sens (0.5 µM). Le volume du mélange est complété à 50 µl avec de l'eau stérile et les mélanges sont placés dans le thermocycleur (Eppendorf). Puis les échantillons sont d'abord chauffés à 95°C pendant 15 min pour activer la *Taq* DNA polymérase (Qiagen). Les cycles d'amplification (dénaturation, fixation des amorces et synthèse) sont alors réalisés (dénaturation: 45 sec à 95°C; hybridation des amorces: 45 sec à 59°C; élongation: 1 min à 72°C). Une étape d'élongation finale est réalisée 10 min à 72°C.

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (w/v) dans un tampon TBE coloré par du bromure d'éthidium (0.5 µg/ml).

Minipréparation de plasmide. Des colonies prélevées stérilement sur les boîtes de Pétri sont mises à développer dans 5 ml de milieu LB liquide, supplémenté par de l'ampicilline (100 µg/ml). Les tubes sont placés à 37°C une nuit, sous agitation. La minipréparation de plasmide se réalise sur environ 3 à 5 ml de milieu de culture bactérienne. Une centrifugation à 13 000 g pendant 5 min est d'abord réalisée pour éliminer le surnageant de culture. Le culot est ensuite repris par 200 µl d'un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM d'EDTA et 100 µg/ml de RNase A. Un volume de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% (p/v) SDS) est ensuite ajouté. Après agitation par retournements successifs pendant 1 min, un volume d'acétate de potassium 3 M, pH 5.5 est ajouté. L'ensemble est placé 15 min dans la glace. Une centrifugation à 13000 g pendant 20 min est réalisée et le surnageant est récupéré. Un volume d'isopropanol est alors versé dans le surnageant. Après une centrifugation à 13000 g pendant 20 min, le culot est récupéré et séché. Il est ensuite remis en suspension par 50 µl d'eau ultrapure exempte de nucléase. Un dosage est réalisé en spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm afin de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN plasmidique extrait.

Maxipréparation de plasmide. Cette technique est utilisée pour la production d'ADN plasmidique en grande quantité, dont la pureté permet soit le séquençage soit la transfection de cellules eucaryotes. Le principe d'isolement des plasmides est identique à la minipréparation (*conférer paragraphe*) mais dans ce cas, les volumes d'extraction sont plus grands. Le protocole est effectué selon les recommandations du fournisseur (Qiagen, Plasmid Maxi kit).

B. Extraction des ARN totaux.

1. A partir de cellules en monocouche.

Après décongélation des cellules, l'extraction des ARN totaux se fait grâce au kit RNeasy (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Les cellules sont resuspendues dans 350 µL de tampon RLT, additionné de β-mercapto-éthanol (10 µL/mL)(Sigma). Cette étape a pour but de lyser les membranes cellulaires et de libérer ainsi leur contenu en acides nucléiques. De l'éthanol à 70% (v/v) est ajouté avant de passer ce mélange sur la colonne d'extraction d'ARN, 3 lavages sont ensuite réalisés par les tampons RW1 (1 fois) et RPE (2 fois) fournis dans le kit. L'éluion est réalisée avec 25 µL d'eau exempte de nucléases.

Afin d'éliminer d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique lors de l'extraction des ARN totaux, chaque échantillon est traité à la DNase I (1 U/µL, Invitrogen).

Suivant la concentration en ARN obtenue par dosage spectrophotométrique, des échantillons contenant 1 µg d'ARN sont préparés (qsq avec de l'eau), sachant que le volume total final est de 11 µL au maximum. La DNase (1 µL) mélangée à un tampon (v/v) est alors ajoutée (15 min à température ambiante). Cette réaction est arrêtée par addition d'EDTA qui va chélater les ions divalents et ainsi inhiber l'action de la DNase. Il faut cependant inactiver cette enzyme avant de réaliser la transcription inverse par une incubation des échantillons de 10 min à 65°C.

2. A partir de cultures tridimensionnelles.

Aux différents temps, les billes sont prélevées et solubilisées pendant 5 minutes à 37 °C dans une solution de Citrate-EDTA à pH 6.8 (Citrate de sodium tribasique 55mM; EDTA 50 mM) (Sigma). L'ensemble est centrifugé par un pulse (13 000 rpm), puis lavé 5 fois dans une solution PBS 1X. Le surnageant est éliminé et le culot final est congelé à sec à -80 °C.

3. A partir des prélèvements expérimentaux

a. Membranes synoviales

Lors de la dissection de l'articulation du genou, les membranes synoviales sont soigneusement récupérées et placées dans des cryotubes, puis congelées immédiatement à -80°C. Lors de la décongélation, 350µL de tampon RLT additionné de β-mercaptoéthanol est ajouté à chaque tube et l'ensemble est broyé à l'aide d'un ultra-turax (Bioblock, Meudon, France) (piston) jusqu'à solubilisation des tissus. L'extraction se poursuit ensuite de la même façon que pour les cellules en culture (paragraphe B.2.1).

b. Cartilage

Lors de la dissection de l'articulation du genou, le cartilage rotulien est d'abord soigneusement séparé de l'os sous-chondral à l'aide d'un scalpel. 350µL de tampon RLT additionné de β-mercaptoéthanol est ensuite ajouté pour chaque échantillon. Le cartilage est broyé à l'aide pistons stériles jusqu'à solubilisation des tissus. L'extraction se poursuit ensuite de la même façon que pour les cellules en culture à l'aide du kit RNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, France).

4. Vérification de l'intégrité des ARN totaux extraits.

a. Dosage spectrophotométrique.

Ce dosage permettra d'effectuer l'étape de transcription inverse à partir de la même quantité d'ARN totaux dans tous les échantillons. La quantité d'ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. La concentration en ARN est donnée par la formule suivante : $[ARN]=A_{260} \times 1/D \times 40 \mu\text{g/ml}$, où D = facteur de dilution de l'échantillon.

Parallèlement, le rapport A260/A280 (absorbance à 260 et 280 nm) est mesuré. Il doit être compris entre 1,8 et 2 pour que l'on puisse estimer que nos extraits d'ARN ne sont pas contaminés par des extraits protéiques.

b. Migration sur gel d'agarose.

Afin de vérifier que les ARN récupérés ne sont pas dégradés, on effectue une migration sur gel d'agarose 1 %. Les dépôts sont composés de 2 µl d'extrait d'ARN additionnés de 5 µl de bleu de charge. Un agent intercalant des acides nucléiques, le BEt (Bromure d'Ethidium, Eurobio) est ajouté au gel d'agarose. Il permet de révéler les bandes sous UV. Les extraits d'ARN dégradés donnent sur gel une traînée diffuse, alors que s'ils ne le sont pas, nous pouvons observer deux bandes distinctes qui correspondent aux ARN majoritaires, 18 S et 28 S.

C. Transcription inverse.

1. Avec la reverse transcriptase M-MLV.

Cette réaction permet d'obtenir un ADN simple brin complémentaire (ADNc) à l'aide d'une amorce poly-dT et d'une enzyme, la transcriptase inverse MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen). Cette enzyme possède une activité ADN polymérase ARN dépendante ainsi qu'une activité exoribonucléasique hybride dépendante permettant la dégradation des ARN contenus dans les hybrides ADN / ARN.

L'ADNc est obtenu à partir d'une quantité d'ARN comprise entre 500 ng et 1 µg (la quantité d'ARN est différente selon les manipulations, elle dépend de l'extraction d'ARN réalisée auparavant), en utilisant des amorces se fixant sur la partie poly-adylée des ARN messagers (ARNm). Suite au dosage des ARN, il faut réaliser différentes dilutions afin que nos échantillons aient tous la même concentration. Le mélange réactionnel contient 11 µL de solution d'ARN et 9 µL de tampon réactionnel. Ce tampon est composé de 4 µL de tampon de RT, de 2 µL de DTT, de 1 µL de dNTP, 1 µL d'oligo-dT et de 1 µL de transcriptase inverse. La réaction de transcription inverse se déroule pendant 1 heure à 37°C. Les ARN restants sont dénaturés par la chaleur (5 min à 95°C).

2. Avec la transcriptase inverse iScript™.

Cette enzyme est obtenue par une modification de la transcriptase inverse dérivée du M-MLV qui lui confère une plus grande sensibilité. Ainsi, son utilisation s'avérera nécessaire pour transcrire des échantillons d'ARNm tels ceux issus du cartilage rotulien de rat. En effet, les ARN totaux extraits sont faiblement concentrés. Ces ARN sont mis au contact de 4 µL de solution 5X iScript Reaction Mix, et de 1 µL d'enzyme (iScript Reverse Transcriptase), les réactifs proviennent du « iScript cDNA Synthesis Kit » (Bio-rad, Marnes-la-coquette, France). Le volume final étant de 20 µL, nous avons choisi de travailler systématiquement avec 15 µL d'ARN totaux. De ce fait, les études de PCR qui suivront, devront impérativement comprendre l'étude de l'expression d'un gène de ménage afin de normaliser les résultats. La réaction de transcription inverse comprend deux étapes d'incubation, 5 min à 25°C suivies de 30 min à 42°C. Enfin, les ARN restants sont dénaturés par la chaleur durant 5 minutes à 85°C. Les échantillons d'ADNc seront conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

D. PCR quantitative en temps réel : PCRq

1. Principe

Cette technique va nous permettre de suivre en temps réel l'amplification d'un fragment d'ADN donné, grâce au kit QuantiTech SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) et un appareillage particulier le LightCycler (Roche Applied Science). Le principe général est celui d'une PCR classique. Ainsi, grâce à l'utilisation d'une matrice d'ADN, d'amorces spécifiques, et du mélange réactionnel fourni dans le kit – ce dernier comprenant, la Taq polymérase, les dNTP, et un tampon de PCR adéquat (Tris HCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 5mM MgCl₂, pH 8,7) - un fragment d'ADN déterminé va être amplifié par réaction de polymérisation en chaîne. La différence essentielle provient de la présence dans la solution réactionnelle d'un intercalant de l'ADN nommé le SYBR Green. Ce fluorophore a la capacité d'émettre une fluorescence très vive lorsqu'il est intercalé dans de l'ADN double brin, fonction disparaissant dès qu'il se retrouve sous sa forme libre (**Figure 56**). La réaction s'effectue dans des capillaires en verre de 1,5 mm de diamètre et de 3 cm de hauteur. Ceci favorise les échanges thermiques entre le mélange réactionnel et l'appareil, diminuant ainsi les durées des différentes étapes de la PCR, et donc le temps nécessaire à l'exécution du programme. Pendant toute la durée du processus, un microspectrofluorimètre couplé au LightCycler va nous permettre de mesurer la fluorescence émise par le SYBR Green. Ainsi il est possible de suivre l'évolution en temps réel de la quantité d'amplificats en effectuant des relevés de fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation. Cette évolution peut-être représentée par une sigmoïde. En effet, la fluorescence émise ne sera détectée qu'à partir d'un seuil nécessitant plusieurs cycles d'amplification avant d'augmenter exponentiellement jusqu'à un second seuil, le SYBR Green se trouvant alors en quantité limitante. Ce n'est donc que durant la phase exponentielle que la quantité d'amplicons obtenus sera directement proportionnelle à la fluorescence émise.

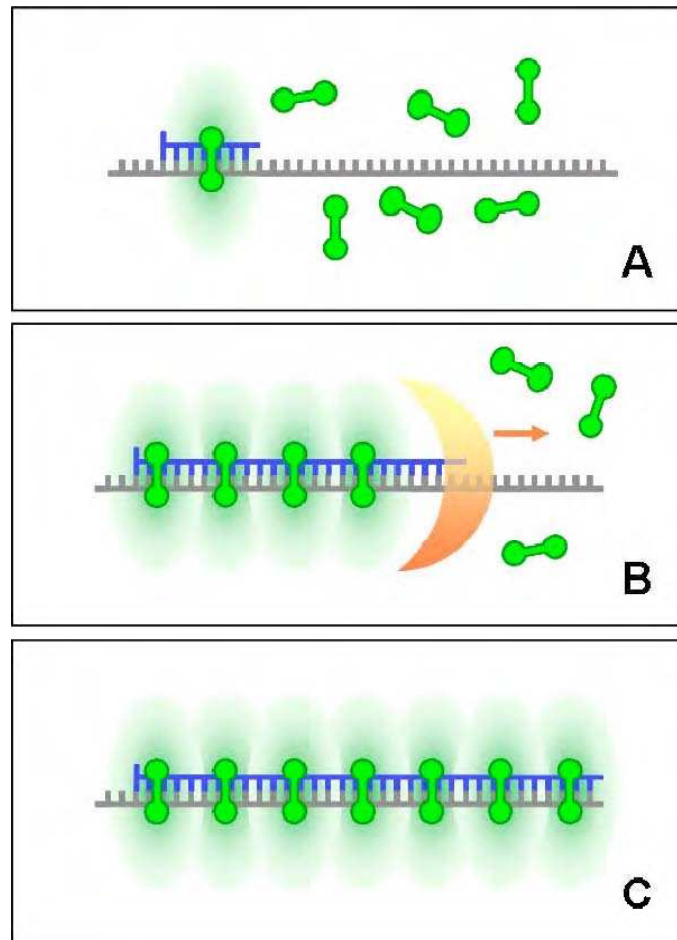


Figure 56 : PCRq par incorporation de SYBR Green.

Le SYBR Green est une molécule qui fluoresce uniquement lorsqu'elle est intercalée au sein de l'ADN double brin à la longueur d'onde d'excitation. Ainsi au cours des différents cycles d'amplification, aucune fluorescence n'est décelable pendant les étapes de dénaturation, l'ADN se trouvant sous forme simple brin. Le SYBR Green commence à s'intercaler dès la formation d'ADN double brin, donc lors de la phase d'hybridation (A) et cette incorporation se poursuit tout au long de l'élongation (B). La quantité maximale de SYBR Green intercalé est donc retrouvée à la fin de chaque élongation (C). C'est pourquoi le relevé de fluorescence s'effectue pour chaque cycle de PCR à la fin de la phase d'élongation.

2. Protocole expérimental

Chaque extrait d'ADNc obtenu après la transcription inverse est dilué 5 fois dans de l'eau. La réaction a lieu dans des capillaires en verre de 1,5 mm de diamètre et de 3 cm de hauteur.

Le mélange réactionnel contient : - 2µL d'extrait d'ADNc.

- 10µL de SYBR Green (Quantitect SYBR, Qiagen)
- 1µL d'amorce sens (Eurogentec)
- 1µL d'amorce antisens (Eurogentec)
- 6µL d'eau ultra pure (Eppendorf).

Matériels et méthodes

Il existe une étape initiale d'activation de l'enzyme de 15 min à 95°C, suivi de 40 cycles de 10 sec à 95°C (dénaturation), 20 sec à la température d'hybridation des amorces et 15 sec à 72°C (élongation). A la fin de chaque cycle, la fluorescence émise par le SYBR Green est mesurée. Les amorces utilisées sont présentées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel. Séquences synthétisées par EUROGENTEC (Angers, France).

Gènes	Amorce Forward (5' 3')	Amorce Reverse (5'3')
RP29	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTAC	AGACGCGGCAGAGCGAGAA
TNF-α rat	AGCCCTGGTATGAGCCCATGTA	CCGGACTCCGTGATGTCTAAGT
TNF-α humain	CTCCTCACCCACACCATCA	GGAAGACCCCTCCAGATAG
IL-1β rat	CTTCCCCAGGACATGCTAGG	CAAAGGCTTCCCCTGGAGAC
IL-1β humain	GGACAAGCTGAGGAAGATGC	TCGTTATCCCATGTGTGCGAA
IL-6 rat	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	ACAGTGCATCATCGCTGTTC
IL-6 humain	GGCACTGGCAGAAAACAACC	GCAAGTCTCCTCATTGAATCC
iNos rat	AATGCGGAAGGTCATGGC	CAGCTTTCCTGTCTCAGTAGCAAA
MCP-1 rat	CAGATCTCTCTCCTCCACCACTAT	GCATTAAGTGCATCTGGCTGAGACAGC
vEGF rat	CACATCTGCAAGTACGTTTCGTTTA	CAGAGCGGAGAAAGCATTGT
vEGF humain	GCAGAATCATCACGAAGTGG	GCATGGTGATGTTGGACTCC
Cox2 rat	TACAAGCAGTGGCAAAGGCC	CAGTATTGAGGAGAACAGATGGG
Cox2 humain	GAATCATTCACCAGGCAAATTG	TCTGTACTGCGGGTGGAAACA
TTP rat	GACCTTCCAATTTCCCCTTC	TCCCAGAGAGTGTGCAGATG
MMP13	GTCATCCTACCCATTGCAT	GCTTGTGCATCAGCTCCATA

Une gamme étalon du gène cible allant de 10^{-3} à 10^{-7} ng/mL est également préparée pour chaque expérience. Cette gamme étalon est préparée après la purification du produit de PCR obtenu à partir de l'ADNc du gène cible.

3. Courbe de fusion.

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. La température de fusion expérimentale obtenue est alors comparée à la valeur théorique pour chaque gène considéré. La vérification de cette T_m nous permet de vérifier la spécificité de l'amplification lors de la PCR, en effet, un pic correspond à un gène amplifié (**Figure 57**, exemple du TNF- α).

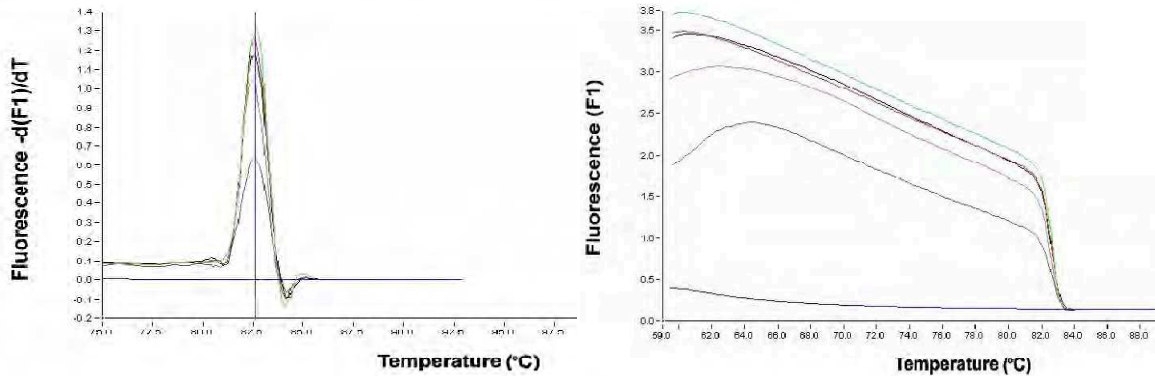


Figure 57 : Vérification de la spécificité de l'amplification par PCRq par la détermination du T_m du produit de PCR amplifié du TNF alpha. La présence d'un seul pic traduit l'unicité du fragment amplifié et la comparaison du T_m observé et du T_m théorique confirme l'identité du fragment amplifié. (Valeur de T_m théorique : <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>).

Ainsi, après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95 °C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température d'hybridation, provoquant ainsi la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95 °C et la fluorescence émise par le SYBRGreen est relevée tout les 0,1 °C. Lorsque 50 % de l'ADN double brin sont dissociés, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe.

4. Analyse des résultats

Principe

Afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux, nous commençons systématiquement par effectuer une PCR quantitative ciblant la séquence d'un gène de ménage (codant, dans notre cas, pour la protéine ribosomale RP29) dont le taux d'expression ne varie pas selon les stimuli ou traitements affligés aux cellules (*in vivo* ou *in vitro*). Cette étude permettra d'affecter un facteur de correction aux résultats obtenus pour l'analyse de l'expression des gènes d'intérêts. Enfin pour évaluer les concentrations du fragment d'ADN considéré, dans chaque échantillon à tester, nous réalisons une gamme d'étalonnage à partir de la séquence d'ADN cible préalablement amplifiée par PCRq, purifiée et diluée à différentes concentrations (en général de 10^{-3} à 10^{-7} ng/ μ l). La qualité de la gamme est vérifiée par régression linéaire (**Figure 58**).

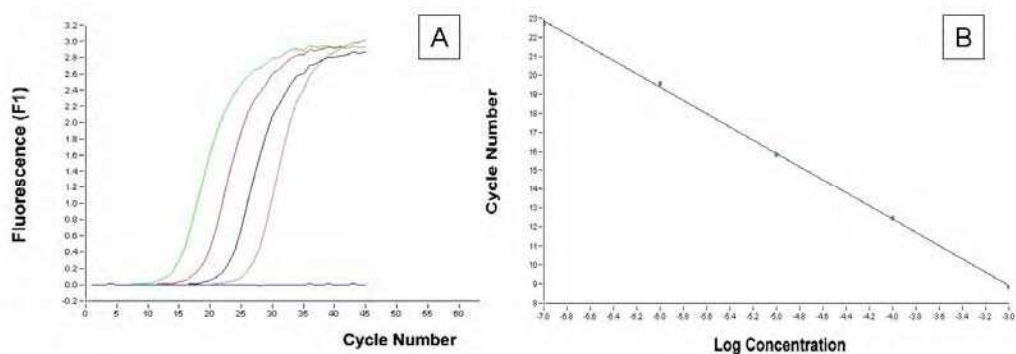


Figure 58 : Gamme étalon obtenue par dilutions successives (ng/ml) du produit de PCR amplifié du TNF alpha, après purification de celui-ci. L'efficacité de l'enzyme est vérifiée pour des concentrations en produit de PCR allant de 10^{-3} à 10^{-7} ng/ml. La droite ainsi obtenue permet d'affecter une concentration à chaque échantillon analysé. La figure A montre l'évolution de l'amplification par PCRq en temps réel de la gamme étalon du TNF- α , et la figure B correspond à la régression linéaire obtenue à partir de A.

La quantification relative de l'expression en ARNm est déterminée grâce à la méthode des delta delta Ct (294).

V. Paramètres biochimiques.

A. Mesure de la biosynthèse des protéoglycannes.

Les protéoglycannes (PGs) sont des constituants majeurs du cartilage hyalin. L'agrécan, présent en quantité équimolaire avec les petits PGs, biglycane, décorine et fibromoduline, est constitué de 150 chaînes de GAGs sulfatés environ, qui représentent près de 90 % de sa masse moléculaire. L'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ dans le cartilage patellaire constitue ainsi un reflet de la synthèse des PGs.

Nous avons adapté une méthode développée par Van den Berg sur des rotules de souris pour apprécier la synthèse des PG dans le cartilage patellaire chez le rat. Elle consiste à mettre en culture les explants dans un milieu (RPMI 1640 HEPES- HCO_3 , Invitrogen ; 3 h, 37 °C, 5 % CO_2) supplémenté en L-glutamine (2mM), en antibiotiques et en $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (0.7 $\mu\text{Ci/ml}$; Dupont-Nemours, France). Plusieurs lavages (sérum physiologique) permettent d'éliminer le $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ non incorporé, puis la décalcification des rotules (acide formique 5% (v/v)) de réaliser une biopsie centropatellaire (2 mm de diamètre, Stiefel). Les échantillons sont solubilisés (Soluène-350, Packard, Rungis, France ; 0.5 ml) et le ^{35}S incorporé est compté dans un compteur de radioactivité après l'ajout d'un liquide scintillant (Hionic-Fluor, Packard ; 4.5 ml) (295).

B. Dosage du NO dans les surnageant cellulaires.

Avant d'effectuer le dosage des médiateurs de l'inflammation dans les surnageants cellulaires, il convient de s'assurer que les cellules ont bien été stimulées par l'IL-1 β . Pour cela, un dosage du NO selon la méthode de Griess est réalisé, le NO étant un marqueur de la réponse inflammatoire.

C'est un dosage indirect, ce sont les nitrites, produits de dégradation du NO qui sont dosés. Ce dosage consiste en une réaction de diazotation en deux étapes : les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 550 nm.

Le dosage se réalise en plaque 96, il consiste en la réaction de 100 μL de réactif de Griess (solution A de Griess = 0,1% de dichlorohydrate de naphthyléthylène diamine dilué dans de l'eau + solution B de Griess = 1% de sulfanilamide dans H_3PO_4 à 5%) avec 100 μL de surnageant cellulaire.

C. Dosage ELISA

Les concentrations en TNF alpha sont déterminées par une méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ; R&D Systems). C'est un dosage immuno-enzymatique en phase hétérogène. Le dosage a été réalisé selon les instructions du fournisseur. L'anticorps adsorbé sur une microplaque de 96 puits est mis en contact avec un échantillon contenant l'antigène d'intérêt pendant 1 heure. Après 4 lavages, un anticorps biotinylé anti-TNF alpha est ajouté. Après une incubation d'une heure, l'excès d'anticorps est éliminé par 4 lavages, puis la streptavidine conjuguée à la peroxydase est ajoutée. Après une incubation

supplémentaire de 30 minutes, 4 lavages sont effectués, puis le substrat est ajouté. Après 1 heure d'incubation, l'ajout d'une solution d'acide hydrochlorique stoppe la réaction. La densité optique est lue à 450 nm versus 630 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques (Dynatech, MR 500). Une gamme étalon est réalisée en parallèle et permet ainsi de calculer la concentration. Les résultats sont exprimés en concentration (pg/mL).

D. Dosage multiplex

Les concentrations de 24 cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p(70), IL-13, IL-17, IL-18, Leptin, GRO/KC, TNF α , IFN γ , GM-CSF, RANTES, MCP-1, MIP-1 α , G-CSF, IP-10, Eotaxin, vEGF) sont déterminées dans le liquide synovial et le sérum des rats ayant subi ou non une injection de mBSA. Ces dosages sont effectués à différents temps avec le kit LINCOPlex (LINCO Research, St Charles, Missouri, USA). Ce dosage repose sur l'utilisation de microbilles associées à des systèmes d'analyse de type cytométrie de flux. Les concentrations dans chaque échantillon sont mesurées 3 fois selon les recommandations du fournisseur. Les mesures sont récupérées à l'aide du Luminex-100 system Version 1.7 (Luminex, Austin, TX). L'analyse des résultats est réalisée en utilisant le logiciel MasterPlex QT 1.0 (MiraiBio, Alameda, CA).

IV. Analyse statistique.

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 4. Les différents tests utilisés sont précisés en même temps que les résultats obtenus. Le risque des tests effectués est de $\alpha=0,05$ lorsqu'il n'est pas précisé. Les histogrammes présentent les résultats sous forme de moyennes \pm l'écart type (SD) ou bien, \pm l'écart standard à la moyenne (SEM).

RESULTATS ET DISCUSSION

ETUDE *IN VITRO*

I. Mise au point des conditions expérimentales.

A. Vérification de l'innocuité des oligonucléotides sur les cultures de cellules articulaires.

Le premier objectif de ce travail consistait en l'évaluation de la faisabilité de l'inhibition de l'expression du TNF alpha par une approche de type oligonucléotidique, à savoir, soit par l'utilisation d'oligonucléotides triple hélice (TFO), soit par la technique dite d'ARN interférence (siRNA). Pour ce faire, nous avons dans un premier temps évalué l'influence de ces deux approches sur l'activité mitochondriale et la viabilité de cultures de cellules articulaires (synoviocytes en 3^{ème} passage et chondrocytes en premier passage de rat et humains). L'inhibition de l'expression du TNF alpha a ensuite été vérifiée aux niveaux transcriptionnel et traductionnel dans les deux types de cellules précédemment cités, en conditions inflammatoires, induites soit par l'IL-1 β soit par le LPS.

1. Etude de l'effet du TFO sur les synoviocytes et chondrocytes articulaires

Les synoviocytes en P3 (SyP3) et chondrocytes en P1 (ChP1) sont mis en culture en plaques 96 puits à une densité de 5000 cellules par puits puis transfectés par l'oligonucléotide TFO aux concentrations de 1, 10 et 100 nM. Les tests MTT et LDH sont effectués après 3 temps de contact cellules / oligonucléotides ; 24, 48 et 72 heures. Les résultats obtenus pour le test LDH aux trois temps de contact sur les chondrocytes sont présentés sur la **Figure 59**.

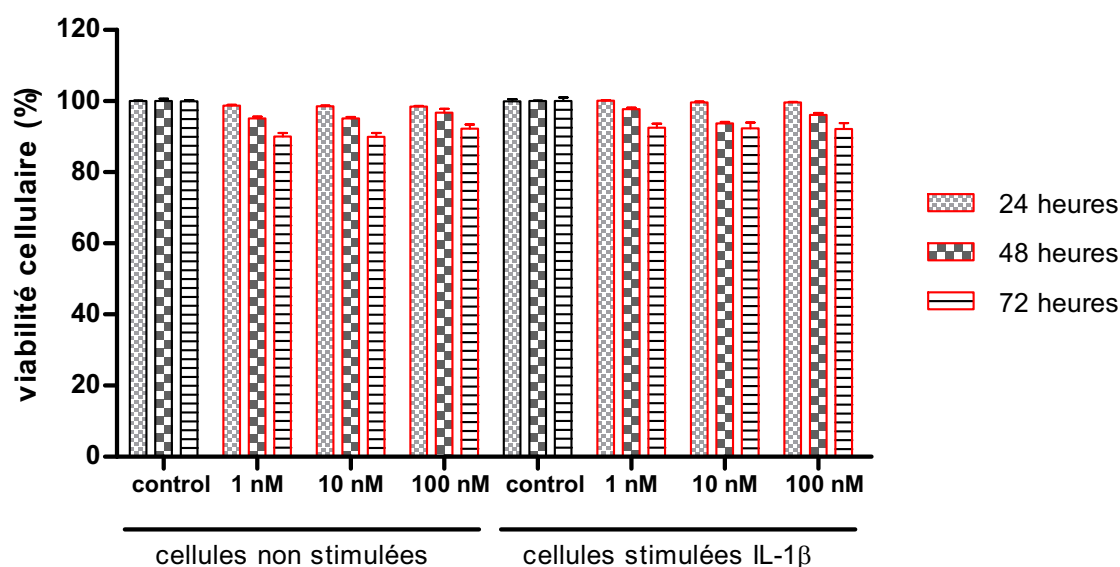


Figure 59 : Viabilité cellulaire (déterminée par test LDH) de chondrocytes en P1 transfectés par l'oligonucléotide TFO. La viabilité cellulaire est estimée par mesure de l'activité lactate déshydrogénase dans le milieu extracellulaire. Les mesures sont effectuées après 24, 48 et 72 heures post-transfection de l'oligonucléotide TFO. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9.

Nous observons que la viabilité cellulaire des chondrocytes en P1 cultivés en monocouche et transfectés par le TFO pour une gamme de concentrations allant de 1 à 100nM n'est pas affectée (cytotoxicité inférieure à 10%, maximum à 72 heures de contact). Dans les mêmes conditions, la stimulation des cultures de cellules articulaires par l'interleukine 1 β n'affecte pas la viabilité cellulaire. Des résultats similaires sont obtenus avec les synoviocytes en P3, permettant de mettre en évidence l'innocuité de l'oligonucléotide TFO vis-à-vis de la viabilité cellulaire. Les tests MTT menés en parallèle à ces expériences tendent également à démontrer que la transfection d'oligonucléotides TFO n'affecte pas l'activité mitochondriale des cellules articulaires de rats cultivées en monocouche. Une étude de l'innocuité à plus long terme pourrait être envisagée par la mise en culture en système tridimensionnel des cellules articulaires afin de limiter la prolifération cellulaire.

2. Etude de l'effet du siRNA.

Nous avons suivi un protocole identique pour évaluer l'effet de la transfection de siRNA sur la viabilité cellulaire (LDH) et l'activité mitochondriale (MTT). Les résultats obtenus concernant les tests LDH sur des synoviocytes en P3 sont présentés sur la **Figure 60**.

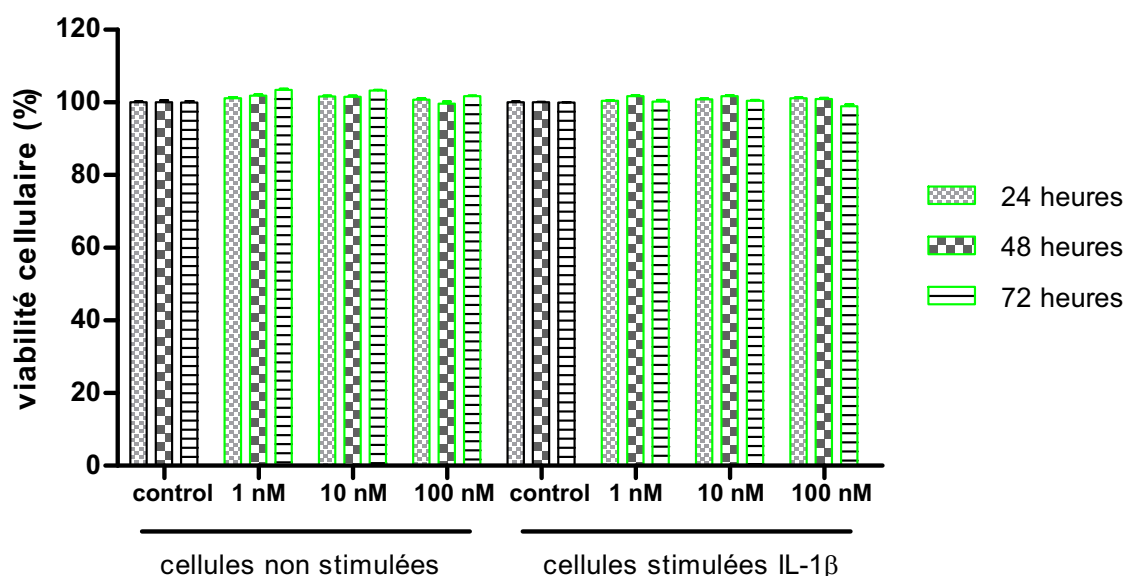


Figure 60 : Viabilité cellulaire de synoviocytes en P3 transfectés par l'oligonucléotide siRNA à des concentrations de 1, 10 et 100 nM. La viabilité cellulaire est estimée par mesure de l'activité lactate déshydrogénase dans le milieu extracellulaire. Les mesures sont effectuées après 24, 48 et 72 heures post-transfection du siRNA. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9.

Nous observons des résultats comparables à ceux obtenus pour le TFO. La transfection de siRNA dans une gamme de concentrations allant de 1 à 100 nM n'affecte pas la viabilité des synoviocytes en P3 pendant les 72 heures de temps de contact (mortalité < 5%), que les cellules soient stimulées par de l'IL-1 β ou non. Il en est de même pour les chondrocytes en P1 (résultats non présentés). L'activité mitochondriale (test MTT) des cellules articulaires transfectées par le siRNA n'est pas non plus modulée.

Ces tests préliminaires nous permettent de conclure en l'absence d'effets délétères provoqués par la transfection des oligonucléotides anti-TNF- α utilisés sur des cultures de cellules articulaires de rat en conditions inflammatoires. Il convenait ensuite de mettre au point les conditions expérimentales d'étude de l'expression génique.

B. Mise au point des conditions d'étude de l'expression génique (ARNm et protéines).

Afin d'évaluer le potentiel inhibiteur de nos oligonucléotides, il nous était nécessaire de se placer dans des conditions inflammatoires. En effet, à l'état basal, dans les conditions physiologiques, le TNF- α est très faiblement exprimé (il existe un renouvellement très rapide des messagers du TNF). C'est pourquoi nous avons utilisé deux stimuli inflammatoires sur nos cultures de cellules articulaires : LPS et IL-1 β (10 ng/mL). Ces stimuli ont la potentialité d'induire *in vitro* l'expression des principaux médiateurs de l'inflammation. De plus, ces deux stimuli induisent une réponse inflammatoire par le biais de voies de signalisations différentes. Cette caractéristique nous permettra de vérifier l'indépendance des effets observés vis-à-vis du stimulus inflammatoire.

1. Cinétique d'induction des médiateurs inflammatoires par une stimulation à l'IL-1 β (10ng/mL)

Nous avons étudié la cinétique d'induction des messagers des médiateurs de l'inflammation et tout particulièrement du TNF- α afin de se placer dans des conditions telles que l'induction en terme d'ARNm soit maximale. Nous avons mesuré par RT-qPCR l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β , iNos, cox2 et de l'IL-6 après différents temps de stimulation, les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 61**.

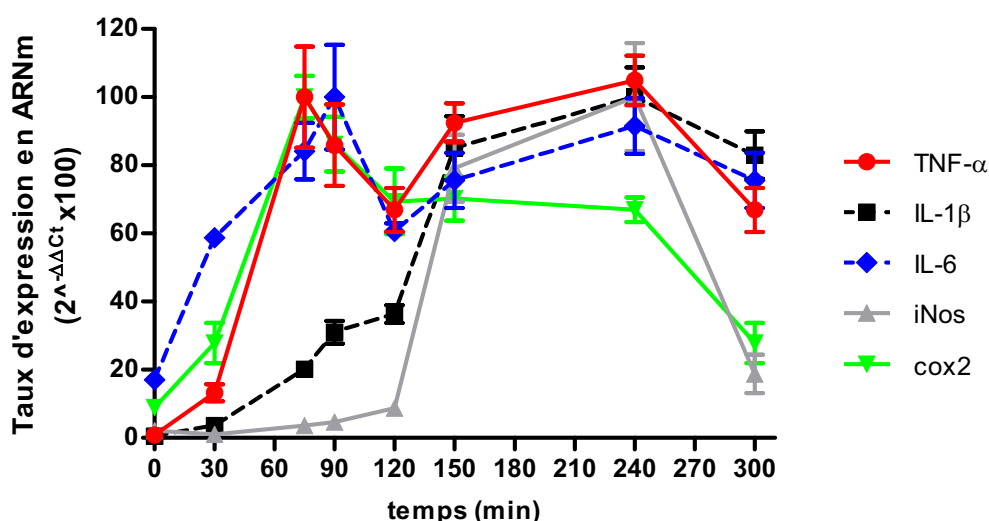


Figure 61 : Cinétique d'expression des médiateurs inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNos et cox2 par des synoviocytes de rat en P3 suite à une stimulation par de l'interleukine-1 β 10ng/mL. L'expression en ARNm est mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le pic d'induction en ARNm du TNF- α se situe entre 2 et 4 heures de stimulation par l'IL-1 β . Cette étude a été menée sur 8 heures et nous avons noté une baisse de l'induction des messagers du TNF- α après 4 heures de stimulation. Nous observons également que les autres médiateurs analysés présentent une induction significative après 4 heures de stimulation. Cette observation nous a conduits à étudier par la suite l'expression en ARNm de nos médiateurs inflammatoires après 4 heures de stimulation par l'IL-1 β 10 ng/mL.

Une étude similaire a été menée en parallèle sur des chondrocytes en P1 dans laquelle nous observons également une induction significative des médiateurs inflammatoires étudiés (et particulièrement du TNF- α) après 4 heures de stimulation.

2. Cinétique d'induction par un traitement au LPS.

La même démarche expérimentale a été suivie avec une stimulation au LPS. Le profil d'induction de l'expression des médiateurs inflammatoires obtenu est présenté sur la **Figure 62**.

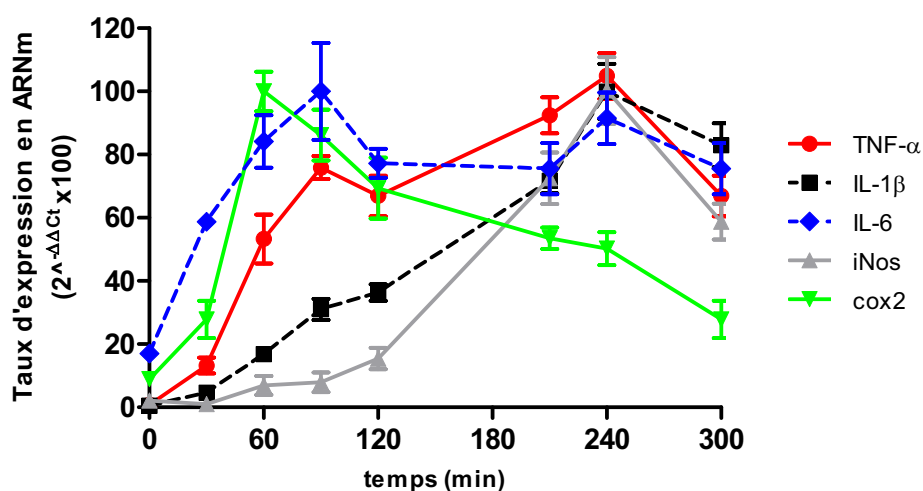


Figure 62 : Cinétique d'expression des médiateurs inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNos et cox2 par des synoviocytes de rat en P3 suite à une stimulation par du LPS 10ng/mL. L'expression en ARNm est mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9.

Comme pour la stimulation à l'IL-1 β , le maximum d'induction en ARNm du TNF alpha se situe après 4 heures. Nous observons également que l'IL-1 β , l'IL-6 et iNos présentent une induction significative de leur expression en ARNm après 4 heures de stimulation. Le pic d'induction de Cox2 est pour sa part plus précoce (1 heure de stimulation), cependant son expression est toujours significativement supérieure à l'expression basale après 4 heures de stimulation. Des résultats comparables sont obtenus avec des chondrocytes en P1, même si les facteurs d'induction sont sensiblement moins importants que dans les synoviocytes (facteur 10 en moyenne).

Parallèlement à cette étude, nous avons mesuré la cinétique de relargage des médiateurs dans le milieu extracellulaire par dosage ELISA. Nous avons ainsi observé un relargage significatif des médiateurs inflammatoires (TNF- α , NO, IL-6) après 18 à 20 heures de stimulation.

C. Démarche expérimentale suivie.

Les résultats obtenus précédemment nous ont amené à proposer la démarche expérimentale suivante (**Figure 63**) pour l'évaluation de l'inhibition de l'expression du TNF- α dans les synoviocytes et les chondrocytes *in vitro*.

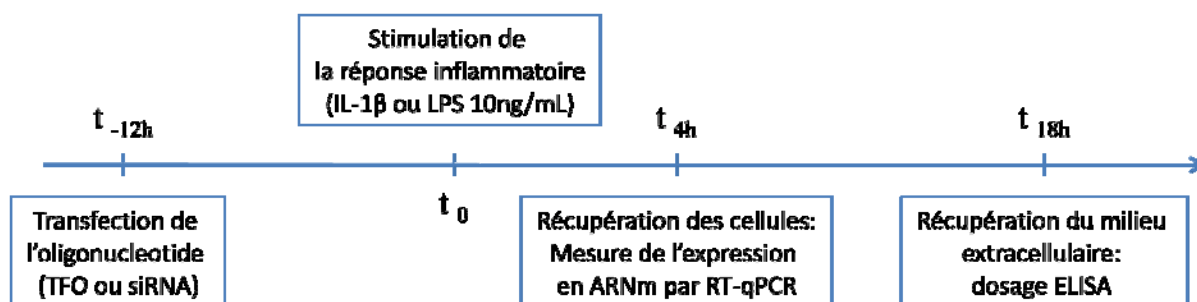


Figure 63 : Représentation schématique de la démarche expérimentale suivie pour évaluer l'efficacité de l'inhibition de l'expression génique par les oligonucléotides TFO et siRNA.

Les oligonucléotides TFO et siRNA sont transférés dans les cellules articulaires 18 heures avant le début de la stimulation de la réponse inflammatoire, ensuite, deux cas de figure sont envisagés : (1) les cultures de cellules sont arrêtées après 4 heures de stimulation pour une analyse de l'expression en ARNm par RT-PCR en temps réel, (2) le milieu extracellulaire est récupéré 18 heures après le début de la stimulation et les médiateurs sont dosés par ELISA. Cette démarche a été utilisée pour évaluer le potentiel inhibiteur de nos oligonucléotides.

II. Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition de l'expression du TNF- α par une approche de type oligonucléotidique (TFO ou siRNA).

L'efficacité du TFO et du siRNA a été évalué dans cette partie sur des cultures primaires de cellules articulaires (synoviocytes et chondrocytes) de rat.

A. Test des différents modes de renforcement de l'oligonucléotide TFO.

L'utilisation de TFO sous entend la présence d'acides nucléiques libres dans la cellule et donc l'exposition de ceux-ci aux nucléases cellulaires. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons souhaité étudier l'influence d'un renforcement chimique de notre oligonucléotide TFO sur son efficacité *in vitro*. Nous avons ainsi comparé l'efficacité d'un oligonucléotide avec des liaisons phosphodiesters classiques à un TFO renforcé par des liaisons phosphorothioates (**Figure 64**).

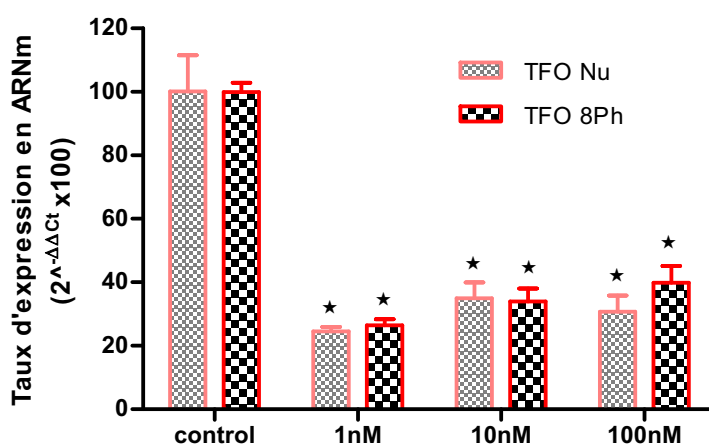


Figure 64 : Efficacité comparée des oligonucléotides TFO non renforcé (Nu) et renforcé phosphorothioate (8Ph) sur l'inhibition de l'expression du TNF- α en ARNm dans des cultures de synoviocytes en P3. Résultats présentés sous forme de moyenne \pm SEM, 3 expériences indépendantes, n=9. *p<0,05 vs cellules stimulées IL-1 β 10 ng/mL.

Il apparaît ici que l'on obtient une inhibition significative de l'expression du TNF- α dans des synoviocytes en P3 pour des concentrations en TFO de 1, 10 et 100 nM (inhibition maximale de 75% pour la concentration de 1 nM). Il n'existe pas de différence significative entre les pourcentages d'inhibition obtenus avec un TFO non renforcé et ceux obtenus avec le TFO 8Ph. La même démarche a été utilisée avec des chondrocytes, aucune différence significative entre l'efficacité des 2 oligonucléotides n'est observée. Cependant nous pouvons noter que l'inhibition maximale de l'expression en TNF- α est supérieure dans ce type cellulaire (85% à une concentration de 1 nM). L'analyse de ces résultats ne nous permet pas d'affirmer que le renforcement de l'oligonucléotide TFO par des liaisons de type

phosphorotioate (et donc a priori sa plus grande stabilité) ait une influence sur l'efficacité d'inhibition de l'expression du TNF alpha *in vitro*. Nous pouvons supposer que sur une étude à plus long terme, une différence d'efficacité pourrait apparaître du fait d'une plus longue persistance. Néanmoins, les données bibliographiques relatant la possibilité de dégradation des TFO non renforcés *in vivo* nous ont poussées à conserver pour la suite de nos expériences un oligonucléotide renforcé par des liaisons phosphorotioate aux deux extrémités (5' et 3').

B. Evaluation de la concentration optimale pour l'inhibition de l'expression du TNF- α .

Après avoir retenu le renforcement phosphorothioate pour nos expérimentations *in vitro*, nous avons utilisé une gamme de concentrations en TFO allant de 1fM à 500nM afin, d'une part, de déterminer les quantités optimales d'oligonucléotide à apporter dans les différents types de cultures de cellules articulaires pour obtenir une inhibition significative de l'expression en ARNm du TNF alpha et d'autre part, afin de comparer l'efficacité relative de la stratégie TFO vis-à-vis de l'ARN interférence qui est à l'heure actuelle la méthode d'inhibition de l'expression génique de référence.

1. Sur les synoviocytes en P3.

Les effets obtenus sur des cultures de synoviocytes de rat sont présentés sur la **Figure 65**.

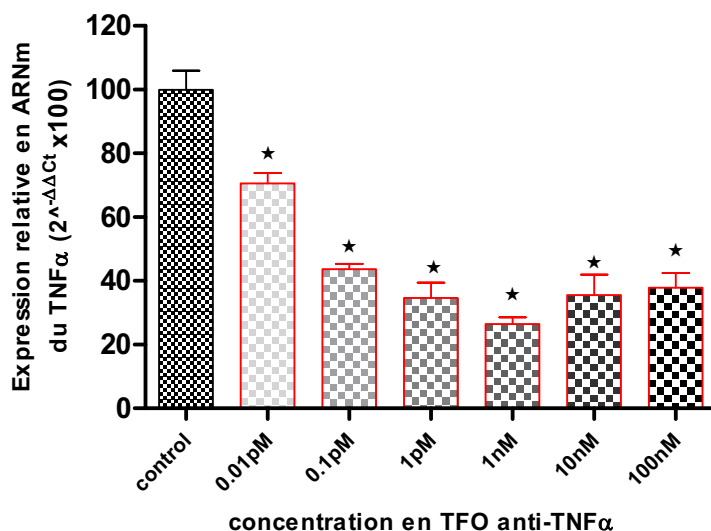


Figure 65 : Dose réponse de l'inhibition de l'expression en TNF- α en fonction de la concentration en TFO 8Ph dans des synoviocytes en P3 de rat. L'expression en ARNm est mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=12.*p<0,05 vs cellules stimulées IL-1 β 10 ng/mL.

Nous observons sur la **Figure 65** que l'inhibition maximale de l'expression en TNF- α est obtenue pour une concentration de 1 nM en TFO. L'inhibition de l'expression en TNF- α est significative dès 10 fM (30% d'inhibition) et le reste jusque 100 nM. L'inhibition de

l'expression est concentration-dépendante jusqu'à 1 nM puis on atteint un seuil maximal d'inhibition. Pour des concentrations en TFO supérieures à 100 nM, l'efficacité a même tendance à diminuer. Cette étude souligne la possibilité d'inhiber significativement l'expression du TNF- α avec des concentrations en TFO très faibles (de l'ordre du picomolaire).

2. Effet sur les ChP1.

La même gamme de concentrations a été testée sur des chondrocytes en P1 et le taux d'inhibition évalué par RT-PCR quantitative en temps réel (avec RP29 comme gène de ménage). Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 66**.

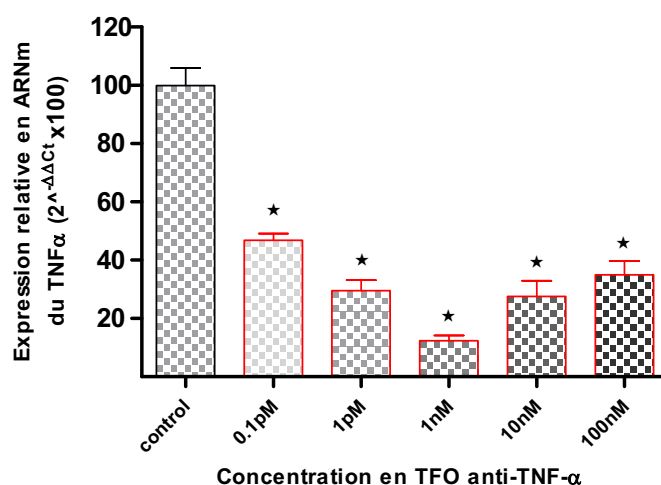


Figure 66 : Dose réponse de l'inhibition de l'expression en TNF- α en fonction de la concentration en TFO 8Ph dans des chondrocytes en P1 de rat. L'expression en ARNm est mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9. *p<0,05 vs cellules stimulées IL-1 β 10 ng/mL.

Nous observons sur les chondrocytes en P1 une inhibition de l'expression des ARNm du TNF alpha plus marquée que sur les synoviocytes avec une inhibition maximale de 85 % à la concentration de 1 nM. Globalement, la tendance des résultats obtenus pour les autres concentrations est similaire à ce qui est observé sur les synoviocytes avec un pourcentage d'inhibition légèrement plus prononcé pour des concentrations similaires.

Ces observations mettent en évidence que la concentration optimale pour l'inhibition de l'expression du TNF- α est de 1 nM. Nous souhaitons ensuite comparer ces résultats à ceux obtenus avec la stratégie d'ARN interférence.

C. Inhibition de l'expression du TNF- α par un siRNA.

1. Effet du siRNA sur les cellules articulaires

Comme pour le TFO, nous avons utilisé une large gamme de concentrations en siRNA (1 pM à 500 nM) afin de déterminer la concentration optimale pour nos études. Les expériences ont été réalisées sur des synoviocytes en P3 et des chondrocytes en P1, les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 67**.

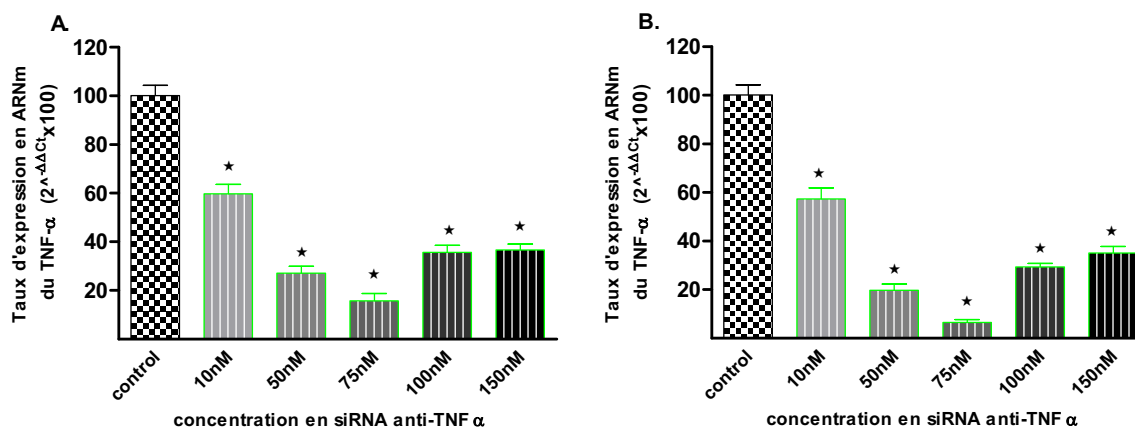


Figure 67 : Dose réponse de l'inhibition de l'expression en TNF- α en fonction de la concentration en siRNA dans des synoviocytes en P3 (A) et des chondrocytes en P1 (B) de rat. L'expression en ARNm est mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9.

Nous observons que l'inhibition de l'expression du TNF- α dans les deux types cellulaires est significative pour des concentrations en siRNA comprises entre 10 nM et 150nM. L'effet du siRNA est plus marqué sur les chondrocytes avec une inhibition maximale supérieure à 90 % pour une concentration de 75 nM (contre 83 % dans les synoviocytes). La concentration optimale en siRNA est de 75 nM, ce qui est nettement supérieur à la concentration en TFO retenue (1 nM).

2. Comparaison siRNA / TFO.

Nous avons ensuite réalisé une comparaison entre l'efficacité des deux approches (siRNA et TFO) (**Figure 68**) sur des synoviocytes en P3.

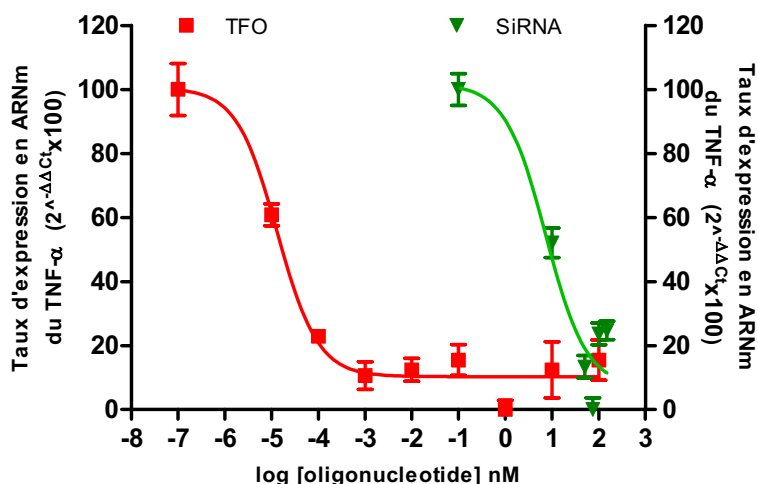


Figure 68 : Dose réponse comparée de l'efficacité du TFO et du siRNA sur l'inhibition de l'expression du TNF- α dans des synoviocytes en P3 de rat. L'expression en ARNm est mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=12.

La présentation des résultats sous cette forme met en avant l'avantage d'utiliser la stratégie TFO en terme de quantité d'oligonucléotide à apporter. Pour obtenir un degré d'inhibition identique, il est nécessaire d'apporter 50 fois plus de siRNA que de TFO.

Nous pouvons souligner ici que toutes les expérimentations précédentes, réalisées avec une stimulation de la réponse inflammatoire par de l'IL-1 β 10 ng/mL, ont également été effectuées avec le LPS comme inducteur inflammatoire (Figure 69).

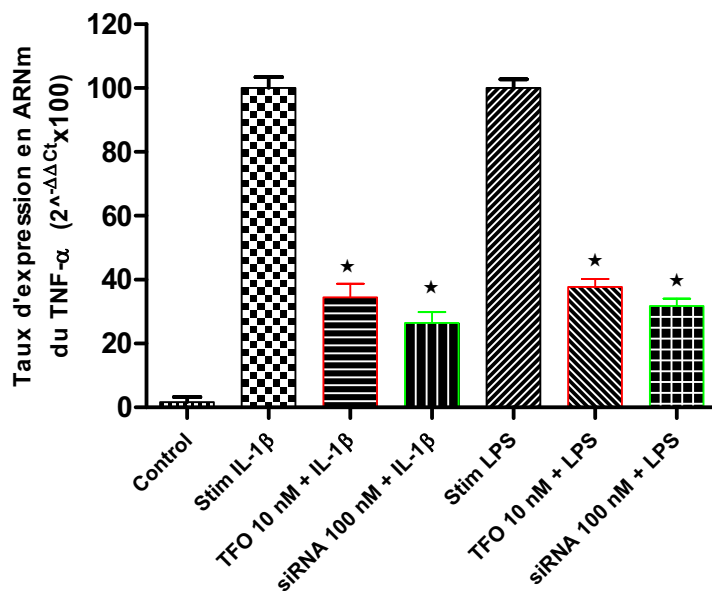


Figure 69 : Vérification de l'indépendance des effets observés vis-à-vis du stimulus inflammatoire. Des synoviocytes en P3 sont transfectés soit par le TFO soit par le siRNA anti-TNF- α puis sont soumis à une stimulation de 4 heures par l'IL-1 β ou le LPS 10 ng/mL. Résultats présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9. *p<0,05 vs cellules stimulées IL-1 β 10 ng/mL.

Les résultats que nous avons obtenus ne montrent aucune différence significative dans l'inhibition de l'expression du TNF- α , que ce soit avec une stimulation par de l'IL-1 β ou par du LPS.

D. Etude du potentiel inhibiteur des oligonucléotides TFO et siRNA sur les médiateurs protéiques.

Les résultats *in vitro* encourageants obtenus dans l'inhibition de l'expression en ARNm nous ont conduits à confirmer que ces effets se traduisaient au niveau des médiateurs protéiques relargués dans le milieu extracellulaire. Nous avons quantifié le TNF- α relargué par ELISA et effectué le dosage de NO dans le milieu extracellulaire par la méthode de GRIESS après 4, 24 et 48 heures de stimulation des chondrocytes et synoviocytes par l'IL-1 β ou le LPS.

1. Inhibition de l'expression en TNF alpha

Les résultats obtenus sur des chondrocytes stimulés par le LPS sont présentés sur la Figure 70.

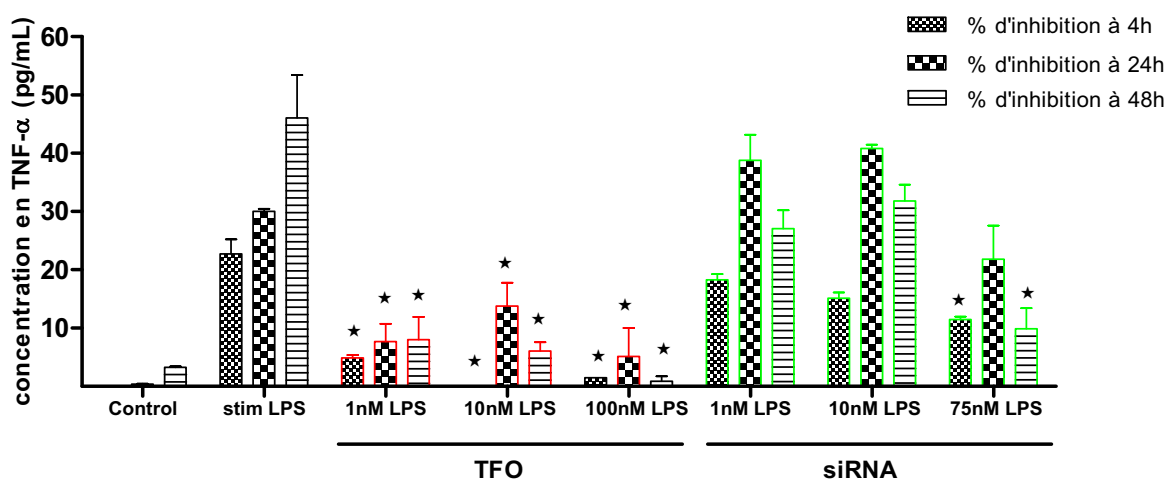


Figure 70 : Inhibition de la synthèse de TNF alpha par les oligonucléotides anti-TNF- α TFO et siRNA dans des chondrocytes en P1 stimulés par du LPS.* $p < 0,05$ en comparaison avec les cellules stimulées (par l'IL-1 β ou le LPS) au temps considéré. Résultats présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=9.

Nous observons une induction significative du relargage du TNF- α suite à la stimulation au LPS. La transfection de TFO permet d'inhiber significativement cette induction après 4, 24 ou 48 heures de stimulation LPS. Il n'existe pas de différence significative d'efficacité entre les concentrations de 1, 10 et 100 nM. Cependant l'inhibition obtenue par le TFO est supérieure à celle générée par la transfection de siRNA. Pour le siRNA, seule la concentration de 75nM permet d'inhiber significativement l'expression de TNF alpha après 4 et 48 heures de stimulation. Aux concentrations de 1 et 10 nM, l'effet sur la production de TNF- α est limité. Une expérimentation similaire a été menée avec une stimulation à l'IL-1 β et les résultats observés sont semblables (efficacité du TFO à 1, 10 et

100 nM, et efficacité du siRNA seulement à 75 nM). De même, sur les synoviocytes, les observations suivent une tendance identique avec néanmoins des concentrations en TNF- α secrétées plus fortes qu'avec les chondrocytes.

Parallèlement à ces expériences nous avons vérifié l'inhibition de l'expression en ARNm dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus ne nous permettent pas d'établir de corrélations directes entre le pourcentage d'inhibition en ARNm et celui en protéines.

2. Effet sur la sécrétion de NO.

En utilisant la méthode de GRIESS, nous avons dosé le NO sécrété dans le milieu extracellulaire. Le NO est un marqueur de l'intensité de la réponse inflammatoire. Les résultats sont présentés sur la **Figure 71**.

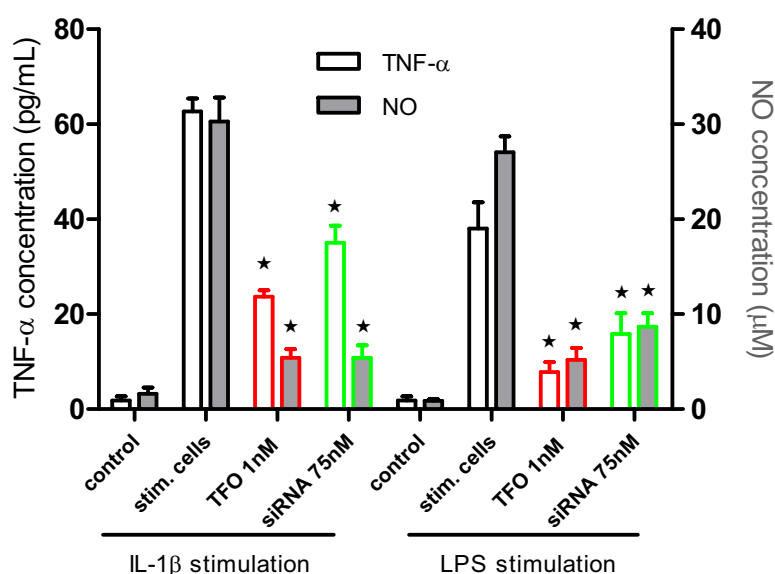


Figure 71 : Dosage de NO et de TNF- α dans le milieu extracellulaire de cultures synoviocytes en P3 après 24 heures de stimulation par de l'IL-1 β ou du LPS 10 ng/mL. *p<0,05 vs cellules stimulées IL-1 β 10 ng/mL.

Nous observons que pour les deux types de stimulation sur des synoviocytes en P3, l'inhibition de la sécrétion de TNF- α s'accompagne d'une inhibition significative de l'expression de NO dans le milieu extracellulaire. Ces résultats sont obtenus avec les concentrations optimales d'inhibition de l'expression du TNF- α (1 nM pour le TFO et 75 nM pour le siRNA).

III. Efficacité de la stratégie TFO sur des cellules articulaires humaines.

Les tests de transfection des synoviocytes et chondrocytes humains par l'utilisation de polymères cationiques (PEI, Transférine) ayant montré une efficacité de transfert très limitée nous nous sommes penchés sur la technique de transfection par électroporation. Ce procédé permet d'améliorer l'efficacité de transfert des oligonucléotides siRNA et TFO.

A. Mise au point de la technique de transfection des cellules articulaires humaines.

Afin d'évaluer la toxicité potentielle de la technique d'électroporation sur les synoviocytes et chondrocytes humains, nous avons effectué un test de cytotoxicité (test MTT) sur des synoviocytes suite à leur électroporation. Cette expérience a également vocation à déterminer le temps de latence nécessaire suite à ce choc avant de pouvoir stimuler les cellules par de l'IL-1 β . Pour cela nous avons comparé la réponse de synoviocytes en P3 ayant subi un pulse d'électroporation (impulsion électrique) à de synoviocytes n'en ayant pas subi. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 72**.

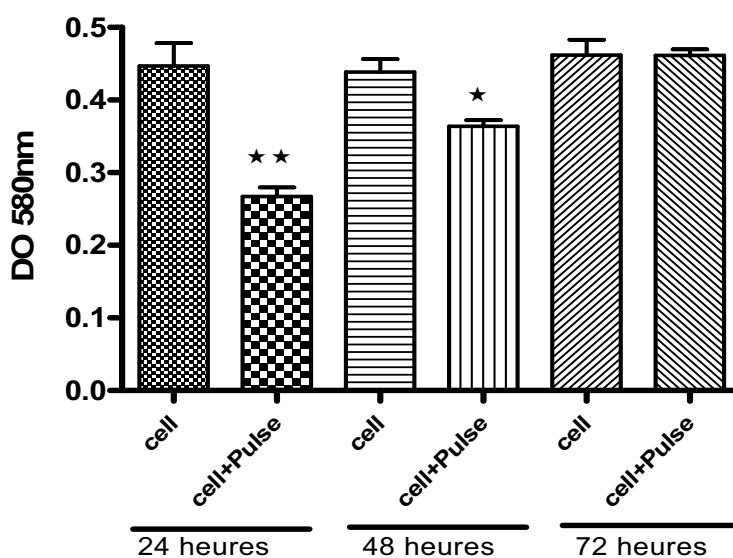


Figure 72 : Test MTT sur des synoviocytes en P3 ayant été électroporés (cell + pulse) ou non (cell). Ce test effectué 24, 48 et 72 heures après l'électroporation des cellules. * $p < 0,05$, en comparaison avec les cellules non pulsées.

Ces données permettent d'affirmer qu'il semble nécessaire de laisser au repos les synoviocytes plus de 24 heures après l'électroporation. C'est pourquoi nous avons effectué nos stimulations à l'IL-1 β environ 40 heures après dans les expériences qui suivent.

Lors de chaque expérience où nous avons transfecté des cellules par l'oligonucléotide TFO anti-TNF- α , un contrôle de l'efficacité de transfection est réalisé. Pour effectuer ce contrôle, nous transfectons dans les mêmes conditions expérimentales des cellules avec un

plasmide codant pour la GFP. L'observation microscopique par fluorescence des cellules transfectées à la GFP met en évidence l'expression de ce gène dans la cellule : une fluorescence verte est observée sous excitation ($\lambda=480\text{nm}$). Nous pouvons ainsi vérifier que les cellules ont bien été transfectées, comme démontré sur la **Figure 73**.

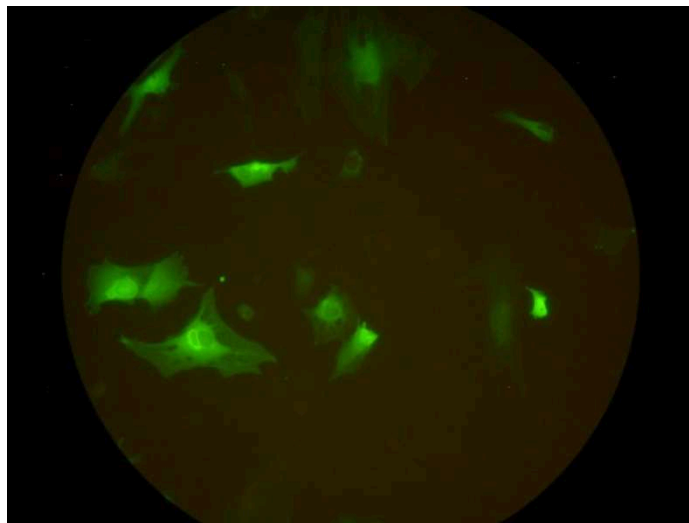


Figure 73 : Photographie de synoviocytes en P3 transfectés par de la GFP grâce à la technique d'électroporation (Grossissement x40).

Comme lors des expérimentations sur les cellules de rat, nous avons effectué une cinétique d'induction des médiateurs inflammatoires préalablement aux tests d'efficacité du TFO. Il s'est avéré que le pic d'induction en ARNm du TNF- α se situe après 4 heures de stimulation à l'IL-1 β , temps auquel nous nous sommes placés pour évaluer l'efficacité du TFO et du siRNA.

B. Potentiel inhibiteur des oligonucléotides TFO et siRNA sur des synoviocytes et chondrocytes humains.

1. Effet du TFO humain.

Etant donné que les prélèvements de tissus articulaires humains sur lesquels nous avons travaillé proviennent de patients dont le stade pathologique est hétérogène, les résultats obtenus ne seront pas globalisés dans un premier temps. Le protocole (méthodes, éthique) a été approuvé par la commission de recherche clinique du CHU de Nancy (CPRC).

a. Inhibition de l'expression en ARNm du TNF alpha

Les synoviocytes humains sont utilisés en P3, pour chaque patient nous évaluons les taux d'expression en ARNm du TNF- α et d'IL-1 β . Les résultats obtenus pour la transfection de synoviocytes humain en P3 par le TFO spécifique du promoteur du TNF- α humain sont présentés sur la **Figure 74**.

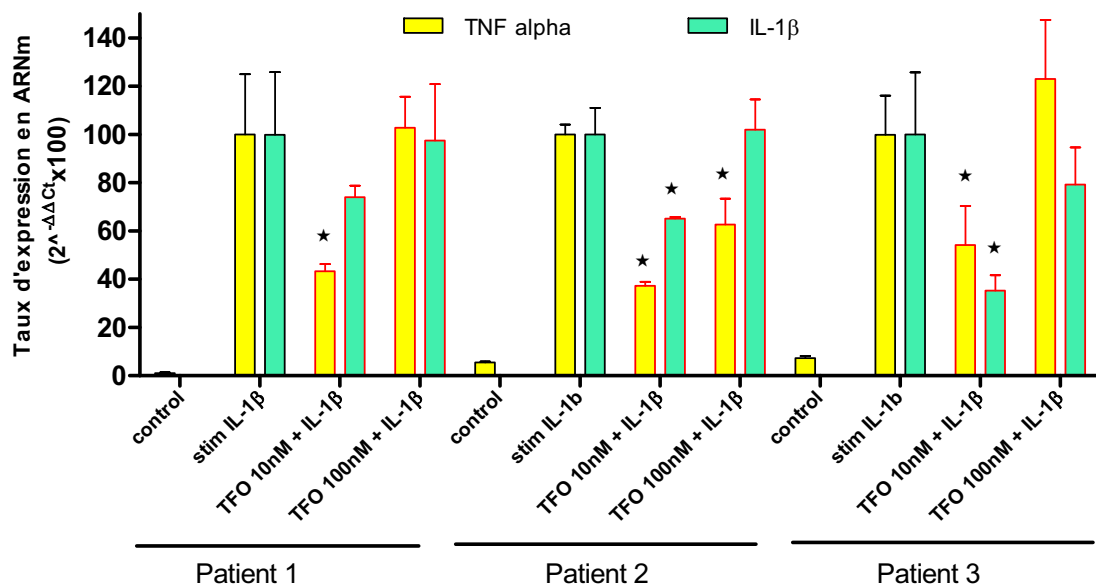


Figure 74 : Effet de l'oligonucléotide TFO anti-TNF- α sur l'expression du TNF alpha dans des synoviocytes P3 humains stimulés 4 heures par de l'il-1 β 10 ng/mL. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=3 pour chaque patient.*p<0,05 vs cellules stimulées par l'IL-1 β 10 ng/mL.

Sur la **Figure 74** nous présentons les résultats obtenus avec les synoviocytes de 3 patients. Pour chacun d'entre eux, l'inhibition de l'expression en TNF est meilleure à la concentration de 10 nM (comparativement à 100 nM). Pour chacun des patients, l'inhibition est de l'ordre de 50 % pour le TNF- α , et cette inhibition s'accompagne d'une diminution significative de l'expression en IL-1 β dans les synoviocytes après 4 heures de stimulation (inhibition de 30 à 60 %).

Le TFO humain a été testé sur les tissus articulaires de 12 patients. Nous avons rencontré un problème de réponse des cultures de cellules articulaires au stimulus inflammatoire pour 5 prélèvements. Il n'existait plus d'induction de la réponse inflammatoire de la part de ces cellules. Il était par conséquent impossible d'évaluer le potentiel inhibiteur du TFO dans ces conditions. Pour les 7 prélèvements restants, nous obtenions une inhibition significative de l'expression en TNF- α (environ 50 % pour des concentrations de TFO comprises entre 1 et 10 nM) accompagnée d'une diminution de l'expression en IL-1 β . Les résultats présentés ici concernent les cultures de synoviocytes. Des expérimentations similaires ont été menées sur les chondrocytes articulaires de ces mêmes patients avec des résultats comparables quant à l'inhibition du TNF (50 % d'inhibition moyenne à 10 nM de TFO) et de l'IL-1 β ainsi qu'une insensibilité des chondrocytes de 5 patients vis-à-vis du stimulus inflammatoire. Cependant, comme pour les cellules de rat, l'induction de l'expression en médiateurs inflammatoires par les chondrocytes suite à la stimulation était 10 fois plus faible que pour les synoviocytes.

Afin de lever l'interrogation quant à l'insensibilité des cellules articulaires de certains patients au stimulus inflammatoire, nous avons testé la sensibilité de synoviocytes et de chondrocytes articulaires provenant de rat arthritiques. Les synoviocytes et chondrocytes

articulaires mis en culture sont issus de rats injectés en intra-articulaire par 600 µg de parois de mycobactéries 24 heures avant la dissection des tissus. Les résultats obtenus mettent en évidence une absence d'induction de la réponse inflammatoire suite au traitement des cellules par de l'IL-1β ou du LPS 10 ng/mL.

b. Confirmation des effets au niveau protéique.

Les surnageants cellulaires sont récupérés après 24 heures de stimulation par l'IL-1β et les concentrations en TNF alpha et NO sont mesurées par ELISA et la méthode de GRIESS respectivement (**Figure 75**). Les résultats présentés sont ceux obtenus sur les 3 patients dont l'inhibition en ARNm est étudiée dans le paragraphe précédent.

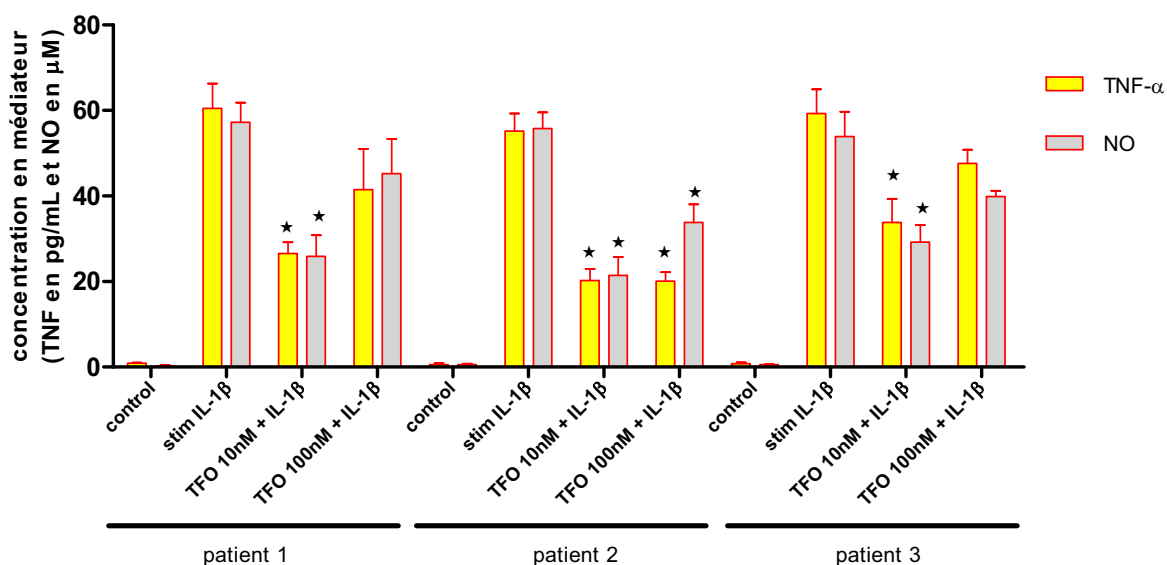


Figure 75 : effet de l'oligonucléotide TFO anti-TNF-α sur la sécrétion de médiateurs inflammatoires (TNF alpha et NO) par des synoviocytes en P3 humains après 24 heures de stimulation par de l'IL-1β 10 ng/mL. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM, n=3 pour chaque patient. *p<0,05 en comparaison avec les cellules stimulées par l'IL-1β 10ng/mL.

Nous observons que la transfection préventive de TFO à la concentration de 10nM induit une inhibition significative de la sécrétion de TNF alpha et de NO par les synoviocytes en P3 humains (inhibition de l'ordre de 50 %). A la concentration de 100nM, l'inhibition de la sécrétion des médiateurs est significative seulement pour le patient 2. Ces observations confirment que l'effet inhibiteur du TFO constaté sur l'expression en ARNm se traduit au niveau des médiateurs protéiques.

2. Efficacité de la stratégie ARN interférence.

Une gamme de concentrations de 1 nM à 200 nM a été testée sur les synoviocytes en P3 et chondrocytes en P1 issus d'une première série de prélèvements. L'inhibition maximale de l'expression en TNF-α est obtenue pour des concentrations en siRNA comprises entre 75 et 100 nM, concentrations que nous avons retenues pour la suite de notre étude sur les cellules

articulaires humaines. La démarche expérimentale est identique à celle suivie pour le TFO, avec une estimation de l'inhibition en termes d'ARNm (4h de stimulation) et de protéines sécrétées (24h de stimulation). Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 76**.

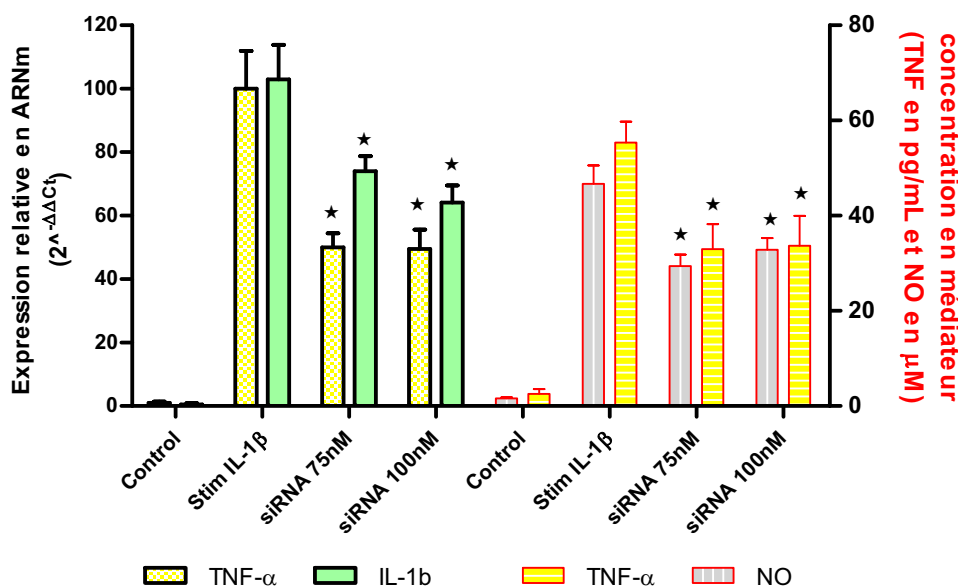


Figure 76 : Inhibition de l'expression en ARNm (TNF- α et IL-1 β après 4 heures de stimulation IL-1 β 10ng/mL) et en médiateurs sécrétés (TNF- α et NO après 24 heures de stimulation IL-1 β 10ng/mL) sur des synoviocytes en P3 humains transfectés préventivement par un siRNA anti-TNF- α aux concentrations de 75 et 100nM. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SEM (Moyenne de 5 patients testés). * $p < 0,05$ vs cellules stimulées IL-1 β 10 ng/mL.

Les résultats présentés ci-dessus sont la forme de moyenne car nous avons retenu uniquement les patients répondant au stimulus inflammatoire et les taux d'inhibition obtenus étaient comparables.

Nous observons que le siRNA aux concentrations de 75 et 100 nM entraîne une inhibition significative de l'expression en ARNm du TNF- α de 50 % qui s'accompagne d'une inhibition de l'expression en IL-1 β (de 30 à 35 % pour les concentrations de 75 et 100 nM respectivement). Ces observations faites sur les synoviocytes sont comparables à celles obtenues avec des chondrocytes en P1. L'inhibition observée en terme d'ARNm se traduit par une inhibition significative de la sécrétion du TNF- α par les synoviocytes et les chondrocytes (45 % d'inhibition). Le relargage de NO observé en conditions inflammatoires est également diminué en présence de siRNA. Nous observons une inhibition significative de 35 % de la sécrétion de NO. Les résultats présentés sont représentatifs de 5 prélèvements testés ; comme pour l'utilisation du TFO, nous avons été confrontés au problème de réponse au stimulus inflammatoire de cellules issues de certains patients.

Les taux d'inhibition relative de l'expression du TNF- α obtenus avec la stratégie siRNA ne présentent pas de différences significatives avec ceux obtenus par le TFO. Il serait nécessaire de travailler avec une gamme de concentrations plus large afin de pouvoir comparer l'efficacité de ces deux stratégies dans les cellules articulaires humaines.

E. Test de mise en culture tridimensionnelle pour l'étude de l'effet à long terme des oligonucléotides.

Une des limites des tests sur des cultures de cellules en monocouche réside dans le fait que l'on ne peut étudier le comportement de ces dernières à moyen et long terme (quelques jours à quelques semaines). Nous souhaitons étudier la persistance des effets de nos oligonucléotides au-delà de quelques jours ainsi que leurs potentiels effets délétères. Par conséquent, nous avons fait le choix de cultiver nos cellules dans une structure tridimensionnelle (billes d'alginate) permettant de limiter la prolifération cellulaire et donc de garder les cellules transfectées à moyen terme.

Ce travail a été effectué avec des synoviocytes et des chondrocytes humains préalablement transfectés avec le TFO ou le siRNA.

Nous avons été confrontés à un problème de dédifférenciation des cellules dans ce biomatériau induisant une insensibilité des cellules aux stimuli inflammatoires (IL-1 β et LPS 10 ng/mL).

IV. Effets collatéraux induits sur les médiateurs de l'inflammation par l'inhibition de l'expression du TNF- α .

Comme nous l'avons mentionné précédemment, lors de l'évaluation du taux d'inhibition de l'expression du TNF- α en ARNm, nous avons mesuré l'induction d'autres médiateurs inflammatoires (IL-1 β , IL-6, iNos, Cox2) après 4 heures de stimulation. Nous partons du principe que la synthèse protéique induite par cette stimulation n'a pas encore eu le temps d'influer sur l'expression des autres messagers inflammatoires. Ces expériences complémentaires avaient pour objectif initial de valider la spécificité d'action de chacune des deux stratégies utilisées.

A. Inhibitions parallèles observées sur les synoviocytes et chondrocytes.

Effet comparé TFO/siRNA.

Les taux d'expression en ARNm de l'IL-1 β , l'IL-6, iNos, et de Cox2 sont mesurés par RT-PCR quantitative en temps réel en même temps que le taux d'expression du TNF- α (après 4 heures de stimulation IL-1 β ou LPS 10 ng/mL). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 77.

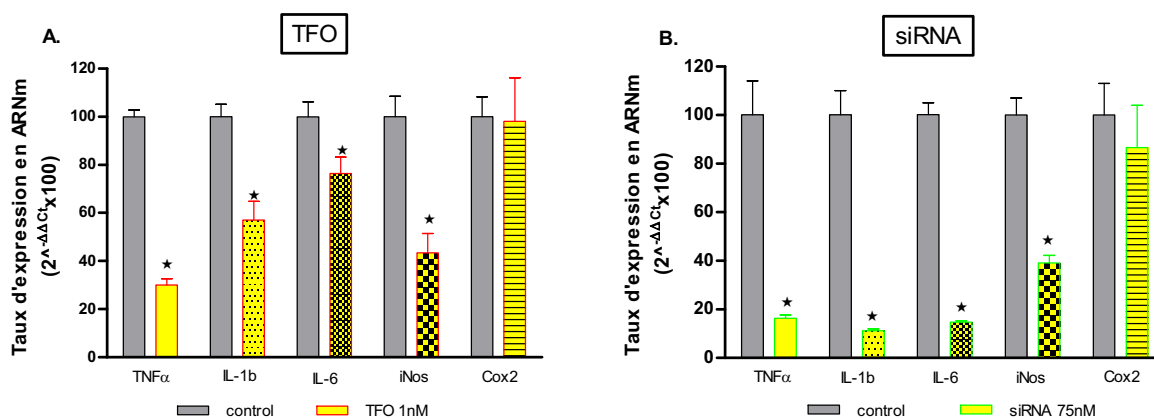


Figure 77 : Mesure de l'expression en ARNm des médiateurs inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNos et Cox2 dans des synoviocytes de rat en conditions inflammatoires (stimulation IL-1 β 10 ng/mL pendant 4 heures). Les synoviocytes sont transfectés préventivement avec l'oligonucléotide TFO (A.) à 1nM ou le siRNA (B.) à 75 nM. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=12. *p<0,05 en comparaison avec les cellules stimulées IL-1 β .

Nous observons que l'inhibition significative de l'expression en TNF- α dans les synoviocytes s'accompagne d'une inhibition significative de l'expression des messagers de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de iNos que ce soit avec la stratégie TFO ou siRNA. Des résultats comparables sont obtenus sur des chondrocytes en P1 avec néanmoins une inhibition plus

marquée de tous ces médiateurs (86, 89, 77 et 68% pour le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et iNos respectivement avec le TFO à 1nM et 93, 89, 84 et 73% avec le siRNA à 75nM). Nous observons également que le taux d'expression en ARNm de Cox2 n'est pas affecté.

De manière similaire, nous avons observé sur les cellules articulaires humaines qu'une inhibition de l'expression en TNF- α de 50 % s'accompagne d'une diminution significative de l'expression en IL-1 β (30%), IL-6 (32%) et iNos (44%) après 4 heures de stimulation IL-1 β 10 ng/mL.

Ces observations nous ont poussés à élargir le panel de médiateurs à étudier dans ces conditions. Nous avons réalisé par PCR quantitative en temps réel en plaque la mesure de l'expression de 84 gènes impliqués dans la réponse inflammatoire afin d'évaluer la répercussion de l'inhibition de l'expression du TNF- α (Tableau 5).

Tableau 5 : Evolution de l'expression en ARNm des médiateurs inflammatoires dans des synoviocytes en P3 transfectés par un oligonucléotide anti-TNF- α (TFO ou siRNA) après 4 heures de stimulation par de l'IL-1 β 10 ng/mL. Les mesures sont effectuées par PCR quantitative en temps réel.

	Traité TFO		Traité siRNA	
	Non affecté	Inhibé	Non affecté	Inhibé
Interleukines	IL1m, IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL12a, IL12b, IL13, IL15, IL16, IL17, IL17b, IL17f, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IL24, IL27, IL1f10, IL1f6, IL1f5, IL1f8IL1f9	IL1a, IL1b , IL11, IL6	IL1rn, IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL12a, IL12b, IL13, IL15, IL16, IL17, IL17b, IL17f, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IL24, IL27, IL1f10, IL1f6, IL1f5, IL1f8IL1f9	IL1a, IL1b , IL11, IL6
Interférons	Ifna1, Ifna2, Ifna4, Ifna5, Ifnb1	Ifng	Ifna1, Ifna2, Ifna4, Ifna5, Ifnb1	Ifng
Famille BMP et TGF	Bmp1, Bmp2, Bmp3, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmp7, Gdf1, Gdf3, Gdf5, Gdf8, Gdf9, Gdf10, Gdf11, Gdf15, Inha, Inhba	Bmp10, Gdf2	Bmp1, Bmp2, Bmp3, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmp7, Bmp10, Gdf1, Gdf2, Gdf3, Gdf5, Gdf8, Gdf9, Gdf10, Gdf11, Gdf15, Inha, Inhba	
Superfamille du TNF	Tnfsf4, Tnfsf7, Tnfsf9, Tnfsf10, Tnfsf12, Tnfsf13, Tnfsf13b, Tnfsf15, Tnfsf18, Tnfrsf11b, Cd40lg, Faslg	Tnfsf11, Lta, Ltb, Tnf	Tnfsf4, Tnfsf7, Tnfsf9, Tnfsf10, Tnfsf12, Tnfsf13, Tnfsf13b, Tnfsf15, Tnfsf18, Tnfrsf11b, Cd40lg, Faslg	Tnfsf11, Lta, Ltb, Tnf
Autres	Csf1, Csf2, Ctf1, Ctf2, Fgf10, Lif, Scgb3a1, Scye1, Mif, Fbs1, Nodal		Csf1, Csf2, Ctf1, Ctf2, Fgf10, Lif, Scgb3a1, Scye1, Mif, Fbs1, Nodal	Lif

Nous observons que peu de médiateurs inflammatoires sont affectés (IL-1 α , IL-1 β , IL-11, IL-6, Ifng, TNF- α , TNFsf11, Lt- α , Lt- β) par l'inhibition de l'expression en TNF alpha après 4 heures de stimulation par l'IL-1 β 10 ng/mL. Les médiateurs surlignés sont ceux que nous avons détectés lors des premières expériences, les confirmant par la même. Cependant, il serait nécessaire d'évaluer une éventuelle corrélation entre le degré d'inhibition de l'expression du TNF- α et les répercussions sur l'expression des autres médiateurs.

La première hypothèse suggérée par ces observations est un problème de spécificité d'action des oligonucléotides TFO et siRNA utilisés, bien que ce soient deux stratégies avec une cible différente menant aux mêmes résultats.

B. Clonage du promoteur du TNF alpha.

Le clonage du promoteur du TNF- α avait deux objectifs : d'une part vérifier la zone d'interaction entre le promoteur et le TFO, et d'autre part mettre en évidence la spécificité d'action du TFO.

Pour ce faire, nous avons cloné différentes régions du promoteur du TNF- α de rat dans le vecteur d'expression pGL3-basic :

- -320/+1
- -500/+1
- -800/+1
- -1146/+1, -1146/+18 et 1146/+150
- -1700/+1 et -1700/+18

La région putative de fixation du TFO sur le promoteur du TNF- α se situe en position -320/-341.

Sur la **Figure 78** sont présentés les résultats d'amplification des régions -1146/+1 et -1700/+18 du promoteur du gène du TNF alpha. Les amorces utilisées au cours de ces PCR possèdent des extrémités cohésives avec des sites de restriction pour les enzymes XhoI (reverse) et MluI (forward).

Nous avons vérifié par migration sur gel d'agarose 1% que les fragments amplifiés par PCR correspondaient bien à leur taille théorique (**Figure 78**).

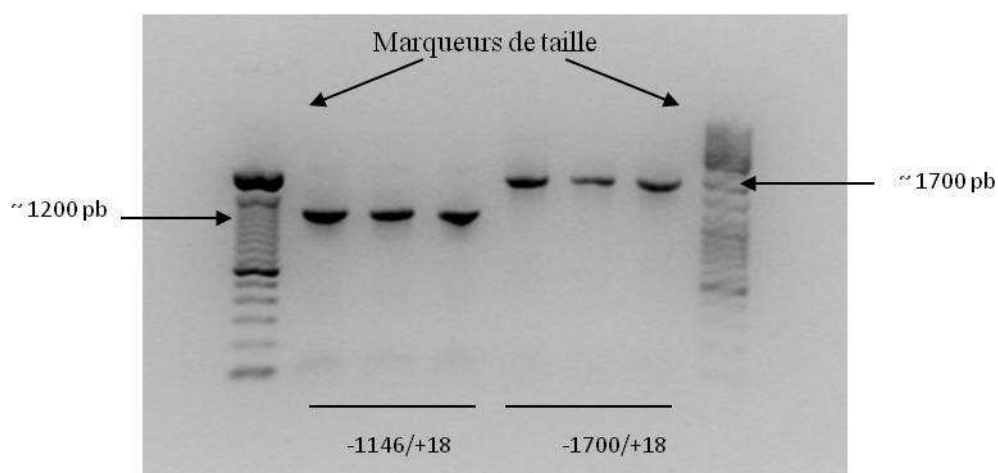


Figure 78 : Numérisation sous éclairage UV par coloration au BEt de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits d'amplification -1146/+18 (gauche) et -1700/+18 (droite) du promoteur du gène du TNF alpha. Les deux PCR sont réalisées en triplicate.

Résultats et discussion

Après digestion de 2µg de produit d'amplification (et 4 µg de vecteur) par 10 unités enzymatiques de chaque enzyme de restriction et ligation (rapport 1 ; 3) de ces produits de PCR dans leur vecteur d'expression (pGL3-basic), des bactéries compétentes *E.Coli* ont été transformées avec les différentes régions du promoteur du TNF alpha. Celles-ci ont ensuite été étalées sur milieu gélosé enrichie en ampicilline (Amp).

Les clones récupérés sont testés par deux techniques distinctes ; par une PCR effectuée directement sur les clones et par la digestion de minipréparations (**Figure 79**).

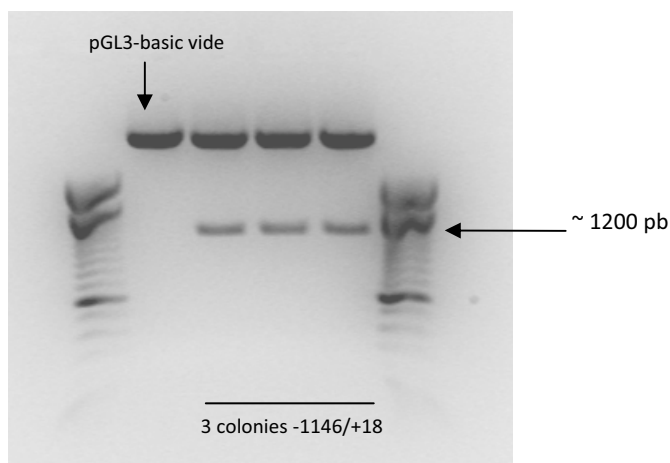


Figure 79 : Numérisation sous éclairage UV par coloration au BEt de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits de digestion (par XhoI et MluI) de 5µg de minipréparation de 3 colonies -1146/+18 testées (plus le vecteur pGL3-basic vide).

Nous observons 2 bandes distinctes, l'une à hauteur du plasmide pGL3-basic et l'autre à une taille d'environ 1200pb pour la construction contenant la région -1146/+18 du promoteur.

Dans un premier temps, les colonies ayant poussé sur milieu gélosé + Amp sont testées par la technique de PCR. Les amorces utilisées pour cette technique sont choisies telle que l'une s'hybride sur le vecteur d'expression (amorce RVp3 pour pGL3-basic) et l'autre sur l'insert qui est censé être entre les deux sites de restriction. Par conséquent, si l'insert est bien présent dans le vecteur, un fragment de la taille de celui-ci doit être amplifié. Nous avons ainsi pu isoler des colonies ayant bien incorporé le vecteur d'expression possédant l'insert souhaité. Chacune des constructions a ensuite été vérifiée par séquençage (GENOME express, gexbyweb@genome-express.com). Les séquences clonées ne comportent pas de mutations.

Après transfection de synoviocytes en P3 par 500 ng de vecteur ayant inséré le promoteur en amont du gène rapporteur de la luciférase, nous réalisons un dosage de l'activité luciférase 4 heures après le début de la stimulation de cellules par de l'IL-1β (soit 18 heures après le début de la transfection) (**Figure 80**).

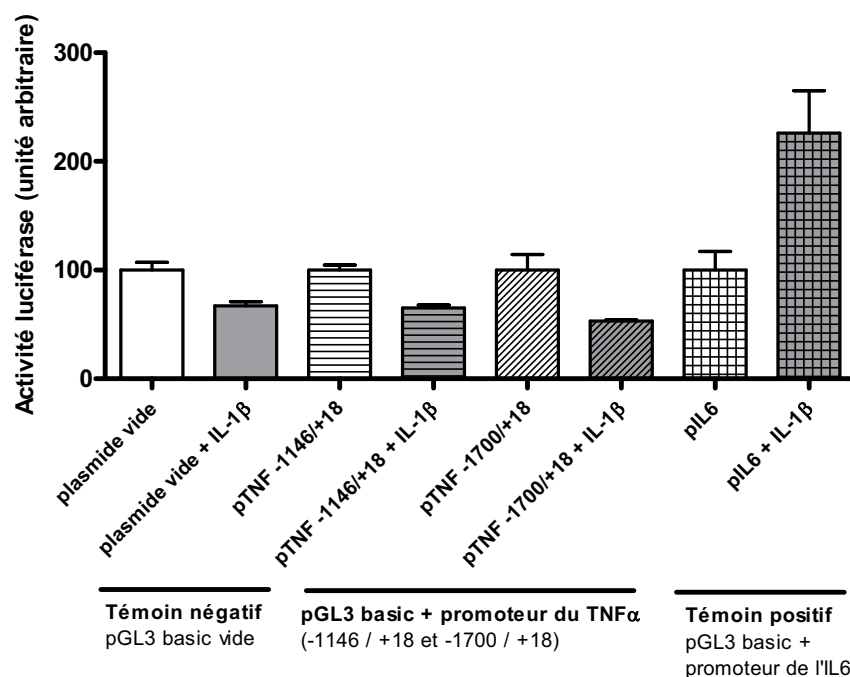


Figure 80 : Evolution de l'activité luciférase de synoviocytes en P3 transfectés par les vecteurs d'expression pGL3-basic ; pGL3-basic/-1146+18 ; pGL3-basic/ -1700+18 et pIL6 suite à une stimulation par de l'IL-1β 10ng/mL. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM, n=6.

Il apparaît ici que l'activité luciférase est induite par l'IL-1β seulement pour les synoviocytes transfectés par le vecteur contenant le promoteur de l'IL6 (dans cette expérience nous avons utilisé comme témoin positif le promoteur du gène codant pour l'interleukine 6, qui est un promoteur qui répond à ce stimulus inflammatoire).

Les synoviocytes transfectés par le promoteur du TNF alpha ne montrent pas d'augmentation de l'activité luciférase suite à une stimulation par de l'IL-1β, ceci démontre l'absence de réponse des constructions réalisées avec le promoteur du TNF-α à ce stimulus. Nous avons également utilisé une stimulation par du LPS mais les résultats furent identiques à ceux obtenus avec l'IL-1β.

Ces constructions ont été transfectées dans des synoviocytes, des cellules Hela et des chondrocytes sans que l'on puisse observer une induction de l'activité luciférase. Par conséquent nous avons décidé de vérifier la spécificité du TFO de manière indirecte, grâce au clonage du promoteur d'un gène dont l'expression est affectée lorsque le TFO anti-TNF-α est transfecté : le promoteur de l'IL-6. Ce promoteur est cloné dans pGL3-basic selon la même démarche expérimentale.

Le TFO est cotransfecté avec la construction contenant le promoteur de l'IL-6 et l'activité luciférase est mesurée après 4 heures de stimulation IL-1β 10 ng/mL (**Figure 81**).

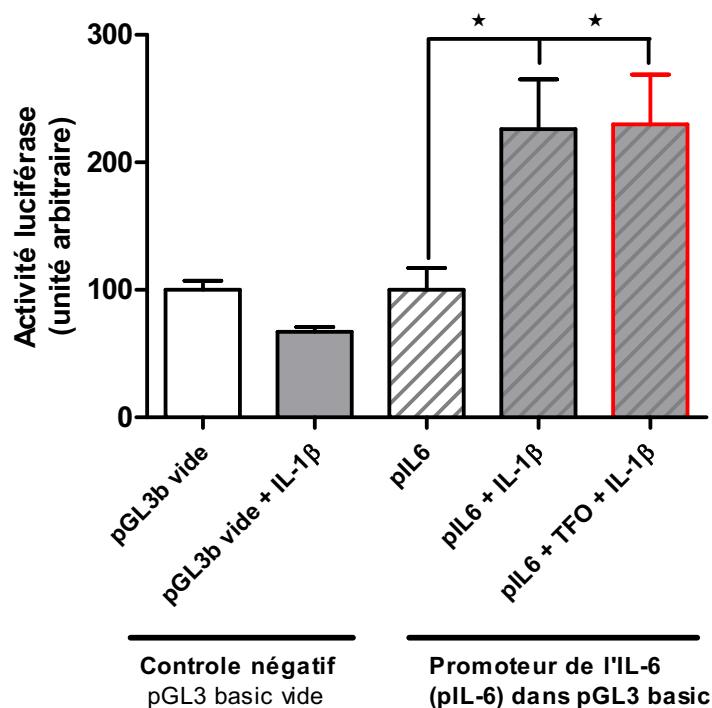


Figure 81 : Evaluation de l'effet du TFO anti-TNF- α sur l'activité du promoteur de l'IL-6. Des synoviocytes de rat en 3eme passage de rat sont co-transfectés par le TFO et le promoteur de l'IL-6 puis une stimulation par de l'IL-1 β 10 ng/mL de 4 heures est réalisée. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=3.*p<0,05.

Nous observons que le TFO n'a pas d'effet direct sur l'activité du promoteur de l'interleukine 6 alors que l'inhibition de l'expression en TNF- α a été évaluée en parallèle (77% d'inhibition de l'expression relative en ARNm). Ce résultat montre que le TFO n'interagit pas avec le promoteur de l'IL-6.

Nous pouvons noter ici qu'au final 8 constructions différentes du promoteur du TNF- α de rat et 5 du promoteur humain ont été réalisées sans qu'aucunes n'apparaissent fonctionnelles.

Une seconde hypothèse quant aux effets collatéraux observés suite à l'inhibition du TNF- α concernait un changement dans la stabilité des ARNm étant donné que des séquences consensus (ARE : AU rich Elements) de régulation de la stabilité des messagers sont retrouvées dans les régions 3'UTR des ARNm des médiateurs affectés.

C. Evolution de la stabilité des ARNm régulés négativement suite à l'inhibition du TNF- α .

1. Mesure de l'expression de TTP (Tristétraproline)

Les régions 5'UTR et 3'UTR des ARNm des médiateurs de l'inflammation tels que le TNF- α , l'IL-1 β , cox2 et l'IL-6 possèdent des séquences consensus qui ont un haut niveau d'homologie entre leurs différents ARNm. Sur ces régions se fixent de nombreuses protéines stabilisatrices ou déstabilisatrices. Une de ces protéines est TTP (Tristétraproline), cette

protéine se fixe sur la région 3'UTR de l'ARNm du TNF alpha. Nous souhaitons donc mesurer l'expression de cette protéine dans nos conditions expérimentales.

Nous n'avons pas observé de différences significatives dans le taux d'expression de cette protéine dans les chondrocytes et les synoviocytes de rat transfectés soit par le TFO, soit par le siRNA, en conditions inflammatoires (stimulation IL-1 β ou LPS 10ng/mL).

2. Evaluation de la stabilité des ARNm.

Afin de vérifier si la régulation négative de l'expression des messagers de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de iNos consécutive à l'inhibition du TNF- α étaient dépendante d'un changement dans la stabilité de leurs ARNm, nous avons mesuré l'évolution de la stabilité des messagers en présence de TFO et de siRNA par l'utilisation d'un inhibiteur transcriptionnel : l'actinomycine D. La néosynthèse des ARNm est stoppée par de l'Actinomycine D après 2 heures d'induction de l'inflammation puis la demi-vie des différents ARNm étudiés est évaluée après mesure par RT-PCR quantitative en temps réel (**Figure 82**).

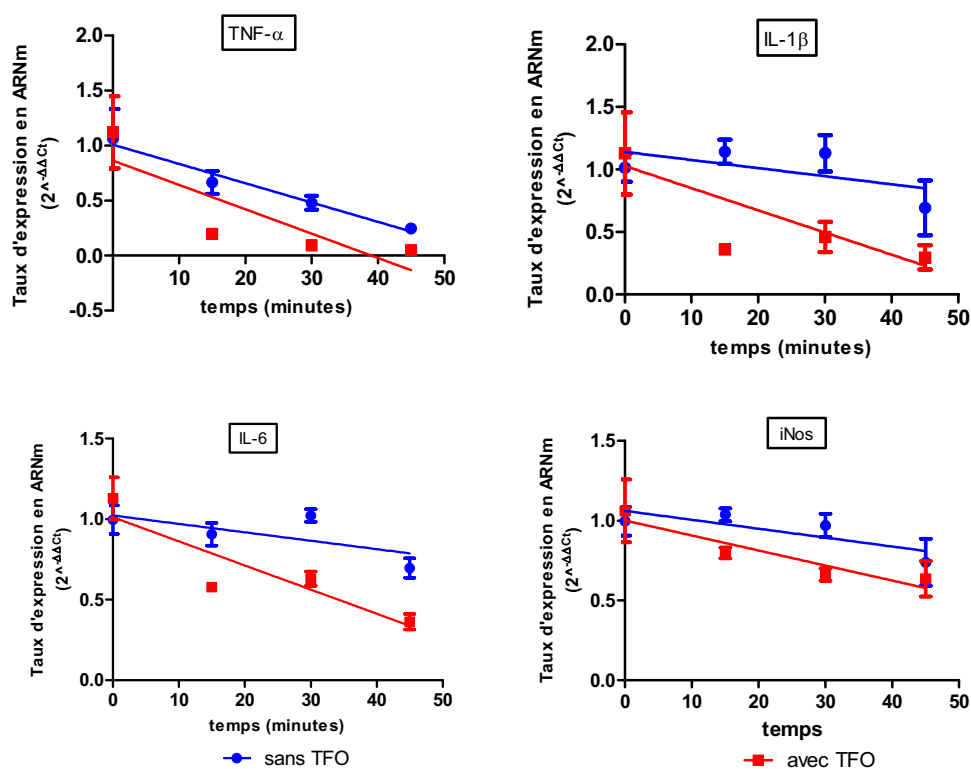


Figure 82 : Evolution de la stabilité des ARNm du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6 et d' iNos en présence de TFO anti-TNF- α suite à une stimulation par l'IL-1 β 10 ng/mL dans des synoviocytes de rat en 3^{ème} passage. L'expression en ARNm est mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne \pm SEM, n=3.

Nous observons que la stabilité des ARNm des cytokines IL-1 β , IL-6 diminue significativement lorsque les cellules sont traitées préventivement avec le TFO. La modification de la stabilité des ARNm d'iNos et du TNF- α est quant à elle plus faible et non

significative. Une démarche expérimentale identique a été suivie avec l'utilisation de siRNA anti-TNF- α , menant à des résultats comparables à ceux présentés ci-dessus.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la stabilité des ARNm est régulée au niveau des régions 3'UTR et 5'UTR. Partant du principe que l'utilisation de siRNA ou de TFO anti-TNF- α engendre une diminution de la quantité d'ARNm du TNF, nous souhaitions vérifier si l'apport exogène de séquences 3'UTR ou 5'UTR de l'ARNm du TNF alpha permettait de moduler la stabilité des ARNm de l'IL-6, de l'IL-1 β et d'iNos. Nous supposons que les protéines se fixant sur les régions 5'UTR et 3'UTR du messenger du TNF alpha n'ayant plus, ou moins, de partenaires, se fixaient sur des régions similaires des messagers des autres cytokines inhibées.

3. Clonage du mRNA du TNF-alpha et tests de surexpression.

a. Clonage des différentes régions de l'ARNm du TNF- α .

Nous avons envisagé de sur-exprimer différentes régions de l'ARNm du TNF- α dans les cellules articulaires transfectées ou non par les oligonucléotides anti-TNF- α afin d'évaluer l'influence de la présence physique de ces différentes régions sur l'inhibition de l'expression des médiateurs affectés parallèlement au TNF alpha.

Nous avons effectué 4 constructions distinctes de la séquence codant pour l'ARNm du TNF- α . Ces constructions sont réalisées dans le vecteur d'expression pcDNA3.1+. Nous avons ainsi cloné les séquences suivantes :

- 5'UTR-CDS-3'UTR (1679pb)
- 5'UTR-CDS (870bp)
- CDS-3'UTR (1517bp)
- CDS (708bp)

Comme dans la partie précédente, une migration sur gel d'agarose nous a permis de vérifier la taille des fragments amplifiés (**Figure 83**).

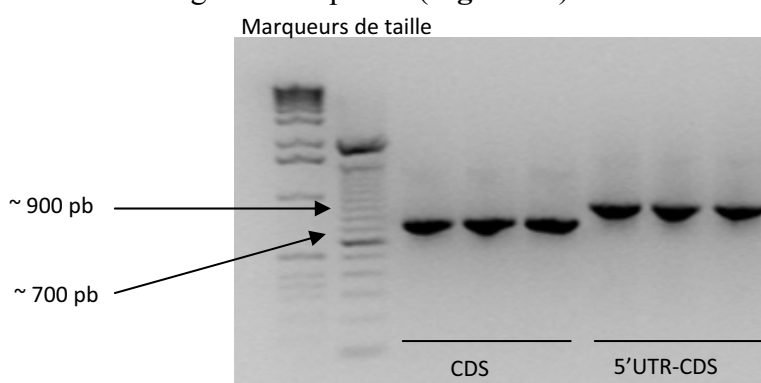


Figure 83 : Numérisation sous éclairage UV par coloration au BEt de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits d'amplification CDS (gauche) et 5'UTR-CDS (droite) de la partie codante du gène du TNF alpha. Les deux PCR sont réalisées en triplicate.

Les résultats présentés sur ce gel mettent en évidence l'amplification des régions CDS et 5'UTR-CDS de la partie du génome de rat codant pour l'ARNm du TNF alpha. Nous avons également vérifié que l'amplification des régions 5'UTR-CDS-3'UTR et CDS-3'UTR était

satisfaisante (taille théorique ~ taille observée) par cette technique de migration sur gel d'agarose.

Screening des colonies positives.

Après digestion de 2µg de produit d'amplification (et 4 µg de vecteur) par 10 unités enzymatiques de chaque enzyme de restriction (XbaI et EcoRI) et ligation (rapport 1 ; 3) de ces produits de PCR dans pcDNA3.1+, des bactéries compétentes *E.Coli* ont été transformées avec les 4 constructions. Celles-ci ont ensuite été étalées sur milieu gélosé enrichie en ampicilline (Amp). Les clones récupérés sont testés par une PCR effectuée directement sur les clones et par la digestion de minipréparations.

Dans un premier temps, les colonies ayant poussées sur milieu gélosé + Amp sont testées par la technique de PCR. Nous utilisons l'amorce T7 (hybridation sur pcDNA3.1) et une amorce qui s'hybride sur l'insert censé être entre les deux sites de restriction. Nous avons testé 10 colonies pour chacune des 4 constructions réalisées.

Sur la **Figure 84** sont présentés les résultats obtenus avec les colonies de la région codant pour le messager du TNF.

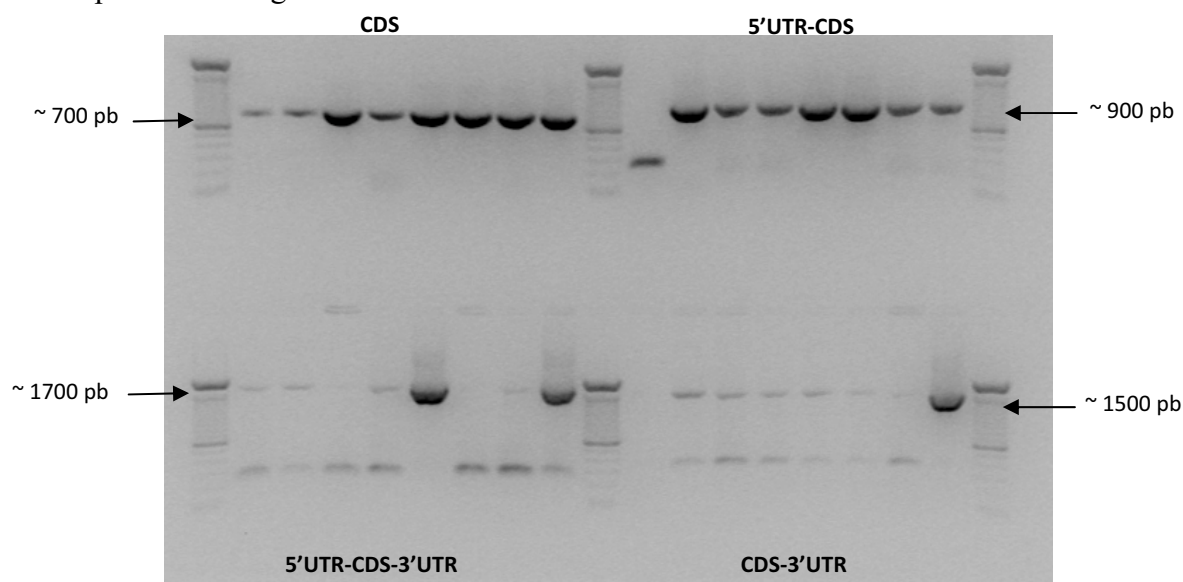


Figure 84 : Visualisation par une coloration au BET, sous éclairage UV, de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits d'amplification obtenus par PCR intra bactérienne sur les colonies CDS (haut gauche), 5'UTR-CDS (haut droite), 5'UTR-CDS-3'UTR (bas gauche) et CDS-3'UTR (bas droite). Les amorces utilisées sont choisies telles que l'une s'hybride sur le vecteur et l'autre sur l'insert souhaité.

Nous observons que pour chacune des constructions testées nous obtenons au moins une colonie dans laquelle nous avons amplifié un fragment d'une taille comparable à celle de l'insert souhaité. Nous pouvons donc supposer que ces colonies ont bien incorporé le plasmide avec l'insert. De plus, un second test est réalisé afin de s'assurer que le vecteur possède le bon insert.

Pour cela, nous réalisons une pré-culture dans du milieu LB + Ampicilline des colonies testées positives par PCR. Nous réalisons une minipréparation à partir de ces pré-

cultures et 5µg de l'ADN plasmidique récupéré est digéré par les enzymes de restrictions. Chaque vecteur utilisé par la suite a été séquençé (GENOME express, *gexbyweb@genome-express.com*) afin de s'assurer de l'absence de mutations dans les séquences clonées.

b. Tests de surexpression des différentes régions de l'ARNm du TNF et évolution de la stabilité des messagers des autres médiateurs.

Nous avons dans un premier temps vérifié la fonctionnalité des 4 constructions réalisées. L'analyse de leur fonctionnalité est réalisée par RT-PCR quantitative, après que les cellules aient été transfectées par le vecteur d'expression contenant les différentes régions de l'ARNm, les ARN totaux sont récupérés (21 heures après le début de la transfection) et analysés (**Figure 85**).

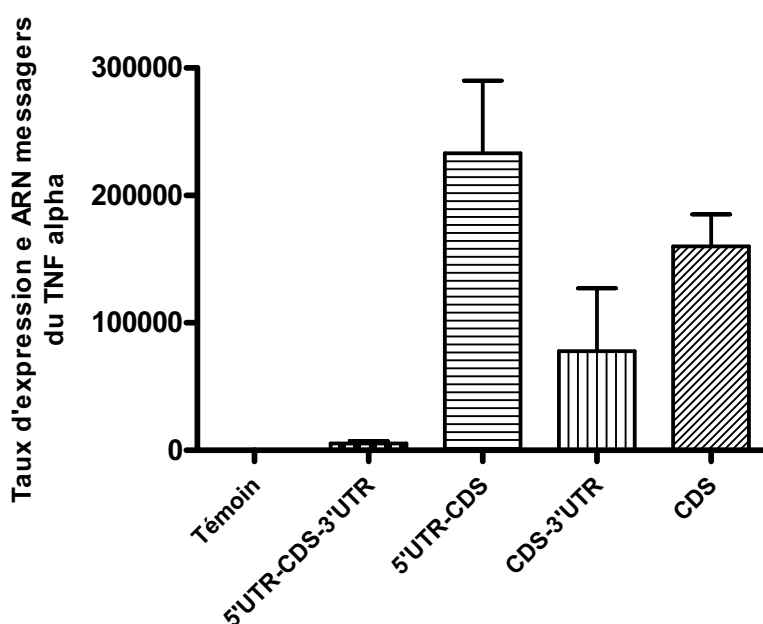


Figure 85 : Test de fonctionnalité des différentes constructions par mesure de la surexpression en ARNm du TNF alpha. Des synoviocytes en P3 de rat sont transfectés par le pcDNA3.1+ contenant chacune des 4 constructions et l'expression en ARNm du TNF- α est mesurée par PCR quantitative. Résultats présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=6.

Nous observons que les cellules transfectées par ces constructions surexpriment toutes les ARNm du TNF alpha (de 50 fois pour le 5'UTR-CDS-3'UTR à 2300 fois pour le 5'UTR-CDS), toutefois il semblerait que les régions UTR influent sur la quantité d'ARNm présents, nous observons en particulier que la présence de la région 3'UTR diminue la surexpression en ARNm.

Un dosage du TNF- α sécrété dans le milieu extracellulaire a également été réalisé pour vérifier que les régions surexprimées étaient bien traduites en protéines. Les résultats obtenus sont superposables à ceux observés en ARNm.

Nous avons ensuite surexprimé les différentes régions de l'ARNm du TNF- α dans des synoviocytes en P3 de rat transfectés ou non par le TFO. L'expression des messagers de l'IL-

IL-1 β et de l'IL-6 sont mesurés après 4 heures de stimulation IL-1 β 10 ng/mL (**Figure 86**). Nous avons vérifié parallèlement l'expression des messagers du TNF- α .

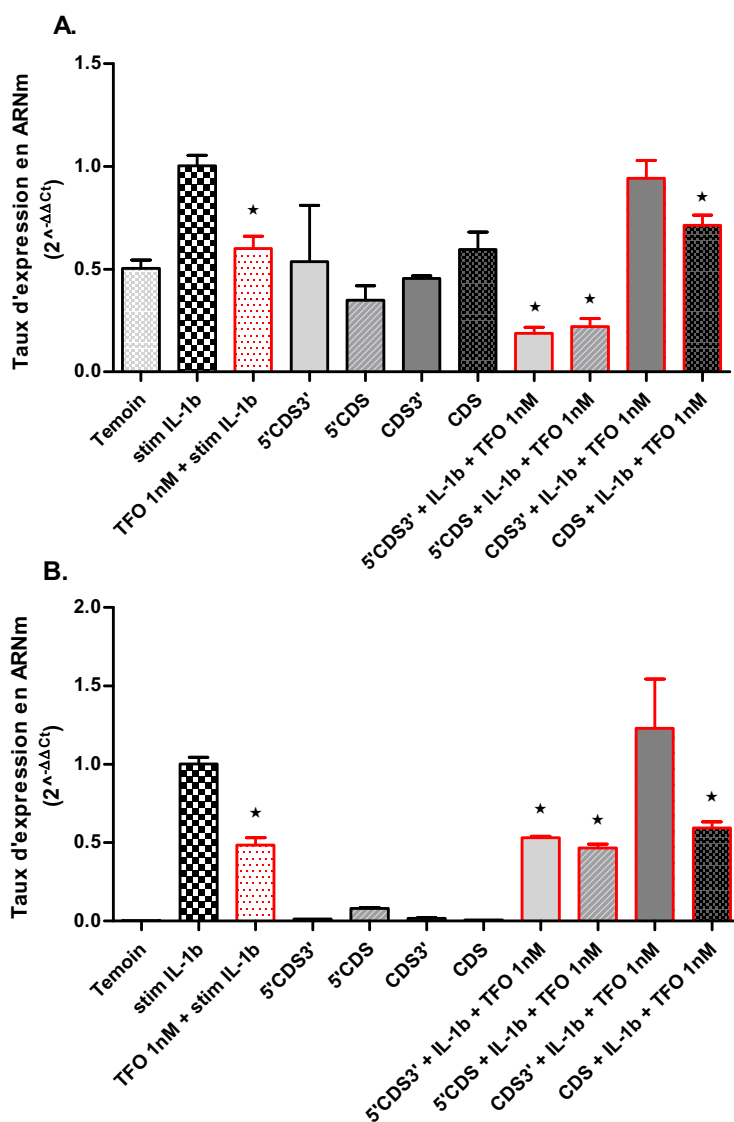


Figure 86 : Influence de la surexpression des différentes régions de l'ARNm du TNF- α sur l'expression de l'IL-1 β (A) et de l'IL-6 dans des synoviocytes en P3 de rat transfectés par le TFO à la concentration de 1 nM. L'expression en ARNm est évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel, les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=6.

Nous observons que la surexpression des régions 5'UTR-CDS-3'UTR, 5'UTR-CDS et CDS n'a pas d'influence significative sur le taux d'expression des messagers de l'IL-1 β et de l'IL-6 (l'inhibition de leur expression en présence de TFO après 4 heures de stimulation IL-1 β 10 ng/mL n'est pas modifiée significativement lorsque ces régions sont surexprimées). Cependant, il apparaît que la surexpression de la région CDS-3'UTR de l'ARNm du TNF- α rétablit l'expression des cytokines IL-6 et IL-1 β à leur niveau observé dans des conditions inflammatoires en l'absence de TFO.

Des manipulations complémentaires doivent être réalisées afin de mieux contrôler le niveau de surexpression des différentes régions de l'ARNm du TNF- α . Toutefois, il semble que les effets collatéraux que nous observons puissent s'expliquer (au moins partiellement) par un changement de stabilité des ARNm, en liaison avec la fixation de protéines stabilisatrices et/ou déstabilisatrices ou de miRNA sur les régions 5'UTR et 3'UTR des ARNm.

Faits marquants

- **L'utilisation d'oligonucléotides TFO et siRNA anti-TNF- α n'affecte ni la viabilité cellulaire, ni l'activité mitochondriale de cultures de synoviocytes et de chondrocytes de rat en conditions inflammatoires.**
- **La transfection de TFO et de siRNA anti-TNF- α permet une inhibition significative de l'expression en ARNm du TNF- α dans les cellules articulaires (chez le rat et chez l'Homme).**
- **L'inhibition observée en ARNm se vérifie au niveau des médiateurs sécrétés.**
- **L'inhibition de l'expression des messagers du TNF- α s'accompagne d'une diminution de l'expression d'autres médiateurs inflammatoires (IL-1 β , IL-6, iNos).**
- **Ces effets collatéraux sont observés en conditions inflammatoires avec les stratégies ARN interférence et TFO, ceci suggérant qu'ils ne sont pas consécutifs à l'aspécificité des oligonucléotides utilisés.**
- **La stabilité des messagers de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de iNos est diminuée en présence de TFO ou de siRNA anti-TNF- α .**

Discussion :

L'utilisation d'oligonucléotides dans le but d'inhiber l'expression génique repose à l'heure actuelle essentiellement sur l'ARN interférence. La perspective de pouvoir contrôler l'expression des gènes par des oligonucléotides formant une triple hélice (296) avec la région promotrice d'un gène est séduisante dans le sens où le nombre de cibles est considérablement réduit (1 gène par cellule / plusieurs milliers d'ARNm de ce gène) (263). Le choix du TNF- α comme cible dans les pathologies inflammatoires articulaires s'appuie à la fois sur la possibilité d'utiliser un TFO spécifique du promoteur de ce gène (297-299) et sur le fait que cette cytokine est une cible privilégiée dans ce type de pathologies (45, 142).

Dans la première partie de cette étude, nous nous sommes attachés à vérifier la faisabilité d'inhiber l'expression du TNF- α dans des cellules articulaires (synoviocytes et chondrocytes) par un TFO spécifique du promoteur du TNF- α dans des conditions inflammatoires. L'efficacité de ce TFO a été comparée à celle d'un siRNA anti-TNF- α .

Par les tests LDH et MTT, nous avons pu mettre en évidence que l'utilisation du TFO et du siRNA n'affecte pas la viabilité et l'activité mitochondriale des synoviocytes et des chondrocytes en conditions inflammatoires. En effet, pour des concentrations en TFO et siRNA allant jusqu'à 100 nM, aucun effet délétère n'a été observé. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le comportement des synoviocytes étant donné que le tissu synovial constitue la principale source de production de cytokines et médiateurs inflammatoires dans l'établissement de la polyarthrite rhumatoïde (300, 301).

Évaluation comparée du potentiel inhibiteur du TFO et du siRNA anti-TNF- α sur les cellules articulaires :

Les études réalisées nous ont permis de mettre en évidence que l'inhibition de l'expression des ARN messagers du TNF- α de rat est possible en utilisant un oligonucléotide triple hélice spécifique de la région promotrice du gène. Les données obtenues montrent que cette inhibition est de l'ordre de 70% pour une concentration de 1 nM de TFO sur des synoviocytes stimulés par de l'IL-1 β recombinante de rat pendant 4 heures. Ces études *in vitro* nous ont permis d'établir une IC₅₀ qui est de l'ordre de 0,1 pM pour le TFO, alors que l'IC₅₀ obtenue avec le siRNA est de l'ordre de 20 nM. Les données de la littérature indiquent que les concentrations utilisées lors des approches antisens, pour obtenir une inhibition comparable sont de l'ordre de 50-200 nM pour les oligonucléotides classiques (ASOs, ODNs) et de l'ordre de 1-20 nM pour des siRNA (302, 303).

Cette différence d'IC₅₀ est liée au nombre de cibles avec lesquelles l'oligonucléotide doit interagir. Dans le cas des oligonucléotides conventionnels (ODNs, siRNAs), la cible est l'ARN messager, qui peut être présent en un grand nombre d'exemplaires (l'expression en ARNm dans les synoviocytes en conditions inflammatoires est induite d'un facteur 1000) (304), d'où une importante quantité en oligonucléotide à apporter pour obtenir une diminution de l'expression du gène choisi. L'avantage de l'oligonucléotide dit « triplex » est d'interagir avec la région promotrice du gène, celui-ci étant présent dans le génome de la cellule en un nombre d'exemplaires limités. Dans ce cas précis, il existe une copie du gène du TNF- α chez

le rat. Le fait de pouvoir obtenir de faibles concentrations efficaces serait un atout considérable lors d'essais *in vivo* car la quantité d'oligonucléotide TFO à apporter, soit par voie locale (intra-articulaire) soit par voie systémique sera plus faible, ce qui pourra théoriquement limiter les effets indésirables générés par des injections répétées de grandes quantités de molécules exogènes (comme les anticorps anti-TNF- α actuels) (305). Les essais réalisés à l'heure actuelle avec des oligonucléotides classiques (siRNA) chez l'animal requièrent une quantité injectée de l'ordre de 3 mg/kg (306).

Toutefois, il nous faut signaler que l'inhibition maximale obtenue avec le siRNA est supérieure à celle obtenue avec le TFO (83% vs 72% sur les synoviocytes). Cette différence peut s'expliquer par le mécanisme d'action des deux approches, le TFO anti-TNF- α , en ciblant le promoteur du gène, ne peut inhiber que la néosynthèse d'ARNm, alors que le siRNA est capable de dégrader tous les ARNm présents. Nous supposons donc que cette différence d'inhibition maximale observée s'explique par le pool d'ARNm du TNF- α présent constitutivement dans les synoviocytes (307). Ce phénomène permettrait également d'expliquer pourquoi les effets du TFO sont plus prononcés sur les chondrocytes car le pool d'ARNm du TNF- α est plus faible dans ce type cellulaire que dans les synoviocytes. Il ne semble pas que cette variation soit le résultat d'une moins bonne biodistribution de l'oligonucléotide puisque l'utilisation d'autres agents de transfection (INTERFERinTM, FuGENE[®] 6, données non présentées) ne permet pas d'améliorer le pourcentage d'inhibition observé. Le fait que cet oligonucléotide TFO inhibe l'expression des ARN messagers du TNF- α tant pour les synoviocytes que pour les chondrocytes s'avère également intéressant en vue d'études *in vivo* dans le sens où l'expression du TNF- α sera bloquée aussi bien dans la membrane synoviale que dans les cellules du cartilage, qui pourraient être stimulées de façon indirecte par les cytokines produites par la membrane synoviale. Cette stratégie permettrait donc d'obtenir un double niveau de protection des cellules articulaires en agissant d'une part sur le site de production majeur des cytokines proinflammatoires (membrane synoviale) mais également en protégeant les cellules de l'articulation (chondrocytes, tendinocytes) des taux résiduels de cytokines proinflammatoires qui proviendraient d'une inhibition incomplète.

De plus, les résultats observés au niveau de l'expression en ARNm ont été confirmés au niveau protéique avec une inhibition significative de la sécrétion du TNF- α dans le milieu de culture par l'utilisation du TFO et du siRNA. L'indépendance des effets observés vis-à-vis du stimulus inflammatoire a également été mise en évidence grâce à l'utilisation de deux inducteurs de l'inflammation (IL-1 β et LPS) activant des voies de signalisation intracellulaire propres (308).

Nous avons en outre démontré la possibilité d'utiliser un TFO spécifique du TNF- α dans les synoviocytes et les chondrocytes humains. Cependant les résultats obtenus sur les cultures de cellules articulaires humaines ont montré une certaine hétérogénéité. Nous supposons que cette variabilité est due à la variabilité des prélèvements sur lesquels nous pouvons travailler. En effet, les cellules utilisées proviennent le plus souvent de patients arthrosiques à différents stades pathologiques et ayant été sous traitement variable. Le principal problème rencontré fût l'insensibilité des cultures de cellules au stimulus inflammatoire, nous supposons que ceci puisse être du à une hyperméthylation de l'ADN des

cellules de ces patients (309). Le cas échéant, il est envisageable d'étudier le pattern de méthylation en utilisant des agents déméthylants tels que le butyrate de sodium.

Globalement, cette étude *in vitro* nous a permis de montrer l'efficacité accrue (quantité d'oligonucléotide à apporter beaucoup plus faible) de la stratégie TFO vis-à-vis de l'ARN interférence pour l'inhibition de l'expression du TNF- α dans les cellules articulaires. Cette étude a également mis en avant un phénomène inattendu avec l'inhibition parallèle de l'expression de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de iNos.

Effets collatéraux sur l'expression des médiateurs de la réponse inflammatoire.

Nous avons souhaité étudier les possibles effets de l'inhibition du TNF- α sur l'expression (ARNm) d'autres médiateurs impliqués dans le processus inflammatoire (307). Pour cela, après transfection des cellules par les oligonucléotides (TFO et siRNA) puis stimulation de la réponse inflammatoire par de l'IL-1 β pendant 4 heures, nous avons mesuré par RT-PCR quantitative l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6, de iNos et de cox2. Le résultat marquant observé, quel que soit le type d'oligonucléotide utilisé (TFO, siRNA) et le type cellulaire (synoviocyte, chondrocyte), est que l'inhibition de l'expression des messagers du TNF- α semble affecter l'expression de certains autres médiateurs du processus inflammatoire (IL-1 β , IL-6 et iNos). Nous supposons que 4 heures après le début de la stimulation, ces effets ne sont pas la conséquence de l'inhibition de la synthèse protéique du TNF- α , la fenêtre de temps semble trop courte. Le fait que cette inhibition collatérale des ARN messagers des autres médiateurs soit observée aussi bien avec le TFO qu'avec le siRNA laisse penser qu'il ne s'agit pas d'un problème de spécificité des oligonucléotides utilisés (TFO et siRNA) puisque le siRNA est hautement spécifique de l'ARN messenger du TNF- α de rat. Pour ce qui est du TFO, nous avons vérifié dans un premier temps que le TFO spécifique du promoteur du TNF- α de rat n'avait pas d'effet sur l'expression en TNF- α de cellules articulaires humaines et inversement. Les résultats obtenus montrent l'absence totale d'efficacité du TFO dans ces conditions, il est donc bien spécifique pour une espèce.

Cette spécificité a également été testée de manière indirecte par la cotransfection dans des synoviocytes d'un vecteur d'expression contenant le promoteur de l'IL-6 et du TFO. Nous avons observé que le TFO inhibe de manière significative l'expression du TNF- α dans ces synoviocytes sans pour autant modifier l'expression induite par le promoteur de l'IL-6. Nous n'avons malheureusement pas pu tester de manière directe la spécificité du TFO sur le promoteur du TNF- α en raison de la non fonctionnalité de nos constructions (promoteurs du TNF- α humain et de rat). Nous supposons que l'absence de réponse au stimulus inflammatoire est consécutive à une modification de la structure tridimensionnelle du promoteur lorsqu'il est cloné dans le vecteur d'expression. Deux équipes ont travaillé sur le promoteur du TNF- α , Goldfeld AE et Falvo (310, 311), cependant, après avoir pris contact avec eux, nous n'avons pas pu récupérer leurs constructions.

Nous nous sommes ensuite penchés sur l'évolution de la stabilité des ARNm au cours de nos expérimentations. Les données récentes de la littérature ont montré que contrairement à ce qui était établi jusqu'à présent, il existe un taux de messagers du TNF- α de rat constitutif

mais ces ARN messagers sont rapidement pris en charge et dégradés, ce qui se traduit par un faible taux de TNF- α sécrété par les cellules à l'état basal. En effet, il existe dans la séquence 3'UTR du TNF- α des séquences spécifiques qui permettent à des protéines cytoplasmiques/nucléaires (tristetraproline, HuR, AUF1, TIS, ...) soit de dégrader (via le protéasome) les messagers soit de les stabiliser afin de permettre une augmentation du taux de traduction en protéine (312, 313). Le TNF- α est une protéine sécrétée de façon très précoce lors du processus inflammatoire (suivant le stimulus) et le fait d'être exprimé de façon constitutive permet à la cellule de réagir rapidement lorsqu'elle est soumise à une condition stressante. C'est pourquoi en l'absence de stimulus, le turn-over des ARN messagers est très rapide (314). Il semblerait que dans nos expériences, le fait d'inhiber la synthèse et/ou la présence de messagers du TNF- α entraîne, lors de l'application d'un stimulus inflammatoire TNF- α dépendant (IL-1 β), une réaction en cascade qui aboutit à diminuer le taux d'expression de certains médiateurs. Le contrôle de l'expression des médiateurs inflammatoires par les A-U Rich Elements fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études (315).

Une des hypothèses à considérer serait que les protéines prenant en charge de manière spécifique les ARN messagers du TNF- α pour la dégradation se trouvent privées de leur partenaire (ARN messagers) et sont dans la possibilité d'interagir par défaut avec d'autres ARN messagers, par l'intermédiaire de séquences spécifiques localisées sur la partie 3'UTR. En effet des séquences ARE communes sont retrouvées sur les régions 3'UTR des messagers de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de iNos (Vérifiées par BLAST des séquences 3'UTR de ces ARNm) (316, 317). Cependant, des séquences communes entre les messagers du TNF- α et de cox2 sont également retrouvées alors que l'expression de ce médiateur n'est pas affectée. Les expériences que nous avons menées ont permis de montrer un changement dans la stabilité des messagers de ces cytokines en présence de TFO. Nos études portant sur la surexpression de parties 3'UTR ou 5'UTR du messenger du TNF- α sont encore sujettes à des ajustements, notamment dans la maîtrise de la surexpression. Dans la continuité de cette étude, il semblerait pertinent de se pencher sur le rôle potentiel des miRNA. En effet, l'intérêt récent et croissant suscité par le rôle des miRNA dans la régulation de l'expression des cytokines (318) ouvre de nombreuses perspectives.

Lors de ce travail, nous avons démontré la possibilité d'inhiber l'expression des ARN messagers du TNF- α par une approche originale reposant sur l'utilisation d'oligonucléotides dits « TFO ». Un tel système présente l'avantage d'être efficace à de faibles concentrations (ordre du picomolaire), comparé à des techniques « antisens » classiques (ODNs, siRNA). Nous avons également montré que cet oligonucléotide est « efficace » dans les différents contingents cellulaires présents dans l'articulation (synoviocytes, chondrocytes). Nous souhaitons ensuite étendre cette étude à des manipulations *in vivo*. L'objectif était de comparer l'efficacité d'un traitement préventif local à base de TFO à celui à base de siRNA dans un modèle expérimental d'arthrite de screening (modèle de mono-arthrite par injection de parois de mycobactéries (282)). La stratégie la plus efficace serait ensuite testée dans un modèle d'arthrite ayant une physiopathologie proche de la PR humaine (modèle d'arthrite à l'antigène (283-285)).

ETUDES *IN VIVO*

Nous souhaitons valider l'efficacité de cette approche d'inhibition par des oligonucléotides *in vivo*. Pour ce faire, il était nécessaire de caractériser au préalable un modèle d'inflammation articulaire chez le rat (annexes I et II).

1. Efficacité comparée des approches TFO et siRNA dans un modèle de mono-arthrite articulaire aiguë par injection de parois de mycobactéries.

Dans un premier temps, nous souhaitons comparer l'efficacité d'une approche de type siRNA *in vivo* à l'approche de type TFO dans un modèle d'arthrite aiguë afin de mettre en évidence les avantages et inconvénients apportés par les deux types d'oligonucléotides. Ce modèle de screening des potentialités anti-inflammatoires avait à vocation de déterminer l'oligonucléotide avec la meilleure efficacité pour ensuite tester ce dernier dans un modèle expérimental ayant une physiopathologie proche de celle de la PR.

Lors de ces expérimentations *in vivo*, le siRNA est vectorisé localement (injection intra-articulaire) à l'aide d'un polymère cationique (jetPEI *in vivo*). Pour le TFO, les données bibliographiques nous ont poussées à utiliser un renforcement de ce dernier du fait de l'exposition d'un oligonucléotide simple brin aux nucléases et autres mécanismes de dégradation cellulaire. Nous avons utilisé un renforcement méthylphosphonate qui confère une bonne résistance aux nucléases et donne une charge globale neutre au TFO. Cette propriété chimique sous-entend une capacité à traverser librement les membranes plasmiques cellulaires (sans agent de vectorisation). Ce TFO renforcé a été testé *in vitro* afin de vérifier que le potentiel inhibiteur vis-à-vis du TNF- α n'est pas affecté. Nous souhaitons également évaluer la biodistribution du TFO dans les tissus articulaires après une injection intra-articulaire.

A. Biodistribution d'un TFO marqué dans les tissus articulaires et démarche expérimentale.

1. Biodistribution du TFO Cy3'.

La distribution de l'oligonucléotide TFO dans les tissus articulaire a été étudiée en utilisant un TFO marqué à la cyanine en 3' : TFO Cy3'. Les rats reçoivent une injection intra-articulaire (genou) de 10 μg de TFO Cy3' repris dans 50 μL de sérum physiologique. 24 heures après, les tissus articulaires sont prélevés (membranes synoviales, rotules, tibia et fémur), et sont préparés histologiquement. Les coupes des différents tissus sont analysées par microscopie confocale. Les clichés obtenus sont présentés sur la **Figure 87**.

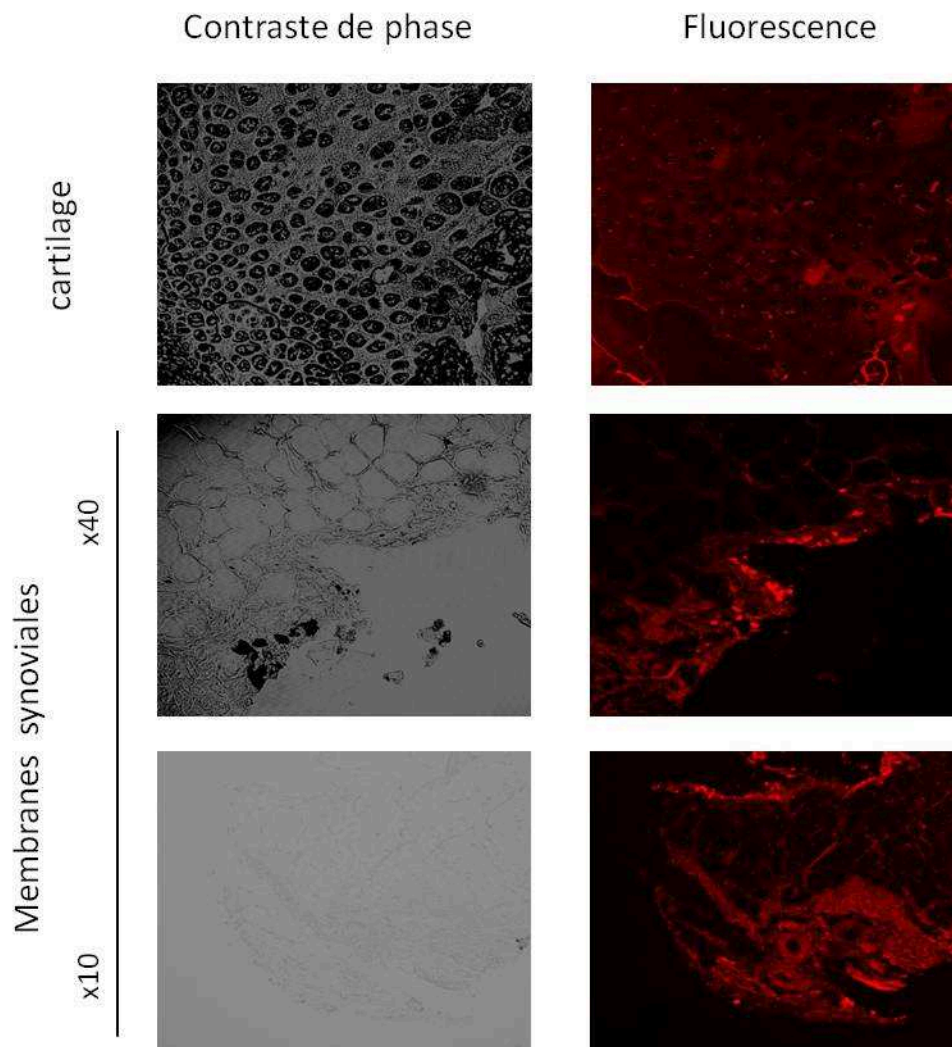


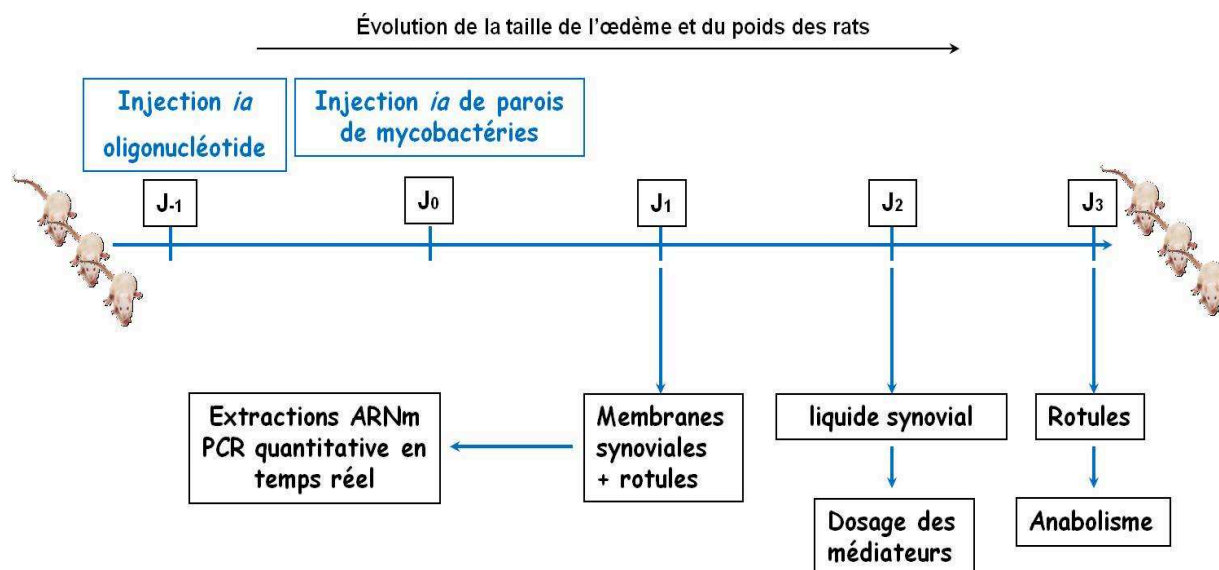
Figure 87 : Clichés relatant la biodistribution d'un oligonucléotide TFO Cy3' obtenus par microscopie confocale. Les images sont issues de coupes histologiques de membranes synoviales et de cartilage articulaire 24 heures après une injection intra-articulaire de 10 µg de TFO Cy3'. Grossissement x10 et x40.

Sur ces images, nous observons que le TFO marqué se localise essentiellement dans la membrane synoviale, particulièrement dans la couche de cellules bordantes. De plus, il apparaît que le TFO Cy3' se retrouve également dans le cartilage articulaire, principalement dans les couches superficielles et intermédiaires du cartilage hyalin.

2. Démarche expérimentale suivie.

Nous nous sommes ensuite attaché à caractériser un modèle de mono-arthrite articulaire aiguë (ANNEXE I) dans lequel nous pourrions évaluer l'efficacité de nos deux approches. Le modèle que nous avons retenu est un modèle de mono-arthrite aiguë par injection intra-articulaire de 600 µg de parois de mycobactéries (*Mycobacterium Tuberculosis : Mtb*). Nous avons ainsi pu mesurer l'effet du siRNA et du TFO sur l'évolution des paramètres cliniques, biochimiques et histologiques dans ce modèle.

La démarche expérimentale que nous avons suivie pour cette étude est présentée ci-dessous :



Nous utilisons un traitement local préventif lors de ces expérimentations. Le traitement préventif par le TFO ou le siRNA est réalisé par injection intra-articulaire 24 heures avant l'induction de l'arthrite. Des groupes de rats sont sacrifiés aux temps adaptés à l'étude du paramètre souhaité. Ceci ayant été mis au point lors de la caractérisation du modèle (ANNEXE I).

B. Effet des oligonucléotides TFO et siRNA sur l'évolution des paramètres cliniques dans un modèle de mono-arthrite articulaire aiguë.

1. Evolution de la taille de l'œdème.

Nous avons évalué l'effet d'une injection préventive de TFO ou de siRNA sur l'évolution de la taille de l'œdème au cours de l'établissement de l'arthrite. Nous avons dans un premier temps testé deux doses de TFO (10 et 20 µg). Nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence significative entre ces deux doses, c'est pourquoi nous ne présenterons dans ces résultats que les effets obtenus avec la dose de 10 µg. Le siRNA est également utilisé à cette même concentration.

Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 88**.

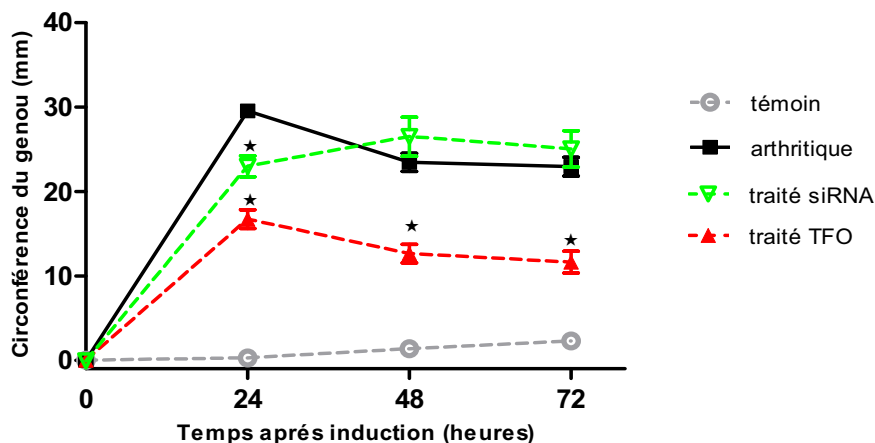


Figure 88 : Evolution de la taille de l'œdème suite à l'induction d'une mono-arthrite articulaire aiguë par injection de 600 µg de parois de mycobactéries chez le rat. Les rats traités siRNA et TFO reçoivent une injection intra-articulaire préventive de 10 µg d'oligonucléotide.*p<0,05 vs rats arthritiques.

L'injection préventive de 10µg de TFO induit une diminution significative de la taille de l'œdème (taille de l'œdème 50% plus petite pendant les 72 heures de suivi) chez les rats arthritiques. La taille de l'œdème chez les rats ayant reçu une injection préventive de siRNA est significativement réduite à 24 heures (23%) mais dès 48 heures, il n'existe plus de différence avec la taille de l'œdème des rats arthritiques.

2. Test d'incapacitance et prise de poids.

Complémentairement à la taille de l'œdème, nous avons évalué la douleur perçue par les rats grâce à un test d'incapacitance (mesure de la répartition du poids des rats sur leurs pattes postérieures) (**Figure 89**).

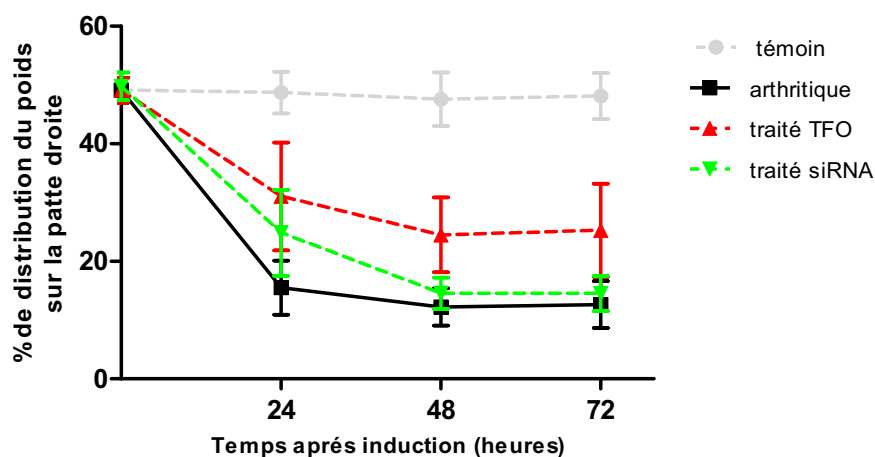


Figure 89 : Pourcentage de répartition du poids des rats arthritiques sur leurs pattes postérieures. Les rats traités siRNA et TFO reçoivent une injection intra-articulaire préventive de 10 µg d'oligonucléotide.

Les résultats observés ne sont pas significatifs, cependant nous observons une tendance ($p=0,072$) chez les rats traités préventivement avec le TFO. En effet, ils présentent une répartition de leur poids plus équilibrée sur leurs pattes postérieures. Ces résultats semblent directement corrélés aux différences de taille d'œdème observées dans le paragraphe précédent.

Nous avons également mesuré l'évolution de la prise de poids par les rats arthritiques (Figure 90).

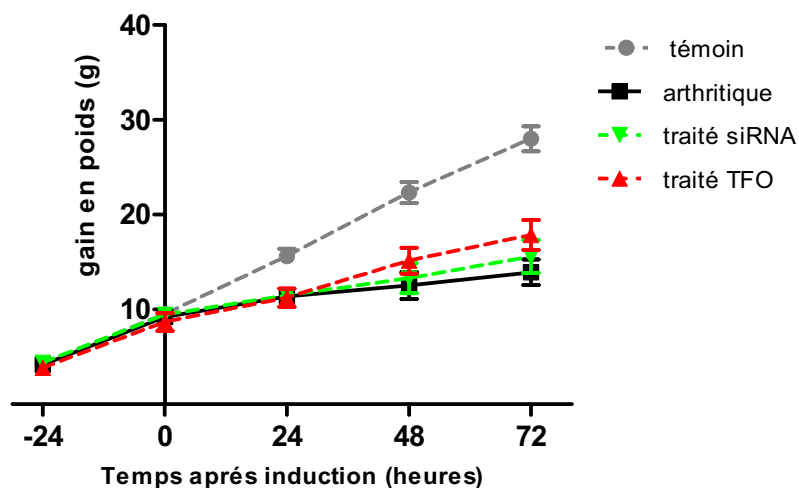


Figure 90 : Evolution de la prise de poids par des rats atteints d'une mono-arthrite articulaire par injection de 600 μ g de parois de mycobactéries ayant reçu ou non une injection préventive de 10 μ g de TFO ou de siRNA.

De manière identique à ce que nous observons pour le test d'incapacité, il n'existe pas de différence significative dans l'évolution de la prise de poids par les rats traités ou non. Néanmoins, il semble que l'injection préventive de TFO ou de siRNA améliore la prise de poids des rats arthritiques.

C. Evolution de l'expression des médiateurs de l'inflammation au sein de l'articulation.

Nous nous sommes intéressés à l'expression de certains médiateurs de l'inflammation (TNF- α , IL-1 β , iNos, vEGF, MMP13) à la fois en termes d'ARNm dans les différents tissus articulaires (membrane synoviale et cartilage) mais également en terme de médiateurs sécrétés dans le liquide synovial (TNF- α , NO).

1. Expression des médiateurs en ARNm.

Les membranes synoviales et le cartilage rotulien sont récupérés après sacrifices des rats (24 heures après l'induction de l'arthrite), les ARNm sont ensuite extraits et leur expression relative est évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel.

a. Dans les membranes synoviales.

La première cytokine inflammatoire dont nous souhaitons mesurer l'expression était le TNF- α (Figure 91).

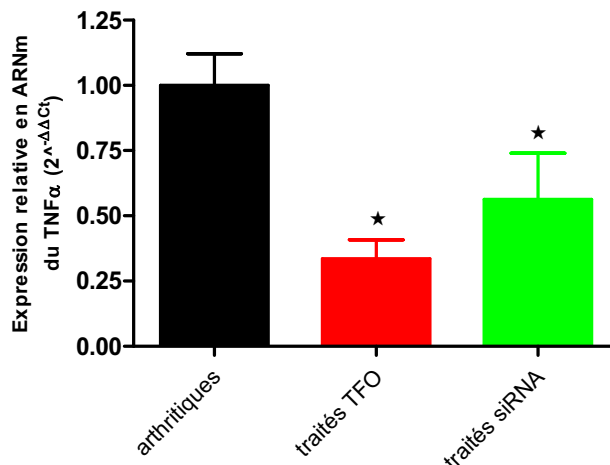


Figure 91 : Expression relative (par rapport à RP29) du TNF- α dans les membranes synoviales de rats arthritiques traités par une injection préventive de 10 μ g de TFO ou de siRNA. Les résultats sont obtenus par PCR quantitative en temps réel. (n=24, moyenne \pm SEM). *p<0,05.

Nous observons une inhibition significative de l'expression en TNF- α dans les membranes synoviales de rats traités préventivement par le TFO (inhibition de 77%) et le siRNA (inhibition de 54%). Il n'existe pas de différence significative entre l'effet du TFO et celui du siRNA mais la tendance est en faveur du TFO.

Pour compléter cette étude, nous avons mesuré l'expression dans les membranes synoviales des médiateurs inflammatoires IL-1 β , iNOS, vEGF et MMP13 (Figure 92).

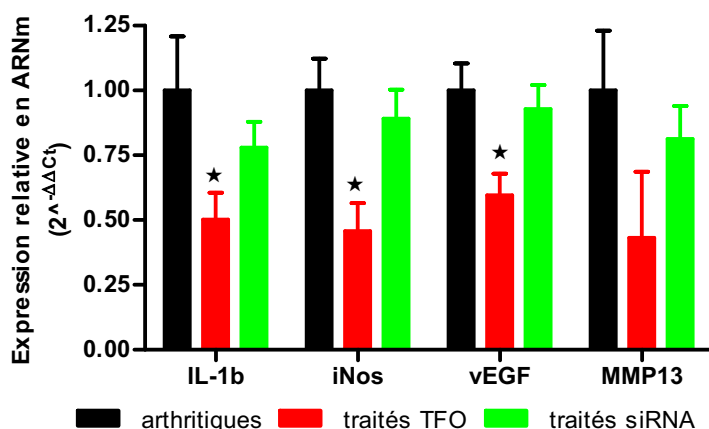


Figure 92 : Expression relative (par rapport à RP29) de l'IL-1 β , d'iNOS, de vEGF et de MMP13 dans les membranes synoviales de rats arthritiques traités par une injection préventive de 10 μ g de TFO ou de siRNA (24 heures après l'induction de l'arthrite). Les résultats sont obtenus par RT-PCR quantitative en temps réel. (n=24, moyenne \pm SEM). *p<0,05.

Il apparaît ici que l'expression en ARNm de l'IL-1 β , d'iNos et de vEGF est significativement inhibée (50, 55 et 41% respectivement) dans les membranes synoviales des rats traités préventivement par le TFO. L'injection préventive de siRNA n'a pas d'effet significatif sur l'expression de ces messagers. L'expression de MMP13 n'est elle non plus pas modulée par le siRNA, ni par l'injection de TFO.

Ces résultats sur l'expression en ARNm tendent à démontrer une meilleure efficacité de la stratégie TFO comparativement au siRNA.

b. Dans le cartilage articulaire.

Le cartilage rotulien est récupéré et l'expression en ARNm des chondrocytes est mesurée comme dans le paragraphe précédent. Dans le cartilage articulaire nous n'observons pas de variations significatives dans l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β , d'iNos et de vEGF. Ces gènes sont faiblement induits dans les chondrocytes articulaires 24 heures après le début de l'arthrite. Néanmoins nous observons que MMP13 est significativement induite chez les rats arthritiques et que le traitement par le TFO inhibe significativement cette induction à hauteur de 48% (résultats non présentés).

2. Evolution des médiateurs sécrétés dans le liquide synovial.

Les liquides synoviaux des genoux de rat sont récupérés 48 heures après l'induction de l'arthrite et les concentrations en TNF alpha et en NO sont mesurées par ELISA et la méthode de GRIESS respectivement (**Figure 93**).

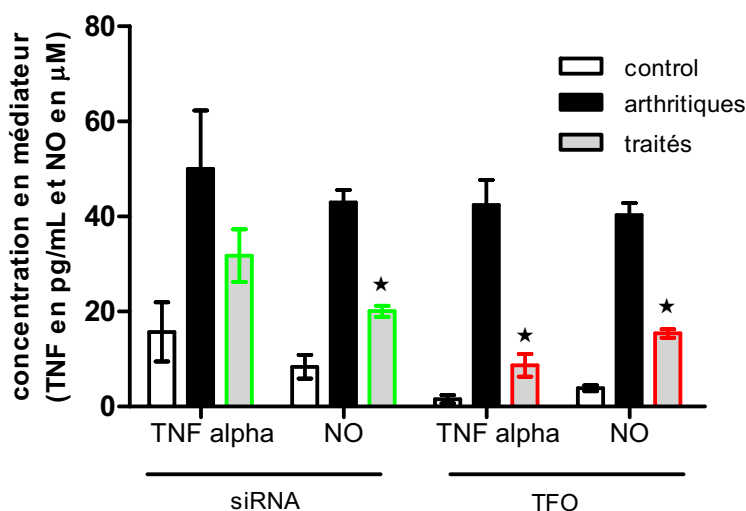


Figure 93 : Concentrations en TNF alpha et en NO dans le liquide synovial de rats arthritiques (après 48 heures) traités préventivement ou non par 10 μ g de TFO ou de siRNA. La concentration en TNF alpha est mesurée par ELISA et la concentration en NO par la méthode de GRIESS. (n=24, moyenne \pm SEM).

L'injection préventive de TFO anti-TNF- α engendre une inhibition significative de la sécrétion de TNF- α dans le liquide synovial (inhibition de 79%) ainsi que la sécrétion de NO

(inhibition de 58%). Nous observons que le traitement par le siRNA permet une inhibition de 50% de l'expression de NO dans le liquide synovial ainsi qu'une inhibition non significative de 23% du relarguage de TNF- α . Ces observations vont dans le même sens que les résultats obtenus au niveau de l'expression en ARNm dans les tissus articulaires, avec une nouvelle fois une efficacité accrue de la stratégie TFO.

D. Analyse histologique des tissus articulaires.

Nous avons d'une part réalisé une analyse histologique des membranes synoviales (avec un score dérivé du score de Rooney) et d'autre part une analyse des structures osseuses et cartilagineuses de l'articulation.

1. Analyse de la membrane synoviale.

Des coupes histologiques de 5 μ m sont réalisées sur les membranes synoviales. Nous avons réalisé un score histologique (**Tableau 6**) à partir de l'observation microscopique de ce tissu coloré à l'HES.

Tableau 6 : score histologique du tissu synovial issu de genoux de rats atteints d'une monoarthrite articulaire aiguë (par injection de 600 μ g de parois de Mycobactéries) et traités ou non préventivement par injection intra-articulaire de 10 μ g de TFO ou de siRNA.

	Hyperplasie synoviale		fibrose		Nombre de vaisseaux		Infiltration diffuse		Infiltration perivasculaire	
	TFO	siRNA	TFO	siRNA	TFO	siRNA	TFO	siRNA	TFO	siRNA
Control	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3
Oligo.	1.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2
Arth.	2.9* \pm 0.1	2.8* \pm 0.3	1.3* \pm 0.2	1.3* \pm 0.2	2.9* \pm 0.1	3.1* \pm 0.3	3.0* \pm 0.2	3.5* \pm 0.2	3.0* \pm 0.1	3.5* \pm 0.2
Traité	1.6* [#] \pm 0.1	2.3* [#] \pm 0.2	0.8* [#] \pm 0.1	1.3* \pm 0.2	2.1* [#] \pm 0.1	2.5* [#] \pm 0.2	1.9* [#] \pm 0.1	2.6* [#] \pm 0.2	1.9* [#] \pm 0.2	2.5* [#] \pm 0.2

Valeurs présentées sous la forme moyenne \pm SEM (n=24). *p \leq 0.05, comparativement au control, [#]p \leq 0.05 comparativement au groupe arthritique, test t de Student. Arth = arthritiques, Oligo = oligonucleotide.

L'analyse histologique met en évidence l'effet favorable induit par l'injection préventive de TFO chez les rats arthritiques. Nous observons que l'hyperplasie synoviale, la fibrose et l'infiltration du tissu synovial sont des phénomènes significativement diminués suite à l'injection locale de TFO. La vascularisation du tissu est également significativement réduite par le TFO. Pour le siRNA, seule l'infiltration lymphocytaire de la membrane synoviale est significativement réduite. Les autres paramètres évalués sont diminués de manière non significative.

2. Evolution des structures osseuses et cartilagineuses.

Le score histologique des structures osseuses et cartilagineuses est réalisé à partir de colorations HES, rouge Sirius, Bleu de Toluidine et Safranine-O de coupes coronales de genoux (frontales, de 5 μ m) (**Figure 94**).

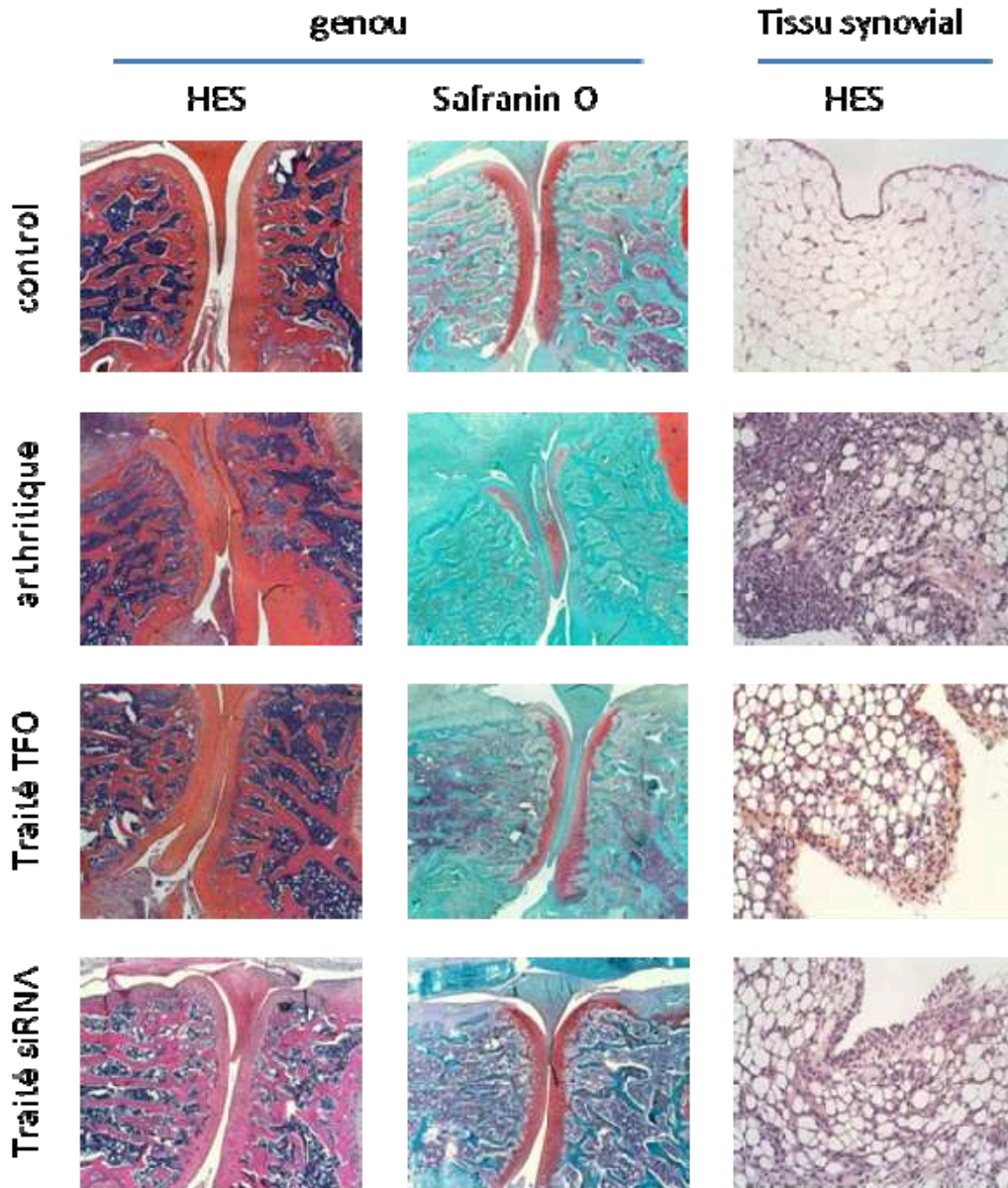


Figure 94 : Images des structures articulaires (genoux en coupe frontale et membranes synoviales) après coloration HES, et Safranin-O. Grossissement x20.

Nous observons que la sévérité des lésions des structures articulaires induites par l'arthrite est limitée par l'injection préventive de TFO ou de siRNA comme cela est confirmé par le score histologique (Tableau 7).

Tableau 7 : score histologique des structures osseuses et cartilagineuses issues de genoux de rats atteints d'une mono-arthrite articulaire aiguë (par injection de 600µg de parois de Mycobactéries) et traités ou non préventivement par injection intra-articulaire de 10µg de TFO ou de siRNA.

	cartilage		os	
	TFO	siRNA	TFO	siRNA
Control	0.06 ± 0.06	0.25 ± 0.25	0.17 ± 0.09	0.25 ± 0.25
Oligonucleotide	0.05 ± 0.05	0.2 ± 0.12	0.14 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Arthritique	1.39* ± 0.15	1.75* ± 0.17	1.96* ± 0.16	1.83* ± 0.16
Traité	0.57*# ± 0.14	1.33* ± 0.36	1.07*# ± 0.17	1.08* ± 0.35

Valeurs présentées sous la forme moyenne ± SEM (n=24). *p<0.05, comparativement au control, #p<0.05 comparativement au groupe arthritique, test t de Student.

L'injection préventive de 10 µg de TFO induit une diminution significative des scores histologiques du cartilage articulaire et des structures osseuses. L'amélioration de ces scores chez les rats traités préventivement par le siRNA n'est pas significative.

Le traitement par les oligonucléotides TFO et siRNA permet de protéger les structures cartilagineuses de l'articulation. Nous avons vérifié si cette observation se traduisait par une amélioration au niveau de la biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage rotulien.

E. Evolution de la biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage articulaire.

Le taux de biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage rotulien est estimé grâce à l'incorporation *ex vivo* de Na³⁵SO₄ (Figure 95).

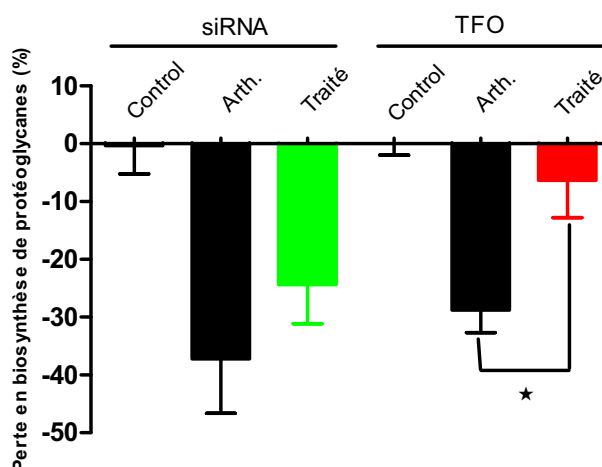


Figure 95 : Evaluation de la perte en biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de rats atteints d'une mono-arthrite articulaire aiguë par injection de parois de mycobactéries et traités ou non préventivement par injection intra-articulaire de 10 µg de TFO ou de siRNA anti-TNF-α. Les mesures sont effectuées 48 heures après l'induction de l'arthrite, les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM, n= 24 rats par groupe. *p<0,05.

La perte significative en biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de rats arthritiques observés 48 heures après l'induction de l'arthrite (28 % de perte de biosynthèse) est limitée par l'injection préventive de TFO anti-TNF- α (6 % de perte de biosynthèse). L'injection préventive de siRNA permet également de limiter cette perte de biosynthèse en protéoglycannes dans le cartilage rotulien mais de manière non significative. Ces résultats vont dans le même sens que les observations des lésions histologiques, à savoir, que le TFO présente une efficacité anti-arthritique accrue vis-à-vis du siRNA anti-TNF- α dans un modèle d'arthrite aiguë chez le rat.

F. Essai de quantification de l'efficacité du TFO dans un modèle d'arthrite aiguë par Tomographie par Emission de Positons (TEP).

1. Mise au point des paramètres d'étude.

Nous nous sommes intéressés à une méthode innovante d'imagerie de suivi des affections arthritiques inflammatoires, la tomographie par émission de positons au ^{18}F -FDG. La tomographie par émission de positons au ^{18}F -FDG est une technique d'imagerie utilisée couramment en cancérologie. Nous souhaitons utiliser cette technologie dans le cadre des pathologies articulaires.

Dans le modèle d'arthrite aiguë par injection de parois de *Mtb*, nous souhaitons évaluer la possibilité de quantifier l'effet du TFO par cette technique. Dans un premier temps, nous devons mettre au point les paramètres d'étude permettant de suivre l'inflammation articulaire et étudier la faisabilité de quantifier le degré d'inflammation ayant cours.

a. Suivi de l'accumulation de ^{18}F -FDG au niveau des sites inflammatoires et quantification.

Nous avons d'abord étudié la capacité du radiotracer (le ^{18}F -FDG) à s'accumuler spécifiquement au niveau des sites inflammatoires. Nous injectons le ^{18}F -FDG par la veine péniennne chez un rat arthritique et analysons sa biodistribution dans le corps de l'animal (Figure 96).

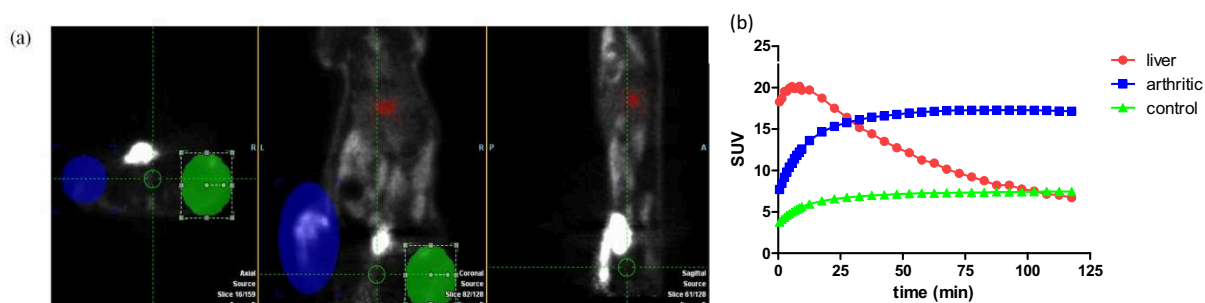


Figure 96 : (a) Biodistribution du ^{18}F -FDG après analyse par TEP chez un rat arthritique (24 après l'induction). Les images représentent des coupes axiales, coronaires et sagittales du corps entier. (b) Représentation de l'accumulation du ^{18}F -FDG dans 3 ROI correspondant au foie, au genou sain (injecté par du sérum physiologique) et au genou arthritique.

Nous observons une accumulation du ^{18}F -FDG au niveau du genou arthritique 24 heures après l'induction de l'arthrite. De plus, l'accumulation du ^{18}F -FDG dans chaque ROI suit une courbe linéaire et semble donc quantifiable.

Nous avons par la suite suivi l'accumulation de ^{18}F -FDG à différents stades de l'établissement de l'arthrite afin de déterminer la fenêtre temporelle favorable à une évaluation de l'efficacité d'un traitement. L'accumulation est mesurée chez des rats arthritiques 24, 48, 72 heures et 7 jours après l'induction par injection de parois de mycobactéries (**Figure 97**).

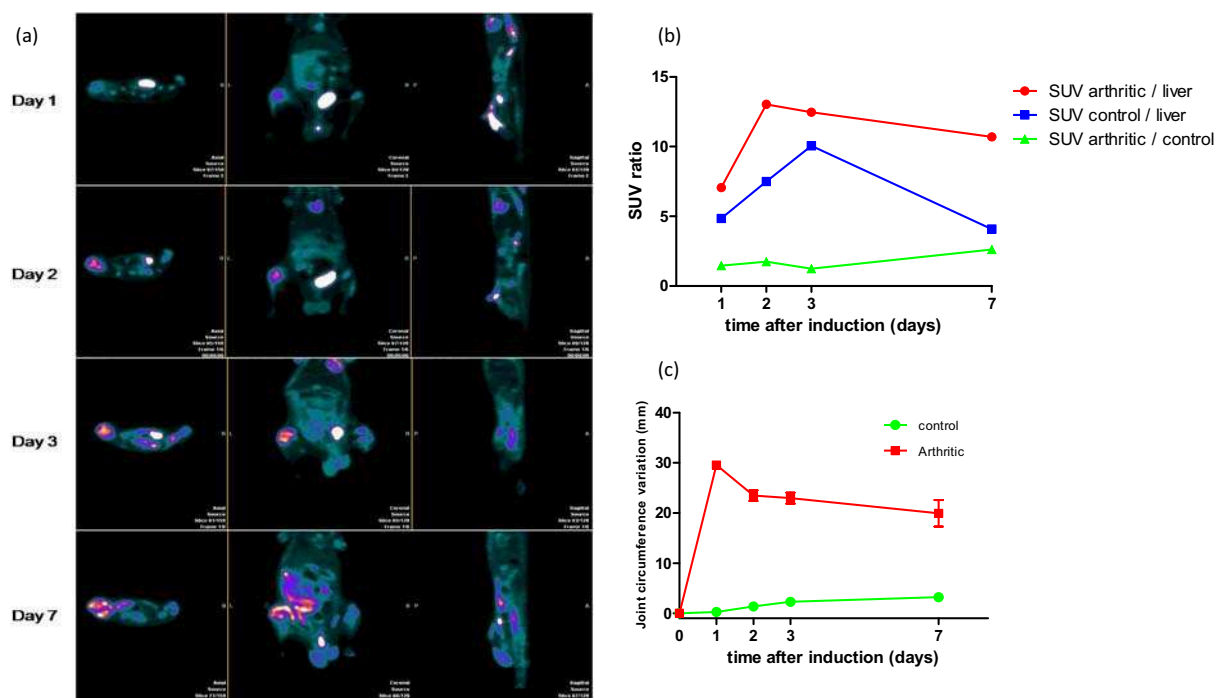


Figure 97 : (a) Biodistribution du ^{18}F -FDG après analyse par TEP chez le rat 1, 2, 3 et 7 jours après l'induction de l'arthrite. Les images sont obtenues 30 minutes après injection par la veine péniennne de 73 MBq de ^{18}F -FDG. (b) Evolution de l'accumulation de ^{18}F -FDG dans le foie et les genoux sains et arthritiques au cours de l'établissement de l'arthrite. (c) Evolution de la taille de l'œdème du genou arthritique de l'établissement de l'arthrite, la circonférence des genoux est estimée grâce à la formule mathématique du périmètre d'une ellipse $2\pi\sqrt{(a^2 + b^2)}$ avec a= largeur du genou et b=hauteur du genou. Les résultats sont présentés comme la différence entre la circonférence à l'instant t et la circonférence du genou avant induction de l'arthrite.

Les images de TEP mettent en évidence une accumulation croissante de ^{18}F -FDG dans le genou arthritique depuis l'induction de l'arthrite jusque 7 jours. Cependant le pic d'accumulation (**Figure 97b**) se situe après 48 heures et est corrélable à l'évolution de la taille de l'œdème chez le rat arthritique. Ces résultats montrent que la TEP au ^{18}F -FDG présente des caractéristiques permettant de suivre l'évolution de l'inflammation dans le genou de rats arthritiques avec une possible quantification.

b. Macro-autoradiographie des tissus articulaire lésés.

En plus de cette étude, nous avons analysé plus précisément l'accumulation de ^{18}F -FDG dans les tissus articulaires lésés. Nous réalisons une autoradiographie des tissus

articulaires avec le suivi de 2 radiotraceurs : le ^{18}F -FDG et le $^{99\text{mTc}}$ -HDP. Les images obtenues sont comparées à une analyse histologique classique des tissus articulaires (**Figure 98**).

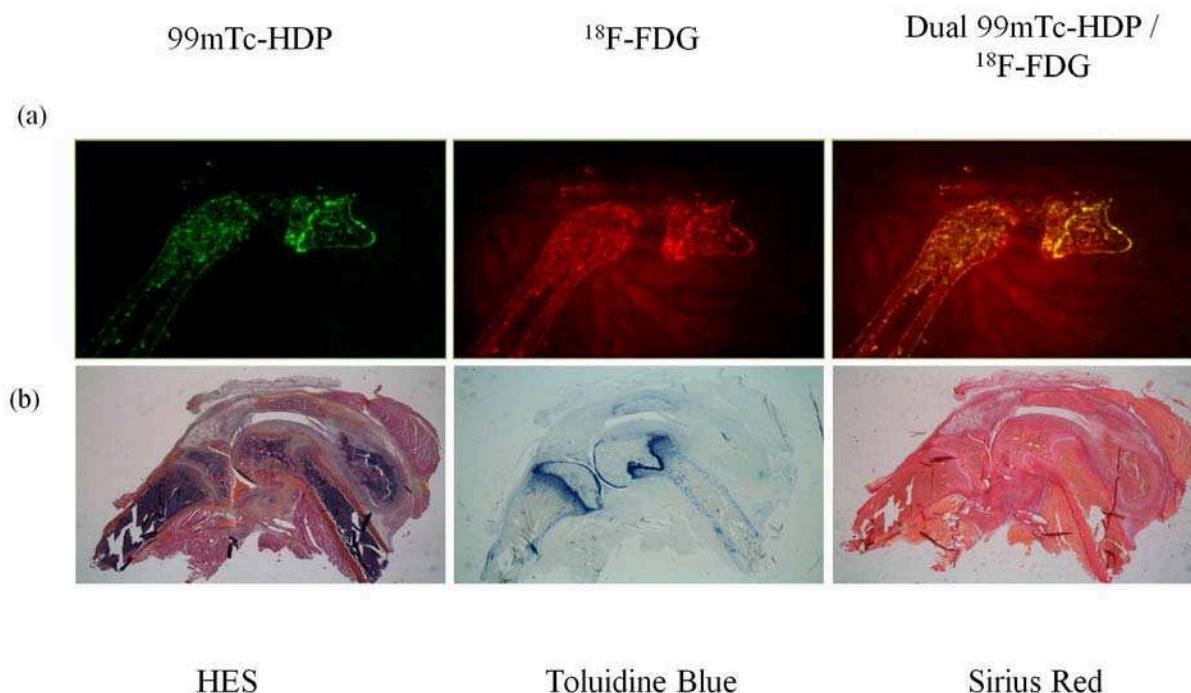


Figure 98 : (a) Macro-autoradiographie de coupes sagittales de genoux de rats arthritiques (48 heures après induction de l'arthrite) ayant préalablement reçu une injection de ^{18}F -FDG (coloration rouge) et de $^{99\text{mTc}}$ -HDP (coloration verte). (b) Colorations histologiques de coupes sagittales de genoux de rats arthritiques 48 heures après l'induction de l'arthrite par injection de parois de mycobactéries.

Nous observons que le ^{18}F -FDG s'accumule principalement dans la membrane synoviale alors que le $^{99\text{mTc}}$ -HDP se localise au niveau de l'os. Par comparaison avec les images histologiques, nous observons que les zones d'accumulation du ^{18}F -FDG correspondent aux régions où se trouvent le pannus synovial et les zones de destruction osseuse.

Ces résultats soulignent la capacité du ^{18}F -FDG à s'accumuler dans les zones inflammatoires et les zones de destruction osseuses. Nous souhaitons donc évaluer l'efficacité du TFO par cette technique.

2. Analyse de l'efficacité du TFO par TEP.

Une injection *ia* préventive de 10 μg de TFO anti-TNF- α est réalisée sur le rat 24 heures avant l'induction de l'arthrite par les parois de *Mtb*. L'évaluation par TEP de l'efficacité du TFO est réalisée 48 heures post-induction de l'arthrite, au pic d'accumulation du ^{18}F -FDG dans le genou arthritique (**Figure 99**). Le rat est ensuite sacrifié et nous effectuons une analyse des tissus articulaires par auto-radiographie afin de déterminer la distribution de deux radiotraceurs (^{18}F -FDG : tissu inflammatoire et $^{99\text{mTc}}$ -HDP : os).

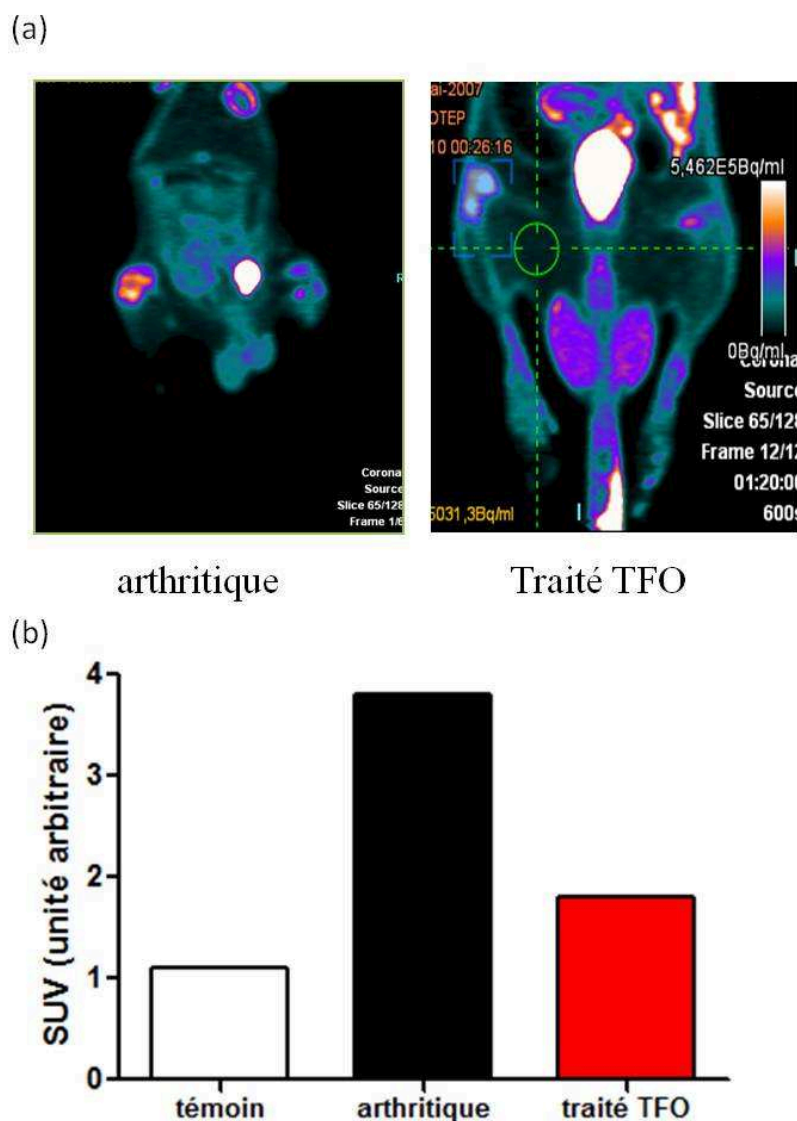


Figure 99 : (a) Biodistribution du ^{18}F -FDG après analyse par TEP chez le rat 48 heures après l'induction de l'arthrite, traité ou non préventivement par 10 μg de TFO anti-TNF- α . Les images sont obtenues 30 minutes après injection par la veine péniennne de 73 MBq de ^{18}F -FDG. (b) Accumulation de ^{18}F -FDG dans les genoux sains, arthritiques et traités TFO 48 heures après induction de l'arthrite aux parois de *Mtb*.

Les images obtenues par TEP (**Figure 99a**) mettent en évidence une différence significative d'accumulation du ^{18}F -FDG dans le genou arthritique suivant que le rat ait été traité ou non préventivement avec le TFO anti-TNF- α . L'injection préventive de TFO permet de diminuer cette accumulation et donc par extrapolation l'intensité de la réaction inflammatoire dans les genoux arthritiques. Ces observations visuelles sont confirmées par l'analyse des SUV (Standardized Uptake Values) (**Figure 99b**). En effet, les rats arthritiques traités préventivement avec le TFO ont une SUV beaucoup plus faible que les rats arthritiques (1,8 vs 3,8). Cependant, l'analyse statistique des résultats n'a pas été réalisée car le nombre de rats utilisés est trop faible.

La distribution des zones inflammatoires dans les tissus de l'articulation est ensuite analysée par autoradiographie (**Figure 100**).

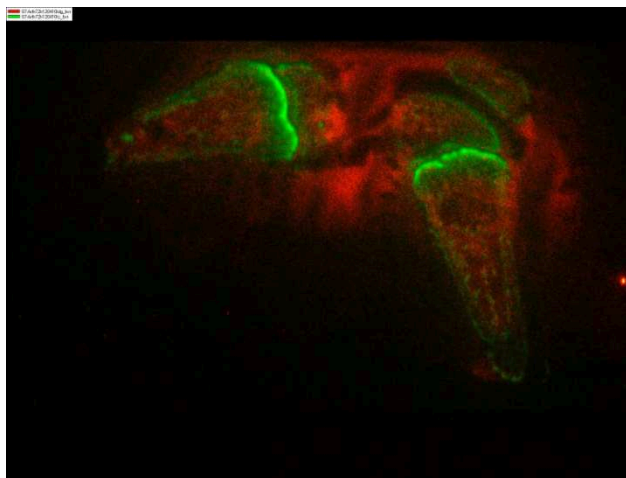


Figure 100 : Macro-autoradiographie d'une coupe sagittale de genou de rat arthritique traité TFO (48 heures après induction de l'arthrite) ayant préalablement reçu une injection de ¹⁸F-FDG (coloration rouge) et de ^{99m}Tc-HDP (coloration verte).

Nous observons sur cette image que le ¹⁸F-FDG se localise principalement dans les tissus synoviaux de l'articulation. Comme cela est mentionné précédemment, le nombre de rats utilisés lors de ces expérimentations est encore trop faible pour que nous puissions effectuer une comparaison statistique avec les scores histologiques obtenus en histologie classique.

Cette étude préliminaire montre cependant l'intérêt potentiel de la TEP au ¹⁸F-FDG dans l'étude de l'efficacité d'un traitement sur les pathologies articulaires inflammatoires.

II. Potentialités anti-arthritiques d'un TFO anti-TNF- α dans un modèle d'arthrite chronique chez le rat.

Les résultats encourageants obtenus grâce à l'injection préventive de TFO anti-TNF alpha dans un modèle d'arthrite aiguë chez le rat nous ont poussés à effectuer ce même type d'expérience dans modèle expérimental d'arthrite chronique. Ce type de modèle se rapprochant d'avantage de la physiopathologie observée dans la polyarthrite rhumatoïde chez l'Homme. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle d'arthrite chronique à la BSA méthylée (mBSA). Dans un premier temps, nous souhaitons analyser l'évolution des différents paramètres ayant cours lors de l'évolution de la pathologie (ANNEXE II).

Dans cette étude, les rats reçoivent une injection intra-articulaire (locale) préventive de 10 μ g de TFO anti-TNF- α . L'induction de l'arthrite consiste en l'injection intra-articulaire de 0,5mg de BSA méthylée. Nous avons évalué l'efficacité du TFO par un suivi des paramètres cliniques (taille de l'œdème, test de douleur et prise de poids), biochimiques (biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage rotulien, dosage des médiateurs de l'inflammation en ARNm et en protéines dans le liquide synovial), et histologiques (évaluation des lésions des structures cartilagineuses, osseuses et du tissu synovial) sur une période de 7 jours suivant l'induction de l'arthrite (**Figure 101**).

Démarche expérimentale suivie :

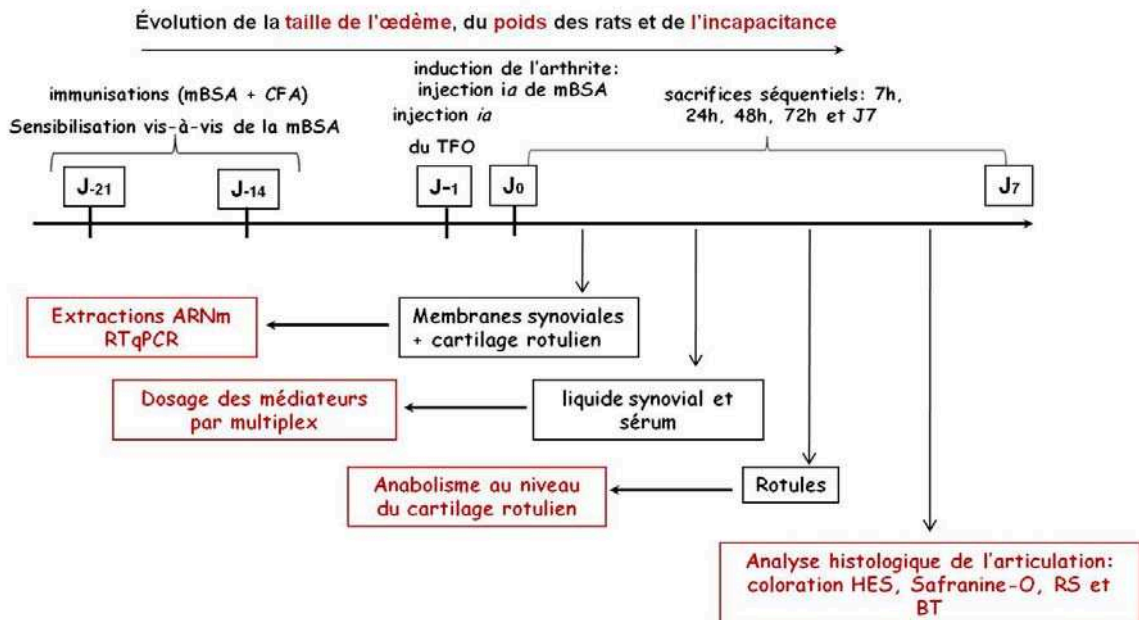


Figure 101 : Démarche expérimentale suivie pour l'évaluation de l'efficacité du traitement local préventif par le TFO dans le modèle expérimental d'arthrite chronique à l'antigène (BSA méthylée : mBSA).

A. Effet du TFO sur l'évolution des paramètres cliniques.

1. Diminution de la taille de l'œdème suite à l'injection préventive de TFO.

Un suivi quotidien de la taille de l'œdème observé au niveau des genoux arthritiques est réalisé (**Figure 102**).

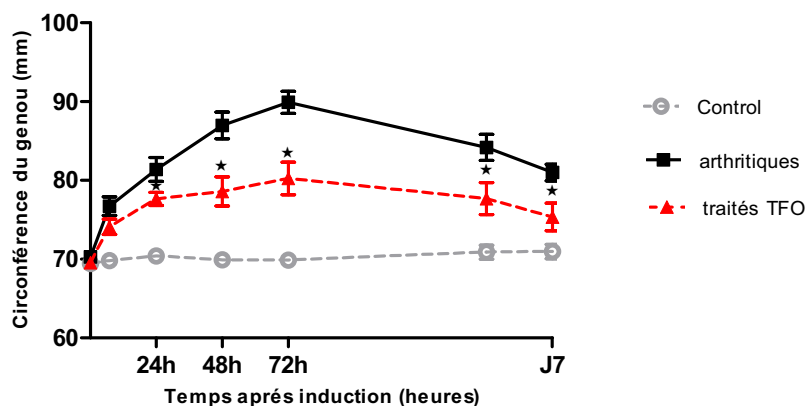


Figure 102 : Evolution de la taille de l'œdème observé au niveau du genou de rats atteints d'une arthrite chronique par injection de mBSA et traités ou non préventivement par le TFO anti-TNF- α . la circonférence des genoux est estimée grâce à la formule mathématique du périmètre d'une ellipse $2\pi\sqrt{(a^2 + b^2)}$ avec a=largeur du genou et b=hauteur du genou. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, n=8 rats par groupe.

Tous les rats développent les premiers signes cliniques de l'arthrite dans les 7 heures suivant l'induction de l'arthrite. La taille de l'œdème croit de manière continue pendant les 3 premiers jours (taille maximale à J3) puis diminue progressivement jusqu'à J7 en restant toutefois significativement supérieure à la taille des genoux des rats non arthritiques. L'injection préventive de TFO permet de diminuer significativement la taille de l'œdème (dès 24 heures et jusqu'à J7, taille de l'œdème 48 % plus faible que chez les rats arthritiques à J2).

2. Evolution de la répartition de la charge pondérale, test de douleur.

Nous avons mesuré l'évolution de la répartition de la charge pondérale des rats arthritiques, traités ou non, au cours de l'établissement de ce modèle (**Figure 103**).

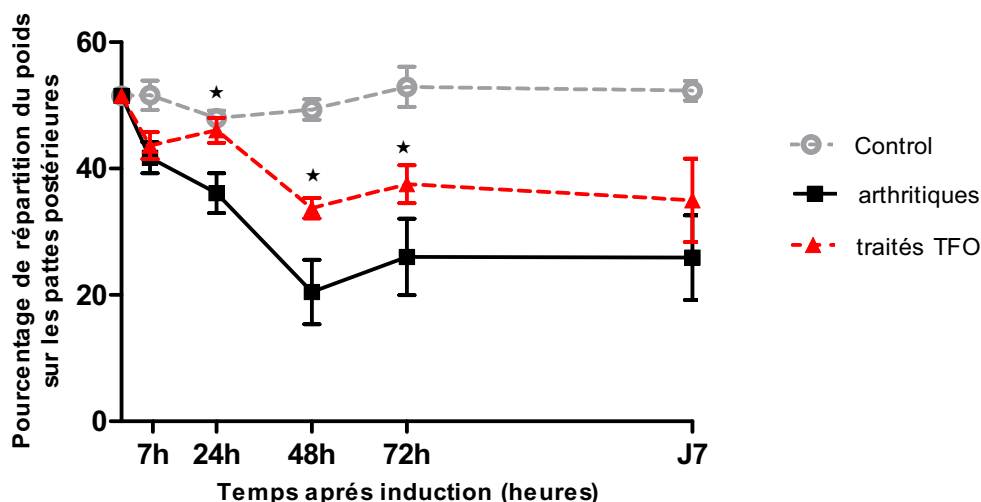


Figure 103 : Evolution de la répartition du poids des rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA sur leurs pattes postérieures et traités ou non préventivement par 10 µg de TFO anti-TNF- α . Les résultats sont présentés sous la forme du pourcentage de répartition du poids sur leur patte postérieure droite (arthritique), moyenne \pm SEM, n=8 rats par groupe.

L'injection intra-articulaire de BSA méthylée engendre une réponse douloureuse très rapide (dès les 7 premières heures) qui se traduit par une redistribution progressive de la charge pondérale des rats arthritiques sur leurs pattes postérieures. Après 48 heures, les rats arthritiques ne répartissent plus que 20 % de leur poids sur la patte arthritique. La douleur se stabilise par la suite et persiste jusqu'à J7 (25 % de leur poids sur la patte pathologique entre J3 et J7). L'injection locale préventive de TFO permet d'améliorer significativement le déséquilibre de répartition du poids dès 24 heures et ce jusqu'à J7.

Nous avons également suivi la prise de poids par les différents groupes de rats sans pouvoir mettre en évidence une différence significative entre les rats traités avec le TFO et les rats arthritiques.

B. Effet du TFO sur l'expression des médiateurs inflammatoires.

Comme dans le modèle d'arthrite aiguë, nous avons dans un premier temps mesuré l'expression en ARNm de médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, vEGF) dans les tissus articulaires (membranes synoviales et cartilage articulaire).

Dans ce modèle d'arthrite chronique à la mBSA, nous avons mesuré par PCR quantitative l'expression génique 24 heures après l'induction de l'arthrite. Dans les chondrocytes articulaires, l'induction des médiateurs inflammatoires est très faible (facteur d'induction de l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6, de MCP-1 et de vEGF inférieure à 2), et nous n'avons par conséquent pas pu évaluer l'effet du traitement par le TFO dans ce tissu. Dans les membranes synoviales, nous observons que l'injection préventive de TFO a un effet inhibiteur sur l'expression du TNF- α (48%), de l'IL-1 β (37%), de l'IL-6 (52%), de MCP-1 (23%) et de vEGF (42%).

Etant donné que le profil d'expression des médiateurs protéiques dans le liquide synovial est plus révélateur de la physiopathologie de l'arthrite, nous avons réalisé un dosage de 24 médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial des rats arthritiques traités ou non par le TFO (**Tableau 8**). Ce dosage est réalisé par la technique Multiplex immuno-assay.

Tableau 8 : Evolution de l'expression de 24 médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial de rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA et traités ou non préventivement par une injection intra-articulaire de 10 μ g de TFO anti-TNF- α . Les résultats sont exprimés en pg/mL sous la forme moyenne \pm SEM, n=8 rats pour chaque groupe. Seules les médiateurs présentant des variations d'expression significatives sont présentés.

	7h			24h			7J			
	médiateur	control	Arthrit	traité	control	Arthrit.	traité	control	Arthrit.	traité
significatif	MCP-1	14.3 \pm 3.3	539 \pm 40	275.4* \pm 56	7.4 \pm 3.6	173 \pm 34.5	104.8 \pm 27.3	3.8 \pm 0.1	35.4 \pm 13.2	64.1 \pm 0.9
	MIP1a	1.94 \pm 0.1	88 \pm 22.2	46.7* \pm 11	1.94 \pm 0.0	23.6 \pm 16.6	5.3 \pm 2.0	1.94 \pm 0.1	1.94 \pm 0.0	15.5 \pm 10.1
	Eotaxin	7.6 \pm 2.4	17.1 \pm 2.2	11.8 \pm 3.0	9.2 \pm 3.8	20.7 \pm 4.2	16.0 \pm 4.7	7.9 \pm 3.2	22.7 \pm 3.6	10.1* \pm 2.4
	IL-2	54.7 \pm 9.5	102.5 \pm 11	57.8* \pm 15	35.8 \pm 9.7	152 \pm 37.5	77.4* \pm 28	19.9 \pm 6.7	130 \pm 20.4	27.7* \pm 6.5
	IL-5	2.4 \pm 0.4	15.5 \pm 3.5	7.4* \pm 3.2	2.6 \pm 0.4	3.6 \pm 1.0	2.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.6	2.4 \pm 0.3	2.2 \pm 0.2
	IL-6	9.7 \pm 0.5	620 \pm 168	874.4 \pm 338	11.3 \pm 1.5	672 \pm 315	212.0* \pm 69	9.7 \pm 0.1	11.9 \pm 2.8	16.8 \pm 6.9
	IL-9	227.9 \pm 37	295.3 \pm 26	364 \pm 104.6	219 \pm 75.5	768 \pm 170.8	490.8 \pm 132	102.7 \pm 34.1	628 \pm 81.7	215.4* \pm 54
	IL-18	528.9 \pm 82	181.3 \pm 15	258.5 \pm 122	269 \pm 76.8	1148 \pm 250	600.7* \pm 95	313 \pm 103.5	922 \pm 162.3	782 \pm 120.1
	Leptin	57.7 \pm 8.2	144 \pm 42	111.2 \pm 26.8	37.8 \pm 5.0	2088 \pm 52.5	109.8* \pm 15	33.1 \pm 15.8	176.6 \pm 50	59.4* \pm 16
	tendance	GRO/KC	19.1 \pm 5.3	145 \pm 17.5	103.6 \pm 40.6	16.4 \pm 4.7	138.3 \pm 49.6	67.5 \pm 13.2	9.4 \pm 7.3	112 \pm 20.4
IFNg		4.0 \pm 0.6	125 \pm 32.9	98.9 \pm 39.4	4.9 \pm 0.2	27.0 \pm 7.9	6.8 \pm 1.3	4.9 \pm 0.1	4.2 \pm 0.7	5.7 \pm 0.9
IL-1b		6.3 \pm 2.1	509 \pm 120	366 \pm 175.7	3.6 \pm 1.2	250 \pm 132.2	94.6 \pm 19.3	3.8 \pm 1.0	53.6 \pm 15.7	87.9 \pm 46.5
IL-4		17.7 \pm 2.1	4.3 \pm 2.0	8.2 \pm 3.7	12.9 \pm 2.2	4.2 \pm 1.9	8.6 \pm 4.2	16.2 \pm 5.1	8.5 \pm 4.1	17.0 \pm 4.2

Nous observons que lors de la phase précoce d'initiation de ce modèle d'arthrite (dans les 7 premières heures), l'expression des chémokines MCP-1, MIP-1 α , IL-2 et IL-5 est significativement réduite chez les rats traités préventivement avec le TFO comparativement avec les rats arthritiques non traités. A 24 heures, les interleukines 2, 6 et 18 ainsi que la leptine présentent une expression significativement plus faible chez les rats traités avec le TFO. Après 7 jours, les niveaux d'expression de l'éotaxine, des interleukines 2 et 9 et de la leptine dans le liquide synovial des rats traités restent significativement inférieurs à ceux observés chez les rats arthritiques non traités. De plus, nous observons que les niveaux d'expression de GRO/KC, de l'IL-1 β , de l'IL-4 et de l'interféron γ chez les rats traités présentent un profil d'expression favorable à une atténuation de l'arthrite (inhibition de l'expression de GRO/KC, IL-1 β et IFN γ et augmentation de l'expression de l'IL-4 qui est une cytokine anti-inflammatoire).

L'analyse du profil d'expression de ce large panel de médiateurs inflammatoires va également pouvoir être confronté à l'évolution des lésions histologiques observées.

C. Analyse histologique des lésions affectant les tissus articulaires.

Nous avons analysé séparément le tissu synovial des structures cartilagineuses et osseuses. Un score histologique (**Tableau 9**) a été établi à partir de l'observation des coupes histologiques colorées à l'HES, au rouge sirius, au bleu de Toluidine et à la safranine-O (**Figure 104**).

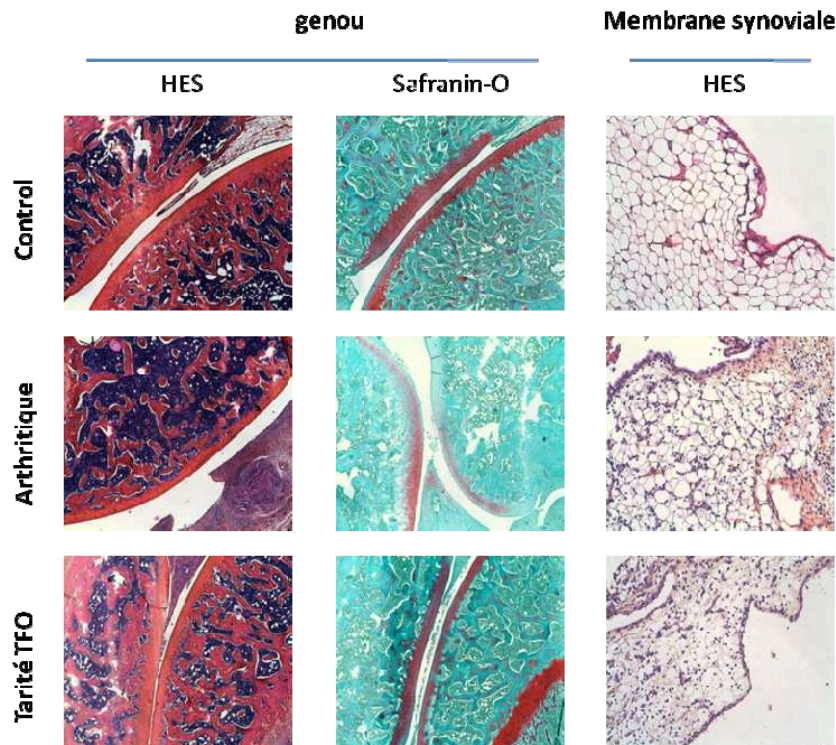


Figure 104 : Images des structures articulaires (genoux en coupe sagittale à J7 et membranes synoviales à 24 heures) de rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA et traités ou non par une injection préventive de 10 μ g de TFO. Les coupes histologiques sont colorées HES et Safranin-O. Grossissement x20.

L'observation de ces clichés souligne l'effet protecteur du traitement préventif avec 10µg de TFO vis-à-vis de la déplétion en protéoglycannes du cartilage articulaire (coloration safranine-O), de la dégradation des structures trabéculaires de l'os et de l'infiltration du tissu synovial. Ces observations sont complétées par l'analyse du score histologique (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Score histologique des structures osseuses et cartilagineuses ainsi que des tissus synoviaux issus de genoux de rats atteints d'une arthrite chronique (par injection de BSA méthylée) et traités ou non préventivement par injection intra-articulaire de 10µg de TFO.

	Hyperplasie synoviale	fibrose	Nombre de vaisseaux	Infiltration diffuse	Infiltration périvasculaire	cartilag e	os
Control	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
TFO seul	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Arthritiques	1.3* ± 0.2	1.3* ± 0.2	2.1* ± 0.1	2.1* ± 0.3	2.8* ± 0.3	1.9* ± 0.3	2.0* ± 0.3
traités	0.8 ± 0.1	0.7* [#] ± 0.1	1.8* ± 0.2	1.6* ± 0.2	1.7* [#] ± 0.2	1.4* ± 0.3	1.6* ± 0.2

Valeurs présentées sous la forme moyenne ± SEM (n=8 rats par groupe). *p≤0.05, comparativement au control, [#]p≤0.05 comparativement au groupe arthritique, test t de Student.

L'analyse de ces scores histologiques révèle que l'injection préventive de TFO permet de diminuer significativement la fibrose et l'infiltration périvasculaire du tissu synovial. Le TFO semble en outre diminuer l'hyperplasie synoviale et protéger la dégradation du cartilage et des structures osseuses mais ces tendances ne sont pas significatives.

Parallèlement à cette analyse histologique, nous avons mesuré l'effet du TFO sur la perte de biosynthèse en protéoglycannes observée dans le cartilage de rats arthritiques. L'injection préventive de TFO diminue de 15% cette perte d'anabolisme au niveau du cartilage rotulien.

Faits marquants

- **Le traitement préventif avec le TFO et le siRNA permet d'améliorer significativement l'évolution des paramètres cliniques, biochimiques et histologiques dans un modèle d'arthrite aiguë.**
- **L'analyse des différents paramètres étudiés au cours de ce modèle d'arthrite expérimental permet de mettre en évidence une efficacité du TFO supérieure à celle du siRNA.**
- **L'évolution d'une arthrite chronique à la mBSA est significativement améliorée par l'injection locale préventive de TFO anti-TNF-α.**
- **Le TFO permet d'inhiber significativement l'expression des chémokines et interleukines dans le liquide synovial des rats arthritiques.**
- **L'injection préventive de TFO assure une protection des tissus synoviaux, osseux et cartilagineux de l'articulation lors du modèle d'arthrite à l'antigène.**

Discussion :

Le ciblage du TNF- α dans des modèles expérimentaux d'arthrite a déjà montré sa pertinence (257, 306, 319, 320). Cependant, ces études portent sur des injections systémiques répétées de grandes quantités d'anti-TNF- α . Un exemple en est donné avec un traitement quotidien à 4 mg/kg d'un analogue du récepteur 1 au TNF- α (PEG sTNFR1) dans un modèle d'arthrite à l'adjuvant (321). Les anti-TNF- α infliximab et etanercept ont eux montré leur efficacité dans un modèle d'arthrite à l'antigène (322) mais à des doses de 7 et 5,5 mg/kg en injection systémique. Nous avons donc décidé de travailler sur un traitement préventif local avec une injection unique de 10 μ g d'oligonucléotide (soit 0,04 mg/kg).

Dans la première partie de cette étude *in vivo*, nous avons utilisé un modèle d'arthrite aiguë rapide à mettre en place afin de comparer l'efficacité des approches TFO et siRNA *in vivo* (282). Ce modèle d'arthrite se caractérise par une inflammation aiguë des tissus synoviaux s'accompagnant secondairement de lésions osseuses et cartilagineuses. Le TNF- α occupe une place prépondérante dans la composante inflammatoire de ce modèle.

Préalablement à l'évaluation du potentiel anti-arthritique du TFO, nous avons étudié la biodistribution de ce dernier dans les tissus articulaires grâce à un oligonucléotide marqué à la cyanine en 3'. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une injection *ia* sans agent de transfection du TFO permet d'atteindre à la fois le tissu synovial et le cartilage articulaire. Une étude sur la biodistribution d'un TFO anti-collagène de type I après une injection intraveineuse chez le rat avait montré la capacité de ce type d'oligonucléotide à pénétrer des cellules ou organes cibles sans perte d'efficacité (323). Le siRNA est lui véhiculé dans l'articulation à l'aide d'un polymère cationique. Cette étude dans un modèle de screening reposant essentiellement sur la comparaison de l'efficacité des approches TFO et siRNA en traitement local, nous ne nous sommes pas penchés sur l'optimisation de la vectorisation du siRNA. A l'heure actuelle, les liposomes cationiques (324) et des systèmes nanoparticulaires (325) permettant un ciblage sélectif et un relargage progressif sont développés.

L'efficacité des approches siRNA et TFO a d'abord été évalué par le suivi des paramètres cliniques dans le modèle d'arthrite aiguë. L'injection préventive de TFO provoque une diminution de la taille de l'œdème et de la douleur ressentie par l'animal plus marquée que le traitement par le siRNA (pour une même dose injectée : 10 μ g). Ces observations confirment les résultats obtenus lors de nos études *in vitro*, à savoir une inhibition de l'inflammation plus prononcée avec le TFO qu'avec le siRNA. De plus, il s'est avéré que l'utilisation de jetPEI *in vivo*[®] pour le transfert du siRNA a un effet potentialisateur de la réaction inflammatoire, notamment de l'induction de l'expression en TNF- α . Ces observations pourraient nuancer nos conclusions quant à l'efficacité propre du siRNA comparativement à celle du TFO. Cependant, le traitement préventif par le TFO s'est également montré plus efficace que le siRNA quant à la limitation de l'expression des médiateurs inflammatoires dans les tissus articulaires et le liquide synovial. Ces résultats soulignent l'intérêt d'inhiber l'expression du TNF- α à un stade précoce de la synthèse protéique (306, 326).

L'objectif premier de cette expérimentation étant de comparer les deux approches afin de tester ensuite ce traitement par des oligonucléotides dans un modèle expérimental plus proche de la PR, nous avons décidé d'utiliser uniquement le TFO dans un modèle d'arthrite chronique à l'antigène (285).

Grâce au modèle d'arthrite par injection de parois de *Mtb*, nous avons également étudié la faisabilité de quantifier l'effet du traitement par le TFO par la tomographie par émission de positons. De récentes études montrent l'intérêt croissant de cette technologie pour la prise en charge des affections articulaires inflammatoires (150, 155, 327). Nos résultats préliminaires semblent montrer la possibilité de coupler une visualisation précise des affections à la quantification du degré d'inflammation. De plus, l'autoradiographie permet de comparer l'accumulation du radiotracer aux scores histologiques. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive et de suivre l'évolution des lésions. Une réduction du nombre d'animaux utilisés serait donc permise.

Lors de l'étude sur le modèle d'arthrite à la mBSA nous avons décidé de focaliser notre étude sur l'expression des médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial. En effet, le profil d'expression de ces médiateurs dans ce compartiment reflète l'évolution de la pathologie telle qu'elle est évaluée en clinique (328, 329). D'autant plus que l'expression en ARNm dans les tissus articulaires n'est pas toujours superposable aux taux de médiateurs sécrétés et actifs. Cette étude nous a en outre permis d'établir des corrélations entre les taux de médiateurs sécrétés et l'évolution des paramètres histologiques dans les différents groupes de rat. Le point négatif de cette étude fut l'absence de détection du TNF- α dans le liquide synovial. Les données bibliographiques nous ont montré que ce phénomène est courant lors de l'étude de ce modèle (322), en effet, il s'avère qu'il est nécessaire de se placer très tôt après l'induction de l'arthrite (dans les 3 premières heures post-induction) si l'on souhaite détecter ce médiateur dans le liquide synovial. Néanmoins l'importance du TNF- α dans la physiopathologie de ce modèle a été démontrée (322).

Parmi le panel de médiateurs que nous avons dosé, nous pouvons établir la relation qui existe entre l'expression des chémokines et l'infiltration globale du tissu synovial (328). Les chémokines sont les médiateurs induits le plus précocement et l'infiltration de la membrane synoviale, par les lymphocytes et les neutrophiles, est la première manifestation histologique observable (dès 7 heures après l'induction de l'arthrite). Le travail effectué sur la caractérisation du modèle à la mBSA nous a permis de mettre en évidence le profil d'expression de l'éotaxine dans l'établissement de l'arthrite, une chémokine jusqu'alors peu décrite dans cette pathologie. Une étude récente souligne le rôle de cette chémokine dans la physiopathologie de cette affection (330). L'analyse des scores histologiques permet de relier la diminution de l'expression des chémokines dans le liquide synoviale générée par le traitement préventif avec le TFO à la diminution de l'infiltration du tissu synovial observée chez les rats traités préventivement. De la même manière, l'IL-1 β et l'IL-17 sont deux cytokines impliquées dans la perte de biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage articulaire (331) et nous pouvons corréliser la limitation de cette perte suite au traitement par le TFO à la baisse d'expression de ces deux cytokines dans le liquide synovial. Une étude récente implique l'interleukine 18 dans la régulation de la synthèse de protéoglycannes dans

Résultats et discussion

le cartilage articulaire (332) et pourrait également être liée aux modulations de l'anabolisme observées au cours de cette étude.

L'injection préventive de TFO a surtout permis de souligner l'effet protecteur sur les structures articulaires par cet anti-TNF- α . Le fait que cette cytokine se trouve en amont de la cascade cytokinique impliquée dans les destructions ostéocartilagineuses observées lors de l'arthrite valide la pertinence de cette cible.

ANNEXE I

Caractérisation d'un modèle de mono-arthrite articulaire par injection de parois de Mycobactéries

Suite à l'étude *in vitro* menée sur la comparaison d'efficacité entre une approche de type TFO et l'approche par ARN interférence, nous souhaitons évaluer le potentiel anti-inflammatoire de ces deux stratégies dans un modèle d'arthrite. L'objectif initial était de trouver un modèle de mono-arthrite articulaire dans le but d'effectuer un traitement préventif et local par injection intra-articulaire. Nous souhaitons, en outre, que ce modèle présente des caractéristiques retrouvées dans la PR humaine, à savoir : infiltration du tissu synovial, atteintes ostéocartilagineuses, avec un rôle central dévolue au TNF- α dans sa physiopathologie (281, 282). Ce modèle s'apparente à un modèle de screening permettant d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de nos approches TFO et siRNA.

Nous avons dans un premier temps travaillé avec un modèle d'inflammation articulaire par injection intra-articulaire d'interleukine-1 β . Ce modèle ne présentait pas de symptômes suffisamment marqués pour que l'on puisse évaluer l'efficacité d'un traitement. L'induction des principaux médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) dans les tissus articulaires est faible (facteur 3) et leur sécrétion dans le liquide synovial est également très faible (taux non détectés par ELISA).

Par conséquent, nous avons travaillé par la suite sur un modèle de mono-arthrite articulaire aigu par injection de parois de Mycobactérium Tuberculosis (*Mtb*).

I. Caractérisation du modèle de mono-arthrite articulaire par injection de parois de Mtb.

A. Suivi des paramètres cliniques.

Nous avons analysé l'évolution de la taille l'œdème dans ce modèle par mesure du diamètre sagittal et coronal des genoux sensibilisés (cf résultats *in vivo* I.B.a). Il a ainsi été mis en évidence qu'au cours de ce modèle les genoux arthritiques présentent un œdème d'une taille significativement supérieure à celle des rats non sensibilisés très rapidement (dès les premières heures post-induction de l'arthrite), ce phénomène perdure pendant les 7 jours de suivi. Une comparaison entre l'injection de différentes doses de parois de *Mtb* injectées a été réalisée : 400, 500 et 600 μg dilués dans 50 μL de sérum physiologique. La taille de l'œdème est dose dépendante et la dose de 600 μg est retenue.

Un test de douleur par mesure de la répartition de la masse corporelle sur les pattes postérieures a également été développés selon les normes du fabricant (cf résultats *in vivo* I.B.b) (287). Les rats arthritiques présentent un déséquilibre significatif dans la répartition de leur poids sur leurs pattes postérieures, et il est possible de mesurer l'efficacité d'un traitement par le suivi de l'évolution de ce déséquilibre.

Nous avons donc décidé de suivre les paramètres cliniques précédents tout au long de nos expérimentations par des mesures quotidiennes sur chaque animal.

B. Essai d'analyse par télémétrie.

Grâce à l'implantation de puces télémétriques nous souhaitons caractériser l'évolution de la mobilité et de la température corporelle des rats arthritiques. Un groupe de rats traités préventivement par une injection intra-articulaire de 10 μ g de TFO anti-TNF- α a été inclus dans cette étude.

1. Mobilité.

Le premier paramètre évalué est l'activité locomotrice des rats (**Figure 105**).

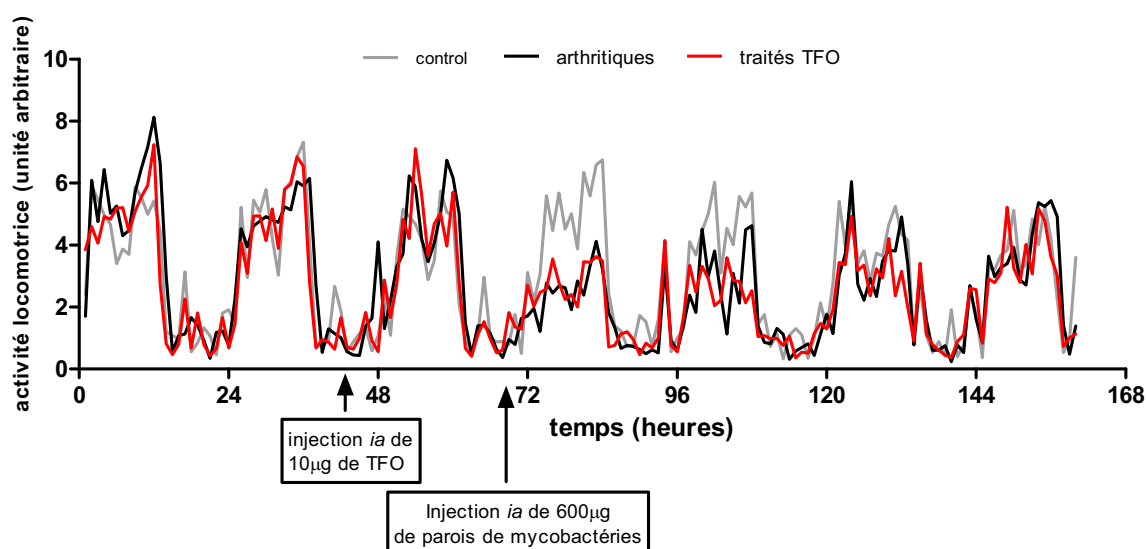


Figure 105 : Evolution de l'activité locomotrice de rats atteints d'une arthrite par injection intra-articulaire de 600 μ g de parois de mycobactéries. Les mesures sont effectuées par les puces télémétriques. Les valeurs présentées sont les moyennes (n=4 rats par groupe).

Nous observons que l'induction de l'arthrite engendre une diminution significative de l'activité locomotrice chez les rats arthritiques. Cette baisse d'activité n'est toutefois significative que lors des 48 premières heures suivant l'induction de ce modèle d'arthrite, par la suite (de J2 à J4) il n'existe plus de différence d'activité entre les groupes de rats. De plus, le traitement préventif par le TFO n'a pas d'influence significative sur cette baisse d'activité lors des 48 premières heures.

2. Température corporelle

La température corporelle est le second paramètre que nous pouvons suivre par télémétrie lors de nos expérimentations (**Figure 106**).

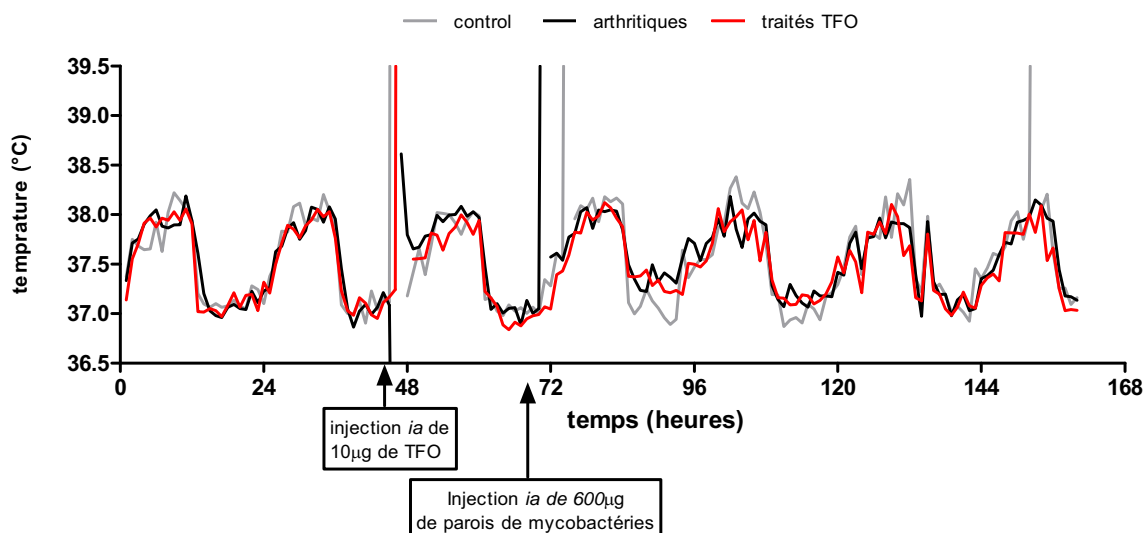


Figure 106 : Evolution de la température corporelle de rats atteints d'une arthrite par injection intra-articulaire de 600µg de parois de mycobactéries. Les mesures sont effectuées par les puces télémétriques. Les valeurs présentées sont les moyennes (n=4 rats par groupe).

Nous n'observons pas de variations significatives de la température corporelle entre les rats arthritiques et le groupe de rats control. Ces résultats ne sont pas en accord complet avec les données bibliographiques où une augmentation de la fièvre est observée (282). Le traitement préventif par le TFO n'induit pas non plus de variations de ce paramètre sur la période de notre étude.

Etant donné la difficulté de mise en place de ce procédé et le peu de résultats significatifs qui en découlent, nous avons décidé de ne pas utiliser l'évaluation par télémétrie pour la suite de nos expérimentations avec le TFO anti-TNF- α .

II. Mesure de l'expression des médiateurs inflammatoires.

A. Expression en ARNm dans les tissus articulaires.

L'expression en ARNm du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6, du vEGF et de MMP13 dans les membranes synoviales et le cartilage articulaire a été évaluée après 7, 24 et 48 heures (post-induction de l'arthrite) afin de déterminer la période temporelle la plus propice à l'évaluation de l'expression des messagers pour la suite de notre étude.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 10** suivant :

Tableau 10 : Taux d'induction des médiateurs TNF- α , IL-1 β , IL-6, vEGF et MMP13 dans les membranes synoviales de rats atteints d'une arthrite par injection de 600 μ g de parois de mycobactéries. Les mesures sont réalisées par PCR quantitative en temps réel 7, 24 et 48 heures après l'induction de l'arthrite. Les résultats sont présentés sous la forme de taux d'induction moyens en comparaison avec des rats sains, n=8 rats par groupe. Le taux de base est de 1.

Médiateur	Facteur d'induction		
	7 heures	24 heures	48 heures
TNF-α	2,1	5,6	1,3
IL-1β	4,7	11,3	1,8
iNos	2,8	8,1	2,2
vEGF	1,7	7,6	5,3
MMP13	6,3	17,3	3,2

Nous observons que le pic d'induction en ARNm pour les médiateurs que nous avons suivi se situe 24 heures après l'induction de l'arthrite. Pour la suite de nos expériences, les tissus articulaires ont donc été récupérés 24 heures après l'induction de l'arthrite dans le cadre de l'évaluation de l'expression en ARNm dans les membranes synoviales et le cartilage articulaire.

Les facteurs d'induction en messagers observés dans le cartilage articulaire sont significativement plus faibles que ceux observés dans les membranes synoviales. Cependant, le pic d'induction se trouve également après 24 heures

B. Sécrétion des médiateurs dans le liquide synovial.

Dans le cadre de l'étude de la sécrétion du TNF- α et du NO dans le liquide synovial des rats arthritiques, nous avons récupéré le liquide synovial aux temps 7, 24 et 48 heures. Le TNF alpha a ensuite été dosé par ELISA et le NO par la méthode de GRIESS.

Nous avons ainsi observé que la concentration en TNF- α dans le liquide synovial est maximale 48 heures après l'induction de l'arthrite (environ 60 pg/mL, la concentration est de 45 pg/mL après 24 heures). Le NO est lui continuellement sécrété dans le liquide synovial aux trois temps d'étude (environ 50 μ M).

Pour la suite de nos expériences, les liquides synoviaux ont donc été analysés après 48 heures.

III. Suivi de la biosynthèse des protéoglycannes dans le cartilage articulaire.

Nous souhaitons également suivre l'évolution de la biosynthèse en protéoglycannes dans le cartilage rotulien. Celle-ci a été mesurée après 24, 48 et 72 heures (**Figure 107**).

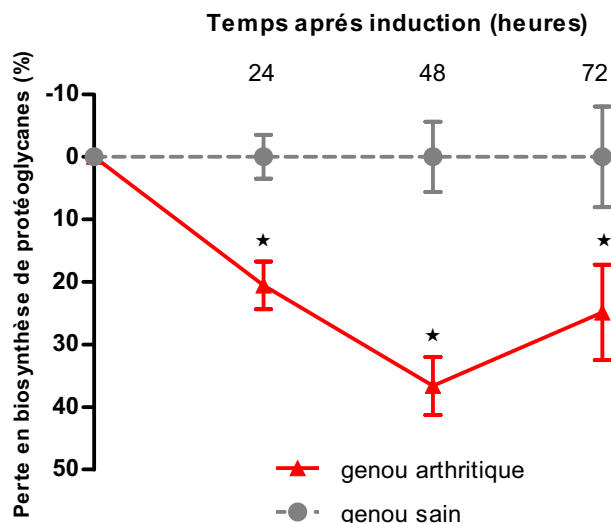


Figure 107 : Evolution de la perte en biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de genoux de rats arthritiques ou non. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de perte d'anabolisme, moyenne \pm SEM (n=8 rats par groupe).

Ces résultats montrent que la perte maximale en biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de rats atteints d'une arthrite par injection de parois de mycobactéries est observée 48 heures après l'induction de l'arthrite. Nous avons choisit ce temps pour l'évaluation de ce paramètre pour les expérimentations ultérieures.

IV. Analyse histologique des tissus articulaires

L'analyse des scores histologique nous a amené à évaluer les lésions des tissus articulaires (cartilage, os et membrane synoviale) 72 heures après le début de l'induction de l'arthrite (cf résultats *in vivo* I.D).

Cette étude préliminaire nous a permis de déterminer les fenêtres de temps adaptées à l'étude de chacun des paramètres que nous souhaitons suivre pour évaluer l'efficacité de nos oligonucléotides anti-TNF- α .

ANNEXE II

Caractérisation du modèle de mono-arthrite articulaire chronique à la BSA méthylée.

Afin d'évaluer le potentiel anti-arthritique de l'oligonucléotide TFO dans un modèle d'arthrite chronique à l'antigène, nous souhaitons caractériser ce dernier. C'est pourquoi nous avons effectué un suivi des paramètres cliniques, histologiques et biochimiques au cours de l'évolution de ce modèle d'arthrite sur une période de 14 jours.

I. Caractérisation clinique du modèle d'arthrite à l'antigène.

A. Evolution de la taille de l'œdème.

Tous les animaux ont développé les premiers signes d'arthrite à la mBSA dans les 7 premières heures suivant la sensibilisation par injection intra-articulaire de BSA méthylée.

Un œdème inflammatoire est observé au niveau du genou arthritique (droit) après sensibilisation (**Figure 108**).

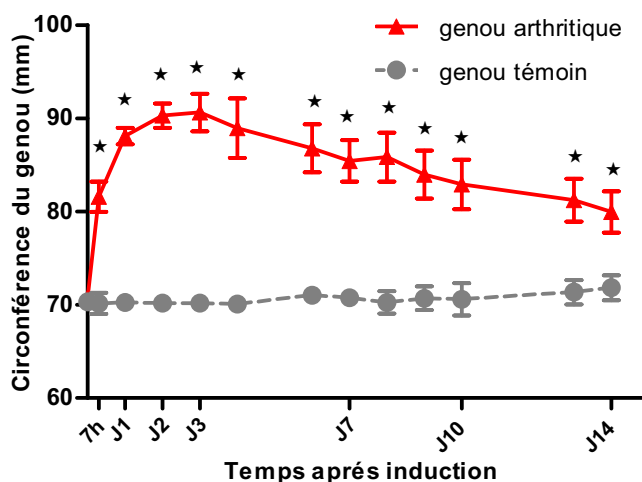


Figure 108 : Evolution de la taille de l'œdème des genoux de rats après induction d'une mono-arthrite articulaire par injection de BSA méthylé sur une période de 14 jours. La circonférence des genoux est estimée grâce à la formule géométrique permettant de déterminer le périmètre d'une ellipse : $2\pi\sqrt{(a^2 + b^2)}$ avec a = hauteur et b = largeur. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM des valeurs (n=28 rats). *p<0,05.

Nous observons que l'œdème atteint une taille maximale après 48 à 72 heures puis il décroît progressivement (de J5 à J14). La taille de l'œdème des genoux arthritiques est significativement plus importante que celles de genoux témoins (injectés avec du sérum physiologique) et ce dès 7 heures post-induction et jusque J14. Dans le même temps, nous avons observé que l'évolution pondérale quotidienne des rats arthritiques était

significativement moins rapide que celui des rats control (poids 17 à 24 % moins important après 14 jours).

B. Distribution de la charge pondérale sur les pattes postérieures.

Parallèlement à l'évaluation de l'évolution de la taille de l'œdème, nous avons effectué un test d'incapacitance relatant la douleur perçue par l'animal par une mesure de la répartition de la charge pondérale sur les pattes postérieures (**Figure 109**).

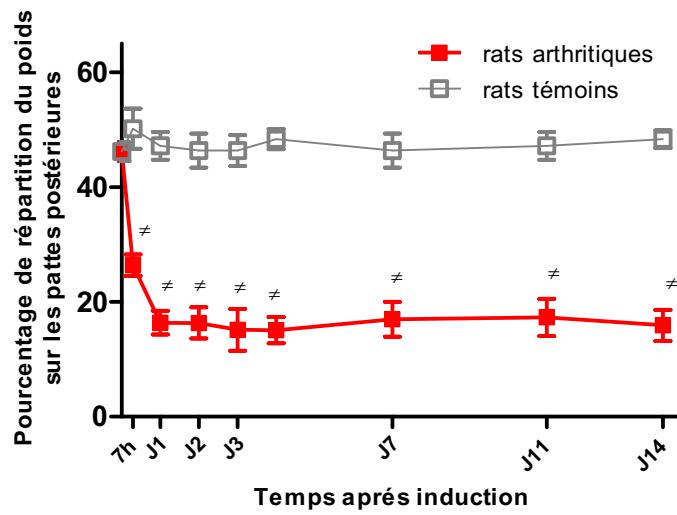


Figure 109 : Effet de l'induction d'une arthrite à l'antigène sur l'évolution de la répartition du poids des rats sur leurs pattes postérieures. Les résultats sont présentés sous la forme du pourcentage de répartition du poids sur la patte droite (moyenne \pm SEM). * $p < 0,05$ vs groupe de rats témoins.

Nous observons que l'induction de l'arthrite induit une réponse douloureuse très rapide causant la redistribution du poids sur la patte saine. Cette redistribution du poids est significative dès 7 heures et est maximale dès 24 heures après l'induction de l'arthrite (les rats placent seulement 16 % de leur poids sur la patte arthritique). Par la suite, la douleur persiste et la redistribution du poids reste stable jusque J14.

II. Evolution de l'expression des médiateurs inflammatoires.

Nous avons évalué l'évolution de l'expression des médiateurs dans la membrane synoviale des genoux de rats ainsi que dans le cartilage articulaire. Nous avons choisi de suivre l'expression de 4 cytokines représentatives de différentes classes fonctionnelles : une chémokine (MCP-1), trois cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6), un facteur de croissance (vEGF) et une métalloprotéinase (MMP13) pour le cartilage articulaire.

A. Cinétique d'expression en ARNm des médiateurs inflammatoires dans les tissus articulaires.

1. Dans la membrane synoviale.

Les taux d'expression en ARNm des différents médiateurs dans les membranes synoviales sont normalisés par rapport au gène de ménage RP29 (Tableau 11).

Tableau 11 : Profil d'expression des médiateurs inflammatoires MCP-1, IL-1 β , vEGF, IL-6 et TNF- α dans les membranes synoviales de genoux de rats atteints d'une arthrite chronique à la mBSA. Les mesures sont effectuées avant l'induction de l'arthrite puis 7 heures, 1, 2, 3, 7 et 14 jours après l'induction de l'arthrite. Les résultats significatifs sont surlignés.

temps	MCP-1		IL-1 β		vEGF		IL-6		TNF- α	
	Arth.	Contro.	Arth.	Contro.	Arth.	Contro.	Arth.	Contro.	Arth.	Contro.
t 0	1 \pm 0,15	1 \pm 0,12	1 \pm 0,1	1 \pm 0,2	1 \pm 0,1	1 \pm 0,2	1 \pm 0,2	1 \pm 0,1	1 \pm 0,1	1.0 \pm 0,1
7 h	13,9\pm5,3	1,5 \pm 0,6	30,2\pm4,7	1,1 \pm 0,2	3,8\pm0,5	1,1 \pm 0,2	35,0\pm8,5	2,1 \pm 1,0	5,1\pm1,1	1.2 \pm 0,6
J1	5,9\pm1,9	1,1 \pm 0,2	49,6\pm29,4	1,0 \pm 0,2	20,0\pm8,2	1,1 \pm 0,3	12,2\pm2,6	1,2 \pm 0,3	11,7\pm4,7	1,2 \pm 0,3
J2	6,3 \pm 2,5	1,2 \pm 0,4	23,4\pm2,0	1,5 \pm 0,5	3,7\pm0,6	1,1 \pm 0,3	157, 5\pm21	1,2 \pm 0,3	0,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4
J3	7,2 \pm 2,7	1,2 \pm 0,22	11,0\pm2,7	1,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,4	1,0 \pm 0,2	58,2 \pm 6,4	1,4 \pm 0,6	0,7 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2
J7	3,3 \pm 0,7	1,0 \pm 0,2	5,9 \pm 2,3	1,1 \pm 0,2	0, \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	79, 7 \pm 42	1,1 \pm 0,3	0,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3
J14	3,2 \pm 1,4	1,1 \pm 0,21	2,3 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	28,7 \pm 7,1	1,3 \pm 0,5	0,8 \pm 0,4	1,2 \pm 0,4

Résultats présentés sous forme de delta delta Ct, relativement à RP29. Valeurs exprimées comme la moyenne \pm SEM (n=5 rats). * P < 0,05 en comparaison avec t0. Les résultats significatifs sont grisés. Arth = arthritique, Contro = controlatéral

L'expression en ARNm de MCP-1, IL-1 β , vEGF, IL-6 et TNF- α est significativement induite dans les 24 premières heures post induction. MCP-1 est le médiateur le plus rapidement induit avec un maximum d'induction de 14 fois dès 7 heures, s'en suivent l'IL-1 β , le vEGF et le TNF- α avec un pic d'induction après 24 heures (induction de 50, 20 et 12 fois respectivement). Par la suite, les taux d'expression décroissent rapidement pour retrouver leurs taux de base. L'IL-6 est elle continuellement significativement induite pendant les 14 jours avec néanmoins un pic d'induction après 48 heures de 157 fois.

2. Dans le cartilage articulaire.

Les taux d'expression de ces mêmes médiateurs complétés par l'étude de l'expression de MMP13 sont également évalués par RT-PCR quantitative à partir des ARNm extraits à partir des chondrocytes du cartilage articulaire.

Aucune différence d'expression significative n'est observée pour l'IL-1 β , MCP-1, vEGF, l'IL-6 et le TNF- α pendant les 14 jours de l'étude. Néanmoins nous observons que l'expression de MMP13 est induite très rapidement après l'induction de l'arthrite. Le taux d'expression est augmenté d'un facteur 3 après 7 heures, puis il y a retour à l'expression basale. Ceci confirme le rôle fondamental de la membrane synoviale dans la physiopathologie de ce modèle de mono-arthrite articulaire chronique à l'antigène.

B. Evolution de l'expression des médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial.

Pour compléter cette étude de l'expression des médiateurs inflammatoires, nous nous sommes intéressés à leur expression protéique à la fois dans le liquide synovial des genoux de rat mais également au niveau systémique. Nous avons ainsi dosé 24 médiateurs par Multiplex immuno-essai tout au long des 14 jours d'étude.

Les taux d'induction sont présentés sur la **Figure 110** ci-dessous :

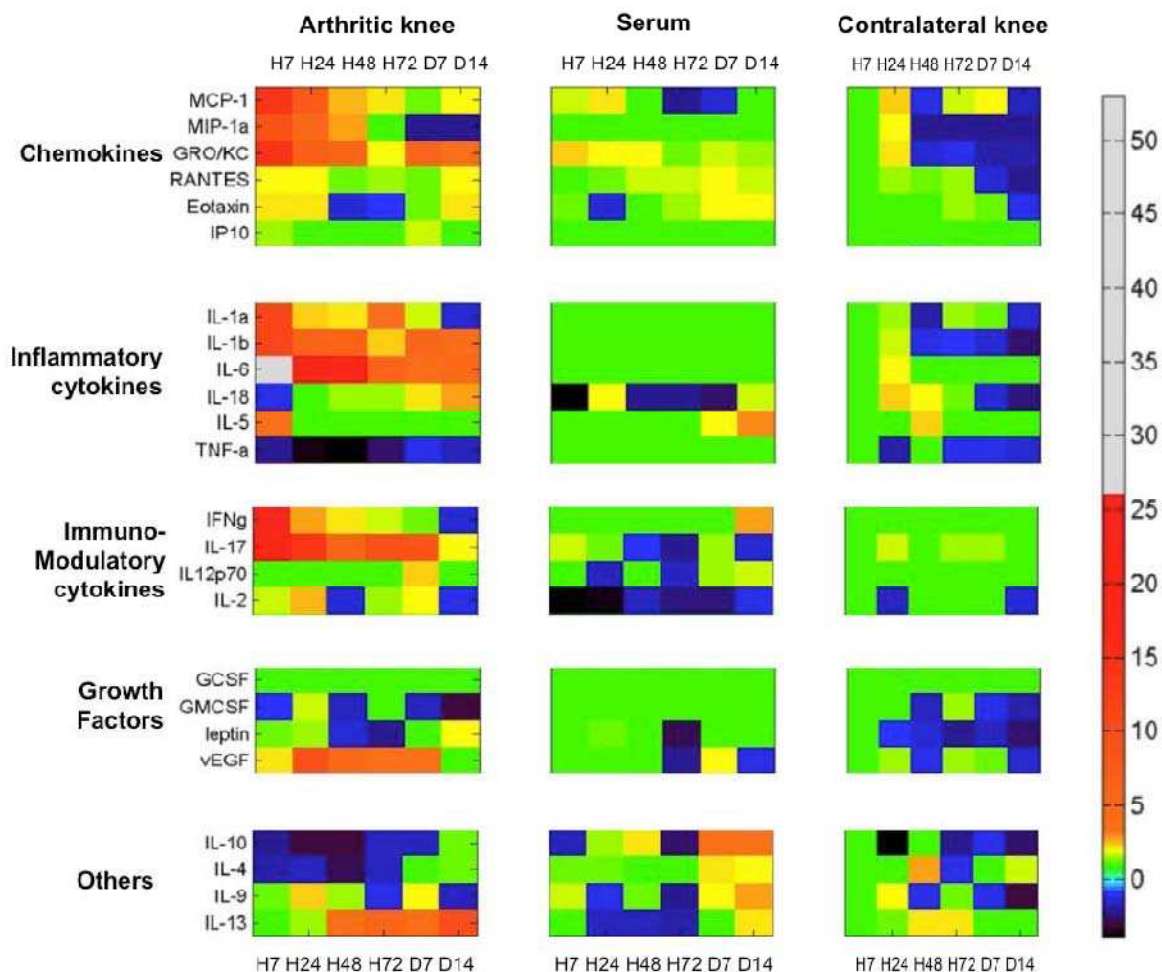


Figure 110 : Profil d'expression des médiateurs inflammatoires aux niveaux local et systémique pendant 14 jours après l'induction d'une arthrite à la mBSA. Les résultats sont présentés sous forme de taux d'induction ou d'inhibition. La couleur correspondant au taux d'expression basal, le gris correspond lui au taux d'induction maximal (x50) et le noir au taux d'inhibition maximal (/5).

1. Induction très précoce de l'expression locale des chémokines.

Le premier fait marquant de ces résultats concerne l'induction rapide de l'expression des chémokines dans le liquide synovial des genoux arthritiques. En effet, dès 7 heures nous observons que MCP-1, MIP-1 α , GRO/KC, l'éotaxine et RANTES sont significativement induites (induction de 14, 9, 14, 2 et 2 fois respectivement). Au niveau systémique, dans le sérum, nous observons que seuls GRO/KC, MCP-1 et RANTES sont induit (x2, x7, x2 et x1,8 respectivement). Nous nous sommes ainsi intéressé aux concentrations de ces médiateurs exprimés (Figure 111).

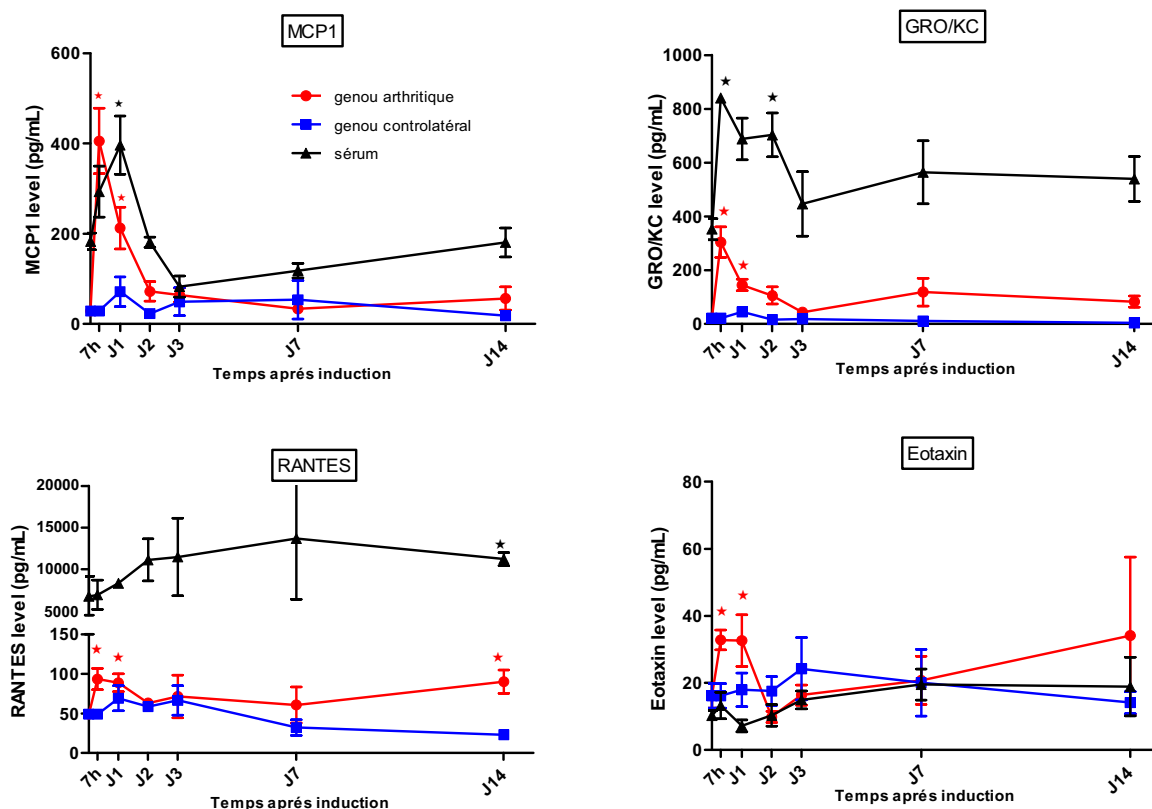


Figure 111 : Profil d'expression des chémokines au cours d'une arthrite à la mBSA aux niveaux local et systémique. Les mesures ont été effectuées juste avant l'induction de l'arthrite puis après 7 heures, 24 heures, 2, 3, 7 et 14 jours. Les résultats sont présentés en pg/mL sous la forme moyenne \pm SEM avec 7 rats par groupe et par temps. MCP-1= monocyte chemoattractant protein-1, RANTES = regulated on activation, normal T expressed and secreted, GRO/KC = Growth-Related Oncogen. * P < 0,05 en comparaison avec la mesure pré-arthritique.

Nous observons que les chémokines les plus fortement exprimées dans le liquide synovial sont MCP-1 et GRO/KC avec des concentrations de 350 à 400 pg/mL au moment du pic d'expression (7 heures). RANTES est exprimée à de fortes concentrations (15 ng/mL) dans le sérum alors que l'éotaxine est présente à de faibles concentrations, que ce soit dans le liquide synovial ou dans le sérum. Le profil d'expression avec un pic d'induction très précoce dans le liquide synovial est ici très apparent. RANTES est la seule chémokine à être significativement surexprimée après 14 jours, à la fois aux niveaux local et systémique.

2. Profil d'expression des cytokines pro-inflammatoires.

Les cytokines pro-inflammatoires suivies lors de cette étude sont également exprimées de manière précoce, mais les concentrations de chacune d'entre elles varient fortement (Figure 112).

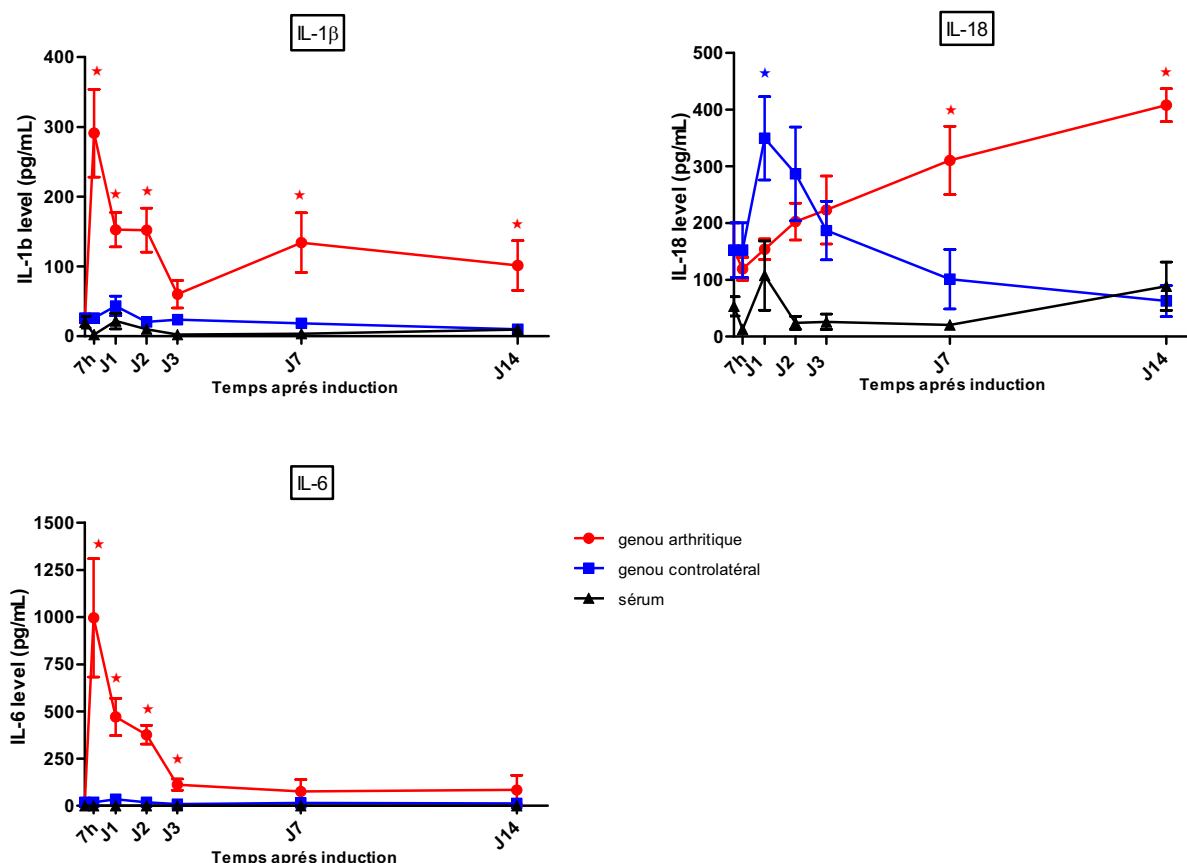


Figure 112 : Profil d'expression des cytokines pro-inflammatoires au cours d'une arthrite à la mBSA aux niveaux local et systémique. Les mesures ont été effectuées juste avant l'induction de l'arthrite puis après 7 heures, 24 heures, 2, 3, 7 et 14 jours. Les résultats sont présentés en pg/mL sous la forme de moyennes \pm SEM avec 7 rats par groupe et par temps. IL = Interleukine. * $p < 0,05$.

Nous observons que l'interleukine 6 est la cytokine pro-inflammatoire exprimée aux concentrations les plus importantes dans le liquide synovial avec un pic à 1 ng/mL après 7 heures. Par la suite, la concentration locale en IL-6 des genoux arthritiques décroît mais reste significativement supérieure à celles des genoux controlatéraux jusque J14. L'IL-1 β a un profil d'expression comparable mais avec des concentrations plus faibles : pic d'expression après 7 heures (induction x12) puis décroissance progressive. L'IL-1 α a également un pic d'expression après 7 heures (x12 également) mais son expression retrouve son taux basal dès 24 heures. Il est à noter que pour ces deux cytokines il n'existe pas de variations de leur expression ni dans les genoux controlatéraux ni dans le sérum. Le profil d'expression de l'IL-18 est lui différent. En effet, dans le liquide synovial des genoux arthritiques, l'IL-18 est progressivement surexprimée avec un pic à J14 (x3 à 400 pg/mL). Nous observons que dans le genou controlatéral il existe une augmentation significative de la concentration en IL-18 à 24 heures (x2,2 à 300 pg/mL) mais celle-ci disparaît dès 48 heures. Dans le sérum, aucune variation significative de l'expression en IL-18 n'est observée. L'expression de l'IL-5 n'est elle pas affecté au cours de ce modèle, et les concentrations en TNF- α ont tendance à diminuer au cours du modèle. Ceci peut s'expliquer par le fait que le TNF est exprimé de manière très précoce au cours du processus inflammatoire et nous émettons l'hypothèse qu'il

serait nécessaire d'effectuer une mesure de cette cytokine à un temps plus précoce (3 heures dans la bibliographie).

3. Expression des cytokines immuno-modulatrices.

Nous avons également étudié le profil d'expression des cytokines immuno-modulatrices IL-2, IL-17, IL12p70 et l'interféron gamma (IFN γ) (**Figure 113**).

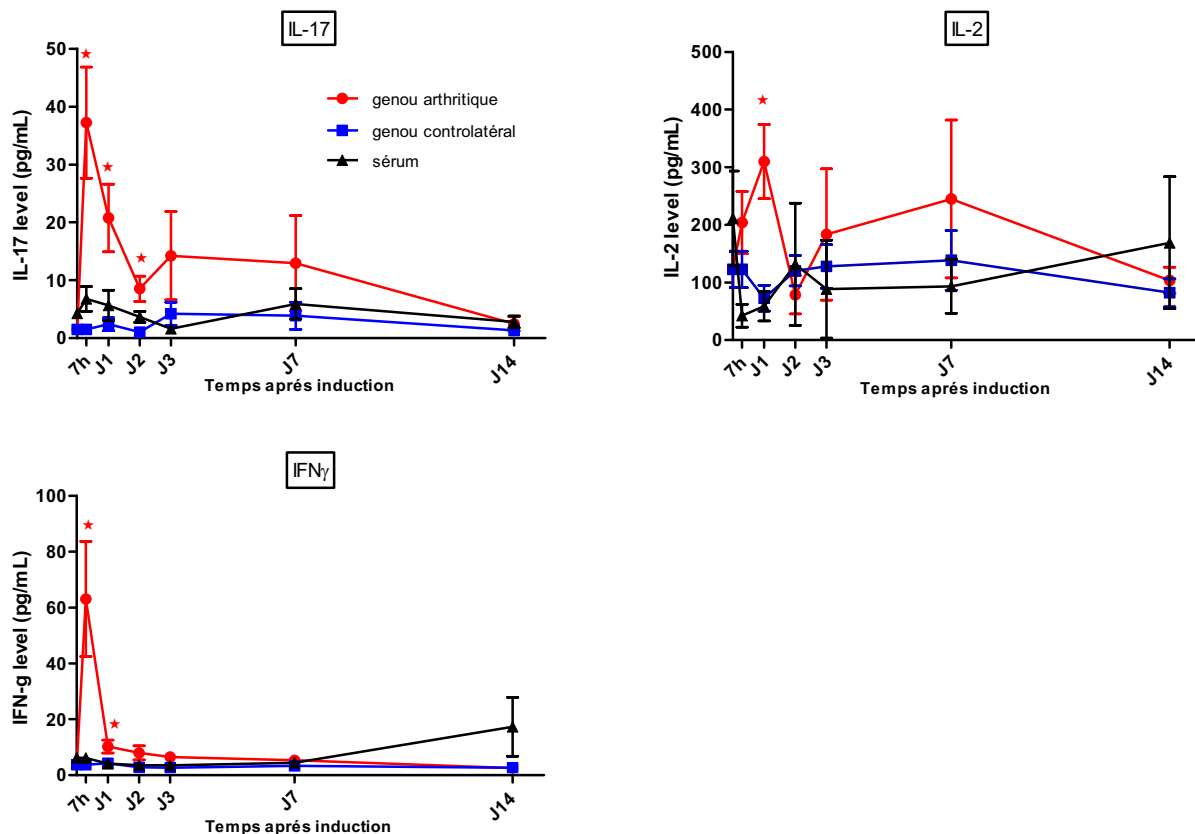


Figure 113 : Profil d'expression des cytokines immuno-modulatrices au cours d'une arthrite à la mBSA aux niveaux local et systémique. Les mesures ont été effectuées juste avant l'induction de l'arthrite puis après 7 heures, 24 heures, 2, 3, 7 et 14 jours. Les résultats sont présentés en pg/mL sous la forme de moyenne \pm SEM avec 7 rats par groupe et par temps. *p<0,05.

Les cytokines immuno-modulatrices étudiées ne présentent pas de variation de leur expression dans les genoux controlatéraux et dans le sérum. Dans le liquide articulaire des genoux arthritiques, l'IL-17 et l'IFN γ sont exprimés très précocement (pic à 7heures) à des concentrations assez faibles, 40 à 60 pg/mL. L'interleukine 2 est exprimée à une concentration basale de 120 pg/mL dans le liquide synovial et connaît un pic d'expression dans les genoux arthritiques à 24 heures (300 pg/mL) puis retourne à son niveau basal jusque J14. L'expression de IL-12p70 ne varie pas, ni dans le liquide synovial, ni dans le sérum et se trouve à de faibles concentrations, de l'ordre de 5 pg/mL.

4. Cinétique d'expression des facteurs de croissance.

Les facteurs de croissance que nous avons suivis au cours de cette étude (GCSF, GMCSF, vEGF et leptine) ont montré peu de variations dans leur expression, que ce soit au niveau local, ou systémique. Nous avons cependant observé que la leptine se trouve à de fortes concentrations dans le sérum (4 à 5ng/mL) et que dans le liquide synovial des genoux arthritiques, ce médiateur est significativement surexprimé après 14 jours. L'expression de vEGF est elle rapidement induite au niveau des genoux arthritiques avec un pic d'expression après 24 heures puis son taux d'expression décroît progressivement pour retrouver son taux basal après 14 jours.

5. Cas particuliers : Profil d'expression de l'IL-9 et de l'IL-13.

Nous avons suivi l'évolution de l'expression de 2 interleukines peu ou pas décrites dans la physiopathologie de l'arthrite. L'IL-9 et l'IL-13 présentent des profils d'expression intéressants dans le liquide synovial des genoux arthritiques (**Figure 114**).

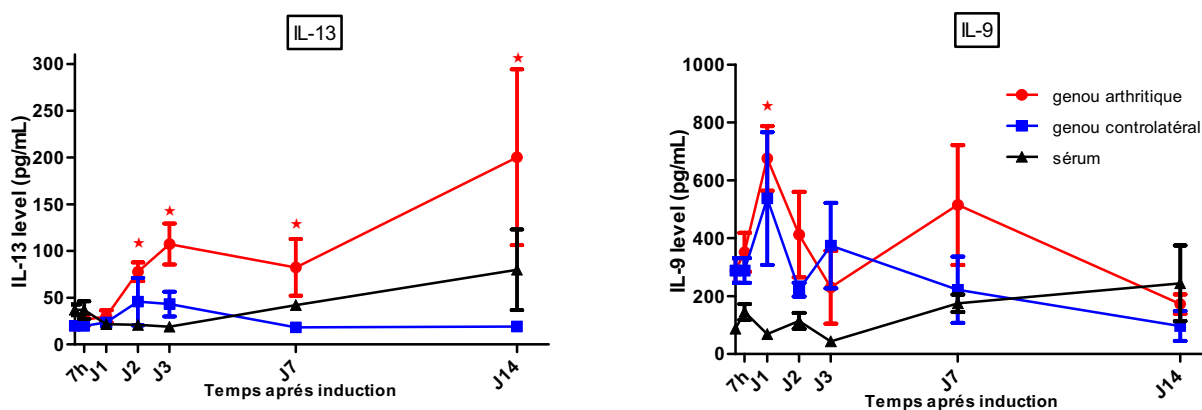


Figure 114 : Profil d'expression des interleukines 9 et 13 au cours de l'établissement d'un modèle de mono-arthrite articulaire à la mBSA. Les concentrations de ces médiateurs sont mesurées dans le liquide synovial des genoux ainsi que dans le sérum des rats. Les résultats sont présentés en pg/mL sous la forme de moyennes \pm SEM avec 7 rats par groupe et par temps. * $p < 0,05$.

Nous observons que les variations d'expression ne sont présentes qu'au niveau local, l'IL-13 qui est induite progressivement jusque J14 et un pic d'expression en IL-9 qui est présent 24 heures après l'induction de l'arthrite à une concentration importante (700 pg/mL).

III. Caractérisation histologique des lésions articulaires.

A. Perte de biosynthèse des protéoglycannes (PG) dans le cartilage articulaire.

Nous avons étudié l'évolution de la biosynthèse des PG dans le cartilage articulaire par incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (Figure 115).

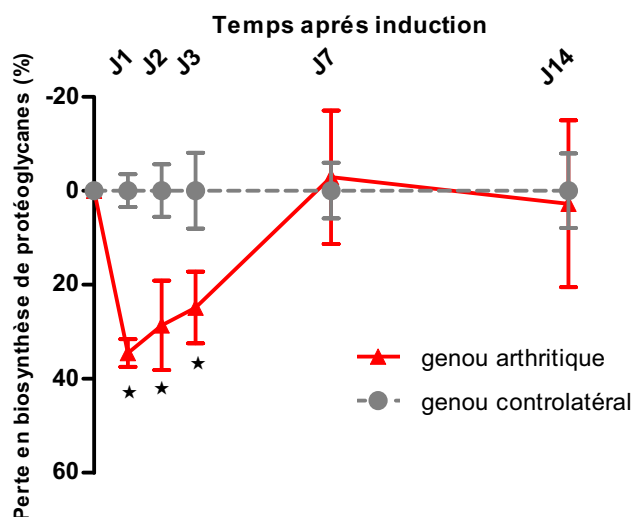


Figure 115 : Cinétique d'évolution de la biosynthèse de protéoglycannes dans le cartilage rotulien de genoux de rats arthritiques ou non. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de perte d'anabolisme, moyenne \pm SEM (n=7 rats par groupe). *p<0,05 en comparaison avec les rats non arthritiques.

Nous observons que la perte en biosynthèse de protéoglycannes est maximale après 24 heures (perte de 36 %) et reste significative jusqu'à 72 heures avant de devenir nulle de J7 à J14. L'induction de l'arthrite à la mBSA a donc un effet rapide et temporaire sur la biosynthèse des PG dans le cartilage articulaire.

B. Analyse histologique des tissus articulaires.

Nous avons effectué une analyse des différents tissus articulaires, à savoir l'os, le cartilage et la membrane synoviale.

1. Analyse des tissus cartilagineux et osseux.

Les tissus osseux et cartilagineux ont été scorés indépendamment afin d'étudier l'évolution progressive des lésions articulaires (Figure 116).

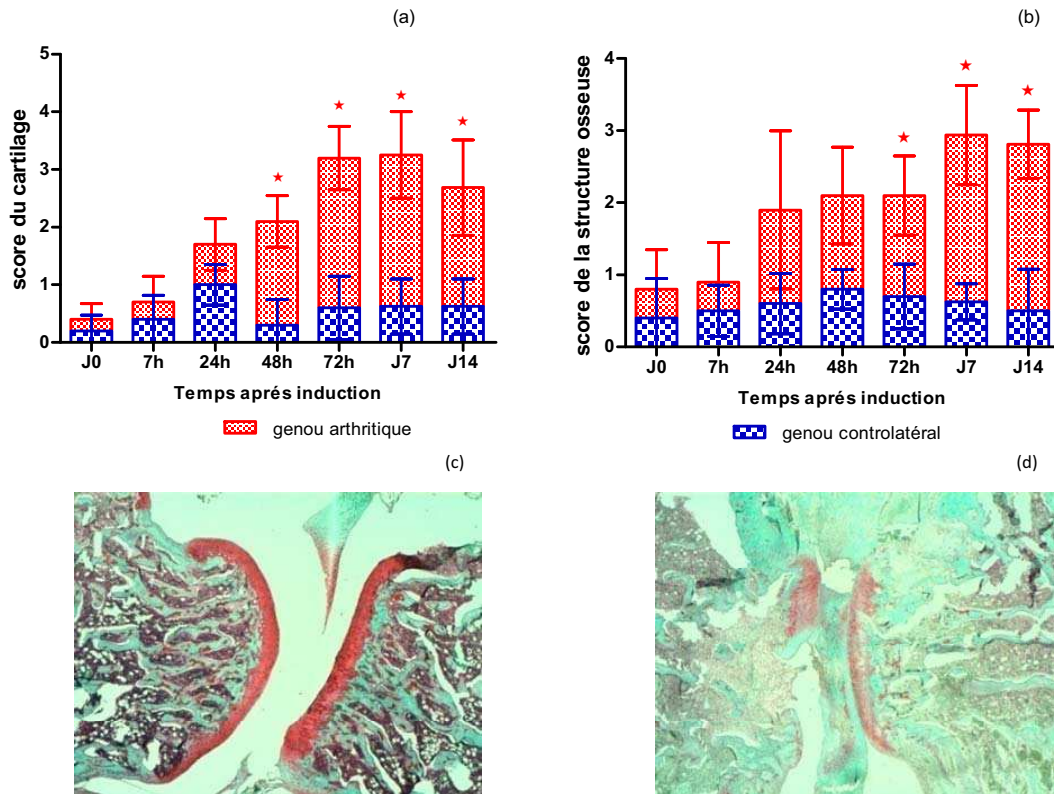


Figure 116 : Evolution des scores histologiques du tissu cartilagineux (a) et des structures osseuses (b) au niveau des genoux de rat, atteints ou non d'une arthrite à la mBSA, sur une période de 14 jours. Coupes histologiques (coloration Safranine-O, grossissement x10) de genoux de rat sain (c) et arthritiques (d) après 14 jours. *p<0,05.

Nous observons que les atteintes cartilagineuses deviennent significatives 48 heures après l'induction de l'arthrite et le restent jusque J14. Comme nous le voyons sur les images de coupes histologiques, ces atteintes sont progressives jusque J14 avec une perte quasi-totale du cartilage dans certains cas. Le même phénomène est observé avec les structures osseuses, néanmoins celles-ci sont plus tardives (significatives à partir de J3). A J14, les remaniements osseux sont importants avec une diminution des structures trabéculaires et une atteinte de la région corticale.

2. Analyse du tissu synovial.

Nous avons effectué un score du tissu synovial sur la période de 14 jours d'arthrite à la mBSA. Les résultats obtenus sont présentés sur le **Tableau 12** ci-dessous.

Tableau 12 : Score histologique des membranes synoviales des genoux de rats arthritiques ou non. L'évaluation des différents paramètres est effectuée avant l'induction de l'arthrite puis à 7 heures, 24 heures, 2 jours, 3 jours, 7 et 14 jours.

temps	Hyperplasie synoviale		fibrose		prolifération des vaisseaux		Infiltration diffuse		Infiltration périvasculaire	
	Arth.	Contr.	Arth.	Contr.	Arth.	Contr.	Arth.	Contr.	Arth.	Contr.
J 0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
7 h	1.2 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.2* ± 0.2	0.8 ± 0.4	2.8* ± 0.6	1.6* ± 0.6
J 1	1.6* ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.6* ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2	2.2* ± 0.4	1.0 ± 0.0	2.0* ± 0.5	1.8* ± 0.4
J 2	2* ± 0.3	0.2 ± 0.2	2.4* ± 0.3	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.0	0.6 ± 0.4	3.4* ± 0.3	0.4 ± 0.3	2.6* ± 0.5	0.4 ± 0.3
J 3	3.2* ± 0.6	0.4 ± 0.3	2.2* ± 0.5	0.6 ± 0.3	1.8* ± 0.2	0.8 ± 0.4	3.4* ± 0.4	0.4 ± 0.3	2.0* ± 0.5	0.4 ± 0.3
J 7	2.5* ± 0.7	0.3 ± 0.3	3.5* ± 0.3	0.3 ± 0.3	2.5* ± 0.5	0.5 ± 0.3	2.8* ± 0.6	0.3 ± 0.4	1.8* ± 0.5	0.4 ± 0.4
J 14	3.3* ± 0.5	0.0 ± 0.0	4.0* ± 0.0	0.3 ± 0.3	1.8 ± 0.5	1.0 ± 0.4	2.0* ± 0.0	0.3 ± 0.3	1.8* ± 0.3	0.8 ± 0.3

Valeurs présentées sous la forme moyenne ± SEM. *p<0.05, test t de Student. Arth = arthritiques, Contr = controlatéral

Nous observons que dès 7 heures, il existe une infiltration perivasculaire du tissu synovial arthritique. Cette infiltration tend ensuite à diminuer mais reste significativement élevée comparativement aux genoux sains. L'infiltration diffuse maximale de la membrane synoviale est observée après 24 à 48 heures et est positivement corrélée à l'infiltration périvasculaire (coeff de Spearman $r_s=0,76$) et peut être relié à l'augmentation du nombre de vaisseaux observée dans les genoux arthritiques. Nous observons également une hyperplasie de la membrane synoviale dans les genoux arthritiques dès 24 heures et jusque J14. De même, une fibrose progressive dès J1 de ce tissu est observée (maximale à J14) dans les genoux arthritiques.

IV. Conclusions et perspectives offertes par la caractérisation de ce modèle d'arthrite à la mBSA.

Cette étude conforte la validité du modèle de mono-arthrite à la mBSA comme support expérimental de PR, tant à l'échelon local que systémique. En effet, l'évolution des paramètres que nous avons observée révèle de nombreuses similitudes avec ce qui s'observe dans l'établissement de la PR (infiltration synoviale, dégradation progressive des structures articulaires, profil cytokinique). La limitation de cette étude concerne le fait que nous n'avons pas pu mettre en évidence la sécrétion du TNF alpha dans le liquide synovial. Cependant, il est classique que cette cytokine soit sécrétée de manière très précoce et qu'il soit donc nécessaire de se placer 2 à 3 heures seulement après l'induction de l'arthrite pour pouvoir la détecter (320). Une seconde conclusion que nous pouvons tirer de cette étude est que les modifications d'expression cytokiniques intra-articulaires prévalent sur les variations systémiques. Nous avons mis en évidence que le profil cytokinique dans la voie systémique n'est sujet qu'à de faibles modifications.

Des perspectives intéressantes découlent également de cette étude. Le suivi d'un large panel de médiateurs nous a permis de mettre en évidence de profil d'expression de médiateurs peu ou pas décrits dans la PR jusqu'à présent. Ceci nous a poussé à tenter d'établir des corrélations entre les médiateurs étudiés et les atteints histologiques observées (**Figure 117**).

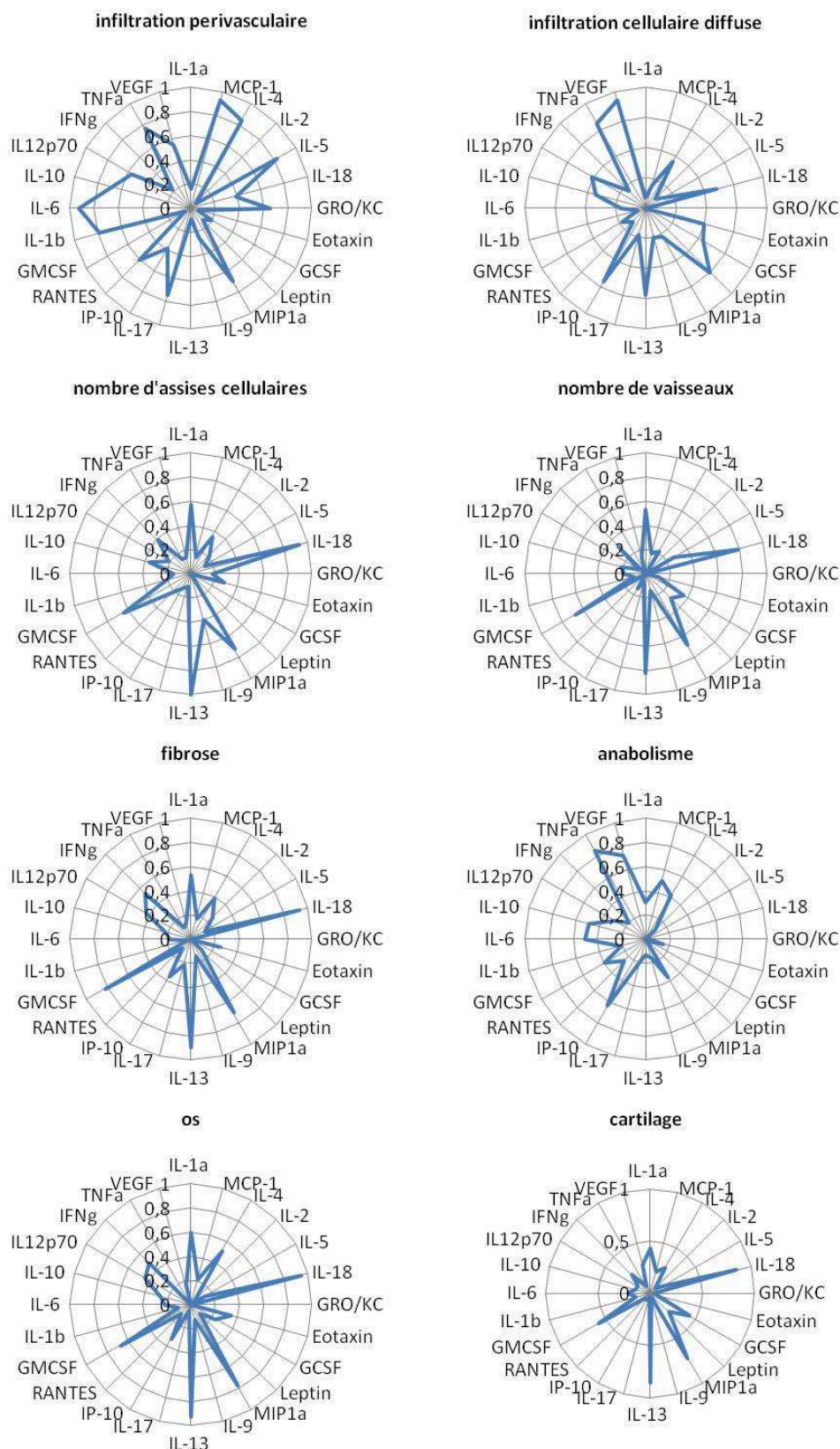


Figure 117 : Représentation schématique des corrélations (Spearman) existant entre le profil d'expression des médiateurs et les atteintes histologiques observées au cours de l'établissement d'une mono-arthrite chronique à la BSA méthylée.

Sur cette représentation schématique, nous observons que l'infiltration des tissus synoviaux semble corrélée au profil d'expression des chémokines étudiées. De manière intéressantes, des chémokines peu décrites jusqu'alors dans cette pathologie (Eotaxine, GRO/KC) présentent un profil d'expression comparable à celui des chémokines couramment décrites (MCP1, RANTES) (333). Nous pouvons également noter que les profils d'expression de l'IL-18 et de l'IL-13 sont corrélés aux atteintes cartilagineuses et osseuses. De récentes études (334, 335) soulignent l'importance de l'IL-18 dans la physiopathologie de l'arthrite. Ce type d'étude est permet d'ouvrir des perspectives d'études sur les médiateurs peu décrits jusqu'alors (336) tels que l'IL-13 (décrit essentiellement dans la fibrose et les réactions allergiques (337)) et l'IL-9 (réactions allergiques). A ce titre, une étude toute récente souligne le rôle de l'éotaxine dans la physiopathologie de l'arthrite (330).

Annexe II

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Conclusions :

Le travail réalisé au cours de cette thèse nous a permis de démontrer l'intérêt d'un oligonucléotide de type « Triplex Forming Oligonucléotide » pour inhiber l'expression du TNF-alpha tant sur des cellules articulaires murines qu'humaines *in vitro*. Nous avons pu mettre en évidence les avancées permises par ce type d'oligonucléotide « TFO » puisque l'IC₅₀ obtenue est 1000 fois inférieure à celle observée avec des techniques classiques (ODNs, siRNAs). Ce ciblage spécifique en amont de la synthèse protéique présente l'avantage d'avoir un nombre de cibles très limité (le nombre de copies d'un gène étant très inférieur au nombre de copies de l'ARN messenger surtout dans le cas de médiateurs inflammatoires tels que le TNF- α). Cette étude *in vitro* nous a également permis de mettre en évidence l'impact de l'inhibition de l'expression des messagers du TNF- α sur l'expression des médiateurs inflammatoires IL-1 β , IL-6 et iNos. Malheureusement nous ne pouvons apporter que des hypothèses à ce phénomène, le travail effectué sur la stabilité des ARNm ne nous ayant pas apporté de réponses claires.

Cette inhibition de l'expression du TNF-alpha dans les différents contingents cellulaires présents dans l'articulation nous a permis d'envisager l'utilisation du TFO dans des modèles expérimentaux d'arthrite. En effet, nous supposons qu'il serait possible, d'une part, de diminuer la production de médiateurs de l'inflammation par la membrane synoviale (site majeur de la réaction inflammatoire lors d'une arthrite) mais également, de protéger les cellules articulaires (chondrocytes) des taux résiduels de cytokines présents au sein de l'articulation et provoquant la dégradation des structures osseuses et cartilagineuses.

La comparaison des stratégies TFO et siRNA dans un modèle d'arthrite expérimentale de screening nous a permis de confirmer l'efficacité accrue du TFO vis-à-vis du TFO lors d'une réaction inflammatoire aiguë. Cette efficacité se traduit tant pour les paramètres cliniques (taille de l'œdème, douleur) et biochimiques (inhibition de l'expression des médiateurs inflammatoires dans les tissus articulaires et le liquide synovial) que pour les paramètres histologiques. En effet, les lésions des tissus synoviaux, osseux et cartilagineux sont protégées de manière plus prononcée avec l'utilisation du TFO.

Ces premiers résultats nous ont amené à confirmer le potentiel de cette approche triple hélice dans un modèle d'arthrite expérimentale chez le rat présentant une physiopathologie proche de celle de la PR. Dans le modèle d'arthrite à la BSA méthylée, le traitement local préventif par le TFO permet en effet de limiter l'évolution de la pathologie. Ces observations ouvrent de réelles perspectives quant à l'utilisation de ce type d'oligonucléotides pour la prise en charge de pathologies inflammatoires.

Perspectives.

Ces travaux génèrent de nombreuses perspectives tant d'un point de vue mécanistique que thérapeutique.

Pour ce qui concerne les études *in vitro*, deux points restent en suspend. Il conviendrait d'abord d'approfondir notre travail portant sur l'interaction du TFO avec le promoteur du

TNF- α . Les problèmes de fonctionnalité des constructions contenant ce promoteur ne nous ont pas permis de valider de manière directe la fixation du TFO sur sa zone putative de fixation dans la région promotrice. Des expérimentations de retard sur gel sont envisagées. Il conviendrait ensuite de travailler sur les effets collatéraux générés par l'inhibition de l'expression des messagers du TNF- α , et notamment sur la régulation de la stabilité des ARNm via la fixation de protéines sur la région 3'UTR. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de supposer que ce phénomène passe par un changement de stabilité des ARNm concernés. Néanmoins, ces travaux doivent être complétés pour confirmer nos hypothèses.

Pour les études *in vivo*, les expérimentations que nous avons réalisées concernent un traitement préventif. Il serait envisageable de tester l'efficacité d'un traitement local avec des doses en TFO inférieures à celles que nous avons utilisées au cours de nos expériences (10 μ g). Il serait également possible d'évaluer l'efficacité de ce concept dans un traitement curatif sur des modèles expérimentaux à plus long terme. De cela découle une seconde perspective de travail sur la vectorisation de notre TFO. Dans nos études, le renforcement du TFO nous a permis de le vectoriser localement sans agent de transfection du fait de sa neutralité. Si l'on envisage un traitement par voie systémique, un travail sur la biodistribution du TFO et son relargage sera nécessaire. Un projet en développement concerne l'encapsulation de TFO dans des systèmes nanoparticulaires qui permettrait un release progressif de ce principe actif.

TRAVAUX PUBLIES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Chevalier, X. R., P. (2005) Normal joint cartilage : anatomy, physiology, metabolism, ageing. *EMC-Rhumatologie Orthopédie* **2**, 41-58.
2. Treilleux, I., Mallein-Gerin, F., le Guellec, D., & Herbage, D. (1992) Localization of the expression of type I, II, III collagen, and aggrecan core protein genes in developing human articular cartilage. *Matrix (Stuttgart, Germany)* **12**, 221-232.
3. Aydelotte, M. B., Raiss, R. X., Caterson, B., & Kuettner, K. E. (1992) Influence of interleukin-1 on the morphology and proteoglycan metabolism of cultured bovine articular chondrocytes. *Connective tissue research* **28**, 143-159.
4. Buckwalter, K. A. & Pennes, D. R. (1990) Anterior cruciate ligament: oblique sagittal MR imaging. *Radiology* **175**, 276-277.
5. Roth, V. & Mow, V. C. (1980) The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *The Journal of bone and joint surgery* **62**, 1102-1117.
6. Guilak, F., Ratcliffe, A., Lane, N., Rosenwasser, M. P., & Mow, V. C. (1994) Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* **12**, 474-484.
7. Madry, H., van Dijk, C. N., & Mueller-Gerbl, M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **18**, 419-433.
8. Saito, T., Fukai, A., Mabuchi, A., Ikeda, T., Yano, F., *et al.* Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nature medicine*.
9. Snelling, S. J., Hulley, P. A., & Loughlin, J. BMP5 activates multiple signaling pathways and promotes chondrogenic differentiation in the ATDC5 growth plate model. *Growth factors (Chur, Switzerland)*.
10. Terry, D. E., Rees-Milton, K., Smith, P., Carran, J., Pezeshki, P., *et al.* (2005) N-acylation of glucosamine modulates chondrocyte growth, proteoglycan synthesis, and gene expression. *The Journal of rheumatology* **32**, 1775-1786.
11. Rajpurohit, R., Koch, C. J., Tao, Z., Teixeira, C. M., & Shapiro, I. M. (1996) Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *Journal of cellular physiology* **168**, 424-432.
12. Lafont, J. E. Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *International journal of experimental pathology* **91**, 99-106.
13. Otte, P. (1991) Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Zeitschrift fur Rheumatologie* **50**, 304-312.
14. Shlopov, B. V., Lie, W. R., Mainardi, C. L., Cole, A. A., Chubinskaya, S., *et al.* (1997) Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis and rheumatism* **40**, 2065-2074.
15. Flannery, C. R., Little, C. B., Hughes, C. E., & Caterson, B. (1998) Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochemical and biophysical research communications* **251**, 824-829.
16. Muir, H. (1995) The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* **17**, 1039-1048.
17. Mokonyimobe, E., Hecquet, C., Robic, D., Bourbouze, R., & Adolphe, M. (1992) Hexosaminidase and alkaline phosphatase activities in articular chondrocytes and relationship to cell culture conditions. *Experientia* **48**, 396-398.
18. Marcelino, J. & McDevitt, C. A. (1995) Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. *Biochimica et biophysica acta* **1249**, 180-188.
19. Mollenhauer, J., Bee, J. A., Lizarbe, M. A., & von der Mark, K. (1984) Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *The Journal of cell biology* **98**, 1572-1579.
20. Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., *et al.* (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of cell biology* **8**, 365-393.
21. Schneiderman, R., Keret, D., & Maroudas, A. (1986) Effects of mechanical and osmotic pressure on the rate of glycosaminoglycan synthesis in the human adult femoral head cartilage: an in vitro study. *J Orthop Res* **4**, 393-408.
22. Wilkins, R. J. & Hall, A. C. (1995) Control of matrix synthesis in isolated bovine chondrocytes by extracellular and intracellular pH. *Journal of cellular physiology* **164**, 474-481.
23. Sommarin, Y., Larsson, T., & Heinegard, D. (1989) Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Experimental cell research* **184**, 181-192.
24. Huber, M., Trattng, S., & Lintner, F. (2000) Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Investigative radiology* **35**, 573-580.

Références bibliographiques

25. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., & Yang, B. B. (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell research* **12**, 19-32.
26. Vincourt, J. B., Etienne, S., Cottet, J., Delaunay, C., Malanda, C. B., *et al.* C-propeptides of procollagens I α 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer research* **70**, 4739-4748.
27. Petit, B., Ronziere, M. C., Hartmann, D. J., & Herbage, D. (1993) Ultrastructural organization of type XI collagen in fetal bovine epiphyseal cartilage. *Histochemistry* **100**, 231-239.
28. Eyre, D. (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis research* **4**, 30-35.
29. Bruckner, P. & van der Rest, M. (1994) Structure and function of cartilage collagens. *Microscopy research and technique* **28**, 378-384.
30. Roughley, P. J. & Lee, E. R. (1994) Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microscopy research and technique* **28**, 385-397.
31. Sandy, J. D., Flannery, C. R., Neame, P. J., & Lohmander, L. S. (1992) The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *The Journal of clinical investigation* **89**, 1512-1516.
32. Roughley, P. J., Melching, L. I., & Recklies, A. D. (1994) Changes in the expression of decorin and biglycan in human articular cartilage with age and regulation by TGF-beta. *Matrix Biol* **14**, 51-59.
33. Font, B., Eichenberger, D., Goldschmidt, D., Boutillon, M. M., & Hulmes, D. J. (1998) Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis--critical roles for disulphide bonding and the C-terminal region. *European journal of biochemistry / FEBS* **254**, 580-587.
34. Tsuji, T., Okada, F., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. (1990) Molecular cloning of the large subunit of transforming growth factor type beta masking protein and expression of the mRNA in various rat tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8835-8839.
35. Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L. M., Heinegard, D., Twardzik, D. R., *et al.* (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *The Biochemical journal* **302 (Pt 2)**, 527-534.
36. Matsushita, N., Kashiwagi, M., Wait, R., Nagayoshi, R., Nakamura, M., *et al.* (2002) Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clinical and experimental immunology* **130**, 156-161.
37. Rowan, A. D., Koshy, P. J., Shingleton, W. D., Degnan, B. A., Heath, J. K., *et al.* (2001) Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis and rheumatism* **44**, 1620-1632.
38. Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H., & Nozawa-Inoue, K. (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Archives of histology and cytology* **63**, 17-31.
39. FitzGerald, O. & Bresnihan, B. (1995) Synovial membrane cellularity and vascularity. *Annals of the rheumatic diseases* **54**, 511-515.
40. Fam, H., Bryant, J. T., & Kontopoulou, M. (2007) Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* **44**, 59-74.
41. Edwards, J. C. (1994) The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *Journal of anatomy* **184 (Pt 3)**, 493-501.
42. Woolley, D. E. & Tetlow, L. C. (1997) Observations on the microenvironmental nature of cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **56**, 151-161.
43. Cooke, T. D., Sumi, M., & Maeda, M. (1985) Nicolas Andry Award, 1984. Deleterious interactions of immune complexes in cartilage of experimental immune arthritis. I. The erosion of pannus-free hyaline cartilage. *Clinical orthopaedics and related research*, 235-245.
44. Berenbaum, F. (1998) 'Rheumatoid chondritis' or the place of cartilage in rheumatoid inflammation. *British journal of rheumatology* **37**, 4-6.
45. Feldmann, M. & Maini, R. N. (2002) Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. *Joint Bone Spine* **69**, 12-18.
46. MacGregor, A. J., Snieder, H., Rigby, A. S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., *et al.* (2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis and rheumatism* **43**, 30-37.
47. Silman, A., Kay, A., & Brennan, P. (1992) Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **35**, 152-155.

Références bibliographiques

48. Brennan, P. & Silman, A. (1994) Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **37**, 808-813.
49. Cutolo, M., Serio, B., Villaggio, B., Pizzorni, C., Craviotto, C., et al. (2002) Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **966**, 131-142.
50. Begovich, A. B., Carlton, V. E., Honigberg, L. A., Schrodi, S. J., Chokkalingam, A. P., et al. (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics* **75**, 330-337.
51. Plenge, R. M., Seielstad, M., Padyukov, L., Lee, A. T., Remmers, E. F., et al. (2007) TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *The New England journal of medicine* **357**, 1199-1209.
52. Plenge, R. M., Cotsapas, C., Davies, L., Price, A. L., de Bakker, P. I., et al. (2007) Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nature genetics* **39**, 1477-1482.
53. Gregersen, P. K., Silver, J., & Winchester, R. J. (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **30**, 1205-1213.
54. Hill, J. A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A. M., Bell, D. A., et al. (2003) Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* **171**, 538-541.
55. Emery, P., Salmon, M., Bradley, H., Wordsworth, P., Tunn, E., et al. (1992) Genetically determined factors as predictors of radiological change in patients with early symmetrical arthritis. *BMJ (Clinical research ed)* **305**, 1387-1389.
56. Gough, A., Faint, J., Salmon, M., Hassell, A., Wordsworth, P., et al. (1994) Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome. *Arthritis and rheumatism* **37**, 1166-1170.
57. Weyand, C. M., McCarthy, T. G., & Goronzy, J. J. (1995) Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* **95**, 2120-2126.
58. Combe, B., Eliaou, J. F., Daures, J. P., Meyer, O., Clot, J., et al. (1995) Prognostic factors in rheumatoid arthritis. Comparative study of two subsets of patients according to severity of articular damage. *British journal of rheumatology* **34**, 529-534.
59. Pinet, V., Combe, B., Avinens, O., Caillat-Zucman, S., Sany, J., et al. (1997) Polymorphism of the HLA-DMA and DMB genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **40**, 854-858.
60. Nieto, A., Caliz, R., Pascual, M., Mataran, L., Garcia, S., et al. (2000) Involvement of Fc gamma receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **43**, 735-739.
61. Nieto, A., Pascual, M., Caliz, R., Mataran, L., & Martin, J. (2002) Association of Fc gamma receptor IIIA polymorphism with rheumatoid arthritis: comment on the article by Morgan et al. *Arthritis and rheumatism* **46**, 556-559.
62. Lard, L. R., van Gaalen, F. A., Schonkeren, J. J., Pieterman, E. J., Stoeken, G., et al. (2003) Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**, 1841-1848.
63. Udalova, I. A., Richardson, A., Ackerman, H., Wordsworth, P., & Kwiatkowski, D. (2002) Association of accelerated erosive rheumatoid arthritis with a polymorphism that alters NF-kappaB binding to the TNF promoter region. *Rheumatology (Oxford, England)* **41**, 830-831.
64. Buchs, N., Silvestri, T., di Giovine, F. S., Chabaud, M., Vannier, E., et al. (2000) IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection against destruction. *Rheumatology (Oxford, England)* **39**, 1126-1131.
65. Buchs, N., di Giovine, F. S., Silvestri, T., Vannier, E., Duff, G. W., et al. (2001) IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes and immunity* **2**, 222-228.
66. Klinman, D. (2003) Does activation of the innate immune system contribute to the development of rheumatoid arthritis? *Arthritis and rheumatism* **48**, 590-593.
67. Silman, A. J., Newman, J., & MacGregor, A. J. (1996) Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis and rheumatism* **39**, 732-735.
68. Cawston, T. (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Molecular medicine today* **4**, 130-137.

Références bibliographiques

69. Nagase, H. & Woessner, J. F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* **274**, 21491-21494.
70. Mort, J. S., Magny, M. C., & Lee, E. R. (1998) Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neoepitope. *The Biochemical journal* **335 (Pt 3)**, 491-494.
71. Baragi, V. M., Fliszar, C. J., Conroy, M. C., Ye, Q. Z., Shipley, J. M., *et al.* (1994) Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-terminal truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally compromised binding affinities as compared to full-length stromelysin. *The Journal of biological chemistry* **269**, 12692-12697.
72. Sanchez-Lopez, R., Alexander, C. M., Behrendtsen, O., Breathnach, R., & Werb, Z. (1993) Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**, 7238-7247.
73. Ward, R. V., Atkinson, S. J., Reynolds, J. J., & Murphy, G. (1994) Cell surface-mediated activation of progelatinase A: demonstration of the involvement of the C-terminal domain of progelatinase A in cell surface binding and activation of progelatinase A by primary fibroblasts. *The Biochemical journal* **304 (Pt 1)**, 263-269.
74. Little, C. B., Hughes, C. E., Curtis, C. L., Janusz, M. J., Bohne, R., *et al.* (2002) Matrix metalloproteinases are involved in C-terminal and interglobular domain processing of cartilage aggrecan in late stage cartilage degradation. *Matrix Biol* **21**, 271-288.
75. Wu, W., Billingham, R. C., Pidoux, I., Antoniou, J., Zukor, D., *et al.* (2002) Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis and rheumatism* **46**, 2087-2094.
76. Hollander, A. P., Heathfield, T. F., Webber, C., Iwata, Y., Bourne, R., *et al.* (1994) Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *The Journal of clinical investigation* **93**, 1722-1732.
77. Billingham, R. C., Wu, W., Ionescu, M., Reiner, A., Dahlberg, L., *et al.* (2000) Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis and rheumatism* **43**, 664-672.
78. Dahlberg, L., Billingham, R. C., Manner, P., Nelson, F., Webb, G., *et al.* (2000) Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis and rheumatism* **43**, 673-682.
79. Mengshol, J. A., Vincenti, M. P., Coon, C. I., Barchowsky, A., & Brinckerhoff, C. E. (2000) Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis and rheumatism* **43**, 801-811.
80. Bau, B., Gebhard, P. M., Haag, J., Knorr, T., Bartnik, E., *et al.* (2002) Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis and rheumatism* **46**, 2648-2657.
81. Chubinskaya, S., Kuettner, K. E., & Cole, A. A. (1999) Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **79**, 1669-1677.
82. Fernandes, J. C., Martel-Pelletier, J., Lascau-Coman, V., Moldovan, F., Jovanovic, D., *et al.* (1998) Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *The Journal of rheumatology* **25**, 1585-1594.
83. Aigner, T., Zien, A., Gehrsitz, A., Gebhard, P. M., & McKenna, L. (2001) Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis and rheumatism* **44**, 2777-2789.
84. Cole, A. A., Chubinskaya, S., Schumacher, B., Huch, K., Szabo, G., *et al.* (1996) Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 11023-11026.
85. Stremme, S., Duerr, S., Bau, B., Schmid, E., & Aigner, T. (2003) MMP-8 is only a minor gene product of human adult articular chondrocytes of the knee. *Clinical and experimental rheumatology* **21**, 205-209.
86. Martel-Pelletier, J., McCollum, R., Fujimoto, N., Obata, K., Cloutier, J. M., *et al.* (1994) Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in

Références bibliographiques

- osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **70**, 807-815.
87. Moldovan, F., Pelletier, J. P., Hambor, J., Cloutier, J. M., & Martel-Pelletier, J. (1997) Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis and rheumatism* **40**, 1653-1661.
 88. Reboul, P., Pelletier, J. P., Tardif, G., Cloutier, J. M., & Martel-Pelletier, J. (1996) The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2011-2019.
 89. Mohtai, M., Smith, R. L., Schurman, D. J., Tsuji, Y., Torti, F. M., *et al.* (1993) Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *The Journal of clinical investigation* **92**, 179-185.
 90. Stove, J., Gerlach, C., Huch, K., Gunther, K. P., Brenner, R., *et al.* (2001) Gene expression of stromelysin and aggrecan in osteoarthritic cartilage. *Pathobiology* **69**, 333-338.
 91. Buttner, F. H., Chubinskaya, S., Margerie, D., Huch, K., Flechtenmacher, J., *et al.* (1997) Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in human articular cartilage. *Arthritis and rheumatism* **40**, 704-709.
 92. Imai, K., Ohuchi, E., Aoki, T., Nomura, H., Fujii, Y., *et al.* (1996) Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer research* **56**, 2707-2710.
 93. Pratta, M. A., Yao, W., Decicco, C., Tortorella, M. D., Liu, R. Q., *et al.* (2003) Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *The Journal of biological chemistry* **278**, 45539-45545.
 94. Abbaszade, I., Liu, R. Q., Yang, F., Rosenfeld, S. A., Ross, O. H., *et al.* (1999) Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *The Journal of biological chemistry* **274**, 23443-23450.
 95. Tortorella, M. D., Burn, T. C., Pratta, M. A., Abbaszade, I., Hollis, J. M., *et al.* (1999) Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science (New York, N.Y)* **284**, 1664-1666.
 96. Tang, B. L. & Hong, W. (1999) ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. *FEBS letters* **445**, 223-225.
 97. Malfait, A. M., Liu, R. Q., Ijiri, K., Komiya, S., & Tortorella, M. D. (2002) Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *The Journal of biological chemistry* **277**, 22201-22208.
 98. Milner, J. M., Elliott, S. F., & Cawston, T. E. (2001) Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen degradation: interaction of serine and metalloproteinase pathways. *Arthritis and rheumatism* **44**, 2084-2096.
 99. Knauper, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G., & Murphy, G. (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *The Journal of biological chemistry* **271**, 1544-1550.
 100. Morel, J. & Berenbaum, F. (2004) Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **71**, 503-510.
 101. Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., *et al.* (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**, 252-256.
 102. Firestein, G. S. & Manning, A. M. (1999) Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis and rheumatism* **42**, 609-621.
 103. Garrington, T. P. & Johnson, G. L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current opinion in cell biology* **11**, 211-218.
 104. Vincenti, M. P. & Brinckerhoff, C. E. (2002) Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis research* **4**, 157-164.
 105. Geng, Y., Valbracht, J., & Lotz, M. (1996) Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *The Journal of clinical investigation* **98**, 2425-2430.
 106. Masuko-Hongo, K., Berenbaum, F., Humbert, L., Salvat, C., Goldring, M. B., *et al.* (2004) Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis and rheumatism* **50**, 2829-2838.

Références bibliographiques

107. Miller, C., Zhang, M., He, Y., Zhao, J., Pelletier, J. P., *et al.* (1998) Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 gene by okadaic acid inhibition of phosphatase activity in human chondrocytes: co-stimulation of AP-1 and CRE nuclear binding proteins. *Journal of cellular biochemistry* **69**, 392-413.
108. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology* **18**, 621-663.
109. Baldwin, A. S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology* **14**, 649-683.
110. Barchowsky, A., Frleta, D., & Vincenti, M. P. (2000) Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine* **12**, 1469-1479.
111. Tak, P. P. & Firestein, G. S. (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation* **107**, 7-11.
112. Mechta-Grigoriou, F., Gerald, D., & Yaniv, M. (2001) The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* **20**, 2378-2389.
113. Hai, T. & Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 3720-3724.
114. Kataoka, K., Fujiwara, K. T., Noda, M., & Nishizawa, M. (1994) MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Molecular and cellular biology* **14**, 7581-7591.
115. Rauscher, F. J., 3rd, Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J., & Spiegelman, B. M. (1988) Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* **52**, 471-480.
116. Suzuki, T., Okuno, H., Yoshida, T., Endo, T., Nishina, H., *et al.* (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic acids research* **19**, 5537-5542.
117. Delerive, P., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *The Journal of endocrinology* **169**, 453-459.
118. Piette, J., Hirai, S., & Yaniv, M. (1988) Constitutive synthesis of activator protein 1 transcription factor after viral transformation of mouse fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 3401-3405.
119. Angel, P. & Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta* **1072**, 129-157.
120. Newberry, E. P., Willis, D., Latifi, T., Boudreaux, J. M., & Towler, D. A. (1997) Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **11**, 1129-1144.
121. Sylvester, J., Liacini, A., Li, W. Q., & Zafarullah, M. (2004) Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes. *Cellular signalling* **16**, 469-476.
122. Uria, J. A., Jimenez, M. G., Balbin, M., Freije, J. M., & Lopez-Otin, C. (1998) Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **273**, 9769-9777.
123. Francois, M., Richette, P., Tsagris, L., Raymondjean, M., Fulchignoni-Lataud, M. C., *et al.* (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element. *The Journal of biological chemistry* **279**, 28411-28418.
124. Oleksyszyn, J. & Augustine, A. J. (1996) Plasminogen modulation of IL-1-stimulated degradation in bovine and human articular cartilage explants. The role of the endogenous inhibitors: PAI-1, alpha 2-antiplasmin, alpha 1-PI, alpha 2-macroglobulin and TIMP. *Inflamm Res* **45**, 464-472.
125. Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Grams, F., Gomis-Ruth, F. X., Nagase, H., *et al.* (1999) Insights into MMP-TIMP interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **878**, 73-91.
126. Bigg, H. F., Shi, Y. E., Liu, Y. E., Steffensen, B., & Overall, C. M. (1997) Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *The Journal of biological chemistry* **272**, 15496-15500.
127. Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B., & Murphy, G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *The Journal of biological chemistry* **271**, 17119-17123.

Références bibliographiques

128. Huang, W., Li, W. Q., Dehnade, F., & Zafarullah, M. (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *Journal of cellular biochemistry* **85**, 295-303.
129. Shinmei, M., Kobayashi, T., Yoshihara, Y., & Samura, A. (1995) Significance of the levels of carboxy terminal type II procollagen peptide, chondroitin sulfate isomers, tissue inhibitor of metalloproteinases, and metalloproteinases in osteoarthritis joint fluid. *J Rheumatol Suppl* **43**, 78-81.
130. Su, S., Grover, J., Roughley, P. J., DiBattista, J. A., Martel-Pelletier, J., et al. (1999) Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatology international* **18**, 183-191.
131. Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., & Thorgeirsson, U. P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European journal of cell biology* **74**, 111-122.
132. Martel-Pelletier, J., Mineau, F., Jovanovic, D., Di Battista, J. A., & Pelletier, J. P. (1999) Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis and rheumatism* **42**, 2399-2409.
133. Zafarullah, M., Su, S., Martel-Pelletier, J., DiBattista, J. A., Costello, B. G., et al. (1996) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes. *Journal of cellular biochemistry* **60**, 211-217.
134. Kuroki, K., Cook, J. L., Kreeger, J. M., & Tomlinson, J. L. (2003) The effects of TIMP-1 and -2 on canine chondrocytes cultured in three-dimensional agarose culture system. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **11**, 625-635.
135. Apparailly, F., Noel, D., Millet, V., Baker, A. H., Lisignoli, G., et al. (2001) Paradoxical effects of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 gene transfer in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* **44**, 1444-1454.
136. van Meurs, J. B., van Lent, P. L., Singer, I., Bayne, E. K., van de Loo, F. A., et al. (1998) Interleukin-1 receptor antagonist prevents expression of the metalloproteinase-generated neopeptide VDIPEN in antigen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* **41**, 647-656.
137. Maini, R. N., Breedveld, F. C., Kalden, J. R., Smolen, J. S., Furst, D., et al. (2004) Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis and rheumatism* **50**, 1051-1065.
138. Klareskog, L., van der Heijde, D., de Jager, J. P., Gough, A., Kalden, J., et al. (2004) Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **363**, 675-681.
139. Keystone, E. C., Kavanaugh, A. F., Sharp, J. T., Tannenbaum, H., Hua, Y., et al. (2004) Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis and rheumatism* **50**, 1400-1411.
140. McCoy, J. M., Wicks, J. R., & Audoly, L. P. (2002) The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* **110**, 651-658.
141. Trebino, C. E., Stock, J. L., Gibbons, C. P., Naiman, B. M., Wachtmann, T. S., et al. (2003) Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9044-9049.
142. Choy, E. H. & Panayi, G. S. (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* **344**, 907-916.
143. Firestein, G. S. & Zvaifler, N. J. (2002) How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis and rheumatism* **46**, 298-308.
144. Firestein, G. S. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356-361.
145. Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., et al. (1996) Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**, 811-822.
146. Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., & Mathis, D. (1999) Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science (New York, N.Y)* **286**, 1732-1735.
147. Matsumoto, I., Maccioni, M., Lee, D. M., Maurice, M., Simmons, B., et al. (2002) How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nature immunology* **3**, 360-365.

Références bibliographiques

148. Kim, W. U., Cho, M. L., Jung, Y. O., Min, S. Y., Park, S. W., *et al.* (2004) Type II collagen autoimmunity in rheumatoid arthritis. *The American journal of the medical sciences* **327**, 202-211.
149. Verheijden, G. F., Rijnders, A. W., Bos, E., Coenen-de Roo, C. J., van Staveren, C. J., *et al.* (1997) Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **40**, 1115-1125.
150. Matsui, T., Nakata, N., Nagai, S., Nakatani, A., Takahashi, M., *et al.* (2009) Inflammatory cytokines and hypoxia contribute to 18F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. *J Nucl Med* **50**, 920-926.
151. Cerci, J. J., Pracchia, L. F., Linardi, C. C., Pitella, F. A., Delbeke, D., *et al.* 18F-FDG PET After 2 Cycles of ABVD Predicts Event-Free Survival in Early and Advanced Hodgkin Lymphoma. *J Nucl Med*.
152. Groves, A. M., Shastry, M., Rodriguez-Justo, M., Malhotra, A., Endozo, R., *et al.* (18)F-FDG PET and biomarkers for tumour angiogenesis in early breast cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*.
153. Kasper, B., Hohenberger, P., Strauss, L. G., & Dimitrakopoulou-Strauss, A. The use of fluorine-18 fluorodesoxyglycose-positron emission tomography for treatment monitoring in patients with soft tissue sarcomas. *Hellenic journal of nuclear medicine* **13**, 40-44.
154. Bertagna, F., Bosio, G., Caobelli, F., Motta, F., Biasiotto, G., *et al.* Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for therapy evaluation of patients with large-vessel vasculitis. *Japanese journal of radiology* **28**, 199-204.
155. Chaudhari, A. J., Bowen, S. L., Burkett, G. W., Packard, N. J., Godinez, F., *et al.* High-resolution (18)F-FDG PET with MRI for monitoring response to treatment in rheumatoid arthritis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **37**, 1047.
156. Kubota, K., Ito, K., Morooka, M., Mitsumoto, T., Kurihara, K., *et al.* (2009) Whole-body FDG-PET/CT on rheumatoid arthritis of large joints. *Annals of nuclear medicine* **23**, 783-791.
157. Boellaard, R. (2009) Standards for PET image acquisition and quantitative data analysis. *J Nucl Med* **50 Suppl 1**, 11S-20S.
158. Strobel, K., von Hochstetter, A. R., & Exner, U. G. (2009) FDG uptake in a rheumatoid nodule with imaging appearance similar to a malignant soft tissue tumor. *Clinical nuclear medicine* **34**, 691-692.
159. Beutler, B., Milsark, I. W., & Cerami, A. C. (1985) Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science (New York, N.Y)* **229**, 869-871.
160. Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., *et al.* (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552-554.
161. Beutler, B. A. & Cerami, A. (1985) Recombinant interleukin 1 suppresses lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. *J Immunol* **135**, 3969-3971.
162. Nedospasov, S. A., Hirt, B., Shakhov, A. N., Dobrynin, V. N., Kawashima, E., *et al.* (1986) The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse. *Nucleic acids research* **14**, 7713-7725.
163. Fiers, W. (1991) Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS letters* **285**, 199-212.
164. Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* **10**, 45-65.
165. Stow, J. L., Manderson, A. P., & Murray, R. Z. (2006) SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* **6**, 919-929.
166. Akira, S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Current opinion in immunology* **15**, 5-11.
167. Li, X., Tupper, J. C., Bannerman, D. D., Winn, R. K., Rhodes, C. J., *et al.* (2003) Phosphoinositide 3 kinase mediates Toll-like receptor 4-induced activation of NF-kappa B in endothelial cells. *Infection and immunity* **71**, 4414-4420.
168. Dauphinee, S. M. & Karsan, A. (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **86**, 9-22.
169. Zhande, R., Dauphinee, S. M., Thomas, J. A., Yamamoto, M., Akira, S., *et al.* (2007) FADD negatively regulates lipopolysaccharide signaling by impairing interleukin-1 receptor-associated kinase 1-MyD88 interaction. *Molecular and cellular biology* **27**, 7394-7404.
170. Miyake, K. (2004) Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Seminars in immunology* **16**, 11-16.
171. Muller, J. M., Ziegler-Heitbrock, H. W., & Baeuerle, P. A. (1993) Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* **187**, 233-256.
172. Moynagh, P. N. (2005) The NF-kappaB pathway. *Journal of cell science* **118**, 4589-4592.

Références bibliographiques

173. Nishikori, M. (2005) Classical and alternative NF- κ B activation pathways and their roles in lymphoid malignancies. *J Clin Exp Hematopathol* **45**, 15-24.
174. Gilmore, T. D. (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684.
175. Dodeller, F. & Schulze-Koops, H. (2006) The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis research & therapy* **8**, 205.
176. Zarubin, T. & Han, J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* **15**, 11-18.
177. Weston, C. R. & Davis, R. J. (2002) The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in genetics & development* **12**, 14-21.
178. Roux, P. P. & Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-344.
179. Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **74**, 589-607.
180. Klooster, A. R. & Bernier, S. M. (2005) Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor act additively to inhibit matrix gene expression by chondrocyte. *Arthritis research & therapy* **7**, R127-138.
181. Pelletier, C., Guerin-Marchand, C., Iannascoli, B., Marchand, F., David, B., *et al.* (1998) Specific signaling pathways in the regulation of TNF-alpha mRNA synthesis and TNF-alpha secretion in RBL-2H3 mast cells stimulated through the high affinity IgE receptor. *Inflamm Res* **47**, 493-500.
182. Holtmann, M. H., Schutz, M., Galle, P. R., & Neurath, M. F. (2002) Functional relevance of soluble TNF-alpha, transmembrane TNF-alpha and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **40**, 587-600.
183. MacEwan, D. J. (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cellular signalling* **14**, 477-492.
184. Weinberg, A. D. & Montler, R. (2005) Modulation of TNF receptor family members to inhibit autoimmune disease. *Current drug targets* **4**, 195-203.
185. MacEwan, D. J. (2002) TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British journal of pharmacology* **135**, 855-875.
186. Tran, C. N., Lundy, S. K., White, P. T., Endres, J. L., Motyl, C. D., *et al.* (2007) Molecular interactions between T cells and fibroblast-like synoviocytes: role of membrane tumor necrosis factor-alpha on cytokine-activated T cells. *The American journal of pathology* **171**, 1588-1598.
187. Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., *et al.* (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**, 351-359.
188. van der Poll, T., Calvano, S. E., Kumar, A., Braxton, C. C., Coyle, S. M., *et al.* (1995) Endotoxin induces downregulation of tumor necrosis factor receptors on circulating monocytes and granulocytes in humans. *Blood* **86**, 2754-2759.
189. Paleolog, E. M., Delasalle, S. A., Buurman, W. A., & Feldmann, M. (1994) Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood* **84**, 2578-2590.
190. Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., *et al.* (1990) A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science (New York, N.Y)* **248**, 1019-1023.
191. Bradley, J. R., Thiru, S., & Pober, J. S. (1995) Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *The American journal of pathology* **146**, 27-32.
192. Wang, B., Kondo, S., Shivji, G. M., Fujisawa, H., Mak, T. W., *et al.* (1996) Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology* **88**, 284-288.
193. Galve-de Rochemonteix, B., Nicod, L. P., & Dayer, J. M. (1996) Tumor necrosis factor soluble receptor 75: the principal receptor form released by human alveolar macrophages and monocytes in the presence of interferon gamma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **14**, 279-287.
194. Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., & Cheng, G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & growth factor reviews* **14**, 193-209.
195. Vandooren, B., Kruihof, E., Yu, D. T., Rihl, M., Gu, J., *et al.* (2004) Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor alpha blockade in spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism* **50**, 2942-2953.
196. Martel-Pelletier, J., Mineau, F., Jolicoeur, F. C., & Pelletier, J. P. (1995) Modulation of TNFSR55 and TNFSR75 by cytokines and growth factors in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol Suppl* **43**, 115-119.

Références bibliographiques

197. Makhatadze, N. J. (1998) Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Human immunology* **59**, 571-579.
198. Tsytsykova, A. V. & Goldfeld, A. E. (2002) Inducer-specific enhanceosome formation controls tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes. *Molecular and cellular biology* **22**, 2620-2631.
199. Ihnatko, R. & Kubes, M. (2007) TNF signaling: early events and phosphorylation. *General physiology and biophysics* **26**, 159-167.
200. Zhang, T., Kruys, V., Huez, G., & Gueydan, C. (2002) AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochemical Society transactions* **30**, 952-958.
201. Ronkina, N., Menon, M. B., Schwermann, J., Tiedje, C., Hitti, E., *et al.* MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: Complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochemical pharmacology*.
202. Winzen, R., Gowrishankar, G., Bollig, F., Redich, N., Resch, K., *et al.* (2004) Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR. *Molecular and cellular biology* **24**, 4835-4847.
203. Phillips, K., Kedersha, N., Shen, L., Blackshear, P. J., & Anderson, P. (2004) Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor alpha, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2011-2016.
204. Dean, J. L., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004) The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular signalling* **16**, 1113-1121.
205. Clark, A. (2000) Post-transcriptional regulation of pro-inflammatory gene expression. *Arthritis research* **2**, 172-174.
206. Sabilia, J. W., D (2002) Tumor necrosis factor α : une cible thérapeutique. *Encycl Méd Chir, Appareil locomoteur* **14**, 16.
207. Ross, J. (1995) mRNA stability in mammalian cells. *Microbiological reviews* **59**, 423-450.
208. Gillet, R. & Felden, B. (2007) [Lost in translation]. *Med Sci (Paris)* **23**, 633-639.
209. Shaw, G. & Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659-667.
210. Bakheet, T., Williams, B. R., & Khabar, K. S. (2006) ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic acids research* **34**, D111-114.
211. Chen, C. Y. & Shyu, A. B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in biochemical sciences* **20**, 465-470.
212. Puig, S., Askeland, E., & Thiele, D. J. (2005) Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**, 99-110.
213. Barreau, C., Paillard, L., & Osborne, H. B. (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research* **33**, 7138-7150.
214. Bevilacqua, A., Ceriani, M. C., Capaccioli, S., & Nicolini, A. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *Journal of cellular physiology* **195**, 356-372.
215. Guhaniyogi, J. & Brewer, G. (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**, 11-23.
216. Gamberi, C., Johnstone, O., & Lasko, P. (2006) Drosophila RNA binding proteins. *International review of cytology* **248**, 43-139.
217. Liao, B., Hu, Y., & Brewer, G. (2007) Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nature structural & molecular biology* **14**, 511-518.
218. Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., *et al.* (2004) Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal* **23**, 3092-3102.
219. Tafesh, A., Bennett, W. R., Mills, F., & Lee, C. H. (2007) Identification of c-myc coding region determinant RNA sequences and structures cleaved by an RNase1-like endoribonuclease. *Biochimica et biophysica acta* **1769**, 49-60.
220. Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., *et al.* (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* **120**, 623-634.
221. Camier, S. & Seraphin, B. (2007) [Destroy this (RNA) message after reading it!]. *Med Sci (Paris)* **23**, 850-856.
222. Chen, C. Y., Gherzi, R., Ong, S. E., Chan, E. L., Raijmakers, R., *et al.* (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451-464.

Références bibliographiques

223. Lin, W. J., Duffy, A., & Chen, C. Y. (2007) Localization of AU-rich element-containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *The Journal of biological chemistry* **282**, 19958-19968.
224. Parker, R. & Sheth, U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell* **25**, 635-646.
225. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., *et al.* (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* **169**, 871-884.
226. Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., & Filipowicz, W. (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111-1124.
227. Lopez de Silanes, I., Quesada, M. P., & Esteller, M. (2007) Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell Oncol* **29**, 1-17.
228. Espel, E. (2005) The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Seminars in cell & developmental biology* **16**, 59-67.
229. Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., & Kollias, G. (1999) Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**, 387-398.
230. Taylor, G. A., Carballo, E., Lee, D. M., Lai, W. S., Thompson, M. J., *et al.* (1996) A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* **4**, 445-454.
231. Carballo, E., Lai, W. S., & Blakeshear, P. J. (2000) Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* **95**, 1891-1899.
232. Ogilvie, R. L., Abelson, M., Hau, H. H., Vlasova, I., Blakeshear, P. J., *et al.* (2005) Tristetraprolin down-regulates IL-2 gene expression through AU-rich element-mediated mRNA decay. *J Immunol* **174**, 953-961.
233. Houzet, L., Morello, D., Defrance, P., Mercier, P., Huez, G., *et al.* (2001) Regulated control by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich element during mouse embryogenesis. *Blood* **98**, 1281-1288.
234. Lu, J. Y., Sadri, N., & Schneider, R. J. (2006) Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes & development* **20**, 3174-3184.
235. Piecyk, M., Wax, S., Beck, A. R., Kedersha, N., Gupta, M., *et al.* (2000) TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *The EMBO journal* **19**, 4154-4163.
236. Katsanou, V., Papadaki, O., Milatos, S., Blakeshear, P. J., Anderson, P., *et al.* (2005) HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Molecular cell* **19**, 777-789.
237. Saklatvala, J. (2004) The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Current opinion in pharmacology* **4**, 372-377.
238. Rajasingh, J., Bord, E., Luedemann, C., Asai, J., Hamada, H., *et al.* (2006) IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression. *Faseb J* **20**, 2112-2114.
239. Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A. D., *et al.* (2006) Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Molecular and cellular biology* **26**, 2399-2407.
240. Fawal, M., Armstrong, F., Ollier, S., Dupont, H., Touriol, C., *et al.* (2006) A "liaison dangereuse" between AUF1/hnRNP D and the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK. *Blood* **108**, 2780-2788.
241. Wei, B. & Pei, G. microRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cellular & molecular immunology* **7**, 175-181.
242. Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T., & Spillane, C. (2009) miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society transactions* **37**, 918-925.
243. Brennan, F. M. & McInnes, I. B. (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3537-3545.
244. Fleischmann, R. & Shealy, D. (2003) Developing a new generation of TNFalpha antagonists for the treatment of rheumatoid arthritis. *Molecular interventions* **3**, 310-318.
245. Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., *et al.* (2001) Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine* **345**, 1098-1104.

Références bibliographiques

246. Maini, R., St Clair, E. W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., *et al.* (1999) Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* **354**, 1932-1939.
247. Hanauer, S. B., Feagan, B. G., Lichtenstein, G. R., Mayer, L. F., Schreiber, S., *et al.* (2002) Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **359**, 1541-1549.
248. Brandt, J., Haibel, H., Cornely, D., Golder, W., Gonzalez, J., *et al.* (2000) Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis and rheumatism* **43**, 1346-1352.
249. Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Furst, D. E., Moreland, L. W., Weisman, M. H., *et al.* (2003) Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis and rheumatism* **48**, 35-45.
250. Petitpain, N., Gambier, N., Wahl, D., Chary-Valckenaere, I., Loeuille, D., *et al.* (2009) Arterial and venous thromboembolic events during anti-TNF therapy: a study of 85 spontaneous reports in the period 2000-2006. *Bio-medical materials and engineering* **19**, 355-364.
251. Mohan, N., Edwards, E. T., Cupps, T. R., Oliverio, P. J., Sandberg, G., *et al.* (2001) Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis and rheumatism* **44**, 2862-2869.
252. Marotte, H., Charrin, J. E., & Miossec, P. (2001) Infliximab-induced aseptic meningitis. *Lancet* **358**, 1784.
253. Campbell, T. N. & Choy, F. Y. (2005) RNA interference: past, present and future. *Current issues in molecular biology* **7**, 1-6.
254. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., *et al.* (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
255. Martinez, J., Patkaniowska, A., Elbashir, S. M., Harborth, J., Hossbach, M., *et al.* (2003) Analysis of mammalian gene function using small interfering RNAs. *Nucleic Acids Res Suppl*, 333.
256. Voinnet, O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature reviews* **6**, 206-220.
257. Schiffelers, R. M., Xu, J., Storm, G., Woodle, M. C., & Scaria, P. V. (2005) Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* **52**, 1314-1318.
258. Felsenfeld, G. & Rich, A. (1957) Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides. *Biochimica et biophysica acta* **26**, 457-468.
259. Le Doan, T., Perrouault, L., Praseuth, D., Habhoub, N., Decout, J. L., *et al.* (1987) Sequence-specific recognition, photocrosslinking and cleavage of the DNA double helix by an oligo-[alpha]-thymidylate covalently linked to an azidoproflavine derivative. *Nucleic acids research* **15**, 7749-7760.
260. Moser, H. E. & Dervan, P. B. (1987) Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science (New York, N.Y)* **238**, 645-650.
261. Mirkin, S. M., Lyamichev, V. I., Drushlyak, K. N., Dobrynin, V. N., Filippov, S. A., *et al.* (1987) DNA H form requires a homopurine-homopyrimidine mirror repeat. *Nature* **330**, 495-497.
262. Mirkin, S. M. & Frank-Kamenetskii, M. D. (1994) H-DNA and related structures. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **23**, 541-576.
263. Helene, C., Giovannangeli, C., Guieysse-Peugeot, A. L., & Praseuth, D. (1997) Sequence-specific control of gene expression by antigene and clamp oligonucleotides. *Ciba Foundation symposium* **209**, 94-102; discussion 102-106.
264. Goni, J. R., de la Cruz, X., & Orozco, M. (2004) Triplex-forming oligonucleotide target sequences in the human genome. *Nucleic acids research* **32**, 354-360.
265. Goni, J. R., Vaquerizas, J. M., Dopazo, J., & Orozco, M. (2006) Exploring the reasons for the large density of triplex-forming oligonucleotide target sequences in the human regulatory regions. *BMC genomics* **7**, 63.
266. Knauert, M. P. & Glazer, P. M. (2001) Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Human molecular genetics* **10**, 2243-2251.
267. Besch, R., Giovannangeli, C., & Degitz, K. (2004) Triplex-forming oligonucleotides - sequence-specific DNA ligands as tools for gene inhibition and for modulation of DNA-associated functions. *Curr Drug Targets* **5**, 691-703.

Références bibliographiques

268. Vasquez, K. M., Narayanan, L., & Glazer, P. M. (2000) Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science (New York, N.Y)* **290**, 530-533.
269. Vasquez, K. M. & Wilson, J. H. (2000) Triplex-directed site-specific genome modification. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **133**, 183-200.
270. Ye, Z., Cheng, K., Guntaka, R. V., & Mahato, R. I. (2005) Targeted delivery of a triplex-forming oligonucleotide to hepatic stellate cells. *Biochemistry* **44**, 4466-4476.
271. Liu, J., Xu, R., Jin, Y., & Wang, D. (2001) In vitro triplex formation and functional analysis of TFOs designed against human c-sis/PDGF-B proto-oncogene. *Science in China* **44**, 83-91.
272. Liu, J., Xu, R., Jin, Y., & Wang, D. (2001) Triplex targeting of human PDGF-B (c-sis, proto-oncogene) promoter specifically inhibits factors binding and PDGF-B transcription. *Nucleic acids research* **29**, 783-791.
273. Vasquez, K. M., Wensel, T. G., Hogan, M. E., & Wilson, J. H. (1996) High-efficiency triple-helix-mediated photo-cross-linking at a targeted site within a selectable mammalian gene. *Biochemistry* **35**, 10712-10719.
274. Carbone, G. M., Napoli, S., Valentini, A., Cavalli, F., Watson, D. K., *et al.* (2004) Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic acids research* **32**, 4358-4367.
275. Lee, J. S., Woodsworth, M. L., Latimer, L. J., & Morgan, A. R. (1984) Poly(pyrimidine) . poly(purine) synthetic DNAs containing 5-methylcytosine form stable triplexes at neutral pH. *Nucleic acids research* **12**, 6603-6614.
276. Shimizu, M., Konishi, A., Shimada, Y., Inoue, H., & Ohtsuka, E. (1992) Oligo(2'-O-methyl)ribonucleotides. Effective probes for duplex DNA. *FEBS letters* **302**, 155-158.
277. Petersen, M. & Wengel, J. (2003) LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends in biotechnology* **21**, 74-81.
278. Lacroix, L., Arimondo, P. B., Takasugi, M., Helene, C., & Mergny, J. L. (2000) Pyrimidine morpholino oligonucleotides form a stable triple helix in the absence of magnesium ions. *Biochemical and biophysical research communications* **270**, 363-369.
279. de Falco, S., Boutorine, A., de Smidt, C., van Berkel, T., Saison, E., *et al.* (1991) Utilization of antisense oligonucleotides in vivo: stability and internalization of hydrophobized oligonucleotides. *Nucleic acids symposium series*, 157-158.
280. Miller, P. S., McParland, K. B., Jayaraman, K., & Ts'o, P. O. (1981) Biochemical and biological effects of nonionic nucleic acid methylphosphonates. *Biochemistry* **20**, 1874-1880.
281. Seed, M. P. & Gardner, C. R. (2005) The modulation of intra-articular inflammation, cartilage matrix and bone loss in mono-articular arthritis induced by heat-killed Mycobacterium tuberculosis. *Inflammopharmacology* **12**, 551-567.
282. Gilroy, D. W., Tomlinson, A., Greenslade, K., Seed, M. P., & Willoughby, D. A. (1998) The effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on cartilage erosion and bone loss in a model of Mycobacterium tuberculosis-induced monoarticular arthritis in the rat. *Inflammation* **22**, 509-519.
283. Williams, R. O. (1998) Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clinical and experimental immunology* **114**, 330-332.
284. Cooke, T. D. & Jasin, H. E. (1972) The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. I. The role of antigen on the local immune response. *Arthritis and rheumatism* **15**, 327-337.
285. Dumonde, D. C. & Glynn, L. E. (1962) The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *British journal of experimental pathology* **43**, 373-383.
286. McDougall, J. J., Watkins, L., & Li, Z. (2006) Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. *Pain* **123**, 98-105.
287. Bove, S. E., Calcaterra, S. L., Brooker, R. M., Huber, C. M., Guzman, R. E., *et al.* (2003) Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **11**, 821-830.
288. Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Simonin, M. A., Guingamp, C., Gillet, P., *et al.* (1999) Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. *Inflamm Res* **48**, 417-424.
289. Constantine, V. S. & Mowry, R. W. (1968) Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *The Journal of investigative dermatology* **50**, 419-423.

Références bibliographiques

290. Junqueira, L. C., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal* **11**, 447-455.
291. van Beuningen, H. M., Glansbeek, H. L., van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (1998) Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **6**, 306-317.
292. Rooney, M., Condell, D., Quinlan, W., Daly, L., Whelan, A., *et al.* (1988) Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **31**, 956-963.
293. van der Sluijs, J. A., Geesink, R. G., van der Linden, A. J., Bulstra, S. K., Kuyper, R., *et al.* (1992) The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *J Orthop Res* **10**, 58-61.
294. Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols* **1**, 1559-1582.
295. Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P., *et al.* (1997) Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis and rheumatism* **40**, 1670-1679.
296. Cheng, K., Ye, Z., Guntaka, R. V., & Mahato, R. I. (2006) Enhanced hepatic uptake and bioactivity of type alpha1(I) collagen gene promoter-specific triplex-forming oligonucleotides after conjugation with cholesterol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **317**, 797-805.
297. Jain, A., Wang, G., & Vasquez, K. M. (2008) DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie* **90**, 1117-1130.
298. Vasquez, K. M., Wensel, T. G., Hogan, M. E., & Wilson, J. H. (1995) High-affinity triple helix formation by synthetic oligonucleotides at a site within a selectable mammalian gene. *Biochemistry* **34**, 7243-7251.
299. Wu, Q., Gaddis, S. S., MacLeod, M. C., Walborg, E. F., Thames, H. D., *et al.* (2007) High-affinity triplex-forming oligonucleotide target sequences in mammalian genomes. *Molecular carcinogenesis* **46**, 15-23.
300. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews* **233**, 233-255.
301. Ospelt, C., Neidhart, M., Gay, R. E., & Gay, S. (2004) Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* **9**, 2323-2334.
302. Grunweller, A., Wyszko, E., Bieber, B., Jahnle, R., Erdmann, V. A., *et al.* (2003) Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic acids research* **31**, 3185-3193.
303. Mahato, R. I., Cheng, K., & Guntaka, R. V. (2005) Modulation of gene expression by antisense and antigene oligodeoxynucleotides and small interfering RNA. *Expert opinion on drug delivery* **2**, 3-28.
304. Okamoto, H., Cujec, T. P., Yamanaka, H., & Kamatani, N. (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of transcription factors. *The FEBS journal* **275**, 4463-4470.
305. Dalocchio, A., Canoni, D., Ruemmele, F., Duquesne, A., Scoazec, J. Y., *et al.* Occurrence of inflammatory bowel disease during treatment of juvenile idiopathic arthritis with etanercept: a French retrospective study. *Rheumatology (Oxford, England)* **49**, 1694-1698.
306. Khoury, M., Escriou, V., Courties, G., Galy, A., Yao, R., *et al.* (2008) Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes. *Arthritis and rheumatism* **58**, 2356-2367.
307. Mori, H. & Nakanishi, T. (2008) [Signal transduction of inflammatory synoviocytes in rheumatoid arthritis]. *Yakugaku Zasshi* **128**, 263-268.
308. Li, Q. & Verma, I. M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 725-734.
309. Jungel, A., Ospelt, C., & Gay, S. What can we learn from epigenetics in the year 2009? *Current opinion in rheumatology* **22**, 284-292.
310. Falvo, J. V., Ugliero, A. M., Brinkman, B. M., Merika, M., Parekh, B. S., *et al.* (2000) Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter. *Molecular and cellular biology* **20**, 2239-2247.
311. Trede, N. S., Tsytsykova, A. V., Chatila, T., Goldfeld, A. E., & Geha, R. S. (1995) Transcriptional activation of the human TNF-alpha promoter by superantigen in human monocytic cells: role of NF-kappa B. *J Immunol* **155**, 902-908.
312. Anderson, P., Phillips, K., Stoecklin, G., & Kedersha, N. (2004) Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *Journal of leukocyte biology* **76**, 42-47.

Références bibliographiques

313. Stamou, P. & Kontoyiannis, D. L. Posttranscriptional regulation of TNF mRNA: a paradigm of signal-dependent mRNA utilization and its relevance to pathology. *Current directions in autoimmunity* **11**, 61-79.
314. Khera, T. K., Dick, A. D., & Nicholson, L. B. Mechanisms of TNF α regulation in uveitis: Focus on RNA-binding proteins. *Progress in retinal and eye research*.
315. Khabar, K. S. Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell Mol Life Sci* **67**, 2937-2955.
316. Katsanou, V., Dimitriou, M., & Kontoyiannis, D. L. (2006) Post-transcriptional regulators in inflammation: exploring new avenues in biological therapeutics. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*, 37-57.
317. Nguyen-Chi, M. & Morello, D. (2008) [Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation]. *Med Sci (Paris)* **24**, 290-296.
318. Li, J., Wan, Y., Guo, Q., Zou, L., Zhang, J., *et al.* Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* **12**, R81.
319. Kumar, R., Dammai, V., Yadava, P. K., & Kleinau, S. (2005) Gene targeting by ribozyme against TNF- α mRNA inhibits autoimmune arthritis. *Gene therapy* **12**, 1486-1493.
320. Joosten, L. A., Helsen, M. M., van de Loo, F. A., & van den Berg, W. B. (2008) Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a comparative study using anti-TNF α , anti-IL-1 α /beta and IL-1Ra. *Arthritis and rheumatism* **58**, S110-122.
321. Schett, G., Stolina, M., Dwyer, D., Zack, D., Uderhardt, S., *et al.* (2009) Tumor necrosis factor alpha and RANKL blockade cannot halt bony spur formation in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism* **60**, 2644-2654.
322. Boettger, M. K., Hensellek, S., Richter, F., Gajda, M., Stockigt, R., *et al.* (2008) Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis and rheumatism* **58**, 2368-2378.
323. Cheng, K., Ye, Z., Guntaka, R. V., & Mahato, R. I. (2005) Biodistribution and hepatic uptake of triplex-forming oligonucleotides against type alpha1(I) collagen gene promoter in normal and fibrotic rats. *Molecular pharmaceutics* **2**, 206-217.
324. Presumey, J., Duroux-Richard, I., Courties, G., & Apparailly, F. Cationic liposome formulations for RNAi-based validation of therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Current opinion in molecular therapeutics* **12**, 325-330.
325. Ravina, M., Cubillo, E., Olmeda, D., Novoa-Carballal, R., Fernandez-Megia, E., *et al.* Hyaluronic Acid/Chitosan-g-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles for Gene Therapy: An Application for pDNA and siRNA Delivery. *Pharmaceutical research*.
326. Inoue, A., Takahashi, K. A., Mazda, O., Terauchi, R., Arai, Y., *et al.* (2005) Electro-transfer of small interfering RNA ameliorated arthritis in rats. *Biochemical and biophysical research communications* **336**, 903-908.
327. dos Anjos, D. A., do Vale, G. F., Campos Cde, M., do Prado, L. F., Sobrinho, A. B., *et al.* Extra-articular inflammatory sites detected by F-18 FDG PET/CT in a patient with rheumatoid arthritis. *Clinical nuclear medicine* **35**, 540-541.
328. Iwamoto, T., Okamoto, H., Toyama, Y., & Momohara, S. (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *The FEBS journal* **275**, 4448-4455.
329. Hunter, P. J., Nistala, K., Jina, N., Eddaoudi, A., Thomson, W., *et al.* Biologic predictors of extension of oligoarticular juvenile idiopathic arthritis as determined from synovial fluid cellular composition and gene expression. *Arthritis and rheumatism* **62**, 896-907.
330. Ablin, J. N., Entin-Meer, M., Aloush, V., Oren, S., Elkayam, O., *et al.* Protective effect of eotaxin-2 inhibition in adjuvant-induced arthritis. *Clinical and experimental immunology* **161**, 276-283.
331. Panico, A. M., Vicini, P., Massimo, G., Cardile, V., Gentile, B., *et al.* (2004) Protective effects of benzisothiazolylamidines on IL-1 beta induced alterations in human articular chondrocyte metabolism. *Inflammation* **28**, 231-235.
332. Inoue, H., Hiraoka, K., Hoshino, T., Okamoto, M., Iwanaga, T., *et al.* (2008) High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. *Bone* **42**, 1102-1110.
333. Endres, M., Andreas, K., Kalwitz, G., Freymann, U., Neumann, K., *et al.* Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*.

Références bibliographiques

334. Dinarello, C. A. (2007) Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Seminars in nephrology* **27**, 98-114.
335. Mao, X. D., Sun, S. J., Pei, Z. Y., & Zhang, L. H. (2009) [Inhibitory effect of triptolide on interleukin-18 and its receptor in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* **25**, 606-608, 611.
336. Milman, N., Karsh, J., & Booth, R. A. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical biochemistry*.
337. Mitchell, J., Dimov, V., & Townley, R. G. IL-13 and the IL-13 receptor as therapeutic targets for asthma and allergic disease. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 527-534.

Références bibliographiques

Résumé. Le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle central dans la physiopathologie de nombreuses pathologies inflammatoires et particulièrement l'arthrite. La neutralisation de cette cytokine par l'utilisation d'anticorps anti-TNF- α a montré son efficacité dans la PR et est aujourd'hui le traitement de référence pour la prise en charge de cette pathologie. Cependant, un tiers des patients traités par anticorps anti-TNF restent réfractaires ou ne répondent pas à ce traitement. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de développer des approches nouvelles ou complémentaires pour renforcer l'arsenal thérapeutique actuellement disponible. L'utilisation d'oligonucléotides triple hélice (TFO) permet de moduler l'expression génique de manière spécifique par interaction avec la double hélice d'ADN. Dans cette étude, nous avons évalué les potentialités anti-inflammatoires d'un TFO anti-TNF- α *in vitro* sur les synoviocytes et chondrocytes articulaires et *in vivo* dans deux modèles d'arthrite expérimentale. Ce TFO interagit avec le promoteur du gène du TNF- α , et son activité inhibitrice a été comparée à celle d'une approche par ARN interférence *in vitro*. Dans les modèles d'arthrite aiguë et chronique, l'injection intra-articulaire préventive de TFO anti-TNF- α permet une amélioration significative des symptômes arthritiques. Particulièrement, le traitement par le TFO diminue sensiblement l'inflammation synoviale et les lésions ostéocartilagineuses articulaires. Ces résultats sont les premiers à montrer la possibilité d'utiliser un TFO *in vivo* et offrent d'intéressantes perspectives thérapeutiques.

Mots clés : cytokines, inflammation, arthrite, oligonucléotide triple hélice, siRNA.

Abstract. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), a pro-inflammatory cytokine, plays a key role in the pathogenesis of many inflammatory diseases, including arthritis. Neutralization of this cytokine by anti-TNF- α antibodies has shown its efficacy in rheumatoid arthritis and is now widely used. Nevertheless, some patients currently treated with anti-TNF- α remain refractory or become non-responder to these treatments. In this context, there is a need for new or complementary therapeutic strategies. Triplex forming oligonucleotides (TFO) can inhibit gene expression with high sequence-specificity by interacting with the DNA double-strand. In this study, we investigated if an anti-TNF- α TFO had a therapeutic activity on inflammatory processes *in vitro* and *in vivo*, as judged from effects on two rat arthritis models. This TFO interacted with the TNF- α gene promoter, and its inhibitory activity was verified and compared to that of siRNA *in vitro*. A local intra-articular preventive injection of TFO in both acute and chronic arthritis models significantly reduced the development of the disease. Furthermore, the TFO efficiently blocked synovitis and cartilage and bone destruction in the joints. The results presented here provide the first evidence that gene targeting by anti-TNF- α TFO modulates arthritis *in vivo*, thus providing proof of concept that it could be used as therapeutic tool for TNF- α -dependent chronic inflammatory disorders.

Keywords: cytokines, inflammation, arthritis, triplex forming oligonucleotide, siRNA.