



HAL
open science

Étude des effets anti-cytokines et anti-cataboliques des rétinoides sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes de rat ou humains stimulés par de l'Interleukine-1 Bêta

Mélanie Kirchmeyer

► **To cite this version:**

Mélanie Kirchmeyer. Étude des effets anti-cytokines et anti-cataboliques des rétinoides sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes de rat ou humains stimulés par de l'Interleukine-1 Bêta. Sciences pharmaceutiques. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10137 . tel-01777276

HAL Id: tel-01777276

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777276>

Submitted on 24 Apr 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>

NANCY UNIVERSITÉ-HENRI POINCARÉ
2008

ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTÉ ET ENVIRONNEMENT »

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le

4 juillet 2008

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
HENRI POINCARÉ DE NANCY**

- Mention Sciences du médicament -

par

Mélanie KIRCHMEYER

Sujet :

« Étude des effets anti-cytokines et anti-cataboliques des
rétinoïdes sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes de
rat ou humains stimulés par de l'IL-1 β »

Co-Directeurs de thèse : A. BIANCHI, PhD (Nancy)
J-Y. JOUZEAU, PU-PH (Nancy)

Membres du jury

Rapporteurs : Monsieur le Professeur Francis BERENBAUM
Monsieur le Docteur Jean-François SAVOURET

Examineurs : Monsieur le Docteur Arnaud BIANCHI
Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU



Prénom, Nom : **Mélanie KIRCHMEYER**

Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Pharmacologie**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le *11 septembre 2008*

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I


Jean-Pierre FINANCE





Remerciements



L'écriture des remerciements est un exercice difficile où il existe des figures de style imposées et où la difficulté est bien souvent d'exprimer de façon sincère ce qui peut sembler convenu... Pourtant, à titre personnel, je suis particulièrement heureuse d'avoir l'occasion ici d'exprimer ma gratitude vis-à-vis de personnes qui ont eu un réel rôle tout au long de ma thèse. J'espère que les quelques mots que je m'appête à écrire réussiront à retranscrire fidèlement mes sentiments à leur égard.

Tout d'abord je souhaite remercier Monsieur le Professeur Patrick Netter et Monsieur le Docteur Jacques Magdalou, qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire dès mon DEA. Je leur suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail.

Je remercie également vivement Monsieur le Professeur Jean-Yves Jouzeau, pour le temps qu'il m'a consacré au cours de cette thèse, pour m'avoir toujours poussée à donner le meilleur de moi-même, et pour m'avoir appris la rigueur scientifique dont il fait preuve à tout moment. Merci pour vos remarques toujours judicieuses et vos connaissances multidisciplinaires. Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de devenir mon directeur de thèse.

Un grand Merci également au Docteur Arnaud Bianchi, pour ses connaissances scientifiques tant expérimentales que théoriques. Merci d'avoir suivi mes travaux au jour le jour, d'avoir constamment réfléchi aux nouvelles pistes à explorer, de ne jamais avoir baissé les bras et de m'avoir soutenue tout au long de cette aventure. Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de devenir mon co-directeur de thèse.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-François Savouret et Monsieur le Professeur Francis Berenbaum du grand honneur qu'ils me témoignent en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse, et de me consacrer une part précieuse de leur temps.

*Un énorme merci, qui ne sera jamais suffisant, à Sylvie Sebillaud. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de ces années, de m'avoir tout appris au niveau technique, et énormément appris côté humain. Grâce à toi, j'ai pu m'épanouir et franchir quelques caps périlleux et j'ai également passé des moments de pur plaisir en dehors du laboratoire avec toi et ta petite famille (et d'ailleurs bienvenue au petit nouveau !!!). Nos balades du jeudi midi, nos sorties shopping, nos longueurs de piscine et nos longues discussions me manqueront terriblement. Il est maintenant hors de question de te perdre de vue !!
A mon rayon de soleil du laboratoire, Merci.*

Dans la catégorie des amis, je souhaite de nouveau remercier Arnaud Bianchi, alias « l'homme invisible », l'homme aux multiples casquettes... Merci pour ton éternel enthousiasme et positivisme qui m'ont permis de garder le moral même lors des passages à vide... Merci également pour l'amitié que nous avons partagée, pour nos multiples discussions cinématographiques ou musicales, pour les découvertes de la nouvelle scène française, autour d'un café ou d'un concert toujours partagés avec plaisir ! PS : À quand le Paris-Brest ???

Merci à l'« inflammation dream team », qui a été une équipe plus qu'agréable au cours de ces quatre années, par ordre alphabétique Frédéric Caillotto, pour ses divertissements symphoniques et son délicieux tiramisu, Meriem Koufany, pour son aide technique, ses thés à la menthe ou encore ses délicieux gâteaux marocains !, David Moulin, ex-colocataire de bureau, pour ses conseils, son savoir-faire et son énergie, Valérie Olive, pour tous les bons et les mauvais moments qu'on a pu partager dans ce bureau, et ton soutien moral et technique ces derniers mois ! Merci pour votre aide précieuse particulièrement efficace lors de cette fin de thèse, autant morale que technique !!

Merci également aux nouveaux arrivés dans l'équipe, nos deux pharmaciens Nikos (merci pour ton enthousiasme et ta bonne humeur) et Stéphi' (merci pour nos longues discussions familiales, immobilières, ou encore les longueurs de piscine ou le concert de Patriiiiiick!), et notre stagiaire de Master Amélie (merci pour tes conseils avisés sur le sommeil, ton aide en manip dans le sprint final, et nos conversations très agréables !). Sans oublier les stagiaires de passage Sophie, Mélanie, et Anne.

Aux « anciens » du laboratoire, qui m'ont accompagnée lors de mes premiers pas dans le monde de la recherche, et qui continuent à le faire, Sandrine Boyault, pipelette adorable, Alexandre Benani, toujours joyeux et prêt à me rendre service, Tony Heurtaux, pour toutes tes qualités humaines et les parties de badminton qui m'ont permis de devenir ton « wall ». Merci au « Graouully », mon « EndNote man » qui m'a sauvé la mise pour ma bibliographie un certain nombre de fois !! Et très agréable compagnon de galère...

Et à tous les membres du laboratoire qui m'ont permis de passer de très bons moments, de goûter à toute une panoplie de gâteaux et autres protocoles de cuisine et de me changer les idées à chaque fois que j'en ai eu besoin, je ne saurai les citer tous, non qu'ils ne soient pas présents individuellement à mon esprit, mais l'accumulation de noms rend le remerciement impersonnel. Je sais, de toute façon, qu'ils se reconnaîtront.

Merci à mes amies, Christine, Pauline et Marina, mais aussi Fanny, qui ont suivi de loin ce travail mais qui ont su être présentes aux moments opportuns.

Enfin merci à ma maman et à mon papa, à mes frères Aymeric et Yoan, à mes « cousin(e)s » (!! Marie-Laure et Gilles, et à ma famille (au sens large !), qui, bien que ne comprenant pas toujours ce que je faisais, n'a pas cessé de me témoigner son soutien irremplaçable.

Et enfin, à « Mon Homme », qui a servi de « punching ball » durant toutes ces années, au gré du stress et de l'anxiété, qui a toujours su me rendre le sourire, m'a motivée, soutenue, et donné confiance en moi. Merci pour nos virées en moto qui m'ont permis de cogiter en plein air. Merci d'avoir géré beaucoup de choses pendant la période délicate de fin de thèse ! Merci pour ton Amour sans lequel tout ça n'aurait pas eu la même saveur...

À ma Maman

À mon Papa

À Régine

À Michel, mon Tonton

À Cédric, « mon Homme, sweet Home »

Je dédie cette thèse





Liste des Travaux

Publications relatives au travail présenté

All-trans retinoic acid (ATRA) suppresses IL-6 expression in IL-1-stimulated synovial fibroblasts by inhibition of ERK_{1/2} pathway independently of RAR activation

Kirchmeyer M., Koufany M., Sebillaud S., Netter P., Jouzeau J-Y., Bianchi A.
Arthritis Reasearch and Therapy, sous presse.

Evidence for species differences in the responses of articular cells by all-trans retinoic acid in cytokine-stimulated chondrocytes.

Kirchmeyer M., Deffaud J., Sebillaud S., Moulin D., Koufany M., Netter P., Jouzeau J-Y., Bianchi A.
Biorheology, 2008, 45, 415-432.

Pathophysiological Relevance of PPAR to Osteoarthritis: from the Control of Inflammation to Cartilage Protection?

Bianchi A., Kirchmeyer M., Galteau M-M., Jouzeau J-Y.
Biomedical and Health Research, Vol. 70, Osteoarthritis, inflammation and degradation: a continuum, J. Buckwalter, M. Lotz and J-F. Stoltz eds, IOS Press, Amsterdam, 2007, pp 77-96.

Publications non présentées dans ce mémoire

Modulatory effect of rhein on IL-1-induced responses in human chondrocytes evaluated by antibody microarrays.

Deffaud J., Kirchmeyer M., Domagala F., Ficheux H., Netter P., Bianchi A., Jouzeau J-Y.
Biorheology, 2008, sous presse.

Effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma agonists on prostaglandins cascade in joint cells.

Moulin D., Poleni P.E., Kirchmeyer M., Sebillaud S., Koufany M., Netter P., Terlain B., Bianchi A., Jouzeau J-Y.
Biorheology, 2006; 43 (3-4): 561-575.

Communication avec actes publiés.

ATRA is anti-inflammatory in IL-1-stimulated synovial fibroblasts by RAR-independent mechanisms

Kirchmeyer M., Koufany M., Sebillaud S., Netter P., Rochette-Egly C., Jouzeau J-Y., Bianchi A.
Congrès de l'OARSI, Fort-Lauderdale, Floride, 6-9 décembre 2007, Osteoarthritis Cartilage 2007, 15 (Suppl C), 355.

Communication orale.

Effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma agonists on prostaglandins cascade in joint cells.

Poleni P.E., Moulin D., Kirchmeyer M., Sebillaud S., Koufany M., Netter P., Bianchi A., Terlain B., Jouzeau J-Y.
4th international symposium on Mecanobiology of cartilage and chondrocyte, Budapest, 20-22 May 2005.

Communications sans actes publiés.

L'ATRA induit des effets anti-inflammatoires dans les fibroblastes synoviaux stimulés par de l'IL-1. Ces effets sont RAR et RXR indépendants.

Kirchmeyer M., Koufany M., Sebillaud S., Netter P., Jouzeau J-Y., Bianchi A.

9ème colloque de la section 30 du CNRS : "De la Recherche à la Découverte", Nice, janvier 2008.

Evidence for species differences in the responses of articular cells to Retinoid X or Retinoic acid receptors agonists.

Kirchmeyer M., Deffaud J., Sebillaud S., Moulin D., Koufany M., Netter P., Jouzeau J-Y., Bianchi A.

5th international symposium on Mecanobiology of cartilage and chondrocyte, Athènes, 11-12 May 2007.

Modulatory effect of rhein on IL-1-induced responses in human chondrocytes evaluated by antibody microarrays.

Deffaud J., Kirchmeyer M., Domagala F., Ficheux H., Netter P., Jouzeau J-Y., Bianchi A.

5th international symposium on Mecanobiology of cartilage and chondrocyte, Athènes, 11-12 May 2007.





Liste des abréviations

9-<i>cis</i>-RA	9- <i>cis</i> -retinoic acid / Acide 9- <i>cis</i> -rétinoïque
ACTD	Actinomycine D
ACF	Adjuvant complet de Freund
ADAM	A disintegrin and metalloprotease / Une disintégrine et métalloprotéase
ADAMTS	ADAM with thrombospondin motifs / ADAM avec des motifs de type thrombospondine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP-1	Activator protein-1 / protéine activatrice-1
APL	Acute promyelocytic leukæmia / Leucémie promyélocytaire aiguë
APS	Ammonium persulfate / Persulfate d'ammonium
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARTS-1	Aminopeptidase regulator of TNF-R1 shedding / Protéine aminopeptidase régulatrice de la maturation du TNFR1
ATF	Activation transcription factor / Facteur de transcription
ATRA	all- <i>trans</i> -retinoic acid / Acide tout- <i>trans</i> -rétinoïque
BCA	Bicinchoninic acid / Acide bicinchoninique
BET	Bromure d'éthidium
bFGF	Basic fibroblast growth factor / Facteur de croissance des fibroblastes basique
BMP	Bone morphogenetic protein / Protéine morphogénétique de l'os
BSA	Bovine serum albumin / albumine bovine sérique
CBP	CREB-binding protein / protéine de liaison à CREB
CDK	Cyclin dependant kinase / Kinase dépendant des cyclines
CHX	Cycloheximide
CIA	Collagen-induced arthritis / Arthrite induite au collagène
COX	Cyclooxygénase
CRABP	Cellular retinoic acid binding protein / Protéine cellulaire liant l'acide rétinoïque
CREB	Cyclic AMP (adenosine monophosphate) responsive element-binding / Élément de réponse qui lie l'AMP (adénosine monophosphate) cyclique
CRP	C-reactive protein / Protéine C-réactive
DD	Death domain / Domaine de mort cellulaire
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium / Milieu modifié par Dulbecco
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
DTT	Dithiotréthol
ECL+	Enhanced Chemiluminescence / Chimioluminescence réhaussée
EDTA	Éthylène-diamine-tétra-acétate
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / Dosage immunoenzymatique sur support solide
ERK	Extracellularly regulated kinase / Kinase régulée par des signaux extracellulaires
FADD	Fas-associated DD containing protein / Protéine adaptatrice associée au DD
Fra	Fos related-Antigen / Antigène apparenté à Fos
GAG	Glycosaminoglycane
GFP	Green fluorescent protein / Protéine fluorescente verte
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulatory factor / Facteur de croissance des colonies de granulocytes et de macrophages
GRO-α	Growth-related oncogene- α / Oncogène- α apparenté à la croissance
HAT	Histone acétylase
HDAC	Histone désacétylase
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid / Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HLA	Human leucocyte antigen / Antigène des leucocytes humains
HRP	Horse-radish peroxidase / Peroxydase de Raifort
ICE	IL-1 β Converting Enzyme / Enzyme de conversion de l'IL-1 β

IFN	Interféron
IGF I	Insulin-like growth factor / Facteur de croissance apparenté à l'insuline
IKBα	Inhibitor of NF- κ B / Inhibiteur de NF- κ B
IKK	I κ B kinase
IL-(1)R	Récepteur à l'interleukine-(1)
IL-(1β)	Interleukine-(1 β)
IL-1Ra	Interleukine-1 Receptor antagonist / Antagoniste du récepteur à l'IL-1
IL-1RAcP	Accessory protein of IL-1 receptor / Protéine accessoire du récepteur à l'IL-1
iNOS	NO synthase inductible
IRAK	IL-1 receptor associated kinase / Kinase associée au récepteur de l'IL-1
JAK	Janus kinase
JNK	C-Jun N-terminal MAP kinase / Kinase qui phosphoryle la région N-terminale de c-Jun
LB	Luria-Bertoni
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin-rich repeat / Famille protéique riche en motifs leucine
MAPK	Mitogen-activated protein kinase / Protéine kinase activée par des agents mitogènes
MCP-1	Monocyte Chemoattractant protein-1 / Protéine-1 chimioattractante pour les monocytes
MEC	Matrice extra cellulaire
MEK	MAP ERK kinase
MEKK	MEK kinase
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1 α / Protéine-1 α inflammatoire des macrophages
MKK	MAP kinase kinase
MKP-1	MAP kinase phosphatase-1
MMLV	Murine moloney leukaemia virus / virus de la leucémie murine Moloney
MMP	Métalloprotéase matricielle
MT-MMP	Membrane type-MMP / MMP membranaire
MTT	Bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells / Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NAK	NF- κ B activating kinase / Kinase activatrice de NF- κ B
NEMO	NF- κ B essential modulator / Modulateur essentiel de NF- κ B
NF-IL-6	Nuclear factor interleukin-6 / Facteur nucléaire de l'IL-6
NF-κB	Nuclear factor kappa B / Facteur nucléaire kappa B
NIK	NF- κ B-inducing kinase / Kinase activant NF- κ B
NK	"Natural killer" / "Tueur naturel"
NO	Monoxyde d'azote
p/CAF	CBP-associated factor / Facteur associé à CBP
PAGE	Poly-acrylamide gel electrophoresis / Électrophorèse en gel de poly-acrylamide
PBS	Phosphate buffered saline / Tampon phosphate salin
pCMV	Promoteur du cytomégalovirus
PCRq	Quantitative polymerase chain reaction / Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
PDGF	Platelet derived growth factor / Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEI	Polyéthylénimine
PG	Protéoglycane
PGE2	Prostaglandine E2
PIB	Phosphatase inhibitor / Inhibiteur de phosphatase
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate

PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor / Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
QSP	Quantité suffisante pour
RAR	Retinoic acid receptor / Récepteur à l'acide rétinoïque
RARE	RAR response element / Élément de réponse à RAR
RBPC	Retinol binding protein cytoplasmic / Protéine cytoplasmique de liaison du rétinol
RBPp	RBP plasmatique
RIP	Receptor interacting protein / Protéine interagissant avec le récepteur
RXR	Retinoid X receptor / Récepteur aux réxinoïdes
RXRE	RXR response element / Élément de réponse à RXR
SCWA	Streptococcal cell wall induced arthritis / Arthrite induite aux parois de streptocoques
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SAPK	Stress-activated protein kinase / Protéine kinase activée par un stress
STAT	Signal transducer and activator of transcription / Transmetteur de signal et activateur de la transcription
SVF	Sérum de veau fœtal
TAB	TAK-1-binding protein / Protéine de liaison à TAK-1
TACE	TNF- α converting enzyme / Enzyme de conversion du TNF- α
TAK	TGF- β -activated kinase-1 / Kinase-1 activée par le TGF- β
TBS	Tris buffer saline / Tampon salin Tris
TBST	TBS tween
TCGF	T cell growth factor / Facteur de croissance des cellules T
TEMED	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
TGF-β	Transforming growth factor- β / Facteur de croissance transformant- β
TIMP	Tissue inhibitor metalloprotease / Inhibiteur tissulaire des MMPs
TNF-α	Tumor necrosis- α / Facteur nécrosant les tumeurs- α
TPA	12-O-tétradécanoyl phorbol-13-acétate
TRADD	TNFR1-associated DD containing protein / Protéine associée au domaine de mort cellulaire du récepteur au TNF- α
TRAF	TNF-receptor associated protein / Protéine associée au récepteur du TNF
TRE	TPA response element / Élément de réponse au TPA
VEGF	Vascular endothelium growth factor / Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire



Table des matières


TRAVAUX PUBLIÉS	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
<i>Préambule et Objectifs du travail</i>	33
<i>Synthèse bibliographique</i>	41
Chapitre 1. L'articulation normale et pathologique	
1 <i>Présentation générale</i>	42
2 <i>Le cartilage</i>	42
2.1 Structure et composition	42
2.1.1 <i>Aspect macroscopique</i>	42
2.1.2 <i>Histologie du cartilage articulaire</i>	43
2.1.3 <i>Composition</i>	45
2.1.3.1 <i>La matrice extracellulaire</i>	45
2.1.3.2 <i>Les collagènes</i>	46
2.1.3.3 <i>Les protéoglycanes (PGs)</i>	47
2.1.3.4 <i>Les protéines non collagéniques</i>	47
2.2 Rôles du cartilage	48
2.3 Physiologie chondrocytaire	48
2.3.1 <i>Généralités</i>	48
2.3.2 <i>Métabolisme chondrocytaire</i>	50
2.3.3 <i>Nutrition du chondrocyte</i>	50
2.3.4 <i>Anabolisme et catabolisme de la MEC</i>	51
2.3.5 <i>Influence du stress mécanique</i>	51
2.4 Le cartilage pathologique	52
2.4.1 <i>Rappels sur les principales pathologies articulaires</i>	52
2.4.2 <i>Le cartilage arthrosique</i>	53
2.4.3 <i>Le cartilage arthritique</i>	56
3 <i>La membrane synoviale</i>	57
3.1 Structure et organisation	57
3.2 Rôles de la membrane synoviale	58
3.3 La physiologie synoviocytaire	59
3.4 La synoviale pathologique	60
3.4.1 <i>La synoviale arthrosique</i>	60
3.4.2 <i>La synoviale arthritique</i>	60
Chapitre 2. Les principaux acteurs de la réaction inflammatoire articulaire	
1 <i>Les cytokines</i>	63
1.1 Présentation	63
1.2 Les balances des facteurs pro et anti-inflammatoires	65
1.2.1 <i>La balance cytokinique</i>	65
1.2.2 <i>La balance Th1/Th2/Th17</i>	66
1.3 L'interleukine-1 (IL-1)	66
1.3.1 <i>Les cytokines de la famille et les récepteurs de l'IL-1</i>	66
1.3.2 <i>Synthèse et principaux effets cellulaires de l'interleukine-1</i>	68
1.3.3 <i>Rôles de l'IL-1 dans les pathologies articulaires</i>	69
1.3.3.1 <i>Polyarthrite Rhumatoïde</i>	69
1.3.3.2 <i>Arthrose</i>	70
1.4 Le facteur nécrosant les tumeurs (TNF- α)	71
1.4.1 <i>Les cytokines de la famille et les récepteurs du TNF-α</i>	71
1.4.2 <i>Synthèse et principaux effets cellulaires du TNF-α</i>	71
1.4.3 <i>Rôle du TNF-α dans les pathologies articulaires</i>	73
1.4.3.1 <i>Polyarthrite Rhumatoïde</i>	73

1.4.3.2	Arthrose	75
1.4.4	Les cytokines de la famille et les récepteurs de l'IL-6.....	76
1.4.5	Synthèse et principaux effets cellulaires de l'IL-6.....	76
1.4.6	Rôle de l'IL-6 dans les pathologies articulaires.....	78
1.4.6.1	Polyarthrite Rhumatoïde.....	78
1.4.6.2	Arthrose.....	80
1.5	Voies de signalisation impliquées dans la synthèse des cytokines.....	80
1.5.1	La cascade d'activation des kinases.....	80
1.5.1.1	Les ERK.....	81
1.5.1.2	P38 kinase.....	82
1.5.1.3	SAPK/JNK.....	82
1.5.2	Facteurs de transcription.....	83
1.5.2.1	NF-IL-6.....	83
1.5.2.2	NF-κB.....	85
1.5.2.2.1	Présentation générale.....	85
1.5.2.2.2	Implication de NF-κB dans les pathologies articulaires.....	87
1.5.2.3	AP-1.....	90
1.6	Synthèse des stratégies thérapeutiques de modulation des cytokines.....	92
2	Les enzymes de dégradation de la MEC et leurs inhibiteurs naturels	95
2.1	Présentation.....	95
2.1.1	Les métalloprotéases matricielles (MMPs).....	95
2.1.2	Les agrécanases (ADAMTS).....	97
2.1.3	Les inhibiteurs des métalloprotéases matricielles (TIMPs).....	97
2.2	Rôles des MMPs et des ADAMTS dans les pathologies articulaires.....	97
3	Autres médiateurs	99
3.1	Le monoxyde d'azote (NO).....	99
3.1.1	Synthèse et formes biologiquement actives.....	99
3.1.2	Rôles physiopathologiques.....	99
3.2	Les eicosanoïdes.....	100
3.3	Les facteurs angiogéniques.....	102
Chapitre 3. Les rétinoïdes et leurs récepteurs. Utilisation dans le traitement des arthropathies.		
1	Les rétinoïdes	105
1.1	Le métabolisme de la vitamine A.....	105
1.2	Structure et formation des principaux rétinoïdes naturels.....	105
1.3	Transport des rétinoïdes dans l'organisme.....	106
1.4	Catabolisme des rétinoïdes.....	108
1.5	Principales fonctions des rétinoïdes.....	108
1.5.1	La vision.....	109
1.5.2	La différenciation et la prolifération cellulaires.....	110
1.5.3	La reproduction et l'embryogenèse.....	111
1.5.4	La chondrogenèse.....	111
1.5.5	La vascularisation.....	112
1.5.6	Réponse immunitaire et inflammation.....	112
1.5.6.1	La réponse immune.....	112
1.5.6.2	Les facteurs de transcription pro-inflammatoires.....	114
1.6	Principales applications thérapeutiques des rétinoïdes.....	115
1.6.1	Cancérologie.....	115
1.6.2	Dermatologie.....	117
1.6.3	Hyperglycémie et hyperinsulinémie.....	118
1.7	Mode d'action des rétinoïdes.....	118
1.7.1	Action dépendante des récepteurs nucléaires RAR et RXR.....	118
1.7.2	Action indépendante des récepteurs nucléaires RAR et RXR.....	118
2	Les récepteurs aux rétinoïdes	121

2.1	Généralités sur les récepteurs nucléaires.....	121
2.2	Présentation des récepteurs RAR et RXR, isotypes, isoformes et structure générale	121
2.3	Les éléments de réponse aux RAR et aux RXR.....	124
2.4	Localisation des récepteurs RAR et RXR	127
2.5	Mécanismes endogènes de régulation des récepteurs RAR et RXR	127
2.5.1	<i>Phosphorylation</i>	127
2.5.2	<i>Ubiquitinylation et dégradation par le protéasome</i>	129
2.6	Exemple d'un hétéropartenaire de RXR : les PPARs	130
2.7	Régulation de la transcription de gènes cibles par les RAR et RXR.....	131
2.7.1	<i>Mécanisme</i>	131
2.7.2	<i>Gènes cibles de RAR et de RXR</i>	133
2.8	Effets non génomiques des récepteurs RAR et RXR.....	133
2.8.1	<i>Inhibition des facteurs de transcription pro-inflammatoires</i>	133
2.8.2	<i>Activation d'autres facteurs de transcription</i>	136
2.9	Synthèse sur l'apport thérapeutique des rétinoïdes	136
3	<i>Effet des rétinoïdes en physiopathologie articulaire</i>	137
3.1	Études cellulaires	137
3.2	Arthropathies expérimentales.....	137
3.3	Études cliniques	140
	<i>Matériel et Méthodes</i>	141
1	<i>Origine des prélèvements articulaires</i>	142
2	<i>Isolement et culture des fibroblastes synoviaux et des chondrocytes</i>	142
3	<i>Plan expérimental</i>	144
3.1	Modèle cellulaire.....	144
3.2	Molécules étudiées.....	144
3.3	Études de régulation.....	144
3.4	Études de modulation de la voie des MAPKs	145
4	<i>Contrôle de la viabilité cellulaire</i>	145
4.1	Principe	145
4.2	Réalisation.....	145
5	<i>Étude de l'expression des ARNm d'intérêt</i>	146
5.1	Préparation des ARNs totaux	146
5.2	Transcription inverse (RT).....	147
5.3	Choix des amorces	148
5.4	Réaction de polymérisation en chaîne : PCR quantitative en temps réel	150
5.4.1	<i>Principe</i>	150
5.4.2	<i>Réalisation</i>	153
5.5	Analyse des fragments amplifiés	154
6	<i>Étude de l'expression des protéines d'intérêt</i>	154
6.1	Extraction de protéines totales	154
6.2	Électrophorèse.....	155
6.3	Électrotransfert en phase semi-liquide	156
6.4	Immunorévélation	156
7	<i>Étude de la production des médiateurs de l'inflammation</i>	157
7.1	Dosage des nitrites	157
7.1.1	<i>Principe</i>	157
7.1.2	<i>Réalisation</i>	158
7.2	Dosages immuno-enzymatiques de la production du TNF- α et de l'IL-6	158
7.3	Étude de la production des médiateurs de l'inflammation par la technique de « cytokine array » ..	158

7.3.1	<i>Principe</i>	158
7.3.2	<i>Réalisation</i>	160
7.4	Dosage de l'activité métalloprotéase totale.....	161
8	<i>Analyse de l'activité de facteurs de transcription</i>	162
8.1	Les puces à facteurs de transcription.....	162
8.1.1	<i>Extraction des protéines nucléaires</i>	162
8.1.2	<i>Quantification des protéines nucléaires</i>	162
8.1.3	<i>Principe des puces à facteurs de transcription</i>	163
8.1.4	<i>Réalisation</i>	166
8.2	Mesure de l'activation de facteurs de transcription par méthode immunoenzymatique (TransAm®)	167
9	<i>Mesure de l'activité Histone Désacétylase</i>	168
10	<i>Invalidation de l'expression des isotypes RAR par la technique des siRNA</i>	168
10.1	Dessin des siRNAs.....	168
10.2	Transfection transitoire	169
11	<i>Étude statistique</i>	169
Résultats 171		
Chapitre 1. Études préliminaires		
1	<i>Caractérisation des populations cellulaires</i>	172
1.1	Population synoviocytaire.....	172
1.2	Population chondrocytaire	173
2	<i>Vérification de la fonctionnalité de l'ATRA et du 9-cis RA dans notre système expérimental</i>	173
3	<i>Tests de viabilité cellulaire</i>	174
Chapitre 2. Étude des potentialités anti-cytokiniques des rétinoïdes dans les fibroblastes synoviaux de rat.		
1	<i>Expression basale et effet de l'IL-1β sur l'expression des récepteurs RAR et RXR</i>	176
1.1	Récepteurs RAR.....	176
1.2	Récepteurs RXR.....	176
2	<i>Effet des rétinoïdes sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires</i>	177
2.1	Effet de l'acide 9-cis rétinoïque (9-cis RA, co-agoniste RAR/RXR).....	177
2.2	Effet d'une co-stimulation par l'acide 9-cis rétinoïque (9-cis RA) et un agoniste PPAR- γ (Rosi) ..	179
2.3	Effet de l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA, agoniste RAR) et du BMS-649 (agoniste RXR)	180
2.4	Effet dose de l'ATRA	181
3	<i>Effet de l'ATRA sur la régulation des cytokines pro-inflammatoires induites l'IL-1β</i>	183
3.1	Effet de l'ATRA sur la régulation transcriptionnelle.....	183
3.2	Effet de l'ATRA sur la régulation traductionnelle	183

4	<i>Effet de l'ATRA sur l'ensemble des facteurs de transcription activés par l'IL-1β</i>	184
5	<i>Contribution des isotypes RAR aux effets anti-cytokines des rétinoïdes</i>	186
5.1	Effet d'agonistes sélectifs de RAR sur l'expression d'un gène cible : RAR- β	187
5.2	Effet des agonistes sélectifs de RAR sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β	187
5.3	Effet de l'invalidation de l'expression des isotypes RAR sur l'expression d'un gène cible RAR...	190
5.4	Effet de l'invalidation de l'expression des isotypes RAR sur l'effet inhibiteur l'ATRA sur les cytokines pro-inflammatoires.....	190
6	<i>Effet de l'ATRA sur l'activation de la cascade des MAPK induite par l'IL-1β</i>	191
6.1	Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de P38 MAPK induite par l'IL-1 β	192
6.2	Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de JNK induite par l'IL-1 β	193
6.3	Effet de l'ATRA sur la phosphorylation d'ERK _{1/2} induite par l'IL-1 β	194
7	<i>Étude de l'implication de la voie ERK_{1/2} dans les effets anti-inflammatoires de l'ATRA</i>	195
7.1	Validation de l'inhibition de la phosphorylation d'ERK _{1/2} par le PD-98059.....	195
7.2	Contribution de la voie ERK _{1/2} aux effets anti-TNF-a et anti-IL-6 de l'ATRA.....	196
7.3	Contribution de la voie ERK _{1/2} aux effets inhibiteurs de l'ATRA sur les facteurs de transcription induits par l'IL-1.....	196
7.3.1	Contribution d'ERK _{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation d'AP-1.....	197
7.3.2	Contribution d'ERK _{1/2} à l'effet de l'ATRA sur l'activation de NF- κ B.....	197
7.3.3	Contribution d'ERK _{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation de NF-IL-6.....	198
8	<i>Effet de l'ATRA sur l'inhibition de l'activité histone désacétylase induite par l'IL-1β: résultats préliminaires</i>	199
Chapitre 3. Étude préliminaire des potentialités anti-cytokiniques des rétinoïdes dans les fibroblastes synoviaux humains.		
1	<i>Expression basale et effet de l'IL-1 sur l'expression des récepteurs RAR et RXR dans les fibroblastes synoviaux humains</i>	200
2	<i>Effet de l'ATRA et du 9-cis RA sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1β</i>	201
3	<i>Analyse par puces à protéines des effets de l'ATRA et du 9-cis RA sur la production de médiateurs synoviocytaires induits par l'IL-1β.....</i>	202
Chapitre 4. Étude comparative des potentialités anti-cataboliques et anti-inflammatoires de l'ATRA dans les chondrocytes de rat ou humains		
1	<i>Expression basale et effet de l'IL-1β sur l'expression des récepteurs RAR et RXR dans les chondrocytes</i>	207
2	<i>Effet de l'ATRA sur la voie du NO inductible dans des chondrocytes stimulés par IL-1β</i>	208
3	<i>Effet de l'ATRA sur l'expression et l'activité des MMPs induites par l'IL-1β</i>	209



4	<i>Effet de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 induite par l'IL-1β dans les chondrocytes</i>	212
	<i>Discussion</i>	213
1	<i>Expression des récepteurs RAR et RXR dans les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes stimulés par l'IL-1β</i>	214
2	<i>Potentialités anti-cytokines des rétinoïdes dans les fibroblastes synoviaux</i>	216
3	<i>Propriétés anti-cataboliques et anti-inflammatoires de l'ATRA dans les chondrocytes</i>	225
	<i>Conclusions et Perspectives</i>	231
	<i>Références bibliographiques</i>	239
	<i>Annexes</i>	
	<i>Addendum</i>	





Table des illustrations

Figure 1 : Représentation d'un cartilage hyalin (A) et aperçu en microscopie optique après une coloration à l'acide périodique-Schiff (B).....	43
Figure 2 : Représentation schématique des différentes zones du cartilage articulaire adulte.....	44
Figure 3 : Le chondrocyte et sa matrice extracellulaire.....	46
Figure 4 : Vue au microscope électronique d'un chondrocyte et représentation schématique d'un chondrocyte et de son contenu au sein de sa matrice extracellulaire.	50
Figure 5 : Schématisation d'une articulation de genou saine, arthritique ou arthrosique.....	53
Figure 6 : Vue en microscopie optique de coupes d'articulations colorées au rouge congo.....	54
Figure 7 : Représentation schématique du processus de destruction du cartilage au cours de l'arthrose.	56
Figure 8 : Représentation schématique d'une articulation de genou et localisation de la membrane synoviale et de la cavité synoviale.	57
Figure 9 : Vue en microscope optique de synoviocytes de type B mis en culture en monocouche, et transfectés par un plasmide-GFP.....	59
Figure 10 : Pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde.	62
Figure 11 : Balance entre les médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires au cours de la PR.	65
Figure 12 : La famille de l'IL-1 et ses récepteurs : balance entre IL-1, IL-1Ra et sIL-1R.....	67
Figure 13 : Représentation des différents récepteurs à l'IL-1, de la transduction du signal et des voies de signalisation intra-cellulaires activées par l'IL-1.....	68
Figure 14 : Représentation des différents récepteurs au TNF- α , de la transduction du signal et des voies de signalisation intra-cellulaires activées par le TNF- α	73
Figure 15 : Schématisation du système récepteuriel à l'IL-6 et des principales voies activées par la fixation de l'IL-6.	77
Figure 16 : Concept du blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 par le Tocilizumab.....	79
Figure 17 : Schématisation de la cascade des MAPK.	81
Figure 18 : Schématisation des mécanismes d'activation du complexe NF- κ B.....	87
Figure 19 : Schématisation de l'activation et de la régulation de la transcription des sous-unités c-Jun et c-Fos.....	92
Figure 20 : Principe de blocage de l'activité d'une cytokine pro-inflammatoire.....	94
Figure 21 : Schéma simplifié de la biosynthèse des eicosanoïdes.....	102
Figure 22 : Représentation schématique de la structure générale d'un rétinol.	105
Figure 23 : Schématisation de la voie métabolique du rétinol et de ses produits d'oxydation.....	106
Figure 24 : Schéma de l'absorption et de la distribution de la vitamine A dans l'organisme.	107
Figure 25 : Principales fonctions physiologiques des rétinol.	109
Figure 26 : Rôle du rétinol dans le processus de la vision nocturne.....	110
Figure 27 : Représentation de la structure du complexe domaine C2 de la PKC/ATRA/Ca ²⁺	119
Figure 28 : Hypothèse de la régulation de la PKC par l'ATRA et de l'implication des CRABP.	120
Figure 29 : Modélisation et comparaison des structures protéiques des récepteurs nucléaires RAR et RXR.....	124
Figure 30 : Schématisation des différents types d'élément de réponse reconnus par les récepteurs nucléaires.....	126
Figure 31 : Activation de la transcription par les récepteurs aux rétinol.	132
Figure 32 : Transrépression des facteurs de transcription pro-inflammatoires par les récepteurs aux rétinol : exemple avec AP-1.....	135
Figure 33 : Gel d'agarose à 1 % montrant les bandes correspondant aux sous-unités 18S et 28S des ARNs ribosomiques.	147
Figure 34 : Principe de la PCR quantitative en temps réel utilisant comme agent intercalant le Syber Green.	152
Figure 35 : Programmation des cycles thermiques pour la PCR quantitative en temps réel.....	153
Figure 36 : Vues du logiciel d'analyse de qPCR Thermocycler.	153
Figure 37 : Thermocycleur Ligthcycler TM à capillaires (Roche Molecular Diagnostics) permettant le suivi en temps réel de l'amplification des ADNc.....	154

Figure 38 : Gel d'agarose à 2 % montrant le résultat d'une migration électrophorétique d'ADNc préalablement amplifiés par PCR quantitative en temps réel. La visualisation d'une bande unique à la taille déterminée grâce au marqueur de taille permet de vérifier que le fragment amplifié est celui désiré.	154
Figure 39 : Réaction biochimique mise en œuvre lors du dosage des nitrites par la méthode de Griess.	157
Figure 40 : Exemple de révélation par film autoradiographique d'une puce à cytokines.	160
Figure 41 : Principe du déroulement de la réaction immunoenzymatique sur une puce à cytokines. .	161
Figure 42 : Représentation schématique de l'expérience de « puces à facteurs de transcription».	165
Figure 43 : Exemple de révélation par film autoradiographique d'une puce à facteurs de transcription (TranSignal Protein/DNA Array D).	166
Figure 44 : Caractérisation de la population cellulaire synoviocytaire.	172
Figure 45 : Caractérisation de la population cellulaire chondrocytaire.	173
Figure 46 : Effet des rétinoïdes sur l'expression de RAR- β (gène cible RAR).	174
Figure 47 : Effet des rétinoïdes sur la viabilité de cellules articulaires stimulées par de l'IL-1 recombinante homologue.	175
Figure 48 : Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des isotopes RAR dans les fibroblastes synoviaux de rat.	176
Figure 49 : Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des isotopes RXR dans les fibroblastes synoviaux de rat.	177
Figure 50 : Effet de l'acide 9-cis rétinoïque sur les cytokines induites par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	178
Figure 51 : Effet du co-traitement par la rosiglitazone (Rosi) et l'acide 9-cis rétinoïque (9-cis RA) sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.	179
Figure 52 : Effet des rétinoïdes sur les cytokines induites par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	181
Figure 53 : Effet-dose de l'ATRA sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.	182
Figure 54 : Effet de l'ATRA sur l'activation de nombreux facteurs de transcription dans des fibroblastes synoviaux de rat.	185
Figure 55 : Effet des agonistes sélectifs de RAR sur l'expression de RAR- β (gène cible RAR).	187
Figure 56 : Effet d'agonistes sélectifs de RAR sur les expressions du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β induites par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	189
Figure 57 : Effet de l'inactivation de l'expression des isotopes de RAR sur l'expression de l'isotype RAR correspondant dans les fibroblastes synoviaux de rat.	190
Figure 58 : Effet de l'inactivation de l'expression des isotopes RAR sur l'effet inhibiteur de l'ATRA sur les cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 dans les fibroblastes synoviaux de rat.	191
Figure 59 : Cinétique de phosphorylation de la P38 MAPK dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β	192
Figure 60 : Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de la P38 MAPK induite par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.	192
Figure 61 : Cinétique de phosphorylation de SAPK/JNK dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β	193
Figure 62 : Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de JNK induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	193
Figure 63 : Cinétique de phosphorylation d'ERK _{1/2} dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β	194
Figure 64 : Effet de l'ATRA sur la phosphorylation d'ERK _{1/2} induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	195
Figure 65 : Inhibition de la phosphorylation d'ERK _{1/2} par le PD-98059 dans les fibroblastes synoviaux de rat.	195
Figure 66 : Contribution de la voie ERK _{1/2} à l'inhibition de la production de TNF- α et d'IL-6 induite par l'ATRA dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1.	196

Figure 67 : Contribution de la voie ERK _{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	197
Figure 68 : Contribution de la voie ERK _{1/2} et effet de l'ATRA sur l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.....	198
Figure 69 : Contribution de la voie ERK _{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation de NF-IL-6 induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	198
Figure 70 : Effet de l'ATRA sur l'inhibition de l'activité HDAC induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.	199
Figure 71 : Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des isotypes RAR et RXR dans les fibroblastes synoviaux humains.	200
Figure 72 : Effet des rétinoïdes sur les cytokines induites par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux humains.	202
Figure 73 : Effet des rétinoïdes sur la production de médiateurs induits par la stimulation par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux humains.....	203
Figure 74 : Effet de l'IL-1 β sur l'expression des isotypes RAR et RXR dans les chondrocytes de rat ou humains.	208
Figure 75 : Effet de l'ATRA sur la voie du NO inductible dans des chondrocytes de rat ou humains stimulés par l'IL-1 β	209
Figure 76 : Effet de l'ATRA sur l'expression et l'activité des MMPs induites par l'IL-1 β dans les chondrocytes de rat ou humains.	211
Figure 77 : Effet de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 dans les chondrocytes de rat ou humains.	212
Figure 78 : Induction de l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β	220
Figure 79 : Effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation de l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β	221
Figure 80 : Contribution d'ERK _{1/2} dans l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 et de NF-IL-6 dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β	224
Figure 81 : La production du NO, et que l'activation des MMPs peuvent être stimulées par IL-1 β . .	228
Figure 82 : Schématisation de la conséquence de l'état d'acétylation de la chromatine par les HDAC et les HAT sur la transcription des gènes cibles.	233
Tableau 1 : Différences principales entre les deux pathologies articulaires les plus fréquentes, l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde.	52
Tableau 2 : Principaux agents thérapeutiques et stratégies étudiées pour bloquer la voie NF- κ B à différents niveaux.	89
Tableau 3 : Classification des métalloprotéases.	95
Tableau 4 : Récapitulatif des essais de traitement menés sur les arthropathies par des rétinoïdes.	140
Tableau 5 : Composition des pools de cellules humaines utilisées lors de nos expérimentations.	143
Tableau 6 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés dans les expériences sur les cellules humaines : séquences, températures d'hybridation et numéros d'accension GenBank.	149
Tableau 7 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés dans les expériences sur les cellules de rat : séquences, températures d'hybridation et numéros d'accension GenBank.	150
Tableau 8 : Nature et localisation des protéines détectables sur les puces à cytokines Raybiotech®. Les limites de détection correspondantes sont indiquées en pg/ml entre parenthèses.	159
Tableau 9 : Nature et localisation des facteurs de transcription détectés sur la membrane Panomics.	164
Tableau 10 : Effet de l'ATRA sur la régulation transcriptionnelle impliquée dans la répression des cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.	183
Tableau 11 : Effet de l'ATRA sur la régulation traductionnelle des cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 β	184
Tableau 12 : Facteurs de transcription dont l'activité est au moins doublée ou diminuée de moitié par la stimulation par l'IL-1 β ou sous l'effet de l'ATRA.	186
Tableau 13 : Principaux médiateurs dont la production est modulée par l'IL-1 β (A), l'ATRA (B) ou le 9-cis RA (C) dans les fibroblastes synoviaux humains.	205

Préambule et Objectifs du travail

Les pathologies articulaires sont un problème majeur de santé publique dans les pays occidentaux car elles touchent un nombre croissant d'individus, en raison de l'allongement de l'espérance de vie de la population. Les deux rhumatismes les plus fréquemment observés sont l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde, qui sont deux pathologies fondamentalement différentes sur le plan de leurs mécanismes physiopathologiques et de leur prise en charge. Cependant, le développement d'une inflammation articulaire est un processus commun, bien qu'il ait des causes, une intensité et un mode d'évolution distincts.

L'arthrose est la maladie rhumatismale la plus fréquente. Elle touchait environ 15 % de la population mondiale en 1990, et devrait toucher 18 % de personnes en 2020 (30 % des plus de 75 ans) [pour revue voir (Chevalier X., 1999)]. C'est une pathologie caractérisée par une dégénérescence des structures cartilagineuses articulaires, qui peut être due à un déséquilibre des forces mises en jeu sur l'articulation, à un microtraumatisme, à une malformation, à des facteurs génétiques ou encore à une hypersollicitation (pratique intensive du sport, surcharge pondérale).

La polyarthrite rhumatoïde (PR), quant à elle, est le rhumatisme inflammatoire le plus fréquent, qui touche entre 1 ‰ et 1 % de la population française (Alamanos Y. et Drosos A.A., 2005). C'est une maladie systémique du tissu conjonctif d'origine mal connue, caractérisée par une inflammation articulaire chronique, évoluant par poussées. Cette pathologie résulte d'un dysfonctionnement du système immunitaire, qui conduit à une inflammation articulaire et systémique et à la destruction du cartilage et de l'os.

Face aux rhumatismes, les rhumatologues ont longtemps dû se contenter de traiter les symptômes douloureux grâce à des antalgiques ou à des anti-inflammatoires [pour revue voir (Chevalier X., 1999)]. Puis, les corticoïdes ont révolutionné la prise en charge des patients polyarthritiques. Cependant, leur utilisation chronique et/ou à forte posologie est limitée par l'apparition de nombreux effets indésirables. Plus récemment, le perfectionnement des prothèses de hanche ou de genou a permis de redonner espoir et mobilité à des personnes dont les destructions articulaires s'avèrent trop sévères.

Du fait du caractère dysimmunitaire de la PR, des traitements à visée immunologique ont pu être développés. Il s'agit, d'une part, d'une utilisation rationalisée de molécules immunosuppressives comme le methothrexate, l'azathioprine, ou le léflunomide, qui ne sont cependant pas dénuées d'effets indésirables. D'autre part, l'identification du facteur nécrosant les tumeurs (TNF- α) en 1990, puis la démonstration de son rôle physiopathologique clé dans le PR (Maini R.N. *et al.*, 1994) a ouvert la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique. Ceci a conduit au développement d'anticorps monoclonaux chimériques (infliximab) ou humanisés

(adalimumab) ou de récepteurs solubles (étanercept) capables de neutraliser la cytokine dans le milieu extracellulaire (anticorps, récepteurs solubles) ou sous sa forme membranaire (anticorps). Une stratégie comparable vis-à-vis de l'interleukine (IL)-1 a conduit à la commercialisation de l'anakinra, forme recombinante de son antagoniste naturel. Ces traitements ont permis d'améliorer nettement la qualité de vie des patients, même si les effets indésirables de ces traitements ne sont pas négligeables, notamment pour les anti-TNF- α : risque accru d'infections graves et de cancers [pour revue voir (Bongartz T. *et al.*, 2006)]. D'autres molécules immunomodulatrices sont déjà commercialisées, avec pour objectif de réduire le nombre de lymphocytes B (rituximab, anticorps monoclonal chimérique anti-CD20) ou de prévenir l'activation des lymphocytes T (abatacept, mimétique du CTL4 empêchant l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes).

En combinant ces différents traitements, il devient possible de traiter plus de 50 % des patients polyarthritiques.

Dans la prise en charge thérapeutique de l'arthrose, d'autres molécules prescrites en complément des antalgiques et des anti-inflammatoires, ont été regroupées dans une nouvelle classe thérapeutique sous le vocable d'anti-arthrosiques d'action lente. Parmi ces médicaments, les plus souvent prescrits sont le sulfate de chondroïtine, les extraits insaponifiables d'avocat et de soja, l'oxacéprol, la diacérhéine, ou le sulfate de glucosamine [pour revue voir (Clayton J.J., 2007)]. Malgré leur mécanisme d'action variable et parfois mal connu, ces produits ont en commun la capacité d'inhiber certaines métalloprotéases matricielles (MMPs), voire de stimuler la production de facteurs de croissance comme le facteur de croissance transformant (TGF)- β . Certaines études cliniques, parfois controversées, suggèrent que ces molécules pourraient avoir un effet chondroprotecteur (Clegg D.O. *et al.*, 2006, Dougados M. *et al.*, 2001, Maheu E. *et al.*, 1998).

Ce travail de thèse s'inscrit dans la recherche de nouvelles approches pharmacologiques susceptibles de prévenir les processus inflammatoires et/ou cataboliques observés au cours des rhumatismes inflammatoires. En effet, au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR), la synoviale (tissu qui tapisse la capsule articulaire) est le premier tissu touché par la réaction inflammatoire. Elle va produire massivement des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α (Williams R.O., 2006) et des enzymes aux propriétés cataboliques, les MMPs, qui sont relarguées dans le liquide synovial (Burrage P.S. *et al.*, 2006). Cette inflammation se propage alors aux tissus environnants, à savoir le cartilage et l'os sous-chondral. Le cartilage s'érode jusqu'à mettre à

nu l'os chondral, qui va également subir des modifications (remodelage, résorption osseuse, déminéralisation).

L'étude des potentialités pharmacologiques offertes par les récepteurs nucléaires dans les pathologies articulaires, et notamment celle des récepteurs aux glucocorticoïdes (Morand E.F., 2007) ou aux proliférateurs de peroxyosomes (Fahmi H. *et al.*, 2001, Francois M. *et al.*, 2004, Sabatini M. *et al.*, 2002) a montré des résultats encourageants. Cependant, peu d'études ont concerné les récepteurs aux rétinoïdes, dont font partie les RAR (Retinoic Acid Receptor) et les RXR (Retinoid X Receptor). Ces récepteurs sont subdivisés en trois isotypes (α , β et γ), produits à partir de trois gènes différents (Chambon P., 1996, Giguere V. *et al.*, 1987, Petkovich M. *et al.*, 1987). Pour chaque isotype, plusieurs isoformes différentes par leur région N-terminale existent. Elles sont produites par épissage alternatif et par l'utilisation de deux promoteurs différents. Comme pour tous les autres récepteurs nucléaires, l'activation des récepteurs par la fixation du ligand entraîne la liaison du complexe au niveau de sites spécifiques de l'ADN (RARE, Retinoic Acid Response Element, et RXRE, Retinoid X Response Element). Cette liaison va moduler la transcription de gènes cibles. Un autre mode d'action possible est l'inhibition de certains facteurs de transcription comme AP-1 (Nagpal S. *et al.*, 1995, Pfahl M., 1993), NF- κ B (Austena L.M. *et al.*, 2004), et NF-IL-6 (DiSepio D. *et al.*, 1997), par interaction physique des récepteurs aux rétinoïdes avec les facteurs de transcription, ou par blocage de leurs sites de liaison sur l'ADN.

Les ligands de ces récepteurs, appelés globalement « rétinoïdes », sont des molécules dérivées de la vitamine A. Ils peuvent être classés en 2 groupes :

- les rétinoïdes naturels : le rétinol (Vitamine A) ainsi que ses dérivés métaboliques : l'acide tout-*trans* rétinoïque (ATRA ou trétinoïne, agoniste pan-RAR), l'acide 9-*cis* rétinoïque (9-*cis* RA ou alitrétinoïne, co-agoniste pan-RAR et pan-RXR), l'acide 13-*cis* rétinoïque (13-*cis* RA ou isotrétinoïne, agoniste pan-RAR), le rétinaldéhyde (précurseur de la vitamine A sans propriété de fixation sur les récepteurs), ou encore des dérivés esters (formes de stockage inactives) comme le palmitate de rétinyle.
- Les rétinoïdes de synthèse, agonistes sélectifs d'un isotype ou d'une isoforme de RAR ou de RXR, ou non sélectifs, comme l'acitrétine (Ro-101670, agoniste pan-RAR), le BMS-649 (agoniste pan-RXR), le tazarotène (agoniste RAR- β/γ), le 4-HPR (4 hydroxyphénylrétinamide, agoniste RAR- α/β), le

bexarotène (agoniste pan-RXR), le BMS-453 (agoniste RAR- α), le BMS-961 (agoniste RAR- β) ou encore le BMS-753 (agoniste RAR- γ).

Les rétinoïdes participent à un grand nombre de processus biologiques tels que l'embryogénèse, la reproduction, la vision, la croissance, l'inflammation, la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Ross S.A. *et al.*, 2000). Leurs propriétés différenciatrices et anti-prolifératrices ont permis de développer des médicaments pour traiter des pathologies cutanées tels que le psoriasis, l'acné ou d'autres manifestations moins courantes comme l'hyperkératose épidermolytique ou l'érythrodermie congénitale ichtyosiforme non bulleuse. Les rétinoïdes ont également considérablement amélioré le pronostic vital des patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire, pathologie qui s'accompagne d'un défaut de différenciation des promyélocytes en myélocytes matures [pour revue voir (Mantadakis E. *et al.*, 2008)].

Les potentialités anti-inflammatoires des rétinoïdes ont été peu étudiées dans le domaine de la rhumatologie. Dans quelques études cellulaires, l'ATRA s'est avéré capable d'inhiber l'expression de la collagénase (MMP-1) et la synthèse de PGE₂ dans des fibroblastes synoviaux de lapin stimulés par un ester de phorbol (Brinckerhoff C.E. et Harris E.D., Jr., 1981) ou des fibroblastes synoviaux issus de patients polyarthritiques (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1980). Dans des chondrocytes provenant de patients arthrosiques stimulés par de l'IL-1 β ou du TNF- α (Ho L.J. *et al.*, 2005), l'ATRA, comme plusieurs autres rétinoïdes (9-cis RA, 13-cis RA, 4-HPR) ont inhibé l'expression du TNF- α , ainsi que la production des MMP-1 et -13.

Cependant, dans des modèles animaux d'arthrite, l'administration de rétinoïdes a conduit à des résultats très variables. Par exemple, le traitement de rates immunisées contre le collagène de type II par du 13-cis RA ou du 4-HPR aggrave la sévérité de l'arthrite (Trentham D.E. et Brinckerhoff C.E., 1982). En revanche, chez des rats induits par l'adjuvant complet de Freund (ACF), le 13-cis RA diminue la sévérité des lésions cliniques (score, œdème des pattes postérieures) et radiographiques, et inhibe la production de collagénase (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1983). Il en est de même chez des rats sensibilisés contre les parois de streptocoques pour lesquels le 4-HPR inhibe également de la synthèse de médiateurs inflammatoires comme la PGE₂ ou les MMPs dans la synoviale (Haraoui B. *et al.*, 1985). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Hanglow sur des rats induits par l'ACF et traités par du Ro-23-6457 ou du Ro-23-2895 (Hanglow A.C. *et al.*, 1990, Hanglow A.C. *et al.*, 1989). Paradoxalement, les travaux de Beehler en 2003 ont montré que l'utilisation d'un antagoniste de RAR, le BMS-189453,

diminue également la production des MMP-1, -3 et -13 (Beehler B.C. *et al.*, 2003) chez des souris induites par le collagène ou des rats sensibilisés contre les parois de streptocoques. Il faut cependant souligner que cet antagoniste de RAR maintient une activité anti-AP-1 commune avec d'autres rétinoïdes, par laquelle il diminue la production des MMPs.

Si les potentialités anti-arthritiques des rétinoïdes semblent réelles, elles dépendent fortement de l'agent inducteur de l'arthrite, du sexe de l'animal et surtout de la nature du rétinoïde utilisé, ou de sa spécificité de liaison aux récepteurs RAR et RXR. Ceci est bien illustré par le fait que, dans un même modèle, des effets comparables ont été obtenus avec un agoniste ou un antagoniste de la même cible pharmacologique RAR (Beehler B.C. *et al.*, 2004).

Cependant, le fort pouvoir différenciateur cellulaire des rétinoïdes, en particulier au cours de l'embryogénèse, est susceptible de limiter leur utilisation thérapeutique en rhumatologie. En effet, un apport maternel trop important en vitamine A pendant la grossesse provoque de graves malformations osseuses chez le fœtus (malformations crânio-faciales, non fermeture de la fente palatine...). De même, lorsque des dérivés de la vitamine A sont administrés à des enfants ou des adolescents souffrant de problèmes dermatologiques (Yamauchi P.S. *et al.*, 2004), des anomalies d'ossification ou des altérations du cartilage peuvent survenir (suture de l'épiphyse, raccourcissement de la longueur des membres, augmentation du risque de fractures, diminution de la densité minérale osseuse, ...) (Nesher G. et Zuckner J., 1995). De plus, il a été montré que les rétinoïdes favorisent l'apparition d'un phénotype fibroblastique sur des chondrocytes en culture, avec une diminution de l'expression des collagènes de type II et IX, et une augmentation de celle des collagènes de type I et III (Hering T.M., 1999). Les rétinoïdes promeuvent également l'acquisition d'une activité phosphatase alcaline dans les chondrocytes matures et stimulent l'expression de gènes impliqués dans le processus de minéralisation (Hering T.M., 1999). Ces effets potentiellement délétères pour les tissus articulaires apparaissent principalement lorsque les rétinoïdes sont administrés lors des phases de croissance tissulaire, ce qui limite leur utilisation chez la femme en âge de procréer et chez les enfants. Cependant, ces effets indésirables ne sont pas à craindre si le processus de croissance est terminé, ce qui est le cas dans les pathologies articulaires affectant les adultes. De plus, certains effets indésirables de type tératogène sont acceptables si l'efficacité des produits est démontrée. En effet, le risque tératogène peut être prévenu par l'utilisation d'une méthode contraceptive efficace, comme ceci est déjà le cas pour plusieurs traitements de référence de la PR, que sont le méthotrexate ou le léflunomide. Enfin, les effets néfastes des rétinoïdes pourraient être majoritairement dépendants de l'isotype RAR- γ (Elmazar M.M. et

Nau H., 2004), ce qui suggère que l'utilisation d'agonistes sélectifs des autres isotypes RAR permettrait de diminuer leur incidence. Notons cependant que les études de toxicité des rétinoïdes ont été réalisées sur des animaux alors que leur métabolisme est fortement variable d'une espèce à l'autre (barrière placentaire, clairance, métabolites produits...) (Soprano D.R. et Soprano K.J., 1995), ce qui limite l'extrapolation des données même si cela justifie le principe de précaution chez l'Homme.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'effet de plusieurs rétinoïdes, agonistes des récepteurs RAR et/ou RXR, ou d'un isotype RAR donné, sur plusieurs paramètres de l'inflammation, et ceci dans des cellules représentatives des deux principaux tissus de l'articulation : les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes. Dans les fibroblastes synoviaux, nous avons étudié l'impact des rétinoïdes sur l'expression de trois cytokines pro-inflammatoires fortement exprimées au cours de la PR, le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, en utilisant l'IL-1 β comme stimulus inflammatoire. Dans les chondrocytes, nous nous sommes principalement intéressés à leur effet sur la voie inductible de la NO synthase, voie de production de ce médiateur pro-inflammatoire très active dans ce type cellulaire, et sur l'expression et l'activité des MMPs, enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice cartilagineuse. Afin d'essayer de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués, nous avons exploré certaines voies de signalisation dont celles des MAPKs (mitogen-activated protein kinase), et des facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et NF-IL-6.

Compte tenu des antécédents de spécificité d'espèces dans la réponse pharmacologique à certains agonistes des récepteurs nucléaires, et de la seule démonstration des propriétés anti-arthritiques des rétinoïdes chez les rongeurs, nous avons essayé, dans la mesure du possible, de comparer les effets des molécules dans les cellules humaines ou de rat. En effet, l'exemple le plus connu est celui des fibrates, agonistes de PPAR- α , qui provoquent des hépatocarcinomes chez le rongeur, alors qu'ils sont faiblement hépatotoxiques et non cancérogènes chez l'Homme ou le lapin (Lake B.G., 1995). Un autre exemple dans les cellules articulaires est celui de l'effet des agonistes PPAR sur l'expression de l'IL-1Ra (antagoniste du récepteur à l'IL-1). En effet, les fibrates induisent l'expression de l'IL-1Ra dans les chondrocytes de lapin stimulés par l'IL-1 par un mécanisme PPAR- α dépendant (Francois M. *et al.*, 2006), alors que dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par cette même cytokine, elle est induite par la rosiglitazone par un mécanisme PPAR- β/δ dépendant (Moulin D. *et al.*, 2005). Enfin, dans les fibroblastes synoviaux humains, les fibrates et la rosiglitazone n'ont aucun effet sur l'expression de l'IL-1Ra (données du laboratoire).

Notre travail de thèse a donc pour objectifs d'étudier et de comparer les effets anti-inflammatoires des rétinoïdes dans les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes de rat et humains.

Ce manuscrit rassemble, dans une première partie, une synthèse bibliographique consacrée à l'articulation saine ou pathologique, aux principaux acteurs de la réaction inflammatoire articulaire, et enfin aux rétinoïdes et à leurs récepteurs. Puis, dans une deuxième partie, le matériel et les méthodes qui ont été employées au cours de ce travail seront détaillées, ensuite les principaux résultats obtenus seront présentés, et enfin une dernière partie conclura et discutera ces résultats.



Synthèse bibliographique

Chapitre 1. *L'articulation normale et pathologique*

1 Présentation générale

En anatomie, le terme « articulation » désigne l'ensemble des moyens d'union de deux pièces du squelette entre elles.

Les diarthroses, comme les articulations du genou ou de la hanche, représentent le type le plus complexe d'articulations, ce qui cadre bien avec leurs capacités fonctionnelles très élaborées. Elles possèdent en commun toute une série de structures comparables : os sous-chondral, cartilage, membrane synoviale, qui sont agencées de façon variable en fonction des contraintes mécaniques à assurer.

2 Le cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé, de consistance dure, mais non minéralisé, contrairement au tissu osseux. En condition physiologique, ce tissu n'est ni innervé, ni vascularisé. Cependant, le cartilage lésé lors d'une pathologie peut présenter des zones de vascularisation. Un seul type cellulaire, le chondrocyte, est présent au sein d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante et complexe. Les chondrocytes sont en partie responsables de la synthèse ainsi que de la dégradation de cette matrice. Chez l'Homme adulte, on distingue trois types de cartilage (Mallein-Gerin F. et Van der Rest M., 1996) selon la composition de la matrice extracellulaire : le cartilage fibreux, ou fibrocartilage, qui constitue par exemple les disques intervertébraux, le cartilage élastique, que l'on retrouve par exemple au niveau des oreilles, et le cartilage hyalin, qui recouvre les surfaces articulaires.

2.1 Structure et composition

2.1.1 Aspect macroscopique

Le cartilage articulaire normal apparaît blanc, brillant et légèrement translucide. Sa richesse en protéoglycanes (PGs) lui confère un indice de réfraction élevé qui rend les fibres de collagène invisibles, d'où son qualificatif de « hyalin ». L'épaisseur du cartilage varie d'une articulation à l'autre, mais également d'une zone à une autre dans une même articulation : chez l'Homme, elle est de l'ordre de 1 à 2 mm pour le poignet, de 2 à 4 mm pour la hanche, et

de 6 à 7 mm pour le genou. L'épaisseur du cartilage est proportionnelle aux contraintes mécaniques subies.

2.1.2 Histologie du cartilage articulaire

Le cartilage est composé de 2 éléments : les chondrocytes, qui représentent moins de 5 % du tissu, et la MEC (**Figure 1**). Le principal composant de cette matrice est l'eau (environ 75 % de son poids), retenue en son sein grâce au pouvoir hydrophile des PGs.

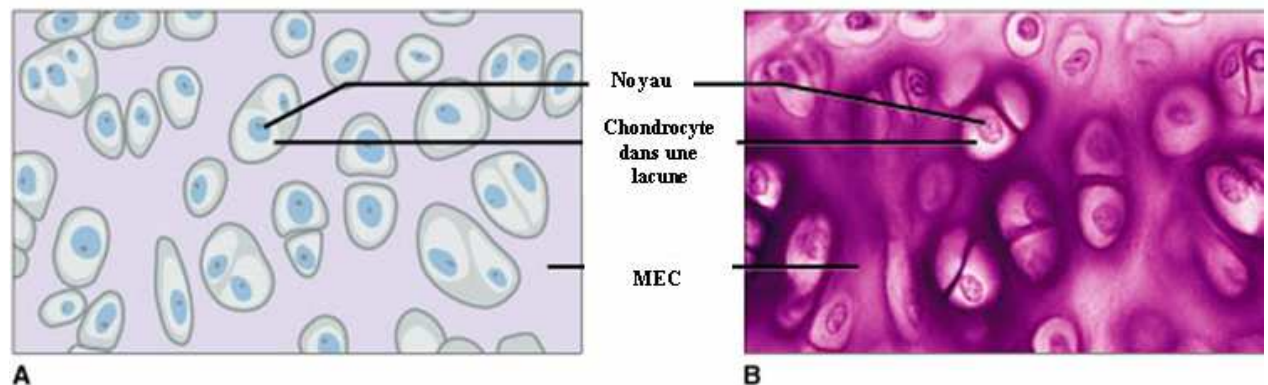


Figure 1 : Représentation d'un cartilage hyalin (A) et aperçu en microscopie optique après une coloration à l'acide périodique-Schiff (B).

Le cartilage hyalin est un cartilage dont la composition biochimique de la MEC lui confère des propriétés mécaniques lui offrant la capacité de transmettre, d'amortir et de distribuer des charges extrêmement importantes grâce à une forte pression osmotique. Il assure le glissement des pièces osseuses entre elles avec un coefficient de friction très bas. Les chondrocytes sont peu abondants, mais de taille importante. Ce type de cartilage est retrouvé principalement au niveau des articulations.

MEC : matrice extracellulaire. Grossissement X 400. Coloration à l'acide périodique-Schiff qui colore en rose-rouge l'acide hyaluronique et les glycoprotéines.

D'après http://people.emich.edu/pbogle/PHED_200/outlines/chapter_05/outline.htm.

Les éléments du cartilage sont assemblés selon une organisation bien définie. La composition et donc les propriétés de la MEC varient suivant son positionnement par rapport à la surface articulaire. Les chondrocytes eux aussi se positionnent différemment et présentent des activités métaboliques variables selon la couche cartilagineuse étudiée (Aydelotte M.B. *et al.*, 1988, Aydelotte M.B. et Kuettner K.E., 1988). On distingue en effet 4 zones distinctes (**Figure 2**) :

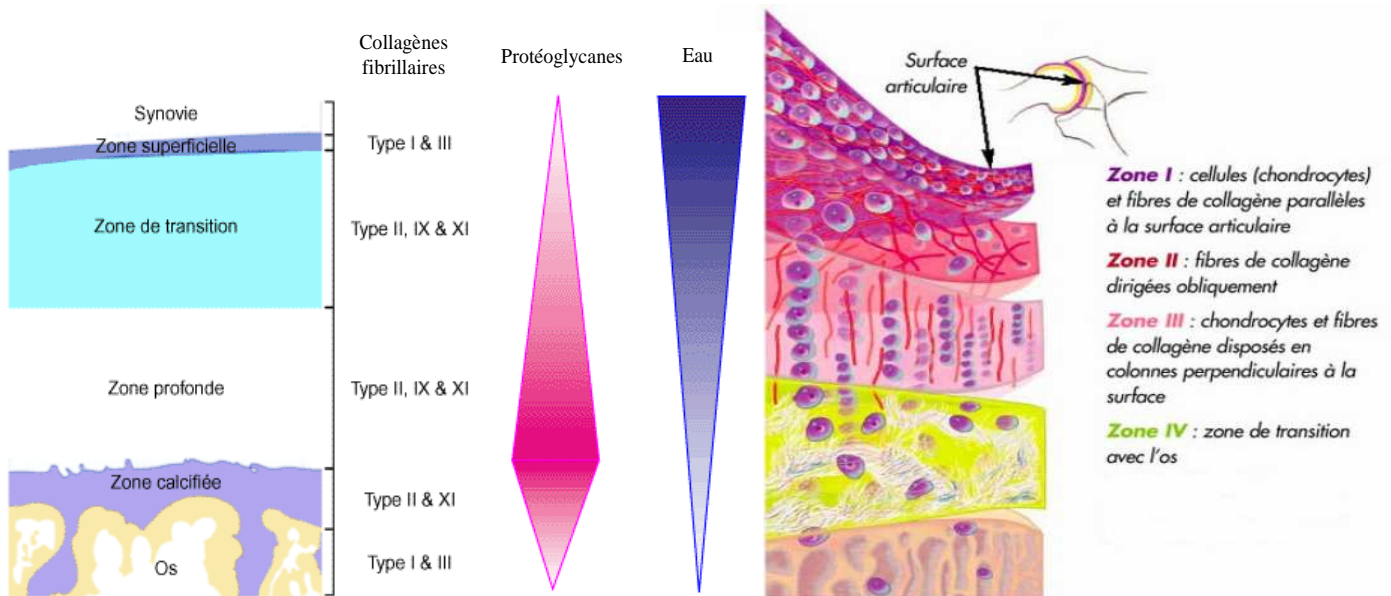


Figure 2 : Représentation schématique des différentes zones du cartilage articulaire adulte.

Le cartilage articulaire adulte est divisé en quatre zones selon le type et l'orientation des fibres de collagène, la quantité de PGs et d'eau, ainsi que la forme et l'activité des chondrocytes. L'épaisseur de ces différentes couches est variable selon l'articulation et l'espèce animale considérée (Hunziker E.B., 1992), elle est en moyenne de 2 à 3 mm chez l'Homme et de 200 à 300 μm chez le lapin ou le rat. D'après l'Atlas de l'arthrose, J-P. Pujol, 1995 et www.labrha.com.

- la zone superficielle, ou tangentielle, très fine. Elle est en contact avec le liquide synovial, et sert donc de surface de « glissement », tout en étant la zone la plus exposée aux contraintes mécaniques. Cette couche représente environ 5 à 10 % de la hauteur totale du cartilage (**Figure 2**). Cette zone peut elle-même être divisée en deux couches : (1) la zone directement en contact avec le liquide synovial, qui est composée d'un film de microfibrilles avec peu de PGs et aucune cellule ; (2) une zone plus profonde qui contient des chondrocytes plats et ellipsoïdaux, disposés parallèlement à la surface articulaire. Ces chondrocytes, deux à trois fois plus nombreux que dans les autres zones, synthétisent une plus forte quantité de collagène et une plus faible quantité de PGs que les chondrocytes des autres zones. Les concentrations en fibronectine et en eau y sont plus élevées. Les chondrocytes synthétisent du collagène de type I et III dont les fibrilles sont orientées parallèlement à la surface articulaire.

- la zone intermédiaire ou de transition : elle constitue la deuxième couche du cartilage, formée de fibres de collagène de type II, IX et XI qui s'entrecroisent obliquement en un réseau non orienté, moins dense que celui de la zone superficielle. L'épaisseur de cette zone, la plus riche en PGs, représente environ 40 à 45 % de l'épaisseur totale du cartilage (**Figure 2**). La quantité d'eau est plus faible que dans la zone superficielle. Les chondrocytes, de forme arrondie et souvent groupés par deux ou trois (cluster), sont entourés d'une matrice

abondante. Ils sont plus actifs dans cette zone que dans la zone supérieure, comme l'indique la taille de leur réticulum endoplasmique et de leur appareil de Golgi.

- la zone radiale ou profonde : elle contient également des fibres de collagène de type II, IX et XI, mais celles-ci sont orientées de façon perpendiculaire à la surface du cartilage. Les chondrocytes de cette zone sont présents en faible densité, arrondis et moins volumineux, orientés en colonnes radiales par rapport à la surface. Cette couche représente également 40 à 45 % de l'épaisseur totale du cartilage (**Figure 2**). Cette zone contient la plus grande quantité de PGs et la plus faible proportion en eau.

- la zone calcifiée : elle est en contact avec la plaque osseuse sous-chondrale à laquelle elle ancre le cartilage et représente entre 5 et 10 % de l'épaisseur totale du cartilage (**Figure 2**). Elle correspond à une zone où le cartilage est en voie de calcification et où les chondrocytes sont hypertrophiques et emprisonnés dans des logettes non calcifiées. Cette zone est quasiment dépourvue de PGs. Elle est séparée de la zone profonde par une couche protéique basophile appelée "tide-mark" (Fawns H.T. et Landells J.W., 1953). Cette couche protéique correspond à un enchevêtrement extrêmement dense de fibres de collagène. Elle contient également des cristaux d'hydroxyapatite et des amas calciques. Des petits canaux permettent le passage des nutriments depuis l'os sous-chondral vers la zone profonde non calcifiée (Fawns H.T. et Landells J.W., 1953).

2.1.3 Composition

2.1.3.1 *La matrice extracellulaire*

La MEC est principalement constituée d'eau (65 à 80 %), de collagènes (10 à 30 % du poids humide du cartilage), de PGs (5 à 10 % du poids humide du cartilage), de hyaluronate, et, en quantité moins importante, de protéines non-collagéniques et de lipides (Kuettner K.E. *et al.*, 1991) (**Figure 3**). La composition, l'organisation, ainsi que les interactions des macromolécules de la MEC confèrent au cartilage ses propriétés biomécaniques.

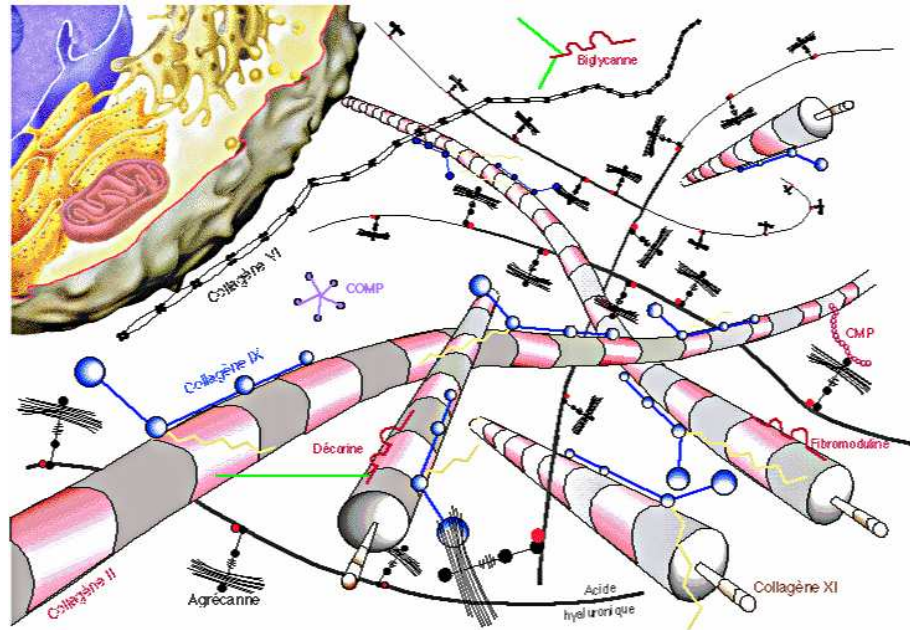


Figure 3 : Le chondrocyte et sa matrice extracellulaire.

Le cartilage est composé d'un seul type de cellule : le chondrocyte. Celui-ci produit une matrice cartilagineuse composée de fibres de collagène de type II, IX et XI, de protéoglycanes (agrécanne, biglycane, décorine, fibromoduline), et diverses autres protéines.

D'après (Mallein-Gerin F. et Van der Rest M., 1996).

2.1.3.2 Les collagènes

Parmi les collagènes du cartilage, on retrouve principalement le collagène de type II (environ 85 % du collagène total), et de façon accessoire les collagènes de type IX (3 %), X (4 %), XI (5 %), et VI (4 %). Le réseau est formé de collagène de type fibrillaire (types II, VI et XI) ou non fibrillaire (types IX et X). Le collagène de type I est absent du cartilage hyalin, bien qu'il représente 90 % du collagène total d'un vertébré.

Le **collagène de type II** est le collagène le plus représenté au sein du cartilage mature (Corvol M.T., 1996). Il forme un réseau dense dont les mailles emprisonnent les agrégats de PGs, ce qui limite l'entrée d'eau dans le tissu. C'est le principal responsable de la résistance aux forces de traction et de compression, ainsi que du maintien de la forme et de la structure tissulaire.

Le **collagène de type VI** stabilise l'interaction collagène/PGs et interagit avec les molécules de hyaluronate (Ayad S. *et al.*, 1989) pour favoriser les relations cellule/matrice.

Le **collagène de type IX** stabilise l'interaction avec les PGs (Olsen B.R., 1997) et favorise la croissance latérale des fibres de collagène de type II.

Le **collagène de type X** est retrouvé en petites quantités dans le cartilage adulte normal (Robins S.P., 1988), et il est principalement localisé dans les zones hypertrophiques du cartilage, les métaphyses (région intermédiaire des os entre diaphyse et épiphyse) et les sites de fracture (Schmid T.M. *et al.*, 1990). Son rôle est encore mal connu, mais il pourrait intervenir dans la croissance et la calcification du cartilage (Eyre D.R. *et al.*, 1992, Mayne R. et Brewton R., 1993).

Le **collagène de type XI** polymérise avec le collagène de type II, et interagit avec l'héparane et l'héparine sulfate pour réguler le diamètre des fibres de collagène II (Eyre D., 2002).

2.1.3.3 Les protéoglycanes (PGs)

Les PGs contribuent à la répartition des contraintes mécaniques sur une surface maximale de l'os sous-chondral (Laasanen M.S. *et al.*, 2003).

Ils sont classés en deux catégories selon leur poids moléculaire :

Les PGs de haut poids moléculaire, formant de larges agrégats, comme par exemple, l'**agrécane**. Celui-ci représente environ 90 % des PGs. Il possède une protéine axiale d'environ 220 kDa, sur laquelle sont fixés, par des résidus sérine ou asparagine, plus d'une centaine de chondroïtines sulfate, une trentaine de kératanes sulfate, et quelques oligosaccharides, ce qui lui confère une masse totale d'environ 2200 kDa (Poole A.R., 1986, Watanabe H. *et al.*, 1998). L'agrécane se lie aux acides hyaluronique de façon non covalente par l'extrémité N-terminale, et cette structure est stabilisée par la présence d'une protéine de liaison (**Figure 3**). Plus de 300 molécules d'agrécane peuvent s'associer autour du squelette d'acides hyaluroniques (HA), et l'ensemble peut atteindre 10 µm (Buckwalter J.A. *et al.*, 1985), maintenu grâce au réseau de fibres de collagène (Hardingham T.E. et Fosang A.J., 1995). Ces PGs, du fait de leur fort poids moléculaire, jouent un rôle majeur dans les propriétés biomécaniques du cartilage (amortissement des chocs notamment).

Les PGs de faible poids moléculaire, tels la **décorine**, le **byglicane**, ou la **fibromoduline**, représentent environ 3 % du tissu cartilagineux (Huber M. *et al.*, 2000), mais ils ne sont pas spécifiques du cartilage.

2.1.3.4 Les protéines non collagéniques

Les protéines non collagéniques et non protéoglycaniques ont été plus particulièrement mises en évidence dans le cartilage hypertrophique. Elles jouent un rôle important dans les

interactions entre les chondrocytes et la matrice extra-cellulaire (Okimura A. *et al.*, 1997) car elle possède une séquence RGD (arginine, glycine, acide aspartique) commune, qui constitue un domaine de liaison aux intégrines (Heinegard D. et Oldberg A., 1989, Peyron J. et Stanescu V., 1994). Les plus abondantes sont la thrombospondine et la fibronectine, l'anchorine II [qui se comporte comme un mécanorécepteur (Mollenhauer J. *et al.*, 1984)], la protéine de liaison de l'agrécan sur le hyaluronate, la chondrocalcine [impliquée dans la minéralisation du cartilage calcifié (Van der Rest M. *et al.*, 1986)] et la COMP (cartilage oligomeric matrix protein).

2.2 Rôles du cartilage

Le cartilage soutient, de manière ferme et flexible à la fois, les pièces osseuses qui s'articulent entre elles. Les deux principaux rôles du cartilage sont de :

- absorber les compressions qui s'exercent à l'intérieur des cavités articulaires et répartir les pressions. Ainsi, les contraintes mécaniques imposées à l'articulation sont diminuées.
- permettre le glissement des pièces de l'articulation, en fournissant une surface articulaire lisse.

L'orientation des fibres de collagène parallèlement à la surface articulaire contribue fortement aux propriétés mécaniques du tissu en apportant une plus grande résistance aux tensions et aux pressions qu'au niveau des zones plus profondes. Cette zone protège le cartilage profond des forces de déchirement générées lors de l'activité articulaire (Roth V. et Mow V.C., 1980). La suppression de cette zone, chez l'animal, augmente la perméabilité du tissu et la charge supportée par la MEC sous-jacente durant la compression. En outre, la surface articulaire limite l'accès du cartilage au système immunitaire, bloquant entre autre la pénétration des immunoglobulines. Une déchirure de cette zone peut donc libérer des constituants natifs ou dégradés du cartilage (néo-épitope), stimuler le système immunitaire et induire à plus ou moins long terme une dégradation du cartilage.

2.3 Physiologie chondrocytaire

2.3.1 Généralités

Le chondrocyte tire son nom du grec : chondros (χονδρο), qui signifie « cartilage » et kytos (κυτος), qui signifie « cellule ». Littéralement, le chondrocyte est donc la « cellule du

cartilage ». Ces cellules d'origine mésenchymateuse sont de forme sphérique et elles sont volumineuses. Elles sont hautement différenciées et spécialisées. Elles mesurent de 10 à 40 µm de diamètre (Stockwell R.A. et Meachim G., 1973), et représentent environ 5 à 10 % du volume du tissu dans le cartilage articulaire adulte humain (Stockwell R.A., 1967). Elles sont agencées par une ou deux cellules au sein de logettes appelées « chondroplast », au sein desquelles les chondroblastes, futurs chondrocytes, se différencient. Ces logettes sont situées à la base de la masse cartilagineuse dure, près de la tête de l'os.

Les cellules sont entourées d'une membrane cytoplasmique très irrégulière, présentant de nombreuses microvacuoles, et de nombreux prolongements qui leur permettent de s'ancrer à la MEC (**Figure 4**). Leur noyau est volumineux, arrondi, et nucléolé dans la région centrale. Leur cytoplasme contient un réticulum endoplasmique rugueux et un appareil de Golgi de taille correspondant à leur activité métabolique (qui est fonction de leur localisation au sein du cartilage) (Horwitz A.L. et Dorfman A., 1968, Revell J.P. et Baldwin J.A.S., 1963). Ils renferment un nombre important de granules de glycogène, ainsi que des lysosomes capables de renouveler les composants de la MEC (Dingle J.T., 1975). Les mitochondries sont peu nombreuses, ce qui est cohérent avec la faible activité respiratoire de ces cellules qui sont localisées dans un environnement anaérobie.

Les cellules présentent deux stades de prolifération : **1**) lors de la phase de croissance du cartilage (chez l'enfant, dans certaines conditions pathologiques, ou lors de la mise en culture *in vitro* des chondrocytes), les cellules sont actives et prolifèrent en mode axial (ligne droite) ou coronaire (cercle) ; **2**) à l'âge adulte, les cellules cessent de proliférer, puis le nombre de chondrocytes diminue avec l'âge. Les cellules passent alors du stade de cellule active, volumineuse, au stade de cellule de réserve et enfin au stade de dégénérescence ou de nécrose.

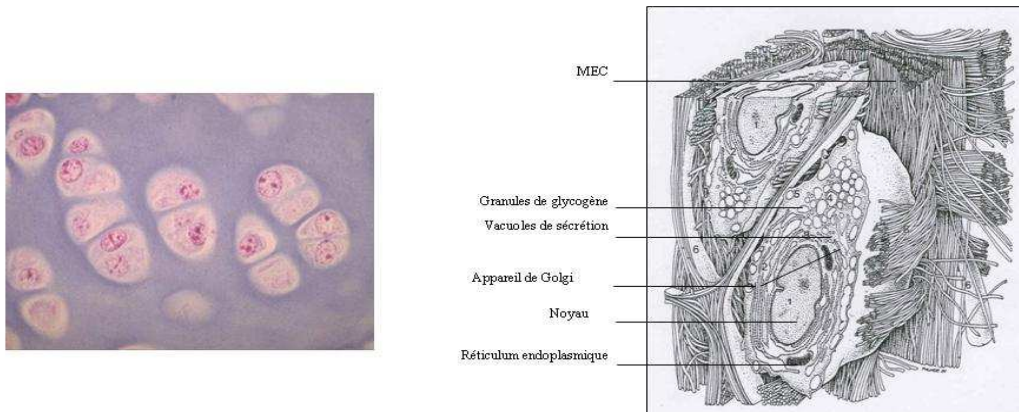


Figure 4 : Vue au microscope électronique d'un chondrocyte et représentation schématique d'un chondrocyte et de son contenu au sein de sa matrice extracellulaire.

Le chondrocyte est l'unique type cellulaire présent dans le cartilage. C'est une cellule d'origine mésenchymateuse, volumineuse et sphérique. Elle est active et prolifère pendant la phase de croissance du cartilage, puis elle cesse de proliférer et entre finalement en phase de dégénérescence ou de nécrose. Cette cellule contient un noyau volumineux, un cytoplasme riche en granules de glycogène, des lysosomes capables de renouveler les composants de la MEC. Les mitochondries sont peu nombreuses, puisque le mode énergétique de ce type cellulaire est essentiellement anaérobie. Son environnement présente des particularités : pH acide, pression osmotique élevée, faible tension en oxygène, peu de contacts intercellulaires.

2.3.2 Métabolisme chondrocytaire

La particularité de ces cellules est de se trouver dans un environnement au pH acide, où la pression osmotique est élevée, et la tension en oxygène faible, ce qui est dû à l'absence de vascularisation du cartilage. Le gradient de pression partielle en oxygène diminue effectivement avec la profondeur du cartilage. Le métabolisme des chondrocytes est donc majoritairement anaérobie (Aydelotte M.B. *et al.*, 1998, Muir H. et Hardingham T.E., 1986). Plus le chondrocyte est proche de la surface articulaire, plus son métabolisme est dit « mixte », c'est-à-dire un mélange entre glycolyse anaérobie et phosphorylation oxydative. Le substrat énergétique préférentiel du chondrocyte est donc le glucose (Goldring M.B., 2006).

2.3.3 Nutrition du chondrocyte

Le chondrocyte étant situé dans un environnement dépourvu de vascularisation et de vaisseau lymphatique, il se nourrit par imbibition par le liquide synovial. Celui-ci est diffusé grâce aux forces de compression engendrées par les mouvements. De même, les déchets métaboliques sont évacués par l'intermédiaire du liquide synovial.

2.3.4 Anabolisme et catabolisme de la MEC

Le chondrocyte contient tous les éléments nécessaires à la synthèse des différents éléments qui constituent la MEC, mais également les protéases capables de les dégrader (van der Kraan P.M. *et al.*, 2002). Il se crée alors un subtil équilibre entre la synthèse et la dégradation des éléments de la MEC, qui, s'il est détruit, engendre des modifications importantes de la structure même du cartilage. L'anabolisme de la MEC est assuré par la production de facteurs de croissance (Franchimont P. et Bassleer C., 1991) qui sont régulés de façon autocrine. Ces facteurs sont par exemple l'IGF I (insulin growth factor I), qui stimule la synthèse des PGs, le TGF- β (transforming growth factor beta) (Trippel S.B., 1995), qui induit également la synthèse des PGs, mais aussi de l'acide hyaluronique, ainsi que des TIMPs (tissue inhibitor metalloprotease), réduisant ainsi la teneur en MMPs (métalloprotéases matricielles). Le catabolisme est quant à lui assuré par des protéases à asparagine ou à cystéines (agissent à pH acide, au niveau cellulaire), des protéases à sérine et des MMPs (agissent à pH neutre, au niveau extracellulaire) (Martel-Pelletier J., 1998, Shlopov B.V. *et al.*, 1997). Les MMPs présentes au sein du cartilage sont principalement des collagénases, des stromélysines, et des gélatinases. D'autres enzymes sont encore capables de digérer les éléments de la MEC, les MT-MMP (membrane type-MMP), associées à la membrane, elles permettent la maturation des cytokines ; les agrécanases et les hyaluronidases (Flannery C.R. *et al.*, 1998) dont les ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs). Toutes ces protéines sont associées à la MEC (sauf les MT-MMP), qui sert de « lieu de stockage » pour ces molécules.

2.3.5 Influence du stress mécanique

Les chondrocytes supportent deux types de contraintes : la pression dynamique (mise en charge, marche), perpendiculaire à la surface, qui augmente l'activité de synthèse ; et la pression statique, qui, elle, diminue l'activité de synthèse de la cellule. L'activité est donc fortement liée aux contraintes mécaniques imposées (Hing W.A. *et al.*, 2002, Lotz M. *et al.*, 1995), qui engendrent une modification morphologique de la cellule (hauteur et volume). Par exemple, lors d'une pathologie dégénérative du cartilage comme l'arthrose, le cartilage est dégradé, la matrice péricellulaire tend alors à augmenter. La cellule perçoit alors moins bien les signaux mécaniques et les réponses métaboliques sont donc anormales.

2.4 Le cartilage pathologique

2.4.1 Rappels sur les principales pathologies articulaires

Les pathologies articulaires sont caractérisées par une modification et une altération progressives de la structure de la membrane synoviale et du cartilage, et même des structures environnantes comme l'os ou les tendons (**Figure 5**). Ceci entraîne, avec le temps, une perte de la fonction articulaire. Il existe cent types de pathologies articulaires différentes, dont les deux formes les plus communes sont (Tableau 1) :

- Les arthropathies dites dégénératives, comme l'**arthrose**, pour lesquelles la destruction du cartilage est un phénomène clé.
- Les arthropathies inflammatoires, telle que la **polyarthrite rhumatoïde** (PR), pour laquelle la destruction du cartilage n'est qu'un facteur secondaire par rapport à l'inflammation initiée dans la synoviale.

Tableau 1 : Différences principales entre les deux pathologies articulaires les plus fréquentes, l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde.

Arthrose	Polyarthrite Rhumatoïde
Premier acteur : le cartilage qui s'érode	Premier acteur : le système immunitaire qui s'attaque à l'articulation
Douleurs, rigidification des articulations des mains, des genoux, de la hanche, ou du dos	Inflammation de toutes les articulations, douleurs sévères au niveau des poignets, des mains et des pieds, mais également au niveau du cou, des coudes, des épaules, des genoux, de la hanche ou des chevilles
Cause majeure d'infirmité aux USA	Éventuellement symptômes extra-articulaires (perte d'appétit, fièvre, baisse d'énergie, anémie, ou grosseurs sous la peau)
Affecte environ 21 millions d'adultes aux USA, et 9 millions en France, plus fréquemment des femmes	Affecte environ 2 millions de personnes aux USA, et 600.000 en France, principalement des femmes, d'âge moyen de 45 ans

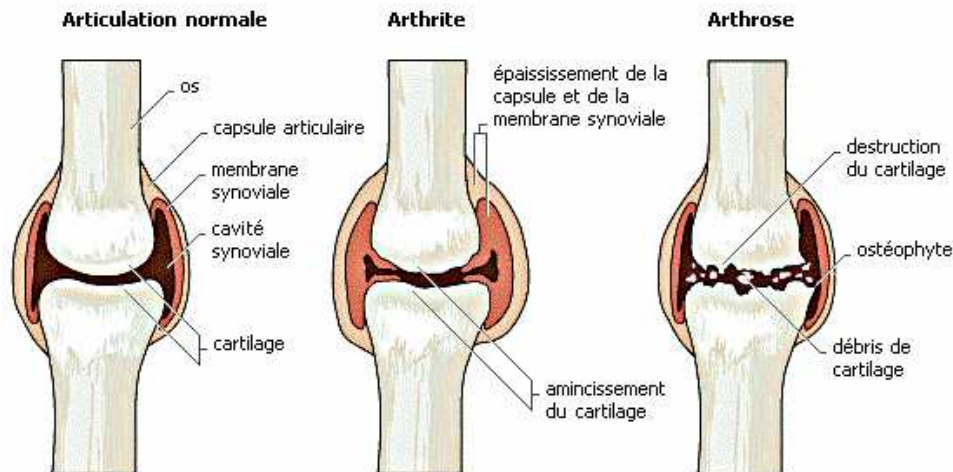


Figure 5 : Schématisation d'une articulation de genou saine, arthritique ou arthrosique.

Au cours d'une pathologie articulaire, toutes les structures de l'articulation sont atteintes : le cartilage, la synoviale, l'os et même les tendons. Lors du développement de l'arthrite, la synoviale s'hypertrophie et le cartilage s'amincit. Au cours de l'arthrose, le cartilage est dégradé et l'os sous-chondral est mis à nu.

D'après <http://obnet.chez-alice.fr/p0465.htm>.

2.4.2 Le cartilage arthrosique

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'arthrose est définie comme « la résultante de phénomènes dégénératifs mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral ». C'est une maladie dégénérative, multifactorielle, qui induit des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires, et biomécaniques du cartilage, qui entraînent la perte d'homéostasie du cartilage. Elle n'est pas considérée comme une arthropathie inflammatoire car peu de neutrophiles sont présents dans le liquide synovial et il n'y a pas de manifestation inflammatoire systémique (Attur M.G. *et al.*, 2002). L'arthrose aboutit à une chondromalacie (« ramollissement »), un œdème, une fissuration, une ulcération, et une perte du cartilage, ainsi qu'à une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de géodes sous-chondrales (**Figure 6**).

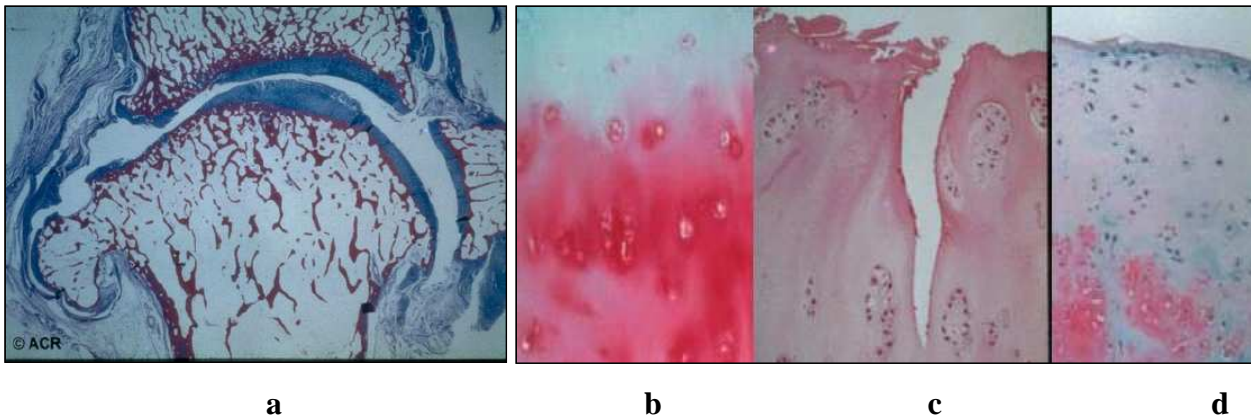


Figure 6 : Vue en microscopie optique de coupes d'articulations colorées au rouge congo.
 En fin de processus arthrosique, l'articulation devient non congruente par la perte du cartilage, par la production d'ostéophytes et par la dénaturation des structures de la synoviale et de la capsule articulaire (a). Sur ces coupes colorées au rouge congo (coloration des protéoglycanes), on observe une diminution de coloration qui correspond à la perte des agrécans (b), des fissures du cartilage (c), et un processus de prolifération de chondrocytes anormaux (d).
 D'après (Tetib J.G., 2005).

Les acteurs de la pathologie arthrosique sont le cartilage, l'os sous-chondral, le liquide synovial, mais aussi la structure ligamentaire. Cependant, la première structure touchée est le cartilage. Les autres structures atteintes sont les conséquences de la pathologie. D'ailleurs, lors de l'induction expérimentale d'une arthrose, la déchirure de la zone superficielle et son remodelage sont les premiers changements détectables (Guilak F. *et al.*, 1994).

Les premières cibles du cartilage touchées sont les PGs. Leur contenu diminue, ils sont moins agrégés, et leur longueur est également réduite (Mankin H.J. et Treadwell B.V., 1986). Aux stades précoces de la maladie, le collagène n'est pas touché. Cependant, par la suite, le réseau collagénique va être altéré, et le collagène libéré va induire une réaction inflammatoire de la membrane synoviale. Aux stades précoces, seule la couche transitionnelle est modifiée par l'œdème, puis des fissures apparaissent en superficie. Elles se propagent ensuite à la couche profonde, puis la couche calcifiée, jusqu'à atteindre la lame osseuse sous-chondrale. Dans les phases les plus avancées de la maladie, le cartilage disparaît et l'os est mis à nu.

La perte des PGs du cartilage s'explique par le fait que les chondrocytes adultes sont incapables physiologiquement de combler le déficit en cartilage acquis au cours de la vie. La capacité d'amortissement du cartilage est alors dépassée. À la surface du chondrocyte, le nombre de récepteurs au bFGF (basic fibroblast growth factor) et à l'IGF diminue, ce qui restreint sa sensibilité vis à vis de ces deux facteurs, et induit l'arrêt de la croissance du cartilage. En revanche, les récepteurs à l'IL-1 de type I et le récepteur P55 au TNF- α augmentent. De plus, le chondrocyte produit des protéases (Flannery C.R. *et al.*, 1998), qui aggravent les conséquences déjà destructrices des contraintes mécaniques induites par le

cartilage vieillissant. Les fragments de PG générés par ces enzymes se retrouvent dans la cavité articulaire où ils sont phagocytés par la synoviale. Cette dernière réagit en produisant de la collagénase, de la stromélysine et des cytokines. Ces molécules sont sécrétées dans le liquide synovial, et pénètrent dans le cartilage. À un premier cercle vicieux « intra-cartilagineux » vient donc s'ajouter un second, « cartilagino-synovial ». La conséquence de ces mécanismes est une inflammation douloureuse, ainsi que la sécrétion de médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial : MMPs, radicaux libres, prostaglandines, cytokines, et facteurs de croissance (Westacott C.I. et Sharif M., 1996). La dernière phase de la maladie est une tentative de réparation du cartilage. En effet, les chondrocytes réagissent en s'hypertrophiant : ils se multiplient et leurs propriétés de synthèse augmentent. Ils tentent de re-synthétiser la trame matricielle par une sécrétion autocrine ou paracrine (de l'os sous-chondral) de facteurs de croissance. Les chondrocytes prolifèrent, et induisent la formation de cartilage *de novo* qui se surajoute de manière anarchique au cartilage préexistant. Mais cette tentative échoue, car le chondrocyte est une cellule fortement différenciée qui se divise mal, sauf au prix d'une dédifférenciation qui le rend alors inapte à une synthèse de matrice efficace. Cette synthèse aboutit à la formation d'ostéophytes sur les régions non portantes du cartilage. Les ostéophytes (ou becs de perroquets) sont des néoformations d'une épiphyse articulaire, avec un os sous-chondral et un tissu cartilagineux de revêtement qui augmentent les surfaces articulaires et bloquent ainsi l'articulation. La régénération ayant avorté, les chondrocytes se dédifférencient (production de matrice mal adaptée) ou meurent par nécrose (*Figure 7*).

À un stade avancé de la maladie, les modifications du cartilage sont structurellement significatives, elles vont des microfissures superficielles à de larges zones de rupture verticale jusqu'à l'os sous-chondral.

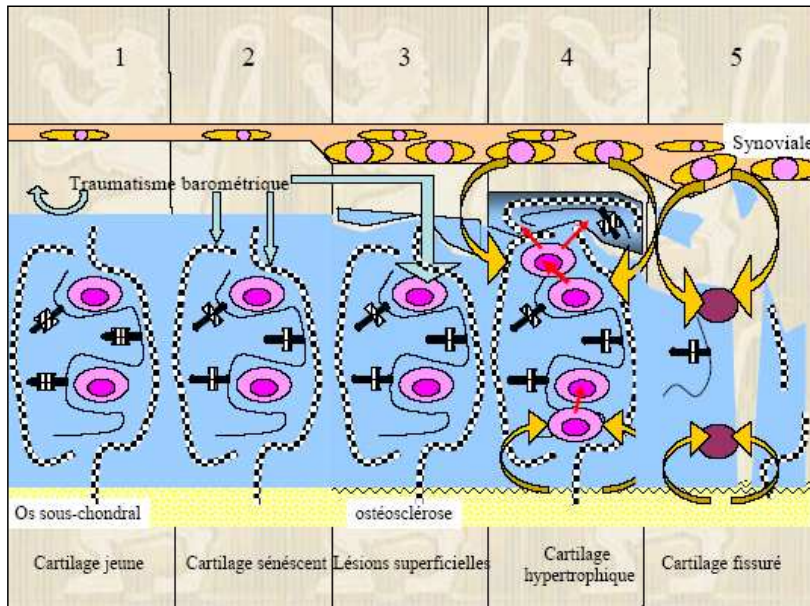


Figure 7 : Représentation schématique du processus de destruction du cartilage au cours de l'arthrose.

Le processus de destruction du cartilage peut être représenté en cinq étapes, allant du cartilage sain, au cartilage sénéscent, conduisant à la perte d'homéostasie de la MEC à cause de la perte du pouvoir osmotique des protéoglycanes, qui entraîne des traumatismes barométriques répétés. Ces conditions aboutissent à des lésions superficielles du cartilage, puis à une réaction hypertrophique des chondrocytes qui vont produire un cartilage de remplacement de qualité médiocre (ostéophytes). Puis les chondrocytes se différencient ou entrent en apoptose, et la synoviale se fibrose.
D'après (Tetib J.G., 2005).

2.4.3 Le cartilage arthritique

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme. On appelle rhumatisme toutes les maladies qui touchent à l'appareil locomoteur. Lorsque plusieurs articulations sont touchées, on parle de « polyarthrite ». La PR touche de nombreuses articulations, avec une prédilection pour la main, le poignet, le genou et le pied. Elle est caractérisée par une inflammation chronique de la membrane synoviale, un dysfonctionnement immunitaire et une érosion progressive du cartilage et de l'os.

Contrairement à la pathologie arthrosique, pour laquelle le cartilage est la première structure touchée, la pathologie arthritique touche en premier lieu la synoviale. Celle-ci devient inflammatoire (étiologie méconnue) et produit de fortes quantités de médiateurs inflammatoires, qui vont agir sur le cartilage et engendrer à terme sa destruction. Comme pour l'arthrose, la production en masse de ces médiateurs induit un déséquilibre dans la balance des facteurs pro/anti-inflammatoires qui va conduire à la perte des PGs du cartilage et à l'affaiblissement du réseau collagénique.

3 La membrane synoviale

3.1 Structure et organisation

La membrane synoviale est un tissu conjonctif lâche hautement spécialisé d'une épaisseur de 50 à 60 μm . Ce tissu tapisse l'intérieur des articulations (**Figure 8**). Cette enveloppe fibreuse forme des replis également appelés « franges synoviales », qui assurent une très grande surface d'échange avec le liquide synovial. Elle est divisée en deux couches (Fell H.B., 1978) :

- une couche qui délimite la cavité articulaire, elle-même divisée en deux sous-couches :
 - intima : couche bordante, composée d'une à deux assises de cellules.
 - sub-intima : couche profonde, contenant de nombreux capillaires sanguins, d'artérioles et de vaisseaux lymphatiques.
- une couche de revêtement qui tapisse la capsule articulaire. Ce tissu n'est pas spécialisé, il est plus ou moins lâche, avec des vaisseaux sanguins de grande taille.

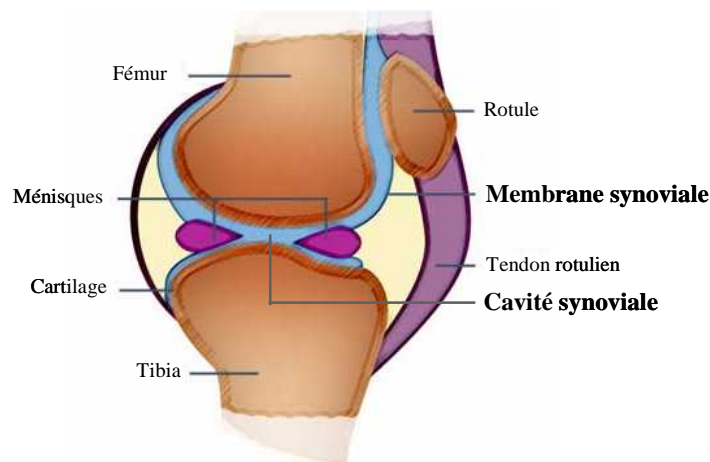


Figure 8 : Représentation schématique d'une articulation de genou et localisation de la membrane synoviale et de la cavité synoviale.

La membrane synoviale est un tissu conjonctif lâche qui tapisse l'intérieur de l'articulation. Elle sécrète le liquide synovial qui lubrifie l'articulation grâce à son coefficient de friction très bas, et nourrit le cartilage grâce à la présence de nombreux vaisseaux sanguins.

D'après <http://www.mon-arthrose.com>.

La membrane synoviale est composée en majorité de fibres élastiques et de tissu adipeux. Elle est richement vascularisée et innervée, ce qui participe au phénomène douloureux dans un contexte de maladie articulaire de nature inflammatoire ou dégénérative. Elle est bordée par des cellules hautement spécialisées : les synoviocytes de type A et B (FitzGerald O. et Bresnihan B., 1995). De plus, un autre type cellulaire représente moins d'1 % des cellules de la membrane synoviale, les cellules « de type dendritique ». Leur rôle est encore mal connu

(Gadher S.J. et Woolley D.E., 1987). Elles sont également appelées mastocytes ou « mast cells ».

3.2 Rôles de la membrane synoviale

La membrane synoviale maintient les deux surfaces articulaires en contact. Elle sécrète le liquide synovial qui lubrifie et nourrit le cartilage. Elle possède trois types de fonctions : tout d'abord une fonction mécanique, de par la sécrétion du liquide synovial, une fonction de nutrition du cartilage, et enfin une fonction de défense contre les infections et l'inflammation. En effet, lors d'une agression mécanique, infectieuse ou inflammatoire, la membrane synoviale s'épaissit, sécrète en excès du liquide synovial, ce qui crée un épanchement. Elle régule également la pression partielle en oxygène, grâce à sa nature fortement vascularisée.

Le liquide synovial, ou liquide articulaire, est un ultra-filtrat du plasma sanguin, dont la teneur en protéines est égale au dixième de celle du plasma, mais lorsque la perméabilité synoviale augmente, sa composition et sa concentration se rapprochent alors de celle du plasma. Dans une articulation saine, le liquide synovial est présent en très faible quantité : il forme un film qui tapisse le cartilage. C'est un liquide transparent ou jaune pâle, limpide, de très forte viscosité. Il est composé principalement d'eau, de sels minéraux, de protéines, d'électrolytes (chlorure, sodium, potassium) et d'urée. Il est riche en hyaluronates (mélange d'acide hyaluronique, de protéines, de polysaccharides, de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique), qui lui confèrent ses propriétés de viscosité. Les hyaluronates forment une sorte de « tamis » qui ne laisse passer que les petites protéines, ce qui explique pourquoi le liquide synovial est dépourvu de fibrinogène, d'immunoglobulines et de macroglobulines. Il est dépourvu de cellule en absence de pathologie.

Le liquide synovial permet avant tout de diminuer les frottements grâce à son coefficient de friction très faible. Il favorise donc le glissement des structures cartilagineuses les unes sur les autres (Buckwalter J.A., 1997). Il évite également les échauffements locaux produits par l'exercice articulaire. De plus, il joue un rôle important dans la nutrition du cartilage. En effet, celui-ci n'étant pas innervé, les échanges avec le sang se font par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins de la membrane synoviale.

La lubrification résulte en fait de combinaisons de mécanismes hydrostatiques et de mécanismes de surface.

- Mécanismes hydrostatiques : ils correspondent à des forces de compression élevées et/ou rapides. Si la pression mécanique appliquée sur le cartilage augmente, celui-ci

joue un rôle d'« éponge » : le liquide synovial jaillit hors de sa cavité. Quand la pression se relâche, le phénomène s'inverse et le liquide synovial rejoint la cavité articulaire par un phénomène d'imbibition.

- Mécanismes de surface : ils correspondent à des forces de faible intensité et/ou de faible vitesse. Les protéines du liquide synovial se lient aux surfaces du cartilage et maintiennent entre elles l'écart nécessaire.

3.3 La physiologie synoviocytaire

Les synoviocytes sont les principales cellules de la membrane synoviale. Ils sont de deux types : les synoviocytes de type A et de type B (**Figure 9**).

- Type A : ou de type macrophagique, ils dérivent de la moëlle osseuse, et plus précisément des monocytes. Ils ont une fonction phagocytaire, et permettent d'éliminer les débris contenus dans l'espace articulaire et synovial.
- Type B : ou de type fibroblastique. Ils sont riches en réticulum endoplasmique granuleux, et possèdent de nombreuses dendrites permettant de former un réseau à la surface de la membrane. Ce sont eux qui synthétisent la majeure partie des constituants du liquide synovial, à savoir l'acide hyaluronique, le collagène, la fibronectine, *etc.* Ils sont également capables de synthétiser des enzymes de dégradation de la synoviale, du cartilage, mais aussi de l'os (collagénase, stromélysine, cathepsine, élastase) en réponse à divers stimuli.

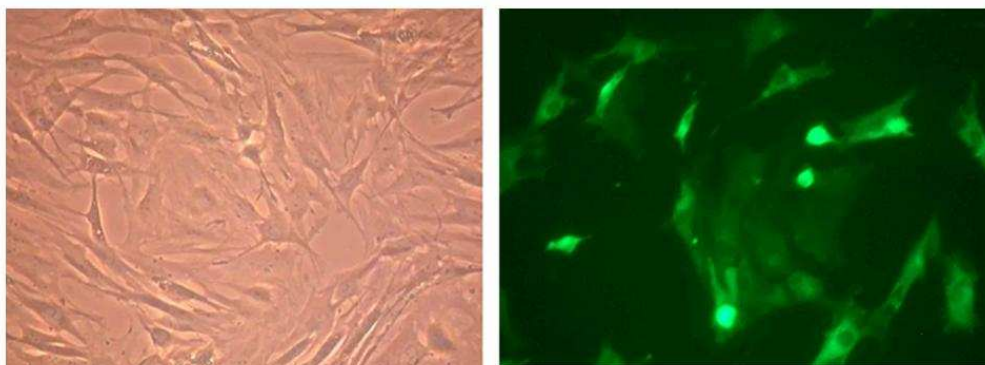


Figure 9 : Vue en microscope optique de synoviocytes de type B mis en culture en monocouche, et transfectés par un plasmide-GFP.

Les synoviocytes de type B sont de type fibroblastiques et se présentent sous une forme étirée. Ce sont les cellules qui composent la membrane synoviale, et qui sont capables de synthétiser les composants du liquide synovial, ainsi que les enzymes de dégradation de la synoviale, du cartilage et de l'os. Sur la photo de droite, les synoviocytes ont été transfectés par un plasmide codant pour la GFP (green fluorescence protein), *pmaxGFP*, qui est intégré dans le cytoplasme des cellules. Grossissement : 100X ; filtre : 475 nm.

3.4 La synoviale pathologique

3.4.1 La synoviale arthrosique

Au cours de la maladie arthrosique, la synoviale est le siège d'une réaction inflammatoire modérée, comparée à celle très importante observée dans la PR. La signification de cette inflammation reste controversée, et les hypothèses conduisant à la synovite sont diverses : des débris liés à l'usure du cartilage, des cristaux ou des cytokines pro-inflammatoires pourraient causer cette inflammation. Cette réaction intervient tardivement dans l'évolution de la maladie et représente un facteur aggravant. Trois aspects de la synoviale sont possibles au cours de l'arthrose : une synoviale normale, une synoviale réactionnelle (le nombre de villosités augmente et la synoviale devient opaque), ou une synoviale inflammatoire (hypervascularisation, prolifération des villosités, hypertrophie). Fréquemment, ces trois types de synoviales s'observent en différents endroits d'une même articulation. La réaction synoviale est modérée et l'hypertrophie des cellules synoviales bordantes est peu importante. Cependant, la synoviale est le siège d'une réaction fibrosante et d'une inflammation cellulaire non négligeable. Ainsi, les synoviocytes déversent dans le liquide synovial des composants qui vont être phagocytés et pourront activer une réaction inflammatoire locale. Ces composants sont notamment l'IL-1, le TNF- α ainsi que des enzymes protéolytiques (collagénase, stromélysine). Le liquide synovial contient un peu plus de cellules que le liquide synovial normal, et sa teneur en hyaluronates diminue avec la sévérité de la pathologie.

3.4.2 La synoviale arthritique

Pour ce qui est de la synoviale, l'évolution de la PR peut être décrite en cinq étapes :

- La première étape est cliniquement « silencieuse », elle implique une anomalie de présentation d'un antigène à des lymphocytes T.
- La deuxième étape est déjà symptomatique sur le plan clinique. Elle fait intervenir la prolifération des lymphocytes T et B qui sont associés au phénomène d'angiogenèse de la membrane synoviale.
- La troisième étape est caractérisée par l'activation des synoviocytes résidents, puis des neutrophiles ayant migré dans le liquide synovial. Le cartilage est encore intact à cette étape.
- La quatrième étape est déterminée par l'atteinte de la synoviale qui conduit à l'activation des chondrocytes, puis à la dégradation du cartilage.

- La cinquième et dernière étape est définie par la poursuite de la dégradation du cartilage, entraînant l'érosion de l'os sous-chondral, la prolifération des chondrocytes et l'altération des ligaments.

L'évolution de la maladie peut se faire quelques fois vers la guérison, mais le plus souvent l'inflammation persiste. Il existe cependant des formes plus ou moins graves, qui vont de la PR peu sévère, non destructrice et localisée, à la PR très sévère et très invalidante. L'inflammation de la membrane synoviale, ou synovite, est responsable de la douleur et du gonflement articulaire. L'épaississement synovial est quant à lui responsable des lésions ostéocartilagineuses et tendineuses des structures avoisinantes. La membrane synoviale secrète abondamment du liquide synovial, qui s'accumule dans l'articulation pour créer un épanchement. Les cellules de la membrane synoviale se multiplient anormalement et les cellules circulantes s'infiltrent, ce qui conduit à l'épaississement et à la désorganisation de cette membrane : c'est le pannus synovial (Bouysset M. *et al.*, 2005, Walker S.E. et Ranatunga S.K., 2006). Ce pannus est un épaississement de l'intima de la membrane synoviale, qui se prolonge dans la cavité articulaire, et qui en recouvre les surfaces (Schiff M.H., 2000, van den Berg W.B. et Bresnihan B., 1999). L'intima passe alors de une à deux couches de cellules à 6 à 8 couches cellulaires, suite à la prolifération des synoviocytes de type A et B (**Figure 10**).

Les synoviocytes participent à la propagation de l'inflammation *via* des mécanismes autocrines et paracrines, grâce à la production de signaux comme les cytokines et les chémokines. Ce sont les cellules principalement responsables de la sécrétion de MMPs, déséquilibrant la balance TIMP/MMP, et de la résorption osseuse par stimulation de l'ostéoclastogénèse. De plus, ces cellules jouent un rôle dans la phase initiale de la synovite en relarguant des chémokines qui vont recruter des leucocytes sur le site de l'articulation, et des cytokines qui vont favoriser l'angiogénèse. Lors de la PR, les fibroblastes sont modifiés, et présentent des taux de prolifération très élevés, une perte d'inhibition de contact, et une expression constitutive de cytokines (Bucala R. *et al.*, 1991, Lafyatis R. *et al.*, 1989, Ritchlin C. *et al.*, 1994). Les fibroblastes secrètent donc toute une panoplie de molécules aux propriétés variées : des cytokines pro-angiogéniques (VEGF [Vascular endothelium growth factor]), des facteurs de croissance (TGF- β , PDGF [Platelet derived growth factor], FGF), des molécules attirant les macrophages (MIP-1 α , Macrophage inflammatory protein-1 α) (Szekanecz Z. *et al.*, 1998) ou les monocytes (MCP-1, Monocyte Chemoattractant protein-1) (Smith R.S. *et al.*, 1997), des MMPs (-1, -3) (Burger D. *et al.*, 1998). Les conséquences de toutes ces manifestations sont une destruction progressive du cartilage, de l'os, une érosion,

un pincement des articulations, une synovite chronique, une infiltration de lymphocytes entre les surfaces articulaires et le pannus synovial.

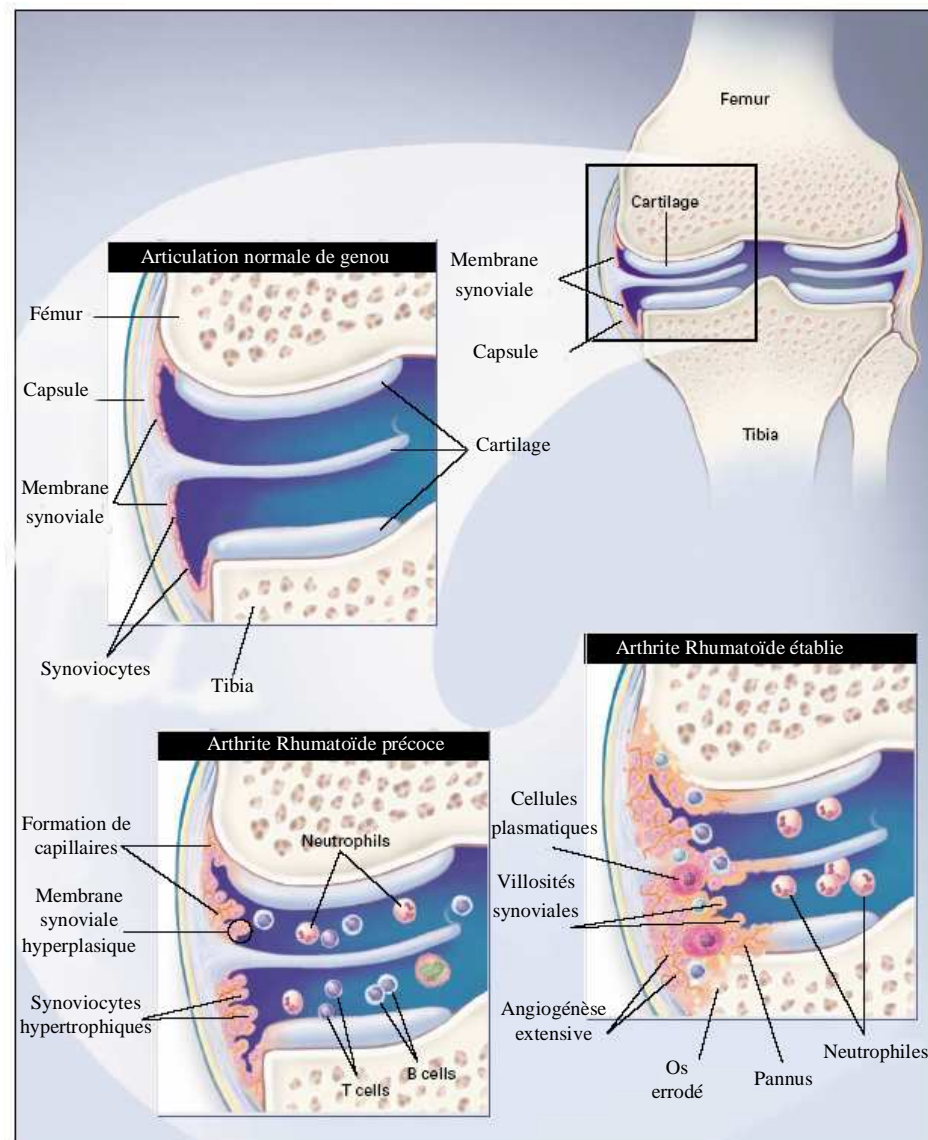


Figure 10 : Pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde.

Dans l'articulation normale du genou, le synovium représente la membrane synoviale (une à deux couches cellulaires) et les tissus conjonctifs sous-jacents. Les cellules présentes au niveau de la synoviale sont les synoviocytes de type A (synoviocytes dits « macrophage-like ») et de type B (synoviocytes dits « fibroblast-like »). Lors de la phase précoce de l'arthrite rhumatoïde, la membrane synoviale s'épaissit du fait de l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules de la synoviale. Un réseau de nouveaux vaisseaux sanguins est formé dans le synovium. Les lymphocytes T (surtout CD4+) et les lymphocytes B s'infiltrent dans la membrane synoviale. Ces cellules sont retrouvées dans le liquide synovial, avec un grand nombre de neutrophiles. Puis la membrane synoviale commence à envahir le cartilage. Lorsque l'arthrite rhumatoïde est établie, la membrane synoviale est transformée en tissu inflammatoire, le pannus. Ce tissu envahit et détruit le cartilage et l'os adjacents. Le pannus est constitué de synoviocytes de type A et B ainsi que de cellules plasmiques. D'après (Choy E.H. et Panayi G.S., 2001).

Chapitre 2. Les principaux acteurs de la réaction inflammatoire articulaire

1 Les cytokines

1.1 Présentation

La première cytokine a été identifiée en 1957. Il s'agissait de l'interféron (IFN), défini à l'époque par son activité anti-virale. Le terme « cytokine » (« cyto » : cellule et « kine » : facteur) fut introduit en 1974 par Stanley Cohen (Cohen S. *et al.*, 1974). En quelques décennies, les cytokines ont connu une explosion d'intérêt dans les domaines de la recherche et de la médecine, qui ont mis en avant l'implication des cytokines dans les processus liés à l'embryogenèse, la reproduction, l'hématopoïèse, la réponse immunitaire, ou l'inflammation. Elles sont également impliquées dans des situations pathologiques comme les maladies inflammatoires chroniques (entérocolites, maladie de Crohn, PR, psoriasis), les hépatites virales, ou le cancer. Les cytokines peuvent aussi être considérées comme des agents thérapeutiques (par exemple le G-CSF [granulocyte-colony stimulating factor] est utilisé pour faciliter la reconstitution hématologique) ou comme des cibles (par exemple le TNF- α dans maladie de Crohn, ou la PR).

Les cytokines sont des messagers chimiques solubles de communication intercellulaire (Fradelizi D., 1998) synthétisés par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus en réponse à un signal activateur. Elles agissent à de très faibles concentrations et à distance, sur de nombreuses cibles. Leur action, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, peut être paracrine (cellules proches), endocrine (cellules ou tissus distants), juxtacrine (cellules en contact), ou autocrine (sur la cellule productrice ou une cellule proche du même type). Il s'agit de protéines ou de glycoprotéines de 8 à 50 kDa. Ces molécules agissent en réseaux, forment des boucles d'amplification et possèdent des propriétés redondantes et pléiotropiques.

Parmi les premières cytokines pro-inflammatoires synthétisées lors du processus inflammatoire, l'IL-1 et le TNF- α jouent un rôle critique (Yoshimura A. *et al.*, 2003). De nombreuses cellules stimulées par ces cytokines sont capables de produire en retour des médiateurs lipidiques de l'inflammation (prostaglandine E₂ [PGE₂] par exemple), des enzymes protéolytiques, des espèces activées de l'oxygène et des chémokines. Elles entretiennent ainsi le processus inflammatoire.

Il existe une trentaine de membres de la famille des cytokines. Les familles principales sont :

- Les interleukines (IL) : les cytokines regroupées sous cette terminologie sont sans parenté biologique ni de fonction entre elles.
- Les chémokines ou chimiokines : ce sont des cytokines de faible poids moléculaire (8 à 10 kDa), ayant toutes en commun un pouvoir chémoattractant. Leur nomenclature est basée sur leur structure protéique, selon le nombre de cystéines conservées en N-terminal, et le nombre d'acides aminés qui les séparent. Elles sont nommées de CCL1 à CCL28, de CXCL1 à CXCL16, XCL1 et 2, et CX3CL1. Elles jouent un rôle clé dans le recrutement et l'activation de nombreuses cellules inflammatoires.
- La famille du facteur nécrosant les tumeurs (TNF).
- Les facteurs stimulant les colonies (CSF).
- Les facteurs de croissance transformant (TGF).

Les cytokines peuvent également être classées en trois catégories selon leurs effets et les cellules qui les activent :

- Les cytokines Th1 : elles regroupent les cytokines produites par des lymphocytes T auxiliaires de type Th1, favorisant l'immunité cellulaire, l'inflammation chronique et la réaction d'hypersensibilité retardée : ce sont essentiellement l'IL-1, l'IL-2, le TNF- α et l'IFN.
- Les cytokines Th2 : elles regroupent les cytokines produites par des lymphocytes T auxiliaires de type Th2, favorisant la production d'immunoglobulines notamment lors de la réaction allergique, comme l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10.
- La cytokine Th17 : les lymphocytes de type Th17 sont induits par l'IL-23, et engendrent la production d'IL-17, ayant des propriétés pro-inflammatoires.

Dans les pathologies ostéo-articulaires, les cytokines jouent un rôle important dans la genèse ou l'amplification des phénomènes inflammatoires, hyperalgiques, immunitaires, mais également dégénératifs. Du point de vue des arthropathies, les cytokines peuvent se répartir en trois catégories :

- Les cytokines pro-inflammatoires ou cataboliques : l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-15, l'IL-17, l'IL-18 ou le TNF- α .
- Les cytokines anti-inflammatoires ou anti-cataboliques : l'IL-1Ra, l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13.
- Les cytokines immuno-modulatrices : l'IL-6, l'IL-11, l'IL-12, l'IL-13 ou l'IFN γ .

- Les cytokines anaboliques : l'IGF-1, le TGF- β ou les BMP (bone morphogenetic protein).

1.2 Les balances des facteurs pro et anti-inflammatoires

1.2.1 La balance cytokinique

Dans l'articulation saine, il existe un équilibre entre les cytokines favorisant la dégradation des constituants matriciels (pro-cataboliques) ou limitant leur biosynthèse (anti-anaboliques) et des cytokines favorisant la réparation du cartilage (pro-anaboliques ou anti-cataboliques). Lorsqu'un déséquilibre s'installe entre la production des facteurs pro- et anti-inflammatoires, une des deux populations prend le dessus sur l'autre (**Figure 11**). C'est le cas par exemple chez les patients atteints de PR, pour qui les biopsies ou l'analyse du liquide synovial montrent une production élevée de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-18, le TNF- α ainsi que diverses chémokines (Feldmann M. *et al.*, 1996). Des cytokines anti-inflammatoires sont également produites (boucle de rétrocontrôle), mais en quantité insuffisante pour pallier la surexpression des cytokines pro-inflammatoires (Katsikis P.D. *et al.*, 1994, Wahl S.M. *et al.*, 1990).

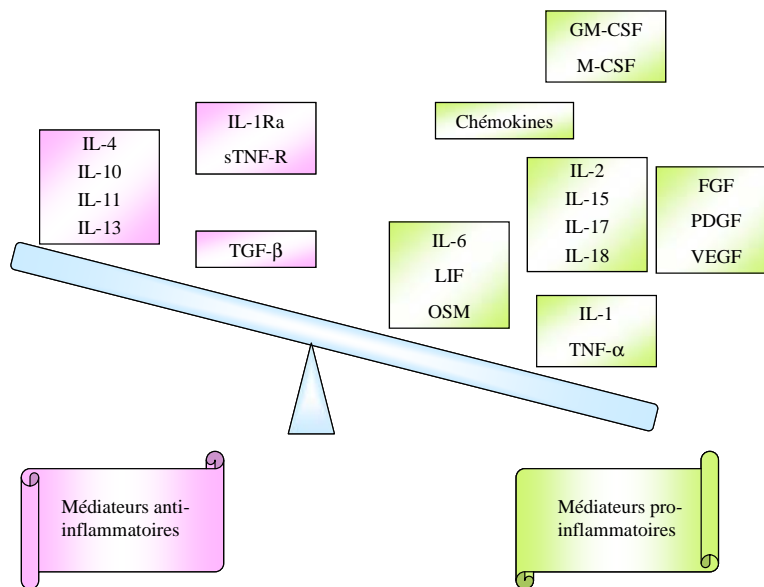


Figure 11 : Balance entre les médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires au cours de la PR.

Lors du développement de la PR, l'articulation est le siège d'un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-inflammatoires qui conduit à la répression des facteurs anti-inflammatoires et à l'induction des facteurs pro-inflammatoires.

TGF : transforming growth factor, sTNF (tumor necrosis factor)-R : soluble receptor for TNF, (G)M-CSF : (granulocyte)-macrophage colony-stimulatory factor, IL (interleukin)-1Ra : antagonist for the receptor IL-1, FGF : fibroblast growth factor, PDGF : plateled-derivated growth factor, VEGF : vascular-endothelium growth factor.

1.2.2 La balance Th1/Th2/Th17

Les cytokines Th1 activent les macrophages, de concert avec l'IL-12 et l'IL-15. Les cytokines Th2 permettent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, elles inhibent la production de cytokines par les macrophages et jouent donc plutôt un rôle anti-inflammatoire. Ces deux types de cytokines s'antagonisent. Au cours de la PR, les lésions évoquent une réaction d'hypersensibilité retardée, et les lymphocytes T CD4 + présents au sein des lésions sont plutôt de type Th1. La conséquence est donc une surproduction d'IL-1, de TNF- α et d'IL-6, et une production importante mais insuffisante d'IL-10 dans le liquide synovial (Llorente L. *et al.*, 1994). Ce modèle Th1/Th2 est actuellement remis en question par la découverte d'un nouveau sous-type de lymphocytes T : les Th17. Ils induisent essentiellement la synthèse d'IL-17, et sont stimulés par l'IL-23. Ils favorisent la production de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires. En effet, l'inhibition de la différenciation des Th17 supprime ou réduit fortement le développement des maladies auto-immunes comme l'encéphalite auto-immune expérimentale chez la souris (Suryani S. et Sutton I., 2007).

1.3 L'interleukine-1 (IL-1)

1.3.1 Les cytokines de la famille et les récepteurs de l'IL-1

Avec le TNF- α , l'IL-1 est l'une des deux cytokines les plus abondantes dans l'inflammation. Elle est principalement produite par les macrophages et les monocytes, mais aussi par les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T, ou encore par les chondrocytes et les synoviocytes (Jouzeau J.Y. *et al.*, 2002, Pacquelet S. *et al.*, 2002, Simonin M.A. *et al.*, 2002).

Les deux formes les plus courantes d'IL-1 sont l'IL-1 α (IL-1F1) et l'IL-1 β (IL-1F2). Il existe cependant d'autres formes d'IL-1 dont l'IL-18 (IL-1F4) et l'IL-1Ra (antagoniste du récepteur à l'IL-1, IL-1F3). De plus, d'autres formes d'IL-1 ont été plus récemment mises à jour grâce à la recherche d'homologues de l'IL-1 dans des bases de données (Lin H. *et al.*, 2001, Mulero J.J. *et al.*, 1999, Smith D.E. *et al.*, 2003). Les fonctions de ces nouvelles isoformes sont encore peu connues (Bufler P. *et al.*, 2002, Gao W. *et al.*, 2003, Lin H. *et al.*, 2001, Taylor S.L. *et al.*, 2002). À l'heure actuelle, il existe sept autres isoformes d'IL-1 décrites, qui vont de l'IL-1F5 à l'IL-1F11 [pour revue voir (Boraschi D. et Tagliabue A., 2006)].

Les différentes formes d'IL-1 peuvent se lier à 10 types de récepteurs différents [pour revue voir (Boraschi D. et Tagliabue A., 2006)]. Les deux principaux récepteurs de surface sont

l'IL-1RI et l'IL-1RII (McMahan C.J. *et al.*, 1991, Sims J.E. *et al.*, 1988). Le récepteur de type I possède un domaine intra-cytoplasmique qui lui permet de générer un signal intracellulaire (Sims J.E. *et al.*, 1993), alors que le récepteur de type II en est dépourvu, ce qui fait de lui un récepteur « leurre » qui va piéger l'IL-1 sans générer de signal (Dinarello C.A., 1996). Ces récepteurs lient l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-1Ra, et de façon moins affine l'IL-1F10. L'IL1Ra se fixe préférentiellement au récepteur de type I, cependant sans générer de signal. Ces récepteurs existent également sous une forme clivée et donc sécrétée, et dans ce cas ils jouent le rôle de « piège » à IL-1, puisqu'ils ne génèrent pas de signal (**Figure 12**).

Il existe également des récepteurs plus spécifiques à l'IL-18 et à l'IL-1F7 : les co-récepteurs IL-18R α et β . De plus, il existe d'autres protéines qui peuvent être associées à des récepteurs, comme la protéine de liaison à l'IL-18, qui sert de piège à l'IL-18 sans transduire de message, et d'autres récepteurs moins étudiés dont certains sont encore orphelins pour l'instant.

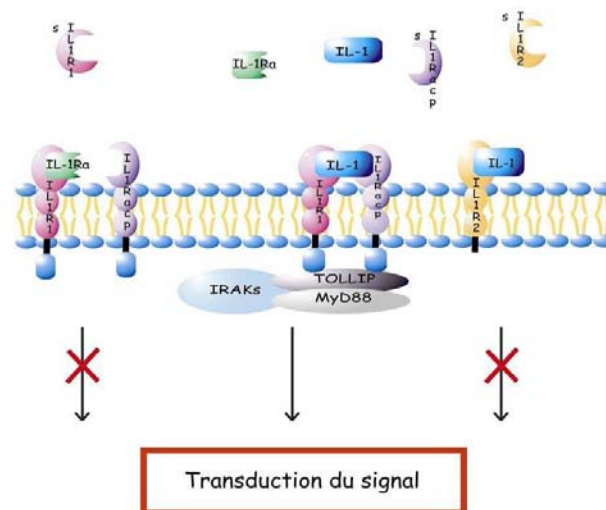


Figure 12 : La famille de l'IL-1 et ses récepteurs : balance entre IL-1, IL-1Ra et sIL-1R.

L'IL-1 est présente sous différentes isoformes, dont l'IL-1 α , l'IL-1 β ou l'antagoniste IL-1Ra. De plus les récepteurs à l'IL-1 sont de plusieurs types : les récepteurs IL-1RI ou IL-1RII existent sous forme membranaire ou soluble (s). L'IL-1RI transduit le signal intracellulaire, alors que l'IL-1RII est dépourvu de la partie intracellulaire et agit donc en récepteur leurre (« decoy R »). Lorsque les récepteurs sont sous forme soluble, ils agissent comme piège à IL-1. L'IL-1Ra, quant à elle, peut se lier aux différents récepteurs, mais ne permet jamais la transduction d'un signal.

Lorsque l'IL-1 se fixe sur son récepteur, une protéine accessoire intervient, l'IL-1RacP (protéine accessoire du récepteur à l'IL-1). Celle-ci est indispensable à la transmission du signal (Wesche H. *et al.*, 1997). Ce complexe de haute affinité recrute alors une autre protéine accessoire, MyD88, ainsi qu'une kinase associée à l'IL-1RI, IRAK (IL-1 receptor associated kinase). Cet ensemble de protéines va permettre la transduction du signal à l'intérieur de la

cellule par différentes voies de signalisation, dont l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (facteur nucléaire κ B) ou AP-1 (protéine activatrice-1) (**Figure 13**).

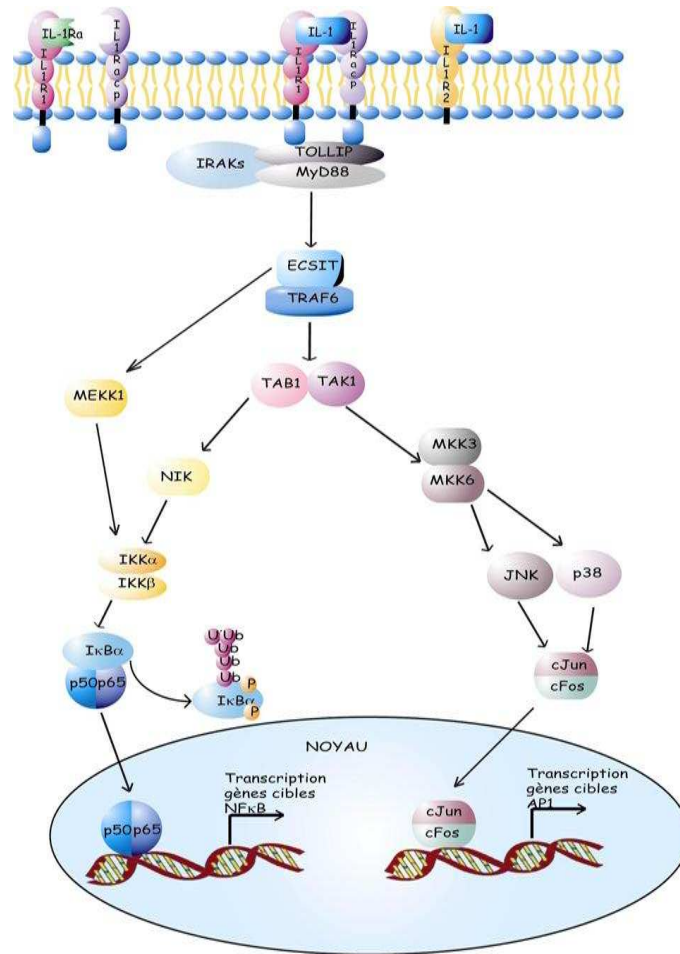


Figure 13 : Représentation des différents récepteurs à l'IL-1, de la transduction du signal et des voies de signalisation intra-cellulaires activées par l'IL-1.

Lorsque l'IL-1 se fixe sur son récepteur, deux protéines accessoires sont recrutées : une protéine associée au récepteur, IL-1RAcP et une kinase, IRAK. Une autre protéine est alors recrutée : MyD88. Ce complexe fonctionnel va engendrer une cascade de signaux intra-cellulaires, et par exemple activer les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B qui vont se fixer au niveau du promoteur de gènes cibles et ainsi activer leur transcription. (TAB : TAK-1-binding protein, TAK : TGF- β -activated kinase-1, MEKK : MAP ERK kinase kinase, MKK : MAP kinase kinase, NIK : NF- κ B-inducing kinase, IKK : I κ B kinase, I κ B : inhibitor of κ B, JNK : c-Jun N-terminal MAP kinase).

1.3.2 Synthèse et principaux effets cellulaires de l'interleukine-1

L'IL-1 α et l'IL-1 β sont synthétisées sous forme d'une pré-protéine de 31 kDa, qui est ensuite clivée par protéolyse en protéine mature de 17 kDa, par l'enzyme de conversion de l'IL-1 (ICE, IL-1 converting enzyme ou caspase-1), qui permet également la maturation de l'IL-18. L'IL-1 α , quant à elle, est clivée par la calpaïne.

L'IL-1 est la plus typique des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la PR ou l'arthrose. Elle induit la dégradation des tissus conjonctifs par le biais de l'induction de

protéases comme la stromélysine et la collagénase (Pelletier J.P. *et al.*, 1993, Unemori E.N. *et al.*, 1991) et de l'inhibition de la synthèse des éléments de la MEC : inhibition de l'expression du pro-collagène de type II (Goldring M.B. *et al.*, 1994) et de la synthèse des PGs dans les chondrocytes (Taskiran D. *et al.*, 1994). C'est également un puissant inhibiteur de la prolifération chondrocytaire (Guerne P.A. *et al.*, 1995). Enfin, cette cytokine permet à elle seule d'induire un grand nombre d'autres facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6, les prostaglandines ou le NO.

1.3.3 Rôles de l'IL-1 dans les pathologies articulaires

1.3.3.1 Polyarthrite Rhumatoïde

Le rôle pathogénique de l'IL-1 a été démontré dans de nombreuses maladies auto-immunes comme la PR, les maladies inflammatoires intestinales, et les pathologies granulomateuses. L'élément primordial dans la pathogenèse de ces maladies est un déséquilibre entre la production d'IL-1 et de l'antagoniste de son récepteur, l'IL-1Ra (Dayer J.M., 2003, Seckinger P. *et al.*, 1987).

De nombreuses observations ont montré que, dans la PR, la destruction des tissus et les conséquences qui en découlent sont dues en partie à la dégradation de la MEC par des enzymes protéolytiques comme les MMPs, ainsi qu'à la synthèse de PGE₂ par les prostaglandine E synthases (PGES). Ces deux groupes d'enzymes sont induits par l'IL-1 dans les chondrocytes (Campbell I.K. *et al.*, 1990, Malfait A.M. *et al.*, 1994, Martel-Pelletier J. *et al.*, 1994, Pelletier J.P. *et al.*, 1995). De plus, l'IL-1 est associée à l'activation des ostéoclastes et donc à l'augmentation de la résorption osseuse. En effet, plusieurs travaux ont montré que l'IL-1 induisait cette résorption osseuse *in vitro*, et que des taux élevés d'IL-1 dans le fluide gingival étaient corrélés à la sévérité de la résorption osseuse. L'implication de l'IL-1 dans la PR a été confirmée par des injections d'IL-1 α ou d'IL-1 β dans des articulations de genou de lapin. Au bout de quelques heures seulement, les auteurs ont pu mettre en évidence l'accumulation de leucocytes dans le liquide synovial et une perte des PGs dans le cartilage (Henderson B. et Pettipher E.R., 1988, Pettipher E.R. *et al.*, 1988). La poursuite de l'injection d'IL-1 α pendant deux semaines induit des modifications sévères de l'articulation (Feige U. *et al.*, 1989). Ces résultats ont été confirmés chez le rat (Chandrasekhar S. *et al.*, 1990). De plus, des souris déficientes en IL-1 β , sensibilisées par des parois de streptocoques développent une arthrite beaucoup moins grave que les souris contrôles (van den Berg W.B. *et al.*, 1999). Enfin, l'injection d'anticorps anti-IL-1 améliore l'arthrite chez la souris et diminue également

l'atteinte du cartilage (Joosten L.A. *et al.*, 1996). L'importance de l'IL-1 au cours du développement de l'arthrite a également été mise en évidence par la transfection d'un plasmide codant pour l'IL-1Ra chez des animaux arthritiques, avec pour résultat une amélioration des signes cliniques (Makarov S.S. *et al.*, 1996). De la même manière, des animaux knock-out pour l'IL-1Ra développent une arthrite au collagène plus rapidement et de façon plus sévère que les animaux contrôles (Hirsch E. *et al.*, 1996, Horai R. *et al.*, 2000, Ma Y. *et al.*, 1998). Enfin, des animaux transgéniques surexprimant l'IL-1Ra présentent une incidence et une sévérité de la PR réduites, et une destruction osseuse et cartilagineuse diminuée (Olivera D.L. *et al.*, 1993, Rordorf-Adam C. *et al.*, 1994). Des essais cliniques randomisés ont permis de tester l'efficacité de cette cytokine anti-inflammatoire, dont le nom pharmaceutique est l'Anakinra (kineret®). Le traitement par l'IL-1Ra a permis de diminuer la progression de la maladie, et de diminuer l'érosion mesurée par radiographie (Jiang Y., 1998). Ce traitement réduit également le nombre d'articulations sensibles (Lebsack M.E. *et al.*, 1991), la sédimentation érythémateuse, la production de protéine C-réactive, le gonflement et la douleur articulaires, ainsi que la sévérité de la maladie de presque 50 %.

1.3.3.2 Arthrose

L'IL-1 a été détectée dans le liquide synovial des patients arthrosiques, bien qu'en concentration moins élevée que chez les patients arthritiques (Farahat M.N. *et al.*, 1993, Melchiorri C. *et al.*, 1998, Middleton J. *et al.*, 1996, Moos V. *et al.*, 1999, Myers S.L. *et al.*, 1990, Smith M.D. *et al.*, 1997). Elle a également été détectée dans la membrane synoviale (Myers S.L. *et al.*, 1990, Towle C.A. *et al.*, 1997). Elle est produite *in vitro* par les chondrocytes et les synoviocytes (Au R.Y. *et al.*, 2007, Morita Y. *et al.*, 2001).

Comme pour la PR, l'injection d'IL-1Ra a été testée dans des modèles animaux d'arthrose. Ces expérimentations ont mis en évidence un ralentissement de la progression de la pathologie, une protection du cartilage, ainsi qu'une diminution de la production de MMP-1 dans le cartilage et enfin une réduction du nombre et de la taille des ostéophytes (Caron J.P. *et al.*, 1996, Fernandes J.C. *et al.*, 2002, Pelletier J.P. *et al.*, 1997). De même, des essais de transfert du gène de l'IL-1Ra ont été effectués dans des modèles animaux d'arthrose, et ont montré que l'intégrité du cartilage des animaux était conservée. Cependant, l'inflammation de la synoviale n'a pas été réduite (Fernandes J. *et al.*, 1999, Frisbie D.D. *et al.*, 2002, Goupille P. *et al.*, 2003, Pelletier J.P. *et al.*, 1997).

Des essais cliniques ont également été menés sur des patients arthrosiques. Cependant, les résultats restent mitigés du fait du faible nombre de patients pour qui une amélioration a été rapportée (Chevalier X. *et al.*, 2005).

La stratégie anti-IL-1 montre de véritables effets thérapeutiques dans le traitement de la PR et des effets à confirmer dans le traitement de l'arthrose. Toutefois, la courte durée de vie de l'IL-1Ra dans le plasma oblige à un traitement journalier à des doses importantes (Campion G.V. *et al.*, 1996). De plus, environ 30 % des patients ne répondent pas à ce traitement, et un nombre considérable de patients déclarent ne pas en être satisfaits (Cohen S. *et al.*, 2002, Lipsky P.E. *et al.*, 2000, Redlich K. *et al.*, 2003, Weinblatt M.E. *et al.*, 2003, Weinblatt M.E. *et al.*, 1999).

1.4 Le facteur nécrosant les tumeurs (TNF- α)

1.4.1 Les cytokines de la famille et les récepteurs du TNF- α

La famille du TNF comprend au total 19 membres, dont les plus connus sont le TNF- α , FasL, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), la lymphotoxine, ou encore RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand). Tous ces ligands ne vont pas conduire à la mort cellulaire, puisqu'au contraire certains participent à la survie des cellules (comme CD27L, CD30L ou CD40L). Ils sont principalement impliqués dans des activités biologiques au cœur du système immunitaire, en modulant les aspects spécifiques de l'immunité cellulaire et humorale. Les membres de la famille du TNF sont synthétisés sous forme d'un précurseur transmembranaire, dont la partie extra-cellulaire va être clivée par une protéase. La forme soluble du TNF va alors se trimériser pour se fixer à l'un des 29 membres de la famille des récepteurs au TNF, lui-même sous forme de trimère.

1.4.2 Synthèse et principaux effets cellulaires du TNF- α

Le TNF- α est produit sous la forme d'un précurseur de 26 kDa. Cette protéine, même immature et liée à la membrane plasmique, est biologiquement active. Elle possède un domaine extracellulaire qui peut être clivé par une enzyme, la TACE (TNF- α converting enzyme, ou ADAM [adisintegrin and metalloprotease]-17) (Black R.A. *et al.*, 1997). Cette forme de 17 kDa est soluble (Jones E.Y. *et al.*, 1989), mais nécessite, comme la forme membranaire, la formation d'un homotrimère pour être active.

Le TNF- α peut se lier avec une affinité élevée (Vilcek J. et Lee T.H., 1991) à deux récepteurs : le TNFR1 et le TNFR2 (Bazzoni F. et Beutler B., 1996, Brockhaus M. *et al.*, 1990). Ces deux récepteurs, assez semblables, possèdent des domaines cytoplasmiques très différents (Pfeffer K. *et al.*, 1993), et donc des voies de signalisation distinctes. Le TNFR1 (p60, p55, ou CD120a) serait plutôt responsable des propriétés pro-inflammatoires du TNF- α , et des réponses de défense contre le non-soi (Peschon J.J. *et al.*, 1998, Tartaglia L.A. *et al.*, 1993). Cette fonction a été particulièrement bien étudiée lors du choc septique (Evans T.J. *et al.*, 1994). Le TNFR2 (p80, p75 ou CD120b), quant à lui, présente une affinité moindre pour le TNF- α (Grell M. *et al.*, 1998) et joue plutôt un rôle dans la stimulation de la prolifération. Comme pour les récepteurs membranaires à l'IL-1, les récepteurs membranaires au TNF- α peuvent être clivés pour produire une forme soluble. Ce clivage s'effectue par la même enzyme qui active le TNF- α : l'ADAM-17 ou TACE (Reddy P. *et al.*, 2000), en réponse à un stimulus inflammatoire. Ceci génère un fragment extracellulaire soluble, qui va fixer le TNF- α et ainsi inhiber son effet. De plus, le récepteur au TNF- α de type 1 peut également être clivé par une autre enzyme : ARTS-1 (aminopeptidase regulator of TNF-R1 shedding), qui appartient à la famille des MMPs à zinc (Cui X. *et al.*, 2002). Le clivage du récepteur par ARTS-1 est associé à deux autres protéines : NUCB2 (nucleobindin 2) et NEFA (DNA binding, EF-hand, acidic amino acid region) (Islam A. *et al.*, 2006).

Le récepteur TNFR1 possède un domaine dit de « mort cellulaire » (death domain, DD), dont est dépourvu le récepteur de type 2. Ce domaine de 70 acides aminés est essentiel aux propriétés apoptotiques du TNF- α . Il permet en effet la fixation de protéines accessoires comme FADD (Fas-associated DD containing protein), et TRADD (TNFR1-associated DD containing protein). TRADD et FADD activent des voies pro-apoptotiques et inflammatoires caractéristiques du TNFR1 (**Figure 14**).

Le TNF- α est majoritairement produit par les phagocytes mononucléés, en particulier les macrophages, les monocytes, les fibroblastes et les lymphocytes B et T, ou encore les synoviocytes et les chondrocytes (Au R.Y. *et al.*, 2007, Morita Y. *et al.*, 2001). La plupart de ses effets pléiotropes seraient dus à des événements précoces comme l'activation de facteurs de transcription (Flora G. *et al.*, 2002, Schubert S.Y. *et al.*, 2002), mais également à des événements tardifs comme l'activation de la caspase-3 (Filippatos G. *et al.*, 2004) et à une réponse anti-proliférative. Les conséquences de l'action du TNF- α sont le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires par la production de médiateurs comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le PDGF (platelet derived growth factor), le TGF- β , la PGE₂, des prostacyclines ou le

GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulatory factor) (Butler D.M. *et al.*, 1995, Haworth C. *et al.*, 1991, Nawroth P.P. *et al.*, 1986). Le TNF- α stimule également les fibroblastes afin qu'ils expriment des molécules d'adhésion, ce qui augmente l'affluence des leucocytes sur le site de l'inflammation, par exemple les articulations des patients atteints de PR.

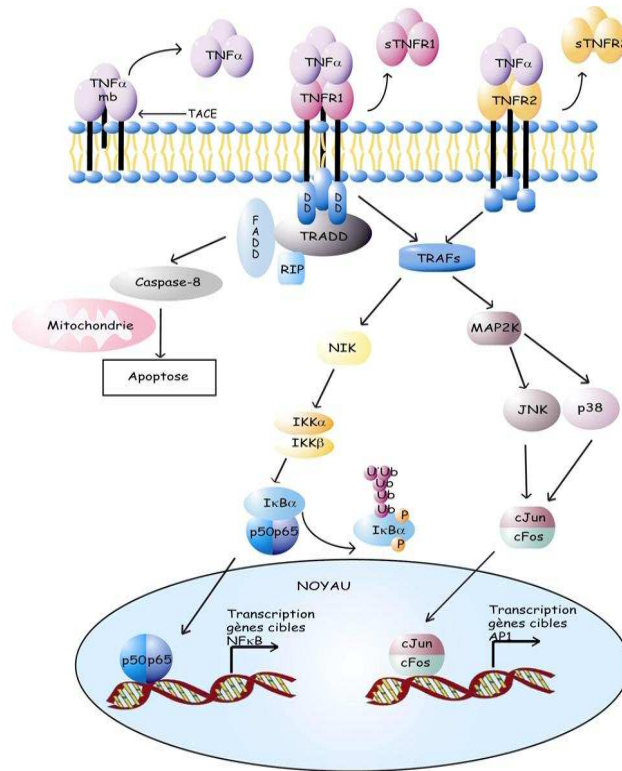


Figure 14 : Représentation des différents récepteurs au TNF- α , de la transduction du signal et des voies de signalisation intra-cellulaires activées par le TNF- α

Le TNF- α est présent sous forme trimérique et lié à la membrane plasmique. Il peut être clivé par une enzyme, la TACE (TNF- α converting enzyme) et ainsi se présenter sous une forme soluble. Le TNF- α peut alors se fixer sur deux récepteurs, le TNFR1 ou le TNFR2, qui existent tous deux sous une forme membranaire et une forme soluble (s). Seule la forme membranaire TNFR1, dotée d'un domaine de mort cellulaire (DD, death domain) est capable de transduire le signal apoptotique. Après la fixation du TNF- α , le système récepteuriel active les protéines accessoires TRADD (TNFR1-associated DD), FADD (Fas-associated DD containing protein) et RIP (receptor interacting protein). Une cascade de signaux intra-cellulaires est alors activée, aboutissant par exemple à l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B qui vont se fixer au niveau du promoteur de gènes cibles et ainsi activer leur transcription. (MAPKK : MAP kinase kinase, NIK : NF- κ B-inducing kinase, IKK : I κ B kinase, I κ B : inhibitor of κ B, JNK : c-Jun N-terminal).

1.4.3 Rôle du TNF- α dans les pathologies articulaires

1.4.3.1 Polyarthrite Rhumatoïde

L'effet pro-inflammatoire du TNF- α a été notamment détecté grâce à ses effets pyrogènes, liés à la libération de PGE₂. Le TNF- α favorise également la résorption osseuse

ainsi que la dégradation du cartilage (Saklatvala J., 1986). De plus, il est capable d'augmenter la production de MMP-1 et de PGE₂ dans les fibroblastes et les synoviocytes de patients atteints de PR (Dayer J.M. *et al.*, 1985). Afin de préciser les effets du TNF- α , des études *in vitro* utilisant des anticorps anti-TNF- α ont prouvé que ceux-ci inhibaient la synthèse d'IL-1 (Brennan F.M. *et al.*, 1989), la production de GM-CSF, d'IL-6, d'IL-8 ainsi que celles de MCP et de VEGF (Alvaro-Gracia J.M. *et al.*, 1991, Butler D.M. *et al.*, 1995) dans des cellules articulaires. Ces effets ont été confirmés par des études cliniques chez des patients polyarthritiques (Charles P.J. *et al.*, 2000, Kraan M.C. *et al.*, 2001, Lorenz H.M. *et al.*, 1996, Paleolog E.M. *et al.*, 1998, Ulfgren A.K. *et al.*, 2000). De façon cohérente, il a été récemment démontré que le TNF- α générant une destruction de l'articulation (résorption osseuse, atteinte du cartilage, inflammation de la synoviale) par le biais de l'induction de la synthèse de l'IL-1. En effet, des souris KO pour l'IL-1 α et β développent une arthrite au TNF- α avec des symptômes atténués par rapport aux souris contrôles (pas de perte de poids, inflammation de la synoviale réduite, érosion de l'os restreinte, moins de perte des PGs...) (Zwerina J. *et al.*, 2007).

De plus, des souris transgéniques exprimant le gène du TNF- α dérégulé développent une arthrite spontanée (Keffer J. *et al.*, 1991), alors qu'un prétraitement avec un anticorps anti-TNF- α ou un récepteur soluble au TNF- α améliore les symptômes de l'arthrite chez des souris induites au collagène (Williams R.O. *et al.*, 1992, Wooley P.H. *et al.*, 1993).

Enfin, les niveaux de TNF- α dans les séra et les liquides synoviaux de patients atteints de PR sont très élevés, et quatre à cinq fois supérieurs sur le site même de l'inflammation (synoviale) par rapport au plasma (Chu C.Q. *et al.*, 1991).

Au vu de l'importance de cette cytokine dans le développement de la PR, des traitements ont d'ores et déjà été testés : l'Infliximab (Remicade[®]), un anticorps chimérique liant le TNF- α soluble et membranaire, l'Etanercept (Enbrel[®]), une protéine de fusion d'un récepteur soluble au TNF- α et de la partie Fc d'IgG1, ou encore l'adalimumab (Humira[®]), une protéine recombinante d'un IgG1 et d'un anticorps monoclonal dirigé contre le TNF- α .

L'efficacité de ces antagonistes du TNF- α dans la PR a été établie par des essais cliniques randomisés (Gartlehner G. *et al.*, 2006, Hochberg M.C. *et al.*, 2005). Les antagonistes ont clairement démontré un ralentissement de la progression radiographique de la maladie, une amélioration de la qualité de vie des patients atteints de PR. Cependant, ces traitements ont mis en évidence des risques d'infection grave au niveau pulmonaire, dermal, ou gastro-intestinal (Bongartz T. *et al.*, 2006). De même, le risque de développer un lymphome est

multiplié par 30 (Baecklund E. *et al.*, 1998, Baecklund E. *et al.*, 2006, Silman A.J. *et al.*, 1988, Wolfe F. et Michaud K., 2004). Enfin, le risque de développer une pathologie cardiovasculaire est augmenté de deux fois environ [comme l'infarctus du myocarde (Solomon D.H. *et al.*, 2003, Wolfe F. *et al.*, 2003), ou l'athérosclérose (del Rincon I.D. *et al.*, 2001)] [pour revue voir (Lin J. *et al.*, 2007, Nasir A. et Greenberg J.D., 2007)].

Le développement d'antagonistes synthétiques du TNF- α a certes permis une nette amélioration de la vie des patients atteints de PR, mais les effets indésirables engendrés ne sont pas négligeables et suggèrent de continuer à élargir la recherche à d'autres cibles aussi efficaces mais dont l'inhibition n'entraînerait pas d'effets secondaires aussi importants. De plus, tous les patients ne répondent pas de la même manière à une thérapie anti-TNF- α . En effet, certains patients y sont insensibles, et plus de 50 % des patients traités par ces thérapies déclarent ne ressentir que 50 % ou moins de bénéfice sur leur qualité de vie. C'est pourquoi d'autres cibles ont été étudiées pour tenter non seulement de freiner l'avancée de la maladie mais également d'obtenir une rémission clinique tout en limitant les effets indésirables.

Des essais ont donc été menés sur le blocage simultané des récepteurs à l'IL-1 et au TNF- α (Infliximab et Anakinra). Ces études ont permis d'obtenir des résultats très encourageants dans un modèle expérimental d'arthrite chez la souris (Zwerina J. *et al.*, 2004) : diminution de l'inflammation de la synoviale, de l'érosion osseuse, du nombre d'ostéoclastes et de la destruction du cartilage, supérieure à celle obtenue en monothérapie. Cependant ces résultats n'ont pas pu être reproduits lors d'études cliniques, les bénéfices n'étant pas supérieurs à la monothérapie, et les risques infectieux se trouvant amplifiés (Genovese M.C. *et al.*, 2004).

1.4.3.2 Arthrose

Comme l'IL-1, le TNF- α apparaît également comme un médiateur important dans l'induction de l'inflammation de la membrane synoviale et de la destruction du cartilage au cours de l'arthrose. Plusieurs observations le mettent en évidence. Ainsi, la TACE est surexprimée dans le cartilage de patients arthrosiques (Amin A.R., 1999). Il en est de même pour le récepteur TNFR1 (Alaaeddine N. *et al.*, 1997). De même, les niveaux de TNF- α retrouvés dans les tissus articulaires de patients arthrosiques sont supérieurs à ceux retrouvés chez des individus sains (Farahat M.N. *et al.*, 1993, Myers S.L. *et al.*, 1990, Smith M.D. *et al.*, 1997). Quelques essais préliminaires ont donc été effectués avec l'Infliximab et l'Etanercept, et ont montré la suppression de la production de NO dans des explants de

cartilage issus de patients arthrosiques (Vuolteenaho K. *et al.*, 2002), ainsi que la diminution de la production de MMPs (Hui W. *et al.*, 2001).

Ces effets restent à confirmer par des essais cliniques. Mais comme pour l'IL-1, il est important de noter qu'au vu des effets secondaires engendrés par les stratégies anti-cytokines, il faudra évaluer les bénéfices par rapport aux effets indésirables potentiels de ces traitements.

1.4.4 Les cytokines de la famille et les récepteurs de l'IL-6

La famille de l'IL-6 compte 7 membres : l'IL-6, le LIF (leukemia inhibitory factor), l'OSM (oncostatin M), le CNTF (ciliary neurotrophic factor), l'IL-11, la CT-1 (cardiotrophine-1) et la CLC (cardiotrophine-like) [pour une revue voir (Rose-John S., 2003)]. Ces protéines se lient aux récepteurs de la famille de l'IL-6, qui sont présents sous forme de dimères comportant tous une chaîne β ou gp130. Le deuxième partenaire du dimère peut être la gp130 elle-même (récepteur à l'IL-11), la chaîne α (récepteur à l'IL-6), le CNTF-R ou le LIF-R (récepteur au LIF, aux cardiotrophines et à l'OSM). L'activation de ces récepteurs entraîne l'activation du complexe JAK/STAT (Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription), qui vont conduire à l'activation de la cascade des MAPK.

Ces cytokines interviennent principalement dans la réponse inflammatoire lors de la phase aiguë ou lors d'une infection. Elles jouent également un rôle important dans l'hématopoïèse, la régénération neuronale et hépatique, ainsi que dans le développement embryonnaire ou la fertilité. La dérégulation des voies de signalisation qui les régule contribue au développement de pathologies comme la PR, l'ostéoporose, les scléroses multiples ou encore de différents cancers (notamment de la prostate).

1.4.5 Synthèse et principaux effets cellulaires de l'IL-6

Clonée pour la première fois en 1986, l'interleukine-6 est une glycoprotéine de 26 kDa possédant un peptide signal de 28 acides aminés. Elle fut tout d'abord étudiée pour son rôle dans la différenciation des lymphocytes B (Hirano T. *et al.*, 1986, Teranishi T. *et al.*, 1982). Puis des études complémentaires ont montré que l'IL-6 était une cytokine pléiotropique, possédant un large panel d'activités biologiques, et agissant sur un grand nombre de cellules cibles. Cette cytokine est principalement produite par les lymphocytes T, les monocytes, les macrophages, les fibroblastes synoviaux et les cellules vasculaires (Morand E.F. et Leech M.,

2005, Privat S.J. *et al.*, 2001, Van Snick J., 1990) ou encore les chondrocytes (Dombrecht E.J. *et al.*, 2007, Tanabe B.K. *et al.*, 1996).

Le récepteur à l'IL-6 est une chaîne composée de deux polypeptides (Taga T. *et al.*, 1989). La chaîne polypeptidique α , qui lie directement l'IL-6, de 80 kDa, existe sous forme membranaire et soluble. Le récepteur soluble n'est pas un piège à cytokine, mais permet au contraire la présentation de l'IL-6 aux cellules dépourvues de récepteur à l'IL-6 mais possédant la protéine gp130. Ce phénomène est appelé « transsignaling » (Kallen K.J., 2002). La deuxième chaîne polypeptidique composant le récepteur de l'IL-6 est la gp130. Cette chaîne de 130 kDa permet de transduire le signal à l'intérieur de la cellule après fixation de l'IL-6 sur la chaîne α . La voie des JAK est alors activée, puis elle va elle-même activer deux voies majeures, la voie des ERK (extracellularly regulated kinase) et de STAT-3 (Hirano T. *et al.*, 2000, Hirano T. *et al.*, 1997) (**Figure 15**).

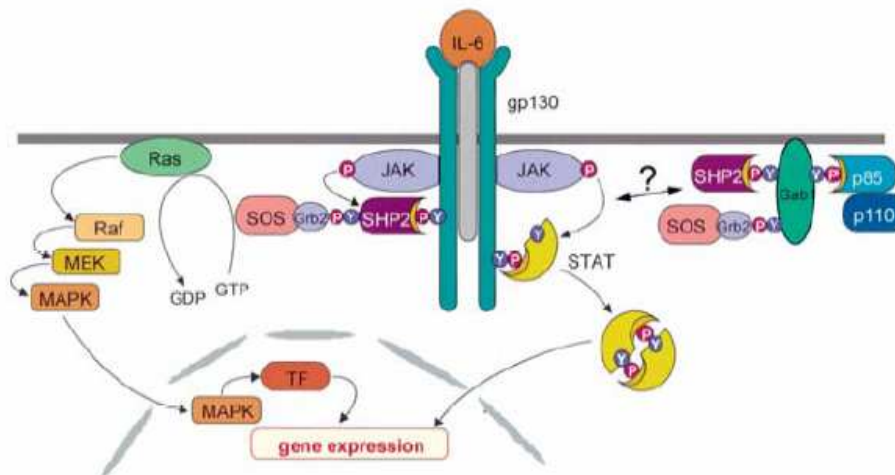


Figure 15 : Schématisation du système récepteuriel à l'IL-6 et des principales voies activées par la fixation de l'IL-6.

L'IL-6 se fixe sur son récepteur composé de deux polypeptides. La transduction à l'intérieur de la cellule se fait par l'activation du complexe JAK/STAT (Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription), qui conduit à l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinase).

Les conséquences de l'activation de ces voies sont multiples : activation et induction des lymphocytes T, stimulation de la croissance et de la différenciation des cellules précurseurs de l'hématopoïèse, maturation des lymphocytes B, différenciation des macrophages et des mégacaryocytes (Yoshizaki K. *et al.*, 1998), ou encore induction de la réponse de la phase aiguë. Elle stimule d'ailleurs la synthèse de certaines protéines composant le complexe protéique de phase aiguë (fibrinogène, protéine C réactive, protéines du complément, ...).

L'IL-6 possède également des rôles plus spécifiques dans les cellules articulaires, comme la prolifération des synoviocytes et des fibroblastes (Van Snick J., 1990). Elle joue donc un

rôle dans la formation du pannus synovial, mais elle induit également de la différenciation des ostéoclastes, ce qui conduit à la résorption osseuse (Tamura T. *et al.*, 1993). De plus, l'IL-6 diminue la production d'agrécan et de collagène de type II, deux constituants majeurs de la MEC spécifiques du cartilage (Legendre F. *et al.*, 2003). Sa synthèse est d'ailleurs augmentée dans les chondrocytes humains par une stimulation à l'IL-1 β ou au TNF- α (Nietfeld J.J. *et al.*, 1990, Tamura T. *et al.*, 1993).

1.4.6 Rôle de l'IL-6 dans les pathologies articulaires

1.4.6.1 Polyarthrite Rhumatoïde

Bien que retrouvée dans de nombreuses pathologies infectieuses, hématologiques et inflammatoires, l'IL-6 ne permet pas la survenue de symptômes inflammatoires lorsqu'elle est injectée, même à des doses 10000 fois supérieures à celles du TNF- α ou de l'IL-1. Le rôle de l'IL-6 est cependant ambigu, puisqu'en plus des propriétés décrites ci-dessus, elle entraîne une diminution de la dégradation des PGs grâce à l'augmentation de la synthèse de TIMPs (Lotz M. et Guerne P.A., 1991). De plus, l'IL-6 augmente également la production d'IL-1Ra et du récepteur soluble au TNF- α (Tilg H. *et al.*, 1994) et inhibe la cyclooxygénase induite par l'IL-1 (Hauptmann B. *et al.*, 1991) ainsi que d'autres cytokines (Aderka D. *et al.*, 1989, Schindler R. *et al.*, 1990). Ainsi, elle pourrait paradoxalement jouer un rôle dans la protection du cartilage (Silacci P. *et al.*, 1998). Ces rôles ambivalents pourraient faire de l'IL-6 une cytokine impliquée dans le rétro-contrôle négatif de la pathologie, limitant les dommages protéolytiques appliqués au cartilage.

Néanmoins, les preuves des rôles pro-inflammatoires de l'IL-6 sont indiscutables. Tout d'abord, des quantités élevées d'IL-6 ont été retrouvées dans l'articulation et le sérum de patients arthritiques, et il existe une bonne corrélation entre sa concentration dans les séra et la sévérité de la maladie (Dasgupta B. *et al.*, 1992, Hirano T. *et al.*, 1988, Houssiau F.A. *et al.*, 1988, Madhok R. *et al.*, 1993, Sack U. *et al.*, 1993). De plus, des souris déficientes en IL-6 présentent une forte résistance à l'induction d'une arthrite au collagène (Alonzi T. *et al.*, 1998, Hata H. *et al.*, 2004, Ohshima S. *et al.*, 1998, Sasai M. *et al.*, 1999), alors que le déficit en IL-1 ou en TNF- α ne le permet qu'en partie (retard du développement de l'arthrite et diminution de l'incidence et de la sévérité). Chez ces souris, l'injection d'IL-6 et de son récepteur reverse cette inhibition. De même, des mutations du récepteur de l'IL-6 chez des souris provoquent l'apparition d'une arthrite spontanée (Atsumi T. *et al.*, 2002).

Toutes ces expérimentations ont montré que le blocage de l'IL-6 pouvait représenter une bonne approche thérapeutique contre la PR. Cependant, le traitement avec un anticorps anti-IL-6 présente des effets indésirables engendrant notamment la production d'IL-6 elle-même. L'injection d'un anticorps humanisé dirigé contre le récepteur de l'IL-6 a donc été testée (**Figure 16**). Plusieurs essais cliniques sur des patients arthritiques [pour revue voir (Kishimoto T., 2006)] ont été réalisés avec le Tocilizumab, qui inhibe spécifiquement l'action de l'IL-6 (Ding C. et Jones G., 2003, Sato K. *et al.*, 1993). Ces études ont conclu à une bonne efficacité du traitement et une toxicité relativement acceptable. En effet, ce traitement a permis de diminuer les manifestations histologiques, cliniques et radiographiques de la maladie, ainsi que la production de MMP-3, ou encore des niveaux d'hémoglobine (résolution de l'anémie engendrée par la maladie), de ceux du fibrinogène et du facteur rhumatoïde (autoanticorps dirigés contre le fragment cristallisable ou Fc des molécules d'IgG) (Nishimoto N. *et al.*, 2004). De plus le métabolisme osseux a été réaugmenté (diminution de l'ostéoporose induite par la pathologie) (Mariette X., 2004).

Quelques effets indésirables ont malgré tout été observés avec ce traitement : une augmentation du cholestérol, la réactivation éventuelle du virus d'Epstein-Barr, quelques allergies et des infections (Nishimoto N. *et al.*, 2004).

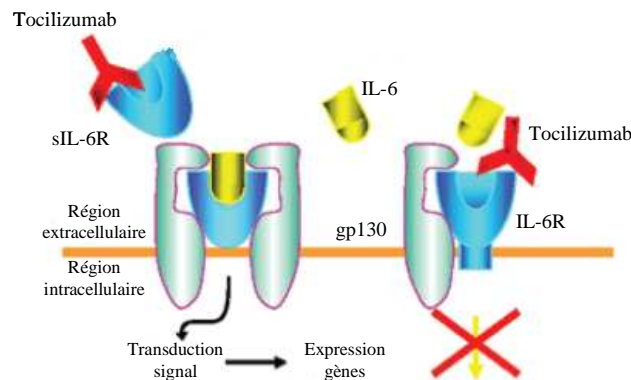


Figure 16 : Concept du blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 par le Tocilizumab.

L'IL-6 se fixe sur son récepteur (représenté ici sous sa forme membranaire). Le récepteur est lié à une protéine transactivatrice, la gp130, qui va engendrer un signal intracellulaire après fixation. L'anticorps dirigé contre ce récepteur, le Tocilizumab, va inhiber la fixation de l'IL-6 sur son récepteur membranaire et ainsi inhiber la réponse intracellulaire à l'IL-6. De même, en bloquant l'accessibilité au récepteur soluble, le Tocilizumab inhibe la présentation de l'IL-6 à d'autres cellules. sIL-6R : récepteur soluble à l'IL-6.

D'après (Kishimoto T., 2006).

1.4.6.2 Arthrose

L'IL-6 est surexprimée dans tous les tissus articulaires des patients arthrosiques, comme chez les patients arthritiques, bien qu'en quantité plus faible (Kaneko S. *et al.*, 2000, Martel-Pelletier J. *et al.*, 1999). Elle contribue au processus pathologique de l'arthrose en :

- augmentant le nombre de cellules inflammatoires dans le tissu synovial (Guerne P.A. *et al.*, 1989),
- stimulant la prolifération des synoviocytes,
- induisant l'amplification des effets de l'IL-1 sur la synthèse des MMPs et l'inhibition de la synthèse des PGs (Nietfeld J.J. *et al.*, 1990).

Bien qu'étant considérée comme un important régulateur des MMPs dans les explants de cartilage issus de patients arthrosiques (Towle C.A. *et al.*, 1997), aucune inhibition directe de cette cytokine n'a été testée à ce jour chez des patients arthrosiques.

1.5 Voies de signalisation impliquées dans la synthèse des cytokines

1.5.1 La cascade d'activation des kinases

La famille des MAPK est constituée de protéines kinases régulées par un signal extracellulaire : les ERKs, p38 kinase et JNK (c-Jun N-terminal kinase) ou SAPK (stress-activated protein kinase) (Chun J.S., 2004). Cette famille de kinases joue un rôle prédominant dans le phénomène de l'inflammation grâce à ses propriétés activatrices de facteurs de transcription comme NF- κ B ou AP-1. Ces facteurs de transcription régulent à leur tour la transcription de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Berenbaum F., 2004). L'activation des MAPK est nécessaire à la phosphorylation de leurs protéines cibles (**Figure 17**). Les MAPK sont activées elles-mêmes par des protéines de la famille des MAPKK (MEK ou MKK), dont l'activité est régulée par des protéines de la famille des MAPKKK (MEKK ou MKKK), régulées par des protéines de la famille des MAPKKKK (MEKKK ou MKKKK). Ces protéines sont activées par des protéines G. Les stimuli qui initient la cascade des MAPK sont très variables : stress cellulaire, IL-1 β , TNF- α , *etc.*

L'inhibition d'un acteur de cette cascade bloque toute la cascade des MAPK, et inhibe ainsi la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Cette stratégie a donc été testée dans des modèles expérimentaux d'arthropathies [pour revue voir (Malemud C.J., 2006)]. Par exemple, le PD198306, qui est un inhibiteur des MEK1 et 2 supprime partiellement la progression de la pathologie dans un modèle d'arthrose chez le lapin, grâce à l'inhibition de l'activité ERK_{1/2} et

à la baisse de l'activité MMP (Pelletier J.P. *et al.*, 2003). De même, dans un modèle murin d'arthrite au collagène, l'utilisation du PD184352, inhibiteur sélectif des MEK, a engendré une diminution de l'œdème des pattes, du score arthritique, et ce de façon dose-dépendante. Le traitement a également permis de diminuer la perte de poids, les dommages observés en histopathologie, ainsi que la perte des PGs (Thiel M.J. *et al.*, 2007).



Figure 17 : Schématisation de la cascade des MAPK.

Un stimulus extra-cellulaire active une protéine G. Celle-ci va induire l'activité d'une protéine de la famille des MAPKKKK (MEKKK), qui va phosphoryler une protéine de la famille des MAPKKK (MEK). Une protéine de la famille des MAPKK (MEK) est phosphorylée, et va elle-même activer une protéine de la famille des MAPK. Enfin, cette dernière phosphoryle une protéine cible.

1.5.1.1 Les ERK

Les ERK comprennent plusieurs membres, dont les formes majoritairement retrouvées sont p42 (ERK1) et p44 (ERK2). Les ERK sont activées par MEK1 (Boulton T.G. *et al.*, 1991). Ces protéines sont rapidement phosphorylées en réponse à un stimulus, et leur activité de phosphorylation est donc précoce. Une des cibles d'ERK est c-Fos.

Des inhibiteurs d'ERK ont été testés dans des modèles d'arthropathie avec succès. En effet, l'utilisation du PD98059 a permis de diminuer la production de NO, l'apoptose chondrocytaire et aussi l'activation des PGE₂ dans des chondrocytes de lapin (Notoya K. *et al.*, 2000). De même, l'inhibiteur d'ERK FR180204 a été testé très récemment dans un modèle d'arthrite induite au collagène chez la souris, et ce traitement a permis de diminuer la perte de poids des animaux ainsi que les scores de l'arthrite (Ohori M. *et al.*, 2007).

1.5.1.2 P38 kinase

Des gènes distincts codent pour 4 kinases p38 chez l'Homme : p38 α , β , γ et δ . Les membres de la famille kinase p38 sont activés par les MKK3, 4, et 6 (Johnston T.H. et Brotchie J.M., 2004). Le rôle de p38 est prédominant dans l'induction de l'expression de la cyclo-oxygénase (COX)-2 ou de la NO synthase inductible (iNOS) (Starkman B.G. *et al.*, 2005). Elle permet également l'activation des MMP-9 et -13, ainsi que de l'IL-1 β et du TNF- α .

L'utilisation d'inhibiteurs de la kinase p38, comme le SB203580 ou le SB202190 a permis d'améliorer les paramètres de l'inflammation, notamment une diminution de la production de NO et de PGE₂, mais a également permis d'interférer avec la voie des caspases et ainsi de diminuer la mort cellulaire (Notoya K. *et al.*, 2000, Sun X. *et al.*, 2002). De même, plus récemment, l'inhibiteur de p38, le FR167653, a été utilisé pour traiter des rats arthritiques induits au collagène, et a permis de diminuer la production de TNF- α et d'IL-1, l'œdème, les scores radiographiques et histologiques, ainsi que le nombre d'ostéoclastes (Nishikawa M. *et al.*, 2007). Certains inhibiteurs synthétiques sélectifs de p38 ont également été testés en phase clinique, comme le VX-745, le VX-702 ou le SCIO-469, avec à chaque fois une amélioration du score clinique, et parfois une réduction des taux circulants de CRP et d'IL-6 [pour revue voir (Schindler J.F. *et al.*, 2007)].

1.5.1.3 SAPK/JNK

Les SAPK/JNK sont activées par les MEKK4 et 7 (Foltz I.N. *et al.*, 1998). Elles ont comme cible principale c-Jun.

Cette cible a été validée par des expériences de souris KO pour SAPK/JNK induites au collagène. Ces souris développent une arthrite moins grave, avec des lésions cartilagineuses moins importantes, et des PGs moins dégradés (Han Z. *et al.*, 2001). Des inhibiteurs de SAPK/JNK ont donc été utilisés, comme le SP600125, ce qui a permis de bloquer totalement la phosphorylation de Jun et l'induction de cette protéine dans des synoviocytes de souris. Cette inhibition supprime la liaison d'AP-1 sur l'ADN, et inhibe ainsi l'expression de la collagénase-3 (MMP-13) (Han Z. *et al.*, 2001).

1.5.2 Facteurs de transcription

1.5.2.1 *NF-IL-6*

NF-IL-6 (nuclear factor of IL-6) est également appelé C/EBP β , NFM, LAP, IL-6-DBP, AGP/EBP ou encore CRP2. Il fait partie de la famille C/EBP ou CCAAT/enhancer binding protein, une famille de facteurs de transcription fortement conservée entre les espèces. Cette famille clonée pour la première fois en 1988 (Landschulz W.H. *et al.*, 1988) contient un domaine particulier, appelé bZip. En effet, le domaine de liaison à l'ADN est lié à un motif de dimérisation en « glissière à leucines » (leucin zipper) dans sa partie C-terminale, constitué de 4 ou 5 résidus leucines configurées en hélice α . La famille C/EBP comporte six membres, notés C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ , et C/EBP ζ .

Le facteur NF-IL-6 (C/EBP β) est présent sous la forme de trois transcrits, produisant trois protéines différentes : le « LAP » de 45 kDa, le LAP* de 38 kDa et le LIP de 20 kDa (Akira S. *et al.*, 1990). Le transcrit LIP est particulier puisqu'il n'est constitué que du domaine de liaison à l'ADN et du domaine « leucin zipper ». Il représente donc un dominant négatif ou inhibiteur (Akira S. *et al.*, 1990).

Avant de se fixer à l'ADN sur son élément de réponse, le facteur NF-IL-6 se dimérise. Les hétérodimères peuvent se former à partir de différents isotypes de C/EBP. En revanche, la liaison avec le sous-type ζ ne permet pas la liaison aux éléments de réponse consensus : PuPuPuTGCAAT(A/C)CCC (Pu : Purine), et le sous-type LIP de C/EBP β forme des dimères non fonctionnels (Descombes P. et Schibler U., 1991).

NF-IL-6 est le facteur de transcription qui est principalement à l'origine de l'induction de l'expression de l'IL-6, même si celle-ci est également activée par d'autres facteurs de transcription tels qu'AP-1 et NF- κ B. NF-IL-6 est exprimé principalement dans les monocytes et les macrophages. Mais il est également produit par les lignées myélocytaires, les hépatocytes, les adipocytes (Akira S. *et al.*, 1990, Maytin E.V. et Habener J.F., 1998), et les lignées cellulaires fibroblastiques (Cao Z. *et al.*, 1991), et est synthétisé dans les synoviocytes (Pope R.M. *et al.*, 1999) et les chondrocytes (Berenbaum F., 2004). Il a également été mis en évidence dans des organes comme le foie, les intestins, les poumons, le tissu adipeux, la rate et les reins (Akira S. *et al.*, 1990, Cao Z. *et al.*, 1991, Chang C.J. *et al.*, 1990, Descombes P. *et al.*, 1990, Katz S. *et al.*, 1993, Kousteni S. *et al.*, 1998, Poli V. *et al.*, 1990, Williams S.C. *et al.*, 1991). Sa régulation et son activation dépendent des interactions avec d'autres facteurs de transcription comme NF- κ B, c-Jun, CREB/ATF ou les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)

(Burk O. *et al.*, 1993, Hsu W. *et al.*, 1994, LeClair K.P. *et al.*, 1992, Lekstrom-Himes J. et Xanthopoulos K.G., 1998, Ness S.A. *et al.*, 1993, Nishio Y. *et al.*, 1993, Stein B. *et al.*, 1993, Vallejo M. *et al.*, 1993, Wedel A. et Ziegler-Heitbrock H.W., 1995, Zagariya A. *et al.*, 1998). Il interagit également avec différents facteurs comme l'AMPc, le glucagon, les hormones de croissance, l'IFN- γ , l'IL-6, le LPS (lipopolysaccharide), le TNF- α , le calcium, *etc.* Son activité est régulée par des agents inflammatoires comme le LPS, les cytokines, les agents mitogènes, les hormones ou le stress (Akira S. *et al.*, 1990, Alam T. *et al.*, 1992, Cardinaux J.R. *et al.*, 2000, Granger R.L. *et al.*, 2000, Kinoshita S. *et al.*, 1992, Poli V., 1998, Poli V. *et al.*, 1990, Ramji D.P. *et al.*, 1993a, Ramji D.P. *et al.*, 1993b, Tengku-Muhammad T.S. *et al.*, 2000). Il contribue à la régulation des médiateurs de l'inflammation comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8.

NF-IL-6 joue un rôle important dans la différenciation cellulaire, la réponse inflammatoire, la régénération du foie, et le métabolisme cellulaire. Dans des cellules articulaires, NF-IL-6 a été dosé dans les synoviocytes humains en plus grande quantité que chez des patients arthritiques, que chez des patients arthrosiques, et que chez des patients sains. De même, la fréquence d'expression nucléaire de NF-IL-6 est corrélée avec l'épaississement de la synoviale et le score inflammatoire. L'expression et l'activation de NF-IL-6, ainsi que sa localisation sont des marqueurs de la progression de la maladie. De même, sa liaison à l'ADN est corrélée avec le taux de CRP (Nishioka K. *et al.*, 2000). NF-IL-6 augmente également la production intracellulaire de COX-2 et de PLA₂ dans les chondrocytes (Massaad C. *et al.*, 2000, Thomas B. *et al.*, 2000).

L'implication de NF-IL-6 dans la pathogenèse de la PR a été démontrée grâce aux modèles animaux. En effet, des souris knock-out pour C/EBP β démontrent des problèmes de sécrétion des protéines amyloïdes A et P, des protéines du complément, et du TNF- α . Des expériences ont prouvé que l'inhibition spécifique de NF-IL-6 inhibait la sécrétion du TNF- α dans les macrophages. De même, le salicylate, aux concentrations pharmacologiques, supprime l'expression de PGE₂, grâce au blocage de la liaison de NF-IL-6 sur le promoteur de COX-2 (Saunders M.A. *et al.*, 2001). Ainsi, la régulation de la production ou de l'activité de NF-IL-6 pourrait représenter une nouvelle approche pour inhiber l'expression des médiateurs de l'inflammation et donc pourrait présenter un effet thérapeutique dans les pathologies articulaires.

1.5.2.2 NF- κ B

1.5.2.2.1 Présentation générale

Le facteur NF- κ B a été découvert en 1986 par Shen et Baltimore, comme un facteur nucléaire pouvant se lier à l'activateur de la chaîne légère kappa des immunoglobulines dans les lymphocytes B (Sen R. et Baltimore D., 1986). NF- κ B est activé en réponse au LPS, montrant ainsi son rôle dans la réponse immune. De plus, NF- κ B interfère avec la balance prolifération/apoptose. Ses propriétés à moduler des processus aussi essentiels ont fait de lui un acteur majeur dans le développement de diverses pathologies.

La plupart des effets physiopathologiques se produisant au cours des arthropathies peuvent être expliqués par l'activation d'un nombre limité de facteurs de transcription comme NF- κ B et AP-1 (Feldmann M., 2001, Okamoto T. *et al.*, 1997). En particulier, de nombreuses cytokines et molécules d'adhésion cellulaire activées lors de la PR sont sous le contrôle de NF- κ B.

NF- κ B est un facteur de transcription qui régule l'expression d'environ 200 gènes impliqués dans des phénomènes aussi variés que l'immunité, l'inflammation (Sha W.C., 1998), la réactivation de certains virus ou encore l'apoptose (Baeuerle P.A. et Baltimore D., 1996, O'Neill L.A. et Kaltschmidt C., 1997).

Ce facteur de transcription se présente sous la forme de dimères de protéines possédant un domaine Rel du côté N-terminal [pour revue voir (Okamoto T., 2006)]. Cette région de 300 acides aminés permet la dimérisation, la translocation vers le noyau, et également la liaison à l'ADN. Ce dimère existe sous différentes formes, selon les protéines qui le composent. Celles-ci se regroupent en deux classes selon leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles (Baeuerle P.A. et Baltimore D., 1996, O'Neill L.A. et Kaltschmidt C., 1997). La classe I renferme les protéines p50 et p52. Ces protéines dérivent des précurseurs cytoplasmiques p100 (NF- κ B2) et p105 (NF- κ B1), qui sont clivés du côté N-terminal. La classe II renferme les protéines p65 (RelA), RelB et p75 (c-Rel). Le plus souvent, un dimère se forme à partir d'une protéine de la classe I et d'une protéine de la classe II. Cependant, des homodimères de p50 ou de p52 peuvent se former, mais ceux-ci sont inactifs. En effet, p65 est indispensable à la fonctionnalité de NF- κ B, puisque c'est cette sous-unité qui contient le domaine de transactivation ainsi que la séquence d'adressage nucléaire (Phelps C.B. *et al.*, 2000a, Phelps C.B. *et al.*, 2000b, Schmitz M.L. et Baeuerle P.A., 1991). Les protéines de la classe I, quant à elles, contiennent le domaine de liaison à l'ADN.

À l'état basal, le complexe NF- κ B est localisé dans le cytoplasme, sous forme inactive car lié à sa protéine inhibitrice I κ B (inhibitor of NF- κ B) (Baldwin A.S., Jr., 1996). Le site de liaison de cet inhibiteur étant situé au niveau du domaine signal de localisation nucléaire de NF- κ B, celui-ci ne peut pas être transloqué vers le noyau. I κ B est en fait représenté par une famille de plusieurs protéines, I κ B- α , - β , - γ , - δ , - ξ et Bcl₃ (Whiteside S.T. *et al.*, 1997, Yamazaki S. *et al.*, 2001). Elles ont toutes en commun un domaine situé en C-terminal contenant une répétition de motifs ankyrines, cruciaux pour l'interaction avec NF- κ B, et un domaine en N-terminal riche en leucines, utile pour son exportation vers le cytoplasme.

NF- κ B est activé par des substances variées, comme les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α) (Baeuerle P.A. et Henkel T., 1994), le stress oxydant (Shen Y. *et al.*, 1996) ou encore les UV (Janssen Y.M. *et al.*, 1995). La « voie canonique » impliquant la kinase d'I κ B est alors activée. Cette voie agit par une cascade de kinases, comme MEKK1 (Karin M., 1999, Lee F.S. *et al.*, 1998, Nakano H. *et al.*, 1998), ERKK2 et 3 (Zhao Q. et Lee F.S., 1999), PKC (Protein kinase C) (Lallena M.J. *et al.*, 1999), ou encore NAK (I κ B kinase activating protein) (Tojima Y. *et al.*, 2000). De plus, les sous-unités de NF- κ B peuvent également être activées par phosphorylation (Hayashi T. *et al.*, 1993, Naumann M. et Scheidereit C., 1994).

En pratique, la première kinase à être activée est NIK (NF- κ B-inducing kinase), qui va phosphoryler la kinase IKK (I κ B kinase) (Ling L. *et al.*, 1998, Nakano H. *et al.*, 1998). Cette protéine est composée de trois sous-unités, IKK- α et IKK- β , qui sont des sous-unités catalytiques, et NEMO (NF- κ B essential modulator) ou IKK- γ , la sous-unité régulatrice. Le complexe IKK/NIK forme le « signalosome », complexe de haut poids moléculaire qui va phosphoryler I κ B- α (DiDonato J.A. *et al.*, 1997, Regnier C.H. *et al.*, 1997, Woronicz J.D. *et al.*, 1997, Zandi E. *et al.*, 1997). Cette phosphorylation induit le recrutement de l'ubiquitine ligase, qui va poly-ubiquitinyler I κ B- α . Ce phénomène induit à son tour le recrutement du protéasome, qui va détruire I κ B- α (Karin M., 1999).

Le facteur NF- κ B est alors libéré et peut entrer dans le noyau, se fixer sur des éléments de réponse sur le promoteur de gènes cibles (**Figure 18**). L'élément de réponse consensus est 5'GGGPuNNPyPyCC-3' (Pu : purine, Py : pyrimidine) (Baeuerle P.A. et Baltimore D., 1996). L'affinité du dimère pour cet élément de réponse diffère selon le type de dimère impliqué (Perkins N.D. *et al.*, 1992, Urban M.B. et Baeuerle P.A., 1991, Urban M.B. *et al.*, 1991). Les gènes contenant un élément de réponse à NF- κ B sont nombreux : ce sont des gènes codant pour des cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-12, IFN- γ , GM-CSF), des molécules d'adhésion cellulaire, des chémokines (IL-8, MIP-1 α , MCP-1), des récepteurs aux cytokines,

des enzymes inductibles (COX-2, iNOS), des gènes anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques, des gènes de la prolifération, ou encore des gènes régulant l'expression des protéines de la famille de NF- κ B, ou permettant son rétrocontrôle (I κ B- α , I κ B- β). Ainsi, la famille NF- κ B/I κ B semble constituer un réseau de protéines autonomes et auto-régulatrices, bien que pouvant également être régulée par d'autres facteurs.

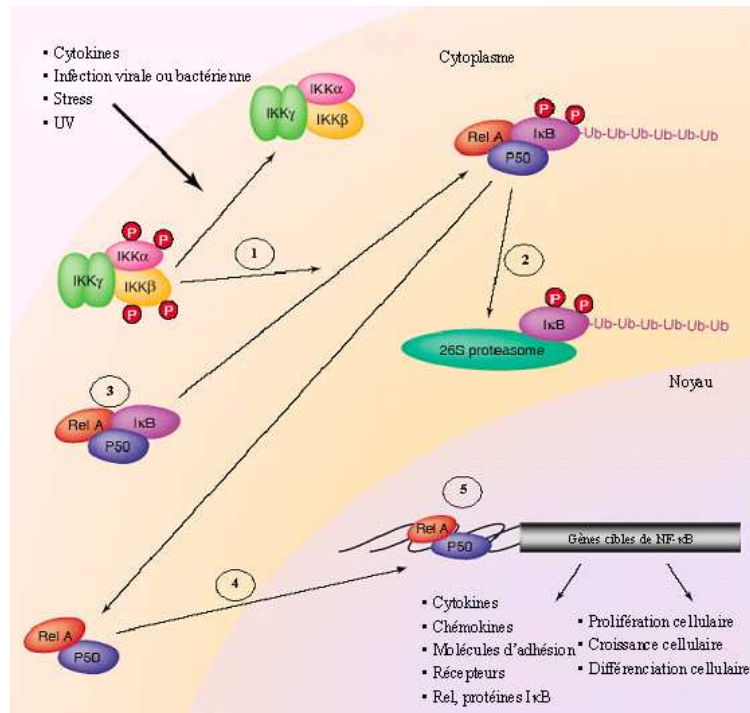


Figure 18 : Schématisation des mécanismes d'activation du complexe NF- κ B.

Après activation par un signal (inflammation, stress, UV, ...), une cascade de kinases permet la phosphorylation d'I κ B- α (1), qui recrute alors l'ubiquitine ligase. L'accumulation de groupements ubiquitine sur cette protéine engendre le recrutement du système du protéasome qui la détruit (2), et ainsi libérer le dimère formant NF- κ B (ici représenté sous sa forme p50/Rel) (3). Ce dimère va entrer dans le noyau (4) et se fixer au niveau d'éléments de réponse situés sur les promoteurs de gènes cibles (5).

D'après (Yamamoto Y. et Gaynor R.B., 2004).

1.5.2.2.2 Implication de NF- κ B dans les pathologies articulaires

Bien que NF- κ B joue un rôle essentiel à la physiologie, une régulation inappropriée de son activité a été invoquée dans la pathogenèse de plusieurs pathologies, dont les maladies inflammatoires et rhumatoïdes (PR, arthrose, athérosclérose, asthme). En effet, les sous-unités de NF- κ B p50 et p65 ont été retrouvées de façon abondante dans des synoviales de patients arthritiques, à des concentrations supérieures aux patients arthrosiques (Handel M.L. *et al.*, 1995). De plus, la quantité d'IKK est élevée dans les synoviocytes de patients arthritiques et arthrosiques. Les modèles animaux d'arthrite expérimentale ont permis de montrer

l'implication de NF- κ B dans la pathogenèse de la maladie. En effet, des expériences ont montré que l'activation de NF- κ B était antérieure aux manifestations cliniques de l'arthrite induite au collagène chez la souris ou à l'adjuvant de Freund chez le rat (Makarov S.S., 2001, Mor A. *et al.*, 2005). De même, la corrélation entre NF- κ B et MMP-3 ou MMP-13 est très bonne, et supérieure à celle observée pour AP-1. NF- κ B et AP-1 sont tous deux activés avant les premiers signes d'arthrite clinique et avant l'augmentation d'expression des MMPs. Dans le même modèle d'arthrite au collagène chez la souris, NF- κ B est localisé dans le noyau des chondrocytes (Eguchi J. *et al.*, 2002) pendant les stades précoces de destruction du cartilage.

Enfin, p65 a été retrouvé dans la couche synoviale de façon beaucoup plus importante au niveau de la patte injectée à l'ACF de l'animal que dans la patte contrôle non injectée (Tsao P.W. *et al.*, 1997). De plus, le transfert intra-articulaire du gène d'IKK- β chez des rats sains induit une arthrite caractérisée par un gonflement sévère de la patte, un changement histologique, une activité IKK largement augmentée, ou encore la liaison de NF- κ B sur l'ADN. Ceci prouve que l'activation d'IKK est cruciale pour l'initiation de la synovite.

NF- κ B est également impliqué dans la dégradation du cartilage articulaire. En effet, l'activation de NF- κ B dans les chondrocytes articulaires stimule la production d'IL-1 β et du TNF- α , qui jouent eux-mêmes un rôle prédominant dans le catabolisme du cartilage articulaire. De plus, des études ont montré que la co-stimulation avec de l'IL-1 β et du TNF- α engendrait une potentialisation synergique de l'activité de NF- κ B dans le cartilage. En outre, dans des chondrocytes de rat, l'activation de NF- κ B réprime l'expression du collagène de type II (Liacini A. *et al.*, 2002, Seguin C.A. et Bernier S.M., 2003), et dans les chondrocytes de patients arthrosiques, NF- κ B augmente l'expression génique et protéique des MMP-1, -3 et -13. Ces résultats ont été confirmés par des expérimentations employant divers inhibiteurs des voies de NF- κ B ou des MAPK. Ces études suggèrent que l'inhibition de la transduction du signal du TNF- α et de l'IL-1 grâce à ces agents pourrait être une stratégie thérapeutique pour diminuer la dégradation du cartilage articulaire au cours de la PR (Liacini A. *et al.*, 2003, Vincenti M.P. et Brinckerhoff C.E., 2002).

Partant de ces données, un nombre de plus en plus élevé d'inhibiteurs de NF- κ B ont été testés. Ces inhibiteurs, notamment des médicaments anti-inflammatoires utilisés en clinique, sont représentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Principaux agents thérapeutiques et stratégies étudiées pour bloquer la voie NF- κ B à différents niveaux.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

D'après (Roman-Blas J.A. et Jimenez S.A., 2006).

Principe d'action de la molécule	Exemples de molécules
Phosphorylation d'I κ B	AINS (Aspirine, salicylate, ibuprofène, sulindac) (Tegeger I. <i>et al.</i> , 2001)
Activité protéase du complexe du protéasome 26S	Bortezomib, ciclosporine, lactacystine (Frantz B. <i>et al.</i> , 1994, Meyer S. <i>et al.</i> , 1997)
Transcription des ARNm des sous-unités de NF- κ B	siARN
Translocation nucléaire des sous-unités de NF- κ B	FK-506, BMS-205820, super répresseur d'I κ B
Liaison à l'ADN de NF- κ B	Glucocorticoïdes, morpholinos (De Bosscher K. <i>et al.</i> , 2000b)
Expression d'I κ B	Glucocorticoïdes (Auphan N. <i>et al.</i> , 1995, Scheinman R.I. <i>et al.</i> , 1995)
Co-activateurs	Glucocorticoïdes (Sheppard K.A. <i>et al.</i> , 1999)

De plus, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont tenté, ces dernières années, d'inhiber spécifiquement des éléments clés de la voie d'activation de NF- κ B. Ces agents, testés sur des modèles animaux, sont des inhibiteurs des fonctions du protéasome, des oligonucléotides « leurres », ou des peptides qui inhibent la localisation nucléaire de NF- κ B. Ces molécules inhibent par exemple l'activation de NF- κ B dans un modèle d'arthrite aux parois de streptocoques chez le rat (Kawakami A. *et al.*, 1999). Cette inhibition est accompagnée d'une chute de la production d'IL-1, d'IL-6 et de NO. D'autres molécules, comme les oligonucléotides « leurres », contenant une séquence de liaison consensus pour NF- κ B qui entre en compétition avec la séquence cible native, ont été injectés dans l'articulation de rats immunisés au collagène de type II. Cette injection a permis de diminuer la sévérité de l'arthrite, notamment le gonflement des pattes, la production de TNF- α et d'IL-1 par la synoviale, et de ralentir la progression de la pathologie (Tomita T. *et al.*, 1999). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle d'arthrose de section du ligament croisé antérieur chez le rat (Hashimoto H. *et al.*, 2003). De plus, l'administration d'un dominant négatif d'IKK- β à des rats induits à l'adjuvant de Freund a permis d'inhiber la translocation nucléaire de NF- κ B, et par voie de conséquence la production d'IL-6 et d'IL-8. De même, des constructions génétiques surexprimant I κ B ou l'expression de protéines I κ B dépourvues du site de phosphorylation (« super répresseur d'I κ B ») ont réduit l'infiltration cellulaire, favorisé l'apoptose des leucocytes au site de l'inflammation et diminué la production de TNF- α et d'IL-1 (modèle de pleurésie chez le rat) (Blackwell N.M. *et al.*, 2004). Enfin, les nouvelles technologies d'ARN interférence visant la sous-unité p65 de NF- κ B ont permis d'inhiber la

production et l'expression de COX-2, iNOS et MMP-9 dans des chondrocytes de rat stimulés à l'IL-1 ou au TNF- α (Lianxu C. *et al.*, 2006).

En conclusion, la famille des facteurs de transcription NF- κ B joue un rôle crucial dans le processus inflammatoire caractéristique de certaines pathologies articulaires, comme la PR ou l'arthrose, conduisant à la destruction du cartilage. Il est donc d'un grand intérêt de trouver des molécules capables d'inhiber efficacement ce facteur.

1.5.2.3 AP-1

AP-1 est un dimère formé par un complexe de protéines codées par des proto-oncogènes de la famille de Jun, Fos et ATF (activating transcription factor). La famille « Jun » est constituée de c-Jun, Jun-B, Jun-D et v-Jun (Vogt P.K. et Bos T.J., 1990). La famille « Fos » comporte 5 membres, c-Fos, Fra (Fos related-Antigen)-1, Fra-2, Fos-B et v-Fos. La famille « ATF » inclut notamment ATF1, ATF2, ATF3 et B-ATF (Angel P. et Karin M., 1991). Le dimère formé est soit un homodimère de Jun ou d'ATF, soit un hétérodimère Jun/Fos ou Jun/ATF. Dans un dimère c-Fos/c-Jun, c-Fos génère l'initiation de la transcription, et c-Jun maintient l'activité du facteur AP-1 (Sen C.K. et Packer L., 1996). Les différents dimères qui peuvent se former possèdent des spécificités d'élément de réponse. En effet, les dimères Jun/Jun et Jun/Fos se lient à un TRE (TPA RE, élément de réponse au TPA, phorbol 12-O-tétradécanoate-13-acétate). Cet élément de réponse sous sa forme consensus est TGACTCA (Hai T. et Curran T., 1991). Les dimères Jun/ATF et ATF/ATF se lient à l'élément de réponse CRE (cAMP RE) (Hai T. et Curran T., 1991).

Une fois fixé sur son élément de réponse, AP-1 active la transcription de gènes cible contenant un élément de réponse à AP-1 dans leurs promoteurs. Ces gènes sont par exemple les MMPs, certaines cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 par exemple), ou le TGF- β (Angel P. et Karin M., 1991, Firestein G.S. et Manning A.M., 1999). Ainsi, par l'activation de ces gènes, AP-1 régule des phénomènes aussi variés que la croissance, la différenciation, ou la prolifération cellulaire (Karin M. *et al.*, 1997). La régulation de l'activité d'AP-1 se fait plutôt au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, qu'au niveau de sa translocation vers le noyau (Karin M. *et al.*, 1997). Les facteurs qui régulent AP-1 sont variés : en effet, la sous-unité c-Fos est activée par des MAPK comme p38, ERK, JNK, qui activent Elk-1 et c-Jun est autorégulée de façon positive (Angel P. *et al.*, 1988) (**Figure 19**).

AP-1 peut affecter la sévérité de l'inflammation articulaire par quatre mécanismes différents :

- Activation de la production de cytokines en coopération avec d'autres facteurs de transcription :
AP-1 coopère avec une autre famille de facteurs de transcription, NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) afin d'augmenter la transcription de gènes comme l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13, l'IFN- γ , le TNF- α , le ligand CD40, le ligand Fas, CD5, CD25, l'IL-8, ou encore MIP-1 α . Ces deux facteurs de transcription créent un complexe ternaire, associé au niveau du site de liaison à l'ADN.
- Régulation de la différenciation des lymphocytes T naïfs :
Lors de la PR, les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes Th1 ou Th2. Les Th1 participent à l'inflammation et sont influencés par l'IFN- γ , le TNF- α , ou l'IL-12. Les Th2 participent quant à eux à la réponse immune humorale et sont induits par l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10. Jun régule la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices, en influençant la réponse immune et les processus inflammatoires.
- Interaction et transrépression du récepteur aux glucocorticoïdes :
Des médiateurs comme l'IL-1, l'IL-2, ou l'IFN- γ sont activés par AP-1 mais sont réprimés par les GR (Karin M. et Chang L., 2001). Ce phénomène est appelé « transrépression », les deux partenaires de ce dimère sont mutuellement exclusifs. Leur association forme un complexe inactif qui est incapable de se lier à l'ADN. Les glucocorticoïdes sont donc des molécules à action anti-inflammatoire, qui, grâce notamment à leurs propriétés anti-AP-1, peuvent être utilisées pour le traitement des pathologies articulaires. Leur principal point négatif est la diminution de masse osseuse qu'ils engendrent, puisqu'AP-1 possède des effets importants sur la différenciation des ostéoclastes et des ostéoblastes.
- Action sur l'immunité innée :
Les dimères AP-1 activent les récepteurs de type « Toll » (Toll-like receptor), qui augmentent l'expression et la production de l'IL-1, du TNF- α , de l'IL-6 ou encore de l'IL-12.

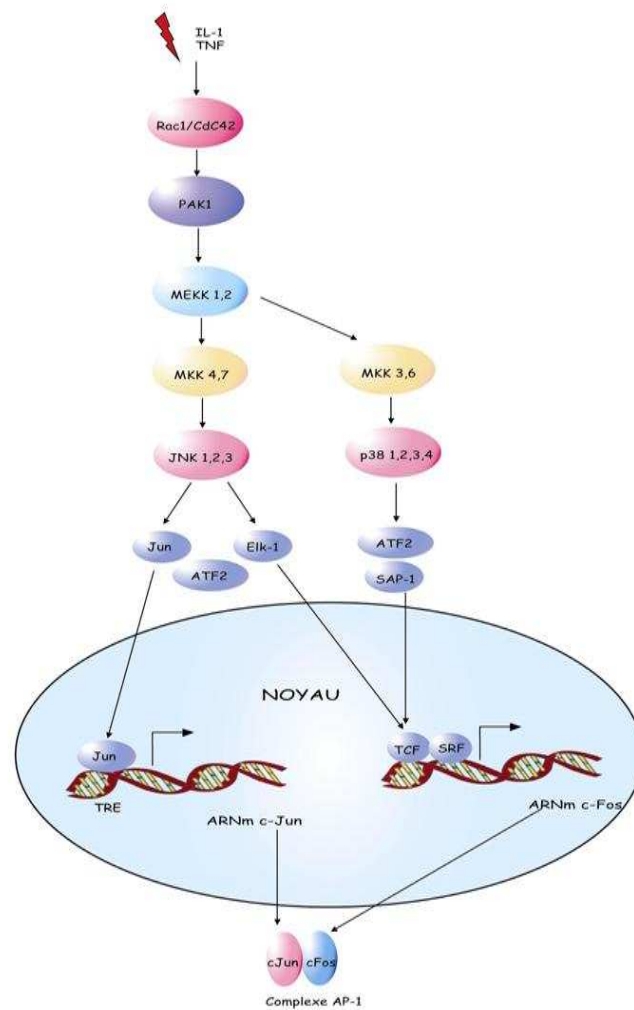


Figure 19 : Schématisation de l'activation et de la régulation de la transcription des sous-unités c-Jun et c-Fos

Après activation par un stimulus ($TNF-\alpha$, $IL-1$), une protéine G active une cascade de kinases (MEKK, MKK, MAPK), activant elles-même des protéines comme Jun, Elk-1 ou ATF-2. Ces facteurs de transcription vont se fixer sur l'ADN au niveau de promoteurs de gènes cibles, dont c-Jun et c-Fos. Après traduction, ces deux protéines se dimérisent pour former le complexe AP-1. D'après (Firestein G.S. et Manning A.M., 1999).

1.6 Synthèse des stratégies thérapeutiques de modulation des cytokines

Étant donné la complexité des interactions entre les cytokines, et la multiplicité des cibles, l'efficacité et la toxicité des expérimentations basées sur les cytokines sont difficilement prédictibles. Toute une variété de stratégies a été explorée pour le traitement des maladies inflammatoires. Elles incluent la neutralisation des cytokines (récepteur soluble, anticorps monoclonal), le blocage du récepteur, ou encore l'activation des voies anti-inflammatoires par des cytokines immunorégulatrices (**Figure 20**).

- Neutralisation des cytokines : les récepteurs solubles ont un rôle physiologique de neutralisation de nombreuses cytokines (sauf pour l'IL-6), comme le récepteur soluble au TNF- α ou à l'IL-1 β . Par exemple, le TNF- α se lie au récepteur de surface de nombreuses cellules, comme les monocytes ou les macrophages, mais il peut également se lier à la forme soluble de ce récepteur. Cette forme permet un rétrocontrôle, modérant l'action inflammatoire du TNF- α .
- Antagonisme du récepteur : une des stratégies visant à bloquer la fixation d'une cytokine sur son récepteur est d'interrompre la transduction du signal par un antagoniste naturel du récepteur, comme par exemple l'IL-1Ra, ou un antagoniste synthétique, comme l'anticorps anti-récepteur cytokinique (par exemple le Tocilizumab avec le récepteur à l'IL-6).
- Activation des voies anti-inflammatoires : en plus des antagonistes naturels des cytokines et des récepteurs solubles, des cytokines immunomodulatrices comme l'IL-10 ou l'IL-4 peuvent supprimer l'inflammation (Isomaki P. et Punnonen J., 1997, Sugiyama E. *et al.*, 1995, van Roon J.A. *et al.*, 1995). Des expériences ont été menées sur des animaux transfectés avec un vecteur viral codant pour des cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10). Lors de l'induction de l'arthrite, ces animaux ont présenté une inflammation réduite, ainsi qu'une diminution de la destruction de l'articulation (Lubberts E. *et al.*, 1999, Whalen J.D. *et al.*, 1999). Cependant ces effets restent à l'heure actuelle relativement méconnus.

Interaction cytokine-récepteur	Description	Exemples
<p>Interaction normale</p> <p>Récepteur cytokinique</p> <p>Cytokine pro-inflammatoire</p> <p>Signal pro-inflammatoire</p>	<p>La liaison d'une cytokine pro-inflammatoire sur son récepteur conduit à la production de molécules effectrices inflammatoires.</p>	<p>TNF-α, IL-1, et IL-6.</p>
<p>Neutralisation des cytokines</p> <p>Récepteur soluble</p> <p>Anticorps monoclonal</p> <p>Pas de signal</p>	<p>La cytokine, fixée sur un récepteur soluble ou interceptée par un anticorps monoclonal, ne peut pas se lier à son récepteur de surface.</p>	<p>Protéine de fusion : récepteur soluble au TNF-α, récepteur soluble à l'IL-1, anticorps monoclonal dirigé contre le TNF-α (infliximab, D2E7, nerelimomab) et anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-6.</p>
<p>Blocage du récepteur</p> <p>Antagoniste du récepteur</p> <p>Anticorps monoclonal</p> <p>Pas de signal</p>	<p>La cytokine est incapable de se lier à son récepteur qui est déjà lié à un antagoniste ou un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur.</p>	<p>L'antagoniste recombinant du récepteur à l'IL-1 et l'anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6 (Tocilizumab).</p>
<p>Activation des voies anti-inflammatoires</p> <p>Cytokine anti-inflammatoire</p> <p>Suppression des cytokines pro-inflammatoires</p>	<p>Les cytokines anti-inflammatoires inhibent l'expression des cytokines pro-inflammatoires.</p>	<p>IL-4 et IL-10</p>

Figure 20 : Principe de blocage de l'activité d'une cytokine pro-inflammatoire.

Le mode d'action des cytokines est semblable quelque soit la cytokine étudiée : en se liant à un récepteur, celui-ci va pouvoir transmettre le message à l'intérieur de la cellule. Afin de bloquer la voie d'activation induite par la cytokine, plusieurs techniques sont possibles : bloquer la cytokine elle-même (anticorps monoclonal), bloquer son récepteur (antagoniste, anticorps monoclonal), ou d'activer des voies anti-inflammatoires (IL-4 ou IL-10).

D'après (Choy E.H. et Panayi G.S., 2001).

2 Les enzymes de dégradation de la MEC et leurs inhibiteurs naturels

2.1 Présentation

2.1.1 Les métalloprotéases matricielles (MMPs)

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des enzymes qui possèdent des caractéristiques semblables (Matrisian L.M., 1990). En effet, elles possèdent toutes deux sites catalytiques renfermant un atome de zinc associé au centre actif, nécessaire à leur activité, et un atome de calcium, nécessaire à leur stabilité. De plus, elles sont sécrétées sous forme latente (pro-enzyme ou zymogène) et sont activées par protéolyse de leur prodomaine par des protéases exogènes (plasmine, tryptase ...) qui rendent possible des processus ultérieurs de clivage. L'activation des pro-MMPs en MMPs fonctionnelles est achevée par une autolyse ou par l'action d'autres MMPs. Ainsi, par exemple, l'activation de la pro-MMP-1 en MMP-1 active requiert l'action de la MMP-3. Enfin, les MMPs sont inactivées par des inhibiteurs spécifiques, les TIMPs (Tissue inhibitor of MMPs). Les MMPs forment une famille dont les membres sont étroitement apparentés. En effet, ils dérivent tous d'un ancêtre commun et présentent de fortes analogies de structure, tout en différant par leur spécificité de substrat. Collectivement, ces protéases sont capables de dégrader la plupart sinon tous les constituants des matrices conjonctives (collagènes, PGs, élastine ou glycoprotéine de structure). Elles sont classées en quatre familles selon leur spécificité de substrat et/ou leur localisation cellulaire (**Tableau 3**) : les collagénases interstitielles, les gélatinases, les stromélysines et les métalloprotéases membranaires (MT-MMP) (Rannou F. *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Classification des métalloprotéases.

PG : protéoglycane, GL : gélatine.

Famille	Membres	Substrats
Collagénases	Collagénase interstitielle : MMP-1	Collagène I, II, III, IV, VI, VII et X, GL, fibronectine, et PG
	Collagénase neutrophile : MMP-8	Collagène I, II, III, IV, VI et X, GL et PG
	Collagénase interstitielle : MMP-13	Collagène I, II, PG, agrécane
	Collagénase interstitielle : MMP-18	Collagène I
Gélatinases	Gélatinase A : MMP-2	GL, collagène de type IV, V, VII, X et XI, élastine, fibronectine, agrécane, entactine et PG
	Gélatinase B : MMP-9	GL, collagène IV et V, élastine, fibronectine, agrécane, entactine et PG
Stromélysine	Stromélysine : MMP-3	PG, fibronectine, laminine, élastine, GL, collagène II, III, IV, V, VI, IX et X
	Stromélysine-2 : MMP-10	PG, fibronectine, laminine, élastine, GL, collagène II, IV, V, IX et X
	Stromélysine-3 : MMP-11	GL, fibronectine et PG
	Matrilysine : MMP-7	GL, fibronectine, laminine, collagène IV, PG, élastine, entactine
	Metalloélastase : MMP-12	Elastine, fibronectine
MMPs de type membranaire	MT-MMP-1 (MMP-14)	Pro-gélatinase A, collagénase 3, collagène I, II, III, fibronectine, laminine, vitronectine, dermatane sulfate
	MT-MMP-2 (MMP-15)	Non défini
	MT-MMP-3 (MMP-16)	Progélatinase
	MT-MMP-4 (MMP-17)	Collagénase-4

Les MMPs sont principalement synthétisées par les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les macrophages, mais également par les chondrocytes et les synoviocytes (Francois M. *et al.*, 2006, Morand E.F. et Leech M., 2005). Leur activation est induite par des médiateurs inflammatoires (IL-1, TNF- α , prostanoïdes ...), notamment par l'intermédiaire des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (Cohen S. *et al.*, 2002), ce qui entraîne un déséquilibre dans la balance MMPs/TIMPs. Ces enzymes ont donc été impliquées dans plusieurs étapes de la réaction inflammatoire. Ainsi, les MMPs favorisent l'extravasation des leucocytes et leur migration vers les foyers inflammatoires en réponse à des gradients chimiotactiques, ainsi que des remaniements tissulaires accompagnant l'inflammation. De même, ces enzymes jouent un rôle clé dans le processus d'angiogenèse.

Les collagénases (MMP-1 et -13 principalement) sont responsables de la dégradation des fibres de collagène de la MEC. L'IL-1 augmente fortement et rapidement l'expression et l'activation de la MMP-1 et de la MMP-13 dans des chondrocytes en culture, ce qui suggère leur intervention précoce dans la pathogenèse des arthropathies. Ces deux MMPs présentent des localisations différentes : la MMP-1 est plutôt située dans la zone superficielle alors que la MMP-13, qui présente une affinité plus forte pour le collagène II, est située dans la zone profonde. La MMP-3 (stromélysine) dégrade les PGs et le collagène de type IX, et intervient donc également dans les processus de destruction du cartilage (Hembry R.M. *et al.*, 1995, Sirum K.L. et Brinckerhoff C.E., 1989). Le collagène dégradé par les MMPs génère des fragments qui vont servir de substrats à d'autres MMPs, comme les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) ou la MMP-13 [pour revue voir (Rannou F. *et al.*, 2006)]. Les PGs sont également métabolisés par les MMPs, dont les MMP-1, -3 et -13 (Pasceri V. *et al.*, 2000).

Ces enzymes sont largement impliquées dans la pathogenèse de la PR et de l'arthrose. En effet, la balance MMPs/TIMPs est en faveur des MMPs et il n'y a plus d'équilibre entre synthèse/dégradation de la MEC. D'une part, quasiment toutes les MMPs sont surexprimées suite aux stimulations par le TNF- α ou l'IL-1 (augmentation des MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, 11, -13 et MMP-MT-1) dans les tissus articulaires de patients arthrosiques ou arthritiques (Mohtai M. *et al.*, 1993, Smith R.L., 1999). D'autre part, les TIMPs sont moins exprimées dans le cartilage arthrosique que dans le cartilage sain (Dean D.D. et Woessner J.F., Jr., 1984).

2.1.2 Les agrécanases (ADAMTS)

D'autres enzymes relativement proches des MMPs détruisent notamment les agrécanes : les ADAMTS. Ces enzymes constituent un sous-groupe des ADAM (a disintegrin and metalloprotease), possédant en plus des motifs thrombospondines (Tang B.L. et Hong W., 1999). Il en existe 19 au total (Apte S.S., 2004). Les deux principales présentes au sein du cartilage et dégradant l'agrécane sont l'ADAMTS-4 (agrécanase-1) et l'ADAMTS-5 (agrécanase-2). L'ADAMTS-4 est inductible, contrairement à l'ADAMTS-5 qui présente une expression constitutive. La perte de l'agrécane est considérée comme un évènement précoce et critique dans la destruction du cartilage, se produisant initialement à la surface articulaire, puis progressant vers les zones plus profondes. Cette étape est suivie par la dégradation des fibres de collagène. Elles ont toutes deux été retrouvées dans le cartilage de patients arthrosiques et arthritiques, et sont induites par l'IL-1 (Malfait A.M. *et al.*, 2002, Tortorella M.D. *et al.*, 1999).

2.1.3 Les inhibiteurs des métalloprotéases matricielles (TIMPs)

Les TIMPs, divisées en quatre groupes (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4) répriment l'activité MMP en s'associant au site catalytique des MMPs activées. Elles forment ainsi des complexes non covalents pratiquement irréversibles ($KD = 10^{-10}M$) empêchant les MMPs d'accéder à leur substrat. De plus, les TIMPs peuvent également réguler l'auto-activation des pro-MMPs. Elles sont toutes présentes au sein des tissus articulaires chez l'Homme (Apte S.S. *et al.*, 1994, Martel-Pelletier J. *et al.*, 1994). La TIMP-1, par exemple, se lie préférentiellement aux MMP-1, -3, -13 et -9, et elle est induite par l'IL-1. La TIMP-2, quant à elle, se lie à la MMP-2, et elle est réprimée par l'IL-1 pendant les stades précoces de l'inflammation, puis son expression est induite. La TIMP-4 est fonctionnellement redondante par rapport à la TIMP-2, et inhibe l'activité de la MMP-2 (Bigg H.F. *et al.*, 1997). Elles sont synthétisées par les mêmes cellules qui synthétisent les MMPs.

2.2 Rôles des MMPs et des ADAMTS dans les pathologies articulaires

Les MMPs représentent donc une cible de choix pour le traitement des arthropathies. Des inhibiteurs ont été développés et testés en phase clinique (PR) ou dans des modèles expérimentaux (arthrose). En effet, le Trocade® (Ro-32-3555), inhibiteur des MMP-1, -8, -13,

-3, -2, -7 et -9, a été utilisé sur du cartilage bovin stimulé à l'IL-1. Cette étude a montré que la dégradation du cartilage était réduite par ce traitement. De plus, utilisé sur des rats induits à l'adjuvant ou dans un modèle murin d'arthrose, cet inhibiteur prévient la dégradation du cartilage et de l'os (Brewster M. *et al.*, 1998). Un autre inhibiteur, le Ro 113-0830, inhibiteur des MMP-8, -13, -2 et -9, administré à des lapins arthrosiques a permis de diminuer les dommages cartilagineux.

Cependant, lors des premiers essais cliniques, ces inhibiteurs n'ont pas été aussi efficaces que chez les animaux, et ont même présenté des effets indésirables importants pour une classe d'inhibiteurs de MMPs (peptidomimétiques) [pour revue voir (Milner J.M. et Cawston T.E., 2005)]. Des études portant sur d'autres classes d'inhibiteurs (non peptidomimétiques) ont rapporté des résultats plus encourageants, et ces molécules sont actuellement en phase clinique I ou II [pour revue voir (Burrage P.S. *et al.*, 2006)], comme le CPA-926 ou le DPC-333. En conclusion, les inhibiteurs des MMPs n'ont pas été aussi efficaces que l'on aurait pu le croire au vu des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. Il est important de noter que la synthèse d'inhibiteurs sélectifs de MMPs est délicate, au vu de la très forte redondance de substrats entre les MMPs.

Comme nous l'avons décrit, les ADAMTS ont également un rôle important dans le développement des pathologies articulaires, de part leur activité agrégolytique. Les ADAMTS qui semblent le plus impliquées sont l'ADAMTS-1, -4 et -5. Cependant, l'importance de l'ADAMTS-4 a récemment été remise en cause, puisque des souris KO pour cette protéine possèdent une activité de clivage de l'aggrécane semblable aux souris contrôles et leur physiologie n'en est pas affectée (Glasson S.S. *et al.*, 2004). En revanche, l'ADAMTS-5 semble l'aggrécane la plus importante dans le cartilage de souris et humain, et pourrait donc constituer une cible importante dans le domaine des arthropathies (Stanton H. *et al.*, 2005). D'ailleurs, l'industrie pharmaceutique développe actuellement des inhibiteurs sélectifs pour cette enzyme (Bursavich M.G. *et al.*, 2007a, Bursavich M.G. *et al.*, 2007b, Gilbert A.M. *et al.*, 2007). Ces molécules n'ont cependant pas encore été testées dans des modèles expérimentaux d'arthrite ou d'arthrose.

3 Autres médiateurs

3.1 Le monoxyde d'azote (NO)

3.1.1 Synthèse et formes biologiquement actives

Le monoxyde d'azote est synthétisé à partir de l'arginine et en présence d'oxygène, par l'action d'au moins trois formes de NO synthase (NOS) : la NOS neuronale (nNOS, NOS I), la NOS inductible (iNOS, NOS II) et la NOS endothéliale (eNOS, NOS III). À pH physiologique, le NO peut réagir avec l'anion superoxyde et former des peroxynitrites, qui sont des composés fortement pro-oxydants pouvant produire des radicaux hydroxyles. Le NO est produit par un grand nombre de cellules, dont les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules du foie, les neurones, mais aussi les chondrocytes et les synoviocytes (Jouzeau J.Y. *et al.*, 2002, Pacquelet S. *et al.*, 2002, Simonin M.A. *et al.*, 2002).

3.1.2 Rôles physiopathologiques

Les effets des radicaux libres, notamment le NO, sur les constituants matriciels sont multiples et complexes. En effet, le NO agit sur la vasodilatation, l'accroissement du débit sanguin, et la diminution de l'agrégation plaquettaire. Il possède également des propriétés microbicides, relaxantes pour les muscles lisses, et neurotransmettrices pour les cellules nerveuses.

Dans les cellules articulaires, le NO est impliqué dans les phénomènes de prolifération, de mort cellulaire, de dégradation ou de synthèse de la matrice cartilagineuse. Il participe également aux effets anti-prolifératifs de l'IL-1 (Blanco F.J. *et al.*, 1995a, Blanco F.J. et Lotz M., 1995, Blanco F.J. *et al.*, 1995b). Il exerce des effets destructeurs sur les chondrocytes en culture en inhibant la synthèse de collagène et du pro-collagène, et en augmentant l'apoptose (Amin A.R. et Abramson S.B., 1998, Hashimoto H. *et al.*, 2003, Hashimoto S. *et al.*, 1998, Hashimoto S. *et al.*, 1999). De plus, il induit l'expression des MMPs dont les collagénases et les stromélysines (Murrell G.A. *et al.*, 1995).

Chez les patients arthrosiques et arthritiques, la concentration en nitrites détectée dans le liquide synovial est importante (Farrell A.J. *et al.*, 1992), avec un taux plus élevé dans la PR que dans l'arthrose (Renoux M. *et al.*, 1996). Chez des patients sains, le cartilage et la membrane synoviale n'expriment pas la forme inductible de la NOS et ne produisent pas ou peu de NO. En revanche, ces mêmes tissus prélevés sur des patients arthrosiques ou arthritiques expriment fortement iNOS et produisent spontanément du NO lorsqu'ils sont mis

en culture (Amin A.R. *et al.*, 1995). Sous l'effet de l'utilisation d'un inhibiteur d'iNOS, la diminution de PGs induite par l'IL-1 est contrecarrée dans des chondrocytes cultivés *in vitro* et dans des explants de cartilage (Bird J.L. *et al.*, 1997, Cipolletta C. *et al.*, 1998, Hauselmann H.J. *et al.*, 1994, Taskiran D. *et al.*, 1994). De même, dans un modèle d'arthrose canin, l'administration d'un inhibiteur sélectif d'iNOS (N-iminoethyl-L-lysine, L-NIL) ralentit la progression des lésions cartilagineuses, diminue l'activité MMP, ainsi que la production d'IL-1, de PGE₂, et du NO dans le liquide synovial. Ainsi, il en résulte un retard du développement des signes radiologiques et cliniques de la pathologie (Pelletier J.P. *et al.*, 1998).

3.2 Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques. Ce sont des molécules à 20 atomes de carbone, dérivés d'acides gras insaturés dont le principal est l'acide arachidonique. Cette famille contient les prostanoides (groupe divisé en prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes), les leucotriènes et les lipoxines (**Figure 21**).

Deux voies enzymatiques permettent la production des différents eicosanoïdes :

- La première voie conduit à la production des prostanoides, à partir du PGH₂ synthétisé par les COX.

Cette classe d'eicosanoïdes dérive des phospholipides membranaires convertis en acide arachidonique (AA) par la PLA₂. L'acide arachidonique est transformé en PGG₂ puis en PGH₂ par les COX. Ce dernier est le substrat commun à la synthèse des PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂, thromboxane (TX)A₂ et des prostacyclines.

La PGE₂ est le principal prostanoides synthétisé dans les tissus articulaires en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Elle est impliquée dans les phénomènes douloureux, le gonflement, la dégradation du cartilage (inhibition de la synthèse des collagènes, augmentation de la production des MMPs, et de l'apoptose chondrocytaire), la résorption osseuse (augmentation de la différenciation des ostéoclastes), l'angiogenèse et la production des médiateurs pro-inflammatoires. Chez les patients arthritiques, elle est retrouvée en grande quantité dans le liquide synovial et dans les synoviocytes (Martel-Pelletier J. *et al.*, 2003). L'inhibition de sa synthèse par inhibition de COX-2, une des enzymes principales de sa production, permet de réduire l'œdème, ainsi que l'infiltration cellulaire. Les principales molécules responsables de l'inhibition de COX-2 sont les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou les molécules synthétiques comme le SC-58125. COX-2 est une des enzymes

inductibles responsables de la synthèse de PGE₂, et elle est surexprimée dans les synoviocytes issus de patients arthritiques stimulés par l'IL-1 ou le TNF- α (Anderson G.D. *et al.*, 1996). De la même manière, cette enzyme est exprimée dans les pattes induites par ACF de rats arthritiques, mais pas dans les pattes contrôles (Mancini J.A. *et al.*, 2001).

Le principal eicosanoïde possédant des propriétés anti-inflammatoires est la 15dPGJ₂. Cette prostaglandine fait partie de la famille des cyclopentones dérivant de PGH₂ par l'action de la PGD synthase. Son rôle anti-inflammatoire a été démontré notamment par sa présence dans les liquides biologiques pendant la résolution de l'inflammation (Gilroy D.W. *et al.*, 1999, Willoughby D.A. *et al.*, 2000). Cette prostaglandine peut se lier aux PPARs, inhiber l'activation d'IKK (Boyault S. *et al.*, 2004, Rossi A. *et al.*, 2000), et permettre l'oxydation de p50/p65, ce qui inhibe sa fixation sur l'ADN.

- La seconde voie amène notamment à la synthèse des leucotriènes et des lipoxines grâce aux lipoxygénases (LOX).

Cette classe d'eicosanoïdes dérive également de la conversion des phospholipides membranaires en AA par la PLA₂, qui sont ensuite pris en charge par les LOX. Parmi ces molécules, les leucotriènes sont les principales à posséder des propriétés pro-inflammatoires. Il en existe de cinq types, nommés de A à E, divisés en 2 classes. La première classe est constituée du LTB₄, et la deuxième des LTC₄, LTD₄ et LTE₄. Le leucotriène le plus impliqué dans les pathologies articulaires est donc le LTB₄, par ses propriétés de chimiotactisme. Cependant, il pourrait également se lier au récepteur PPAR- α et permettre le rétro-contrôle de l'inflammation. Son rôle dans les pathologies articulaires reste donc à préciser.

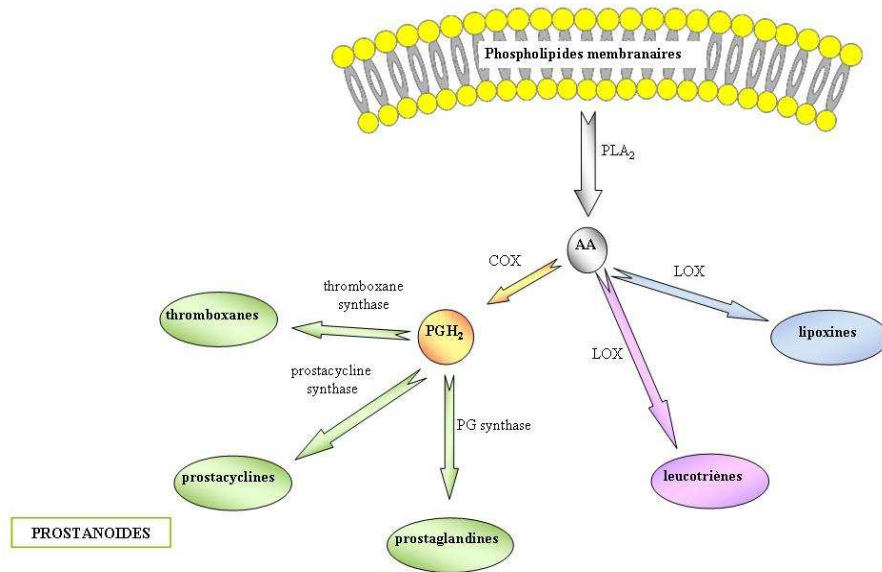


Figure 21 : Schéma simplifié de la biosynthèse des eicosanoïdes.

Les phospholipides membranaires sont transformés en acide arachidonique par les phospholipases. Plusieurs voies peuvent être activées à partir de l'acide arachidonique : la voie de synthèse des prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes), notamment via les cyclooxygénases (COX) et les peroxydases, et la voie des leucotriènes et la voie des lipoxines via les lipoxygénases (LOX).

PLA_2 : phospholipase A_2 ; AA : acide arachidonique ; COX : cyclooxygénase ; PGH_2 : prostaglandine H_2 ; LOX : lipoxygénase.

3.3 Les facteurs angiogéniques

L'angiogénèse est définie comme la croissance de nouveaux capillaires sanguins créés à partir de vaisseaux préexistants. Bien que le cartilage ne soit pas vascularisé, les facteurs angiogéniques jouent un rôle important dans l'homéostasie du cartilage et de la synoviale. En effet, la croissance de nouveaux vaisseaux est nécessaire au développement du pannus rhumatoïde, qui conduit ensuite à l'extension de l'inflammation synoviale, ainsi qu'à la destruction de la structure cartilagineuse.

Ces facteurs sont divisés en pro-angiogéniques et anti-angiogéniques :

- les facteurs pro-angiogéniques sont en majorité représentés par des peptides, dont le VEGF, le bFGF, le TGF- β ou encore le PDGF. Quelques molécules non peptidiques dont l'adénosine ou les PGE_1 et PGE_2 présentent également des propriétés pro-angiogéniques,
- les facteurs anti-angiogéniques comprennent notamment la thrombospondine, l'angiostatine ou l'endostatine.

Le facteur angiogénique majoritairement impliqué dans le développement et l'entretien de la synovite rhumatoïde ou du remodelage du cartilage lors des arthropathies est le VEGF. Il agit

sur la perméabilité vasculaire, joue un rôle central dans la régulation de la vasculogenèse, attire les cellules endothéliales, les monocytes et les polynucléaires, et augmente également la vasodilatation. Il est retrouvé dans les tissus articulaires de patients arthritiques ou arthrosiques, et a été identifié comme le médiateur pivot de l'angiogenèse dans la PR (Koch A.E. *et al.*, 1994, Paleolog E.M., 1996).

De récentes études ont suggéré que le VEGF était également impliqué dans la pathogenèse de l'arthrose. En effet, il est détecté, tout comme ses récepteurs, dans le cartilage et le liquide synovial de patients arthrosiques présentant des changements dégénératifs du cartilage (Pufe T. *et al.*, 2005). Le cartilage ne présentant que de rares vaisseaux sanguins, les propriétés pro-angiogéniques du VEGF ont été remises en cause. Ce facteur semble plutôt augmenter les voies cataboliques du chondrocyte. Ainsi, après s'être fixé sur son récepteur, le VEGF active les voies de signalisation intracellulaires dont les cascades de kinases aboutissant à l'activation d'ERK_{1/2} et à la voie AP-1. Cette voie conduit à la surproduction des MMPs (MMP-1, -3 et -13), des PGE₁ et PGE₂, de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF- α , et à la répression de la synthèse des TIMPs (TIMP-1 et -2). Le VEGF participe ainsi aux phénomènes inflammatoires et dégénératifs se déroulant au cours de l'arthrose.

Les molécules inhibitrices de l'angiogenèse sont testées depuis longtemps en cancérologie, mais n'ont jamais été testées chez l'Homme en rhumatologie. Cependant, certains traitements utilisés pour traiter la PR (comme le methotrexate, la pénicillamine [médicament anti-rhumatismal thiolé d'action lente] ou les anti-TNF) inhibent l'angiogenèse dans des systèmes expérimentaux, permettant de postuler que les inhibiteurs d'angiogenèse pourraient représenter une thérapie dans la PR et l'arthrose.



Chapitre 3. Les rétinoïdes et leurs récepteurs. Utilisation dans le traitement des arthropathies

1 Les rétinoïdes

1.1 Le métabolisme de la vitamine A

Les rétinoïdes sont des substances dérivées de la vitamine A, qui est également appelée all-*trans*-rétinol ou rétinol. Le terme de « vitamine A » se réfère à tous les composés qui possèdent une activité biologique comparable à celle du rétinol. Ce groupe comporte notamment le rétinol lui-même, le rétinal ou encore l'acide all-*trans* rétinoïque (ATRA). La vitamine A est apportée par la nutrition, l'Homme (et les animaux en général) étant incapable de la synthétiser. Elle se retrouve dans la fraction lipidique, la matière grasse du lait et du fromage, les œufs et dans le foie des animaux qui en est l'organe de stockage. La vitamine A peut également être synthétisée à partir de pro-vitamines A, les caroténoïdes, que l'on retrouve dans les végétaux.

Le terme plus générique de « rétinoïdes » inclut les composés naturels dérivés de la vitamine A, ainsi que les analogues synthétiques du rétinol, quelque soit leur activité biologique. Plus d'un millier de ces nouveaux rétinoïdes ont été synthétisés par des chimistes organistes pour d'éventuelles applications thérapeutiques (Dicken C.H., 1984).

1.2 Structure et formation des principaux rétinoïdes naturels

Les rétinoïdes sont composés d'un cycle aromatique à longue chaîne polyène comportant un groupement polaire (alcool, ester, aldéhyde ou acide) (**Figure 22**).

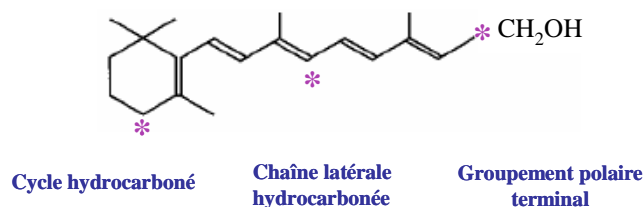


Figure 22 : Représentation schématique de la structure générale d'un rétinoïde.

Les rétinoïdes comportent un cycle et une chaîne latérale hydrocarbonés, ainsi qu'un groupement polaire terminal. Cette structure peut être modifiée en plusieurs endroits (*). Lorsque cette structure n'est pas modifiée, elle représente le rétinol (vitamine A). Si le groupement CH_2OH terminal est remplacé par un groupement CHO , c'est le rétinal, et s'il est substitué par un groupement COOH , c'est l'acide all-*trans* rétinoïque.

Trois générations de rétinoïdes ont vu le jour avec un index thérapeutique toujours plus élevé :

- 1^{ère} génération : dérivés naturels de la vitamine A, dont la trétinoïne (ou acide all-*trans* rétinoïque), l'isotrétinoïne (ou acide 13-*cis* rétinoïque), ou encore le rétinol.
- 2^{ème} génération : les rétinoïdes mono-aromatiques, dont l'étrétinate ou l'acitrétine.
- 3^{ème} génération : les rétinoïdes poly-aromatiques, dont les arotinoïdes.

La majorité des rétinoïdes naturels sont synthétisés à partir du rétinol. La rétinol déshydrogénase transforme le rétinol en rétinaldéhyde all-*trans*, lui-même pris en charge par la rétinal déshydrogénase. L'acide all-*trans* rétinoïque (ATRA) est ainsi synthétisé. Celui-ci peut s'isomériser notamment en acide 9-*cis* rétinoïque (9-*cis* RA) ou en acide 13-*cis* rétinoïque (13-*cis* RA). Il peut également être métabolisé en acide all-*trans* 4-oxo rétinoïque par les cytochromes P450 (CYP26) (**Figure 23**). Chez l'Homme, la concentration sérique du rétinol, comme de l'ATRA ou du 9-*cis* RA est de l'ordre du nanomolaire (Tang G.W. et Russell R.M., 1990).

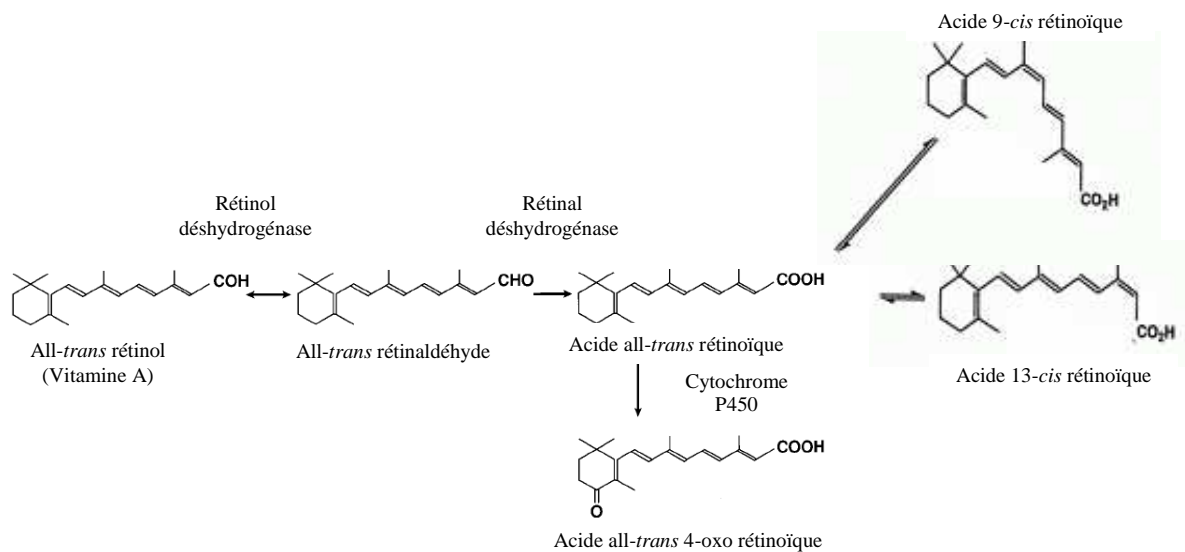


Figure 23 : Schématisation de la voie métabolique du rétinol et de ses produits d'oxydation.

Le rétinol all-*trans* est transformé en acide all-*trans* rétinoïque (ATRA) par plusieurs enzymes. L'ATRA peut s'isomériser en acide 9-*cis* rétinoïque ou en acide 13-*cis* rétinoïque, et être métabolisé par le cytochrome P450 CYP26.

D'après (Ross S.A. et al., 2000).

1.3 Transport des rétinoïdes dans l'organisme

Dans l'estomac, les dérivés de la vitamine A et les caroténoïdes sont libérés des protéines alimentaires pour être hydrolysés dans l'intestin grêle sous l'action conjuguée de la bile et des enzymes pancréatiques (**Figure 24**). Le rétinol et les caroténoïdes sont alors incorporés aux

micelles et absorbés par un mécanisme de transport actif. Ils sont ensuite métabolisés à l'intérieur des cellules intestinales. Le rétinol est lié à un transporteur spécifique cytoplasmique, la retinol binding protein cytoplasmic (RBPc), qui le transporte vers le site de stockage : les globules lipidiques des hépatocytes et des lipocytes. Du foie, le rétinol est libéré dans le sang, où il est transporté par la RBP plasmatique (RBPp). Le rétinol lié à la RBPp se fixe sur l'albumine et le complexe ainsi formé constitue la principale forme circulante de la vitamine A. Dans la cellule, le rétinol est capté puis repris en charge par la RBPc. Il est alors transformé dans la cellule cible pour devenir actif. Le rétinol formé peut être oxydé en ATRA, qui se lie à des protéines spécifiques, les CRABP (cellular retinoic acid binding protein).

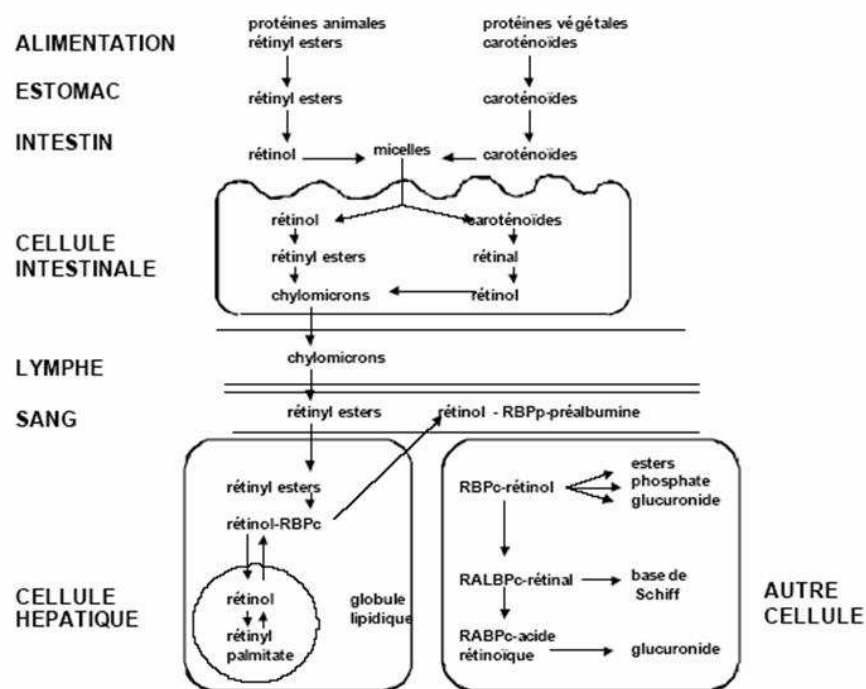


Figure 24 : Schéma de l'absorption et de la distribution de la vitamine A dans l'organisme.

Les CRABP sont de petites protéines intracellulaires qui appartiennent à une famille multigénique de protéines, incluant par exemple CRBP I (Petkovich M., 1992). Elles n'ont pas de structure commune avec les récepteurs aux rétinoïdes. Pourtant, elles lient l'ATRA avec une forte affinité, et le 9-cis RA avec une affinité plus faible. Les CRABP sont absentes de certains tissus cibles de la réponse à l'ATRA, ce qui fait penser qu'elles ne jouent pas de rôle dans les effets induits par l'ATRA (Busch C. *et al.*, 1990, Stoner C.M. et Gudas L.J., 1989), mais elles joueraient plutôt un rôle dans sa synthèse. En effet, ces protéines sont capables de lier le rétinol, et ainsi de le présenter à la rétinol déshydrogénase, elles peuvent également fixer le rétinaldéhyde et l'exposer à la rétinaldéhyde déshydrogénase. De plus, elles facilitent l'hydrolyse des esters de rétinol. Tout ceci favorise la synthèse de l'ATRA. Par

ailleurs, elles contribuent également au catabolisme de l'ATRA, puisque les enzymes le dégradent préférentiellement lorsqu'il est lié aux CRABP. Ces enzymes jouent un rôle dans la protection de l'organisme vis-à-vis des effets délétères des rétinoïdes, puisque des zones très sensibles à l'ATRA (comme le rhombencéphale) en sont fortement dotées (Mader S. *et al.*, 1989). Elles permettraient ainsi de contrôler le niveau d'ATRA disponible pour ses récepteurs en le « séquestrant ». Enfin, les CRABP joueraient un rôle dans le transport de l'ATRA jusqu'aux zones ne possédant pas les enzymes pour le synthétiser. Ainsi, le complexe CRABP/rétinoïdes circule dans le sang lié à une autre protéine, la transthyrétine. Ce complexe se lie à la membrane cellulaire, et seul le rétinoïde pénètre à l'intérieur de la cellule cible. Ces protéines ne sont cependant pas indispensables au transport de l'ATRA, puisque des souris génétiquement déficientes en CRABP sont viables (Lampron C. *et al.*, 1995).

1.4 Catabolisme des rétinoïdes

Un grand nombre de voies de catabolisme des rétinoïdes a été décrit. Celles-ci peuvent être tissu et/ou espèce dépendantes [pour revue voir (Ross S.A. *et al.*, 2000)]. Ces voies incluent les mécanismes d'oxydation (par l'intermédiaire du cytochrome P450 CYP26), ainsi que la formation de glucuronides et de conjugués taurine.

1.5 Principales fonctions des rétinoïdes

Les rétinoïdes interviennent dans une multitude de fonctions biologiques, dont l'embryogenèse (intervention dans le programme de formation de la peau, du système nerveux, ou des cellules sanguines), la prolifération cellulaire, la différenciation, l'inflammation, le métabolisme, la vision ou encore la reproduction [pour revue voir (Ross S.A. *et al.*, 2000)] (**Figure 25**). Les rétinoïdes protègent les muqueuses de la bouche, du nez, de la gorge, des poumons et des voies digestives ou urinaires contre les infections.

Le maintien de l'homéostasie des rétinoïdes est essentiel à une physiologie normale, et un excès ou un déficit en vitamine A entraîne de graves conséquences, notamment tératogènes pour l'embryon (membranolytiques, hépatotoxiques). Toutefois, l'effet tératogène des rétinoïdes dépend du stade de l'embryon, de la dose, de l'isomère ou encore de l'espèce étudiée (Ross S.A. *et al.*, 2000). De la même manière, l'importance physiologique des rétinoïdes est illustrée par le fait que la carence en vitamine A est la première cause mondiale de mortalité infantile (Head K.A., 1999).

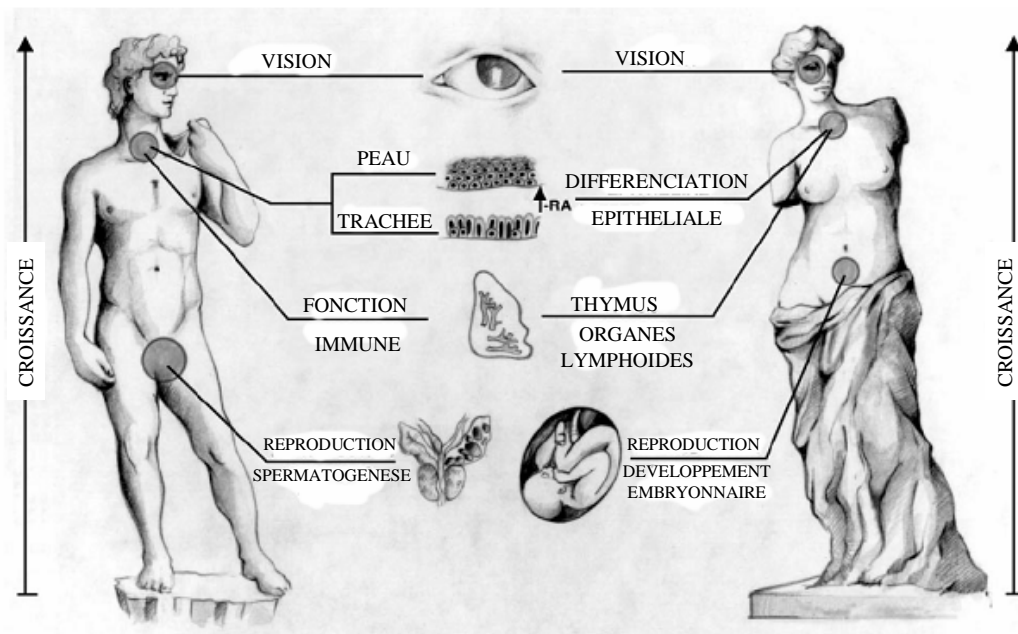


Figure 25 : Principales fonctions physiologiques des rétinoïdes.
D'après (Ross S.A. et al., 2000).

1.5.1 La vision

La vision de nuit, ou l'adaptation à l'obscurité, est un phénomène physico-chimique lié à la présence d'un pigment photosensible dans les cellules en bâtonnets de la rétine : la rhodopsine (**Figure 26**). Sa synthèse s'effectue à partir d'un dérivé de la vitamine A, le 11-*cis* rétinol, et d'une protéine, l'opsine. Lorsque la rhodopsine est exposée à une lumière de faible intensité, le 11-*cis* rétinol est isomérisé en *trans*-rétinol, qui active une cascade de réactions dont la conséquence finale est la décomposition de la rhodopsine et la production d'un influx nerveux. La vision des formes et des couleurs fait appel aux mêmes mécanismes grâce à la présence dans les cellules en cônes de la rétine de trois pigments photosensibles également synthétisés à partir du 11-*cis* rétinol. Ces mécanismes permettent de comprendre pourquoi la carence en vitamine A est la première cause de cécité dans le monde (Head K.A., 1999).

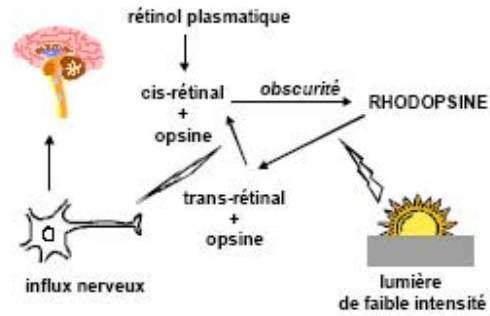


Figure 26 : Rôle du rétinol dans le processus de la vision nocturne.

1.5.2 La différenciation et la prolifération cellulaires

L'ATRA est le rétinoïde principal qui agit sur la différenciation cellulaire. L'ATRA et ses isomères agissent comme des hormones pour réguler l'expression des gènes et ainsi influencer de nombreux processus physiologiques.

En effet, les rétinoïdes interagissent avec des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose. Ainsi, les rétinoïdes augmentent l'expression de p21 ou de p27, des kinases phosphorylant d'autres kinases, ce qui induit un arrêt du cycle et l'induction de la différenciation cellulaire. Dans le cancer du sein, le traitement par l'ATRA entraîne l'inhibition de la cascade de kinases et notamment une diminution de la phosphorylation d'ERK (Nakagawa S. *et al.*, 2003). Cependant, le processus d'inhibition de la prolifération cellulaire dépend fortement du type cellulaire. En effet, dans les cellules neuronales et myéloïdes, l'ATRA induit leur différenciation suite à la phosphorylation d'ERK (Singh U.S. *et al.*, 2003, Yen A. *et al.*, 1998).

Chaque type cellulaire semble donc utiliser des mécanismes différents, mais qui aboutissent tous au même résultat : l'inhibition de la croissance cellulaire, et plus particulièrement de la croissance des cellules tumorales [pour revue (Niles R.M., 2004)].

De plus, les rétinoïdes modulent l'expression et l'activité des différents composants de la machinerie apoptotique. En effet, ils inhibent notamment l'expression de Bcl2 et induisent celle de Bax pendant la phase de différenciation qui précède l'apoptose des cellules, dans des expériences sur des lignées de cancer du sein, du pancréas et des mélanomes (Pettersson F. *et al.*, 2002, Pratt M.A. *et al.*, 2003, Zhang H. et Rosdahl I., 2004).

1.5.3 La reproduction et l'embryogenèse

La vitamine A intervient dans le développement des spermatozoïdes, des ovaires et du placenta, la croissance de l'embryon, ainsi que dans la prolifération et la différenciation de l'épithélium. Un taux sérique en vitamine A important chez la mère est cependant associé à une mortalité et une morbidité infantile accentuées. Une déficience en vitamine A peut également entraîner des malformations embryonnaires notamment au niveau des reins, des yeux et des oreilles (Raz Y. et Kelley M.W., 1999). Les enfants souffrent d'un faible poids de naissance, d'un retard de croissance et/ou d'infections respiratoires.

1.5.4 La chondrogenèse

Le traitement par les rétinoïdes entraîne de nombreux effets indésirables, dont notamment des effets sur le squelette. De façon étonnante, un excès comme un déficit en acide rétinoïque ou en vitamine A entraîne de sérieuses complications notamment chez les femmes enceintes. En effet, les fœtus issus de femmes ayant consommé une quantité importante de vitamine A au cours de leur grossesse risquent l'absence de phalanges terminales, la non fermeture du palais, ou encore des malformations crânio-faciales. Ces observations ont suggéré que la vitamine A pouvait jouer un rôle dans la genèse du squelette. Les rétinoïdes inhibent en effet la différenciation des chondroblastes [pour revue voir (Hoffman L.M. *et al.*, 2003)]. Cette inhibition entraîne l'absence de synthèse des protéoglycanes spécifiques du cartilage (Kochhar D.M., 1985). De plus, les chondrocytes issus de lésions tibiales ou du cartilage articulaire traités par de l'acide rétinoïque s'orientent vers un phénotype de cartilage de croissance, très différent du cartilage articulaire. La synthèse de PG diminue dans les chondrocytes de lapin (Benya P.D. et Padilla S.R., 1986) et de poulet (Horton W.E. *et al.*, 1987), comme celle du collagène de type II (Benya P.D. et Padilla S.R., 1986), alors que la synthèse du collagène de type I augmente (Horton W.E. *et al.*, 1987).

Il semble que ces effets hypochondrogéniques soient en partie dus à la régulation de la voie du TGF- β (Yu Z. et Xing Y., 2006). Des études ont donc été menées dans le but de bloquer la voie de l'acide rétinoïque grâce à des antagonistes de RAR, afin de stimuler la régénération du cartilage et de l'os (Underhill M., 2004).

1.5.5 La vascularisation

Les rétinoïdes présentent des effets contraires sur l'angiogenèse en fonction du système étudié (Lansink M. *et al.*, 1998, Oikawa T. *et al.*, 1993). En effet, des agonistes RAR (Re-80, Am-580, Am-80 et Ch55) utilisés sur des embryons de poulet inhibent le développement de la vascularisation (Oikawa T. *et al.*, 1993), alors que l'ATRA utilisé sur des cellules endothéliales de microvaisseaux augmente la formation de structures ressemblant à des capillaires (Lansink M. *et al.*, 1998). Le mécanisme, ainsi que l'isoforme du récepteur RAR impliqué ne sont pas définis à ce jour. Cependant, la majorité des effets des rétinoïdes observés est une inhibition de l'angiogenèse. Par exemple, dans des kératinocytes humains, le traitement par l'ATRA, le 13-cis RA ou le rétinol all-*trans* inhibe l'expression et la production du VEGF de plus de 50 % (Weninger W. *et al.*, 1998). Dans des lignées cellulaires de cancer thyroïdien, le traitement par le 13-cis RA réduit de 80 % la sécrétion de VEGF, et *in vivo*, lorsque l'ATRA est injecté à des souris ayant subi une xéno greffe, le volume de la tumeur est fortement diminué (Hoffmann S. *et al.*, 2007). Ce phénomène pourrait expliquer en partie les effets thérapeutiques des rétinoïdes dans les affections telles que le psoriasis, qui se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux, la rosacée, qui comporte des œdèmes du visage, des érythèmes et une dilatation des vaisseaux sanguins superficiels, dans les tumeurs solides, ou encore les rétinopathies liées au diabète.

Le phénomène de vascularisation est très important dans le développement des arthropathies, et plus particulièrement dans la PR, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. En effet, le VEGF (principal acteur de l'angiogenèse), entraîne notamment une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui facilite l'attraction des monocytes et des polynucléaires vers le site inflammatoire. Malgré leurs propriétés anti-angiogéniques dans d'autres modèles, les rétinoïdes n'ont pas été testés dans cette optique dans les modèles d'arthropathie. Il n'y a donc pas de données recensées dans la bibliographie concernant l'effet des rétinoïdes sur l'angiogenèse dans les modèles/études cliniques d'arthrose ou de PR.

1.5.6 Réponse immunitaire et inflammation

1.5.6.1 La réponse immune

À ses débuts, la vitamine A était connue comme la « vitamine anti-infection », car elle est essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire. Elle joue un rôle important dans le développement et la différenciation des lymphocytes B et T.

Les récepteurs RAR, ainsi que la vitamine A et ses dérivés, sont impliqués dans le mécanisme de la fonction immunitaire. En effet, les rétinoïdes agissent notamment sur des gènes contrôlant l'activation des neutrophiles (Lawson N.D. et Berliner N., 1999). Par exemple, chez des rats déficients en vitamine A, le recrutement des neutrophiles du sang vers le site de l'inflammation est plus important que chez des rats contrôles, et ce phénomène est réversé lorsque les rats sont traités par de l'ATRA ou des rétinoïdes synthétiques (Ongsakul M. *et al.*, 1985). De même, l'ATRA diminue le nombre de monocytes de la moelle osseuse et de la rate de souris (Miller S.C. et Kearney S.L., 1998), et réprime la transcription d'IL-12 produite par les macrophages (Na S.Y. *et al.*, 1999). Or, l'IL-12 favorise le développement des lymphocytes de type Th1, qui vont produire de l'IFN- γ en retour. L'IFN- γ active à son tour les macrophages. Les rétinoïdes, en inhibant la synthèse d'IL-12, répriment la réaction inflammatoire de type Th1.

Ce changement de profil des lymphocytes T a également été observé dans des études *in vivo* sur des souris déficientes en vitamine A, pour lesquelles la production d'IFN- γ était fortement augmentée (Th1), alors que celles de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 (Th2) étaient réprimées (Cantorna M.T. *et al.*, 1994, Carman J.A. *et al.*, 1992). L'ATRA rétablit en partie le profil Th1/Th2, par un mécanisme encore méconnu. Cependant, il semblerait que l'effet serait plutôt dû à une inhibition des cytokines de type Th1, qui ne jouent plus leur rôle d'antagoniste vis à vis des cytokines de type Th2, qui sont alors induites.

La supplémentation en vitamine A diminue les niveaux sériques de TNF- α et augmente ceux d'IL-10 chez des patients immunodéficients en vitamine A (concentration sérique en rétinol diminuée de 75 % par rapport à des individus sains) (Aukrust P. *et al.*, 2000). De plus, dans des études *in vitro*, l'ATRA inhibe la production de nitrites, d'IL-1, de TNF- α et d'IL-6 dans différents types cellulaires [cellules musculaires de paroi aortique induite par l'IL-1 (Sirsjo A. *et al.*, 2000), fibroblastes de cornée induits par du PMA (phorbol-12-myristate-13-acétate) (West-Mays J.A. *et al.*, 1999), macrophages hépatiques de rat stimulés par du LPS (Motomura K. *et al.*, 2001), fibroblastes pulmonaires (Zitnik R.J. *et al.*, 1994)]. Le 9-cis RA permet également d'inhiber les mêmes médiateurs pro-inflammatoires notamment dans la microglie de souris stimulées par du LPS (Xu J. et Drew P.D., 2006).

1.5.6.2 Les facteurs de transcription pro-inflammatoires

Les rétinoïdes inhibent, par l'intermédiaire des récepteurs RAR et RXR, certains facteurs pro-inflammatoires comme NF- κ B (Austena L.M. *et al.*, 2004), NF-IL-6 (DiSepio D. *et al.*, 1997) ou AP-1 (Nagpal S. *et al.*, 1995, Pfahl M., 1993). Le mécanisme d'inhibition sera détaillé dans le chapitre (2.8). À travers cette régulation négative, la production de certaines MMPs, de cytokines pro-inflammatoires et d'autres gènes impliqués notamment dans la prolifération cellulaire et la réaction inflammatoire sont réprimés par les rétinoïdes. Ce mécanisme explique en partie les effets bénéfiques obtenus lors du traitement de l'arthrite expérimentale (Brinckerhoff C.E. et Harris E.D., Jr., 1981, Haraoui B. *et al.*, 1985, Kuwabara K. *et al.*, 1996), de l'acné ou de l'encéphalite.

Cette inhibition résulte le plus souvent d'une interaction physique entre les récepteurs aux rétinoïdes et les facteurs de transcription. Cependant, certains rétinoïdes engendrent une inhibition de l'activité AP-1, sans pour autant activer les récepteurs RAR ou RXR (Fanjul A. *et al.*, 1994, Nagpal S. *et al.*, 1995). La relation entre les structures des rétinoïdes impliqués et l'inhibition de l'activité AP-1 n'est cependant pas toujours bien définie actuellement. De même, des auteurs ont montré que des antagonistes des récepteurs RAR (BMS-189453) possédaient les mêmes propriétés anti-inflammatoires dans un modèle d'arthrite au collagène chez la souris ou aux parois de streptocoques chez le rat que les agonistes de RAR. Cette inhibition est en fait due aux propriétés anti-AP-1 conservées par ces molécules, qui répriment la production de MMP-1, -3 et -13.

L'ATRA inhibe donc l'activité AP-1, notamment par interaction physique avec c-Jun dans les cellules HeLa ou les cellules épithéliales de rein (Schule R. *et al.*, 1991). Mais il inhibe également l'activité NF-IL-6 dans les cellules issues de carcinomes de Kaposi (Nagpal S. *et al.*, 1997), comme le tazarotène ou TTNPB (agoniste RAR) dans les cellules HeLa stimulées par de l'IFN- γ (DiSepio D. *et al.*, 1997). L'activité basale de NF- κ B est également augmentée chez des souris déficientes en vitamine A, et cette activité est réprimée par un traitement à l'ATRA, alors qu'elle est encore plus augmentée par un traitement avec un antagoniste RAR (AGN 194310) (Austena L.M. *et al.*, 2004).

Les rétinoïdes inhibent donc efficacement ces trois facteurs de transcription pro-inflammatoires, et ceci dans de nombreux types cellulaires très différents.

1.6 Principales applications thérapeutiques des rétinoïdes

Les rétinoïdes sont actuellement utilisés principalement dans la thérapie en dermatologie et en cancérologie. Cependant, de nombreuses expérimentations ont testé les rétinoïdes dans d'autres domaines, comme l'ophtalmologie ou l'oto-rhino-laryngologie.

1.6.1 Cancérologie

Une relation forte entre le développement du cancer et la vitamine A et ses dérivés a été établie par de nombreux travaux ces dernières décennies. Ces observations ont conclu à l'hypothèse selon laquelle un niveau physiologique élevé en rétinoïdes protégeait l'organisme contre le développement de lésions pré-malignes ou malignes. Les récepteurs aux rétinoïdes étant les médiateurs directs de ces derniers, il est logique de constater que des variations de leur expression ou de leur activité sont associées au processus de transformation tumorale. Les rétinoïdes utilisés en cancérologie agissent à tous les stades de la cancérogenèse : initiation, promotion et progression.

Le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire (APL) par les rétinoïdes est la thérapie la plus marquante impliquant les rétinoïdes. L'APL est caractérisée par une accumulation dans la moelle osseuse et dans le sang de précurseurs myéloïdes immatures bloqués au stade promyélocytaire. Cette pathologie résulte quasiment toujours de la translocation chromosomique entre le gène du récepteur alpha à l'acide rétinoïque (RAR- α) et le gène codant pour la protéine de la leucémie promyélocytaire (PML), situés sur les chromosomes 15 et 17 (95 % des cas). La nouvelle protéine chimérique produite se comporte comme un dominant négatif des deux protéines originelles. L'action de **RAR- α** sur ses gènes cibles n'est alors plus assurée, ce qui conduit à une différenciation anormale des promyélocytes. Le traitement de cette pathologie par l'ATRA permet la différenciation des cellules leucémiques en granulocytes matures. Grâce à cette thérapie, une forte rémission (70 % des cas) et une augmentation de l'espérance de vie sont observées. Cependant, la rémission reste de courte durée car l'organisme développe une certaine résistance à l'ATRA, par un catabolisme et une clairance augmentés, ainsi qu'une surproduction des protéines CRABP.

RAR- α n'est pas la seule isoforme de RAR participant clairement au processus de cancérogenèse. En effet, **RAR- β** semble intervenir à différentes étapes de la formation des tumeurs solides. La perte d'expression de RAR- β 2 est ainsi associée à la progression des

tumeurs chez l'Homme, alors que l'induction de son expression, notamment par un traitement à l'ATRA, est corrélée avec l'inhibition de la croissance des tumeurs solides [pour revue voir (Altucci L. et Gronemeyer H., 2001)]. Par exemple, dans des lignées cellulaires de cancer du sein, le promoteur de RAR- β 2 est inhibé, et ce phénomène peut être réversé par la déméthylation de l'ADN ou l'inhibition des histones déacétylases, ou encore le traitement par des rétinoïdes, qui augmentent l'expression des récepteurs RAR (également un des gènes cibles des rétinoïdes) (Hansen L.A. *et al.*, 2000). Cette chute d'expression de RAR- β 2 a également été constatée au cours du processus de carcinogenèse dans d'autres types de tumeurs solides, dont les cancers du poumon, de la tête ou du cou (Wan H. *et al.*, 1999, Widschwendter M. *et al.*, 1997, Xu X.C. *et al.*, 1997b, Xu X.C. *et al.*, 1997a). La réexpression de RAR- β dans ces cellules cancéreuses réverse le processus tumorigénique (Houle B. *et al.*, 1993). De plus, des souris transgéniques exprimant un ARN antisens de RAR- β développent un plus grand nombre de tumeurs que les souris contrôles (Berard J. *et al.*, 1996). RAR- β réprime AP-1 de façon constitutive, ce qui permet d'expliquer en partie ses effets anti-cancéreux, notamment dans le cancer de la peau.

Les rétinoïdes sont également utilisés dans le traitement d'autres cancers, comme celui de la peau, de la vessie, ou encore du foie [pour revue voir (Hill D.L. et Grubbs C.J., 1992)]. Ils agissent *via* un effet anti-promoteur et immunostimulant (activation des cellules NK et des cellules de la cytotoxicité). Ainsi, on peut noter par exemple que le traitement par l'ATRA est déjà utilisé pour traiter l'APL (Fenaux P. *et al.*, 2001), ou le cancer de la thyroïde (Schmutzler C. et Kohrle J., 2000), le 9-cis RA est utilisé pour traiter le sarcome de Kaposi (Dezube B.J., 2000) ou le cancer du sein (Lawrence J.A. *et al.*, 2001). Enfin, le 13-cis RA est également utilisé en cancérologie pour traiter les cancers de la peau (Kraemer K.H. *et al.*, 1988), de la tête ou du cou (Shin D.M. *et al.*, 2001).

Les récepteurs **RXR** semblent également impliqués dans l'inhibition de la cancérogenèse. En effet, des données ont montré que des souris knock-out pour RXR- α dans l'épiderme étaient plus sensibles à l'induction de tumeurs par un agent carcinogène (le DMBA, diméthylbenzanthracène) (Li M. *et al.*, 2000). Ces souris développent plus fréquemment des papillomes (tumeur de la peau), qui progressent également plus rapidement (P. Chambon, données non publiées). La question non résolue est de savoir si cette perte d'expression des récepteurs RXR entraîne une perturbation de la voie RAR/RXR, une dysrégulation de voies spécifiques à RXR, ou une modification des voies d'autres récepteurs nucléaires se dimérisant avec RXR. Une hypothèse a été faite quant à l'action des rétinoïdes (rétinoïdes activant

uniquement les isotypes RXR) sur la voie de signalisation des protéines kinases (PK) A, permettant d'expliquer notamment la différenciation des promyélocytes lors de l'APL (Benoit G. *et al.*, 1999). Il est important de noter que les premiers réxinoïdes testés sur des modèles animaux ont montré des résultats encourageants et des effets indésirables beaucoup plus faibles (Agarwal V.R. *et al.*, 2000, Gamage S.D. *et al.*, 2000, Gottardis M.M. *et al.*, 1996). Le LGD1069 (agoniste RXR) a donc été testé en phase clinique sur deux types de cancers avec une bonne efficacité, le lymphome cutané à cellules T (Cohen M.H. *et al.*, 2001) et le cancer du poumon « non à petites cellules » (Khuri F.R. *et al.*, 2001).

1.6.2 Dermatologie

L'action de la vitamine A sur la prolifération et la différenciation des épithélia en fait une molécule de grand intérêt en dermatologie. Ses dérivés sont utilisés pour traiter les kératoses actiniques et séborrhéiques, les verrues de type viral, le carcinome de cellules basales, l'acné, les ichtyoses, le psoriasis, les lésions précancéreuses ou les mélanomes [pour revues voir (Dawson M.I., 2004, Thacher S.M. *et al.*, 2000, Zouboulis C.C., 2001)].

L'action des rétinoïdes est encore à l'étude actuellement, mais leurs propriétés anti-prolifératives sur les cellules épidermiques, ainsi que leur action sur la kératinisation et les phénomènes de desquamation en font des atouts majeurs en dermatologie (Fisher G.J. et Voorhees J.J., 1996, Torras H., 1996).

Les rétinoïdes actuellement utilisés en dermatologie sont le 13-cis RA (Roaccutane[®]), l'ATRA (Renova[®]), l'adapalène (Différine[®]) pour le traitement de l'acné (Galvin S.A. *et al.*, 1998), ou encore l'étrétinate (Tigasone[®]) ou le tazarotène (Tazorac[®]) pour le traitement du psoriasis (Zhu X.J. *et al.*, 2001). Toutes ces molécules sont des agonistes RAR, et les agonistes RXR ne reproduisent pas ces effets (Thacher S.M. *et al.*, 1997).

De même, les rétinoïdes sont utilisés afin d'atténuer le vieillissement photo-induit de la peau, qui se traduit par d'importantes atteintes de l'épiderme : mort prématurée des cellules, désorganisation de l'épiderme, diminution du nombre de couches cellulaires, cellules rétractées. Le traitement par l'ATRA restaure la qualité de l'épiderme, dont la couche cornée devient plus fine. Macroscopiquement, les rides profondes et l'aspect râpeux au toucher sont significativement améliorés (Montassier P., 1996).

1.6.3 Hyperglycémie et hyperinsulinémie

Les agonistes RXR peuvent avoir une action thérapeutique dans le cadre du diabète, bien que ces effets impliquent l'activation de son hétéropartenaire PPAR. En effet, les effets des agonistes RXR sont reproduits par ceux des agonistes PPAR et l'addition des deux agonistes montre un effet synergique. Le traitement de souris ob/ob (souris obèses) par du LGD1069 ou du LG100268 (deux réxinoïdes) et du gemfibrozil (fibrate, agoniste PPAR- α) fait ainsi chuter plus efficacement les taux de triglycérides que lors du traitement par l'un des deux agonistes seul (Mukherjee R. *et al.*, 1998). La suite de cette bibliographie sera restreinte aux effets des rétinoïdes ou réxinoïdes qui agissent *via* les dimères RAR et/ou RXR.

1.7 Mode d'action des rétinoïdes

1.7.1 Action dépendante des récepteurs nucléaires RAR et RXR

La voie d'action des rétinoïdes la plus connue implique les récepteurs nucléaires RAR (Retinoic acid Receptor) et RXR (Retinoid X Receptor). Cette voie sera détaillée dans le chapitre traitant des récepteurs aux rétinoïdes.

1.7.2 Action indépendante des récepteurs nucléaires RAR et RXR

La voie d'action des rétinoïdes indépendante des récepteurs RAR et RXR est beaucoup moins explorée. Cependant, quelques publications rapportent des effets directs des rétinoïdes sans interagir avec la voie RAR/RXR. Ces effets ont été démontrés dans des études sur des lignées cancéreuses. Par exemple, l'ATRA active directement de petites protéines G Rac1, qui sont des protéines régulatrices en amont de p38 dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Alsayed Y. *et al.*, 2001), ce qui permettrait à l'ATRA de jouer un rôle crucial dans la différenciation cellulaire. De même, certains rétinoïdes (rétinol, 14-HRR) peuvent, selon leur structure, soit induire, soit réprimer l'activité de PKC en se fixant directement sur ces protéines (Imam A. *et al.*, 2001). Le CD437 (agoniste RAR- γ) inhibe l'apoptose des cellules de lignée leucémique résistantes à l'acide rétinoïque à travers un mécanisme indépendant de RAR. En effet, cette lignée étant dépourvue des récepteurs RAR- β et RAR- γ , et présentant un récepteur RAR- α tronqué et non fonctionnel, elle mime le mécanisme de résistance observé lors du traitement de l'APL par les rétinoïdes. Malgré l'absence des récepteurs RAR, le traitement de ces cellules par le CD437 entraîne l'arrêt total de la prolifération et l'entrée en

apoptose. Ce phénomène serait lié à l'augmentation de deux inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines, p21^{waf1/cip1} et GADD45. Le mécanisme exact reste malgré tout à déterminer (Hsu C.A. *et al.*, 1997). De la même façon, l'effet de ce même agoniste a été testé avec succès sur des cellules de carcinomes de la tête et du cou, et ces effets n'ont pas pu être inhibés par un antagoniste de RAR (AGN-193109) (Sun S.Y. *et al.*, 2000).

De façon similaire, dans d'autres types cellulaires, comme une lignée de cellules cancéreuses (Medkova M. et Cho W., 1999) ou des extraits de cerveaux de souris (Cope F.O. *et al.*, 1984), l'ATRA inhibe la voie PKC et ceci de manière tout à fait indépendante de RAR. En effet, les auteurs ont pu démontrer une interaction physique entre l'ATRA et PKC (Ochoa W.F. *et al.*, 2003, Radomska-Pandya A. *et al.*, 2000) (**Figure 27** et **Figure 28**). Cette inhibition physique conduit cependant à une activation ou une inhibition de la protéine PKC, suivant le modèle cellulaire étudié (Radomska-Pandya A. *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent qu'en plus de cette interaction, l'ATRA pourrait également interagir physiquement et ainsi inhiber d'autres molécules en amont dans la voie d'activation des MAPK. Ces interactions restent toutefois à déterminer.

De plus, il a été montré que certains rétinoïdes étaient capables d'inhiber la voie d'activation de NF- κ B de façon RAR-indépendante, puisque des agonistes sélectifs RAR- γ (MX3350-1 ou CD 2325) inhibent IKK, ce qui conduit à l'inactivation de NF- κ B dans des lignées cellulaires tumorales (HeLa, procarcinomes prostatiques, cellules de carcinome de poumon). Ce mécanisme n'est pas réversé par l'utilisation d'antagonistes de RAR, grâce à quoi les auteurs ont conclu à un effet indépendant de RAR. Le mécanisme exact n'a cependant pas pu être défini (Bayon Y. *et al.*, 2003).

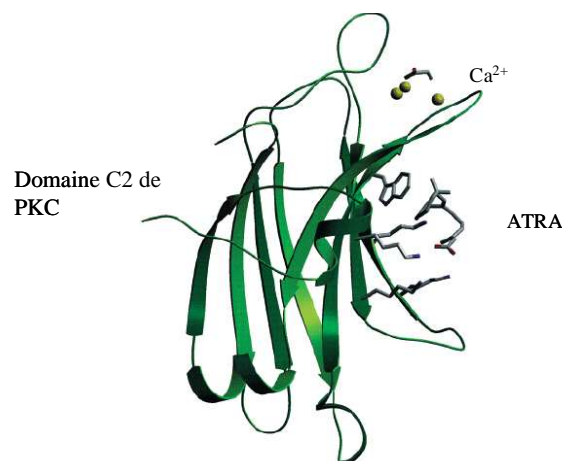


Figure 27 : Représentation de la structure du complexe domaine C2 de la PKC/ATRA/Ca²⁺.
 La PKC pourrait lier l'ATRA au niveau de son domaine C2. Les auteurs ne sont cependant pas en accord sur la conséquence de cette liaison, à savoir si elle active ou inhibe l'activité de la PKC. Cette activité semble dépendante des cellules étudiées.
 D'après (Ochoa W.F. *et al.*, 2003).

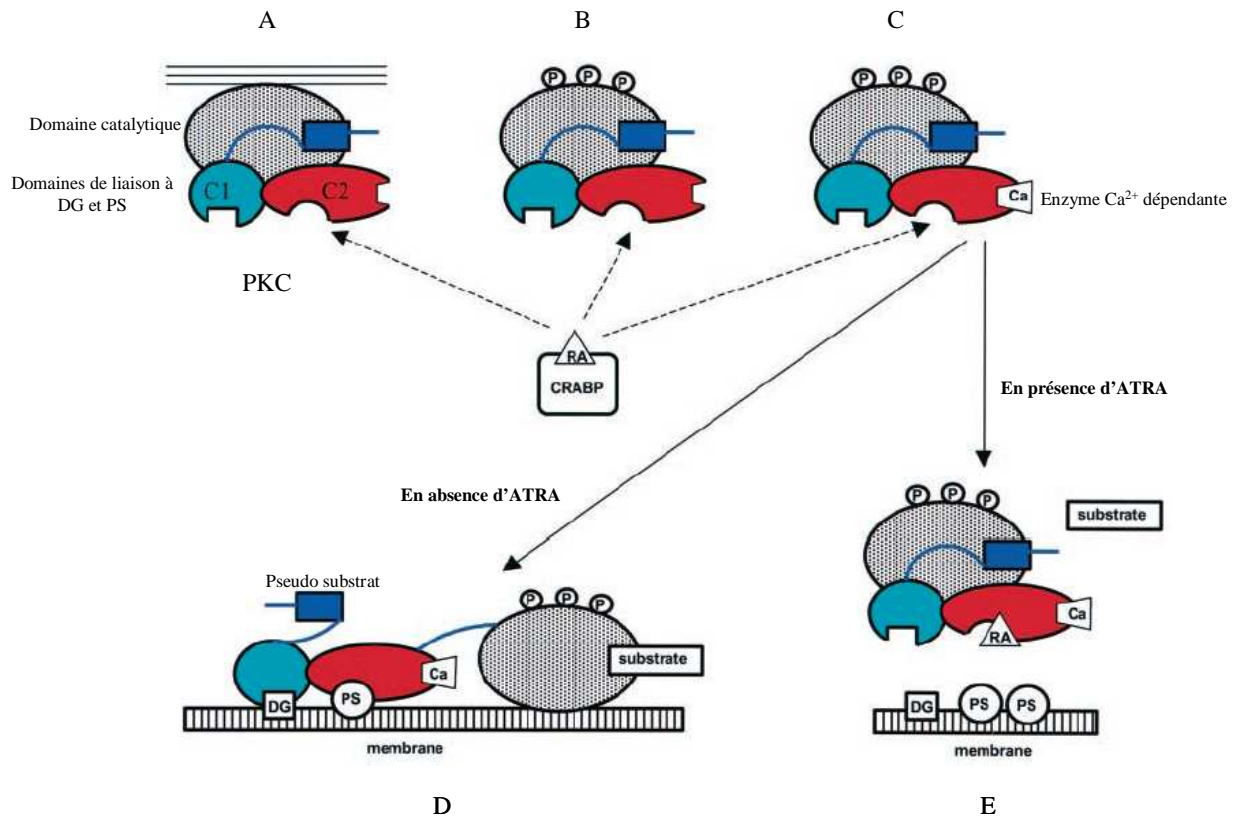


Figure 28 : Hypothèse de la régulation de la PKC par l'ATRA et de l'implication des CRABP.

La partie supérieure du schéma représente le transport de la PKC vers le cytoplasme (A), après avoir été phosphorylée au niveau de son domaine catalytique (B). Dans une situation normale, après avoir été phosphorylée et activée en présence de calcium (C), la PKC se lie à la membrane au niveau du diacylglycérol (DAG) par son domaine C1 et de la phosphatidylsérine (PS) par son domaine C2. Dans cette configuration, le pseudo-substrat ne masque plus le site de liaison du substrat, et la PKC peut donc lier son substrat et le phosphoryler (D). L'ATRA (noté ici RA) transporté par les CRABP pourrait se fixer sur les PKC au niveau de domaine C2 de la reconnaissance de la PS, et ainsi inhiber la fixation de la PKC au niveau de la membrane. La structure ainsi formée ne permet pas la reconnaissance du substrat car la structure en pseudo-substrat masque le domaine de liaison du ligand (E). L'activité de la PKC pourrait ainsi être inhibée par l'ATRA.

D'après (Radomska-Pandya A. et al., 2000).

Une autre hypothèse de mode de fonctionnement des rétinoïdes, cependant moins documentée, est le mécanisme de rétinoylation. Cette modification post-traductionnelle des protéines intervient dans la plupart des lignées cellulaires eucaryotes, et met en jeu la liaison covalente (pont thioester) de l'acide rétinoïque sur des protéines (acylation) (Miano J.M. et al., 1996). Ce phénomène semble impliquer la formation de rétinoyl-CoA, puis la partie rétinoyl serait transférée sur les protéines. Cette modification pourrait jouer un rôle sur la modulation de l'activité de certaines enzymes, et la régulation de protéines de signalisation (Wada M. et al., 2001). Cette réaction est également rendue possible par un traitement à l'ATRA, alors qu'elle est inhibée par le 13-cis RA ou le 9-cis RA (Cione E. et al., 2005). Cette réaction dépend donc des rétinoïdes, mais également du type cellulaire étudié.

2 Les récepteurs aux rétinoïdes

2.1 Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des activateurs transcriptionnels, parfois spécifiques d'un tissu ou d'un type cellulaire, qui régulent le programme d'expression de gènes cibles en se liant à des éléments de réponse (RE, response element) spécifiques, situés dans les régions promotrices de ces gènes. Ces facteurs de transcription transmettent les effets des hormones stéroïdiennes (œstrogène, progestérone, androgènes, glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes), des hormones thyroïdiennes, des rétinoïdes, de la vitamine D₃ et des proliférateurs de peroxyosomes, sur des activités biologiques aussi variées que la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement et l'homéostasie.

La majorité des récepteurs nucléaires agit sous forme de dimère. Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (ER, pour estrogen receptor, AR, pour androgen receptor, PR, pour progesterone receptor, GR, pour glucocorticoid receptor, et MR, pour mineralocorticoid receptor) forment des homodimères. D'autres récepteurs nucléaires peuvent former soit des homodimères soit des hétérodimères, dont le partenaire le plus fréquent est RXR (récepteur aux rétinoïdes X) : RXR lui-même, RAR (récepteur à l'acide rétinoïque), TR (récepteur aux hormones thyroïdiennes), VDR (récepteur à la vitamine D₃), PPAR (récepteur activés par les proliférateurs de peroxyosomes), COUP-TF (facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet) ou LXR (récepteur aux oxystérols).

2.2 Présentation des récepteurs RAR et RXR, isotypes, isoformes et structure générale

Les rétinoïdes exercent leurs effets pléiotropiques à travers l'activation de deux types de récepteurs : RAR et RXR [pour revues voir (Germain P. *et al.*, 2006b, Germain P. *et al.*, 2006a)]. Parmi les RARs, trois sous-types ont été identifiés : RAR- α (NR1B1) fut le premier identifié en 1987 par les groupes de Pierre Chambon et de Ron Evans, RAR- β (NR1B2), et RAR- γ (NR1B3). Ces trois isotypes sont produits à partir de trois gènes différents (Chambon P., 1996, Giguere V. *et al.*, 1987, Petkovich M. *et al.*, 1987). Pour chaque isotype de RAR, plusieurs isoformes existent, qui diffèrent au niveau de leur région N-terminale. Ces isoformes sont produites par épissage alternatif et par l'utilisation de deux promoteurs différents. Il existe deux isoformes majeures pour RAR- α (α 1 et α 2) et pour RAR- γ (γ 1 et γ 2)

et quatre isoformes pour RAR- β (β 1, β 2, β 3 et β 4). Les récepteurs RAR forment principalement des hétérodimères, bien que des homodimères RAR/RAR aient été détectés *in vitro* lors d'expériences de gel retard (Schrader M. *et al.*, 1993).

Les RXRs, comme les RARs, existent sous trois isotypes différents : RXR- α (NR2B1), RXR- β (NR2B2) et RXR- γ (NR2B3) (Kastner P. *et al.*, 1997, Mangelsdorf D.J. et Evans R.M., 1995, Mark M. *et al.*, 1999). Deux isoformes majeures ont été décrites pour chaque isotype, différant au niveau de leur partie N-terminale (Chambon 1996) : RXR- α 1 et α 2, RXR- β 1 et β 2 et RXR- γ 1 et γ 2 (Brocard J. *et al.*, 1996, Fleischhauer K. *et al.*, 1992, Liu Q. et Linney E., 1993, Nagata T. *et al.*, 1994). RXR a d'abord été considéré comme un récepteur orphelin (Mangelsdorf D.J. *et al.*, 1990), avant d'être décrit comme répondant à l'ATRA, cependant à des concentrations très élevées. Plus tard, il a été découvert que l'isomère de l'ATRA, le 9-cis RA représentait un agoniste de très forte affinité pour RXR (Heyman R.A. *et al.*, 1992, Leid M. *et al.*, 1992, Levin A.A. *et al.*, 1992, Mangelsdorf D.J. *et al.*, 1992, Rowe A. *et al.*, 1991, Yu V.C. *et al.*, 1991). En plus d'être capables de s'hétérodimériser avec les RARs, les RXRs peuvent également former des homodimères (Mader S. *et al.*, 1993, Mangelsdorf D.J. *et al.*, 1991), et ils ont de plus été identifiés comme des facteurs nécessaires à l'activation de nombreux autres récepteurs nucléaires (Glass C.K., 1994, Laudet V. *et al.*, 1992, Leid M. *et al.*, 1992).

Les récepteurs RAR et RXR sont organisés structurellement de la même manière que la plupart des récepteurs nucléaires. Chaque domaine forme une interface de liaison protéine/protéine qui permet l'activité spécifique du récepteur (**Figure 29**).

❖ Les domaines A et B, domaines d'activation de la transcription.

Ce domaine, peu conservé entre les différents récepteurs nucléaires, se situe au niveau de la partie N-terminale des récepteurs RAR et RXR, et contient les domaines A et B. Ces domaines représentent le domaine d'activation de la transcription indépendante du ligand (AF-1) (Nagpal S. *et al.*, 1993).

❖ Le domaine C, domaine de liaison à l'ADN.

Au contraire des domaines A et B, le domaine C est un domaine très structuré et fortement conservé entre les récepteurs nucléaires. Il représente en fait la « marque de fabrique » des récepteurs nucléaires. Cette séquence permet la reconnaissance d'une courte séquence d'ADN au niveau des promoteurs de gènes cibles des rétinoïdes. Le DBD (DNA binding domain) des RAR et des RXR est composé d'un domaine structural de deux doigts de zinc formé par huit cystéines (Katahira M. *et al.*, 1992, Knegtel R.M. *et al.*, 1993, Rastinejad F. *et al.*, 2000).

Le rôle de ce domaine est de permettre la liaison spécifique de chaque monomère ou dimère sur l'ADN, mais il sert également d'interface de dimérisation pour chaque monomère. Les RAR et les RXR coopèrent pour se fixer sur les séquences hexamériques.

❖ Le domaine D, domaine charnière.

Ce domaine est une charnière entre les domaines C et E. Il peut être impliqué dans la fixation aux séquences d'ADN (pour RXR) (Lee M.S. *et al.*, 1993), et dans la localisation nucléaire des récepteurs (Ylikomi T. *et al.*, 1992). Contrairement aux autres récepteurs nucléaires, le domaine D des RAR semble relativement bien conservé, et a ainsi pu être divisé en trois domaines [D1, D2 et D3 (Zelent A. *et al.*, 1989)].

❖ Le domaine E, domaine de liaison du ligand.

Le LBD (ligand binding domain) des RAR et des RXR est construit autour d'une structure commune à tous les récepteurs nucléaires (Laudet V. *et al.*, 1992). Ce domaine est composé de trois couches formées de 12 hélices alpha disposées antiparallèlement, au cœur desquelles se trouve un feuillet bêta composant en partie la poche où va se fixer le ligand. Toutefois, ce domaine varie selon les récepteurs, ce qui leur permet d'acquérir une spécificité de ligand [pour revues voir (Apfel C. *et al.*, 1992, Benkoussa M. *et al.*, 1997, Lefebvre B. *et al.*, 1998)]. Ce domaine comprend également une fonction activatrice de la transcription dépendante du ligand (AF-2) ainsi qu'une interface de dimérisation. Son rôle est également de recruter les co-régulateurs (co-activateurs ou co-répresseurs, selon la présence ou l'absence du ligand).

❖ Le domaine F.

Ce domaine est absent du récepteur RXR. Pour RAR, cette séquence semble utile à l'activité de la fonction AF-2 (Tate B.F. *et al.*, 1996), et à la liaison avec des facteurs intermédiaires.

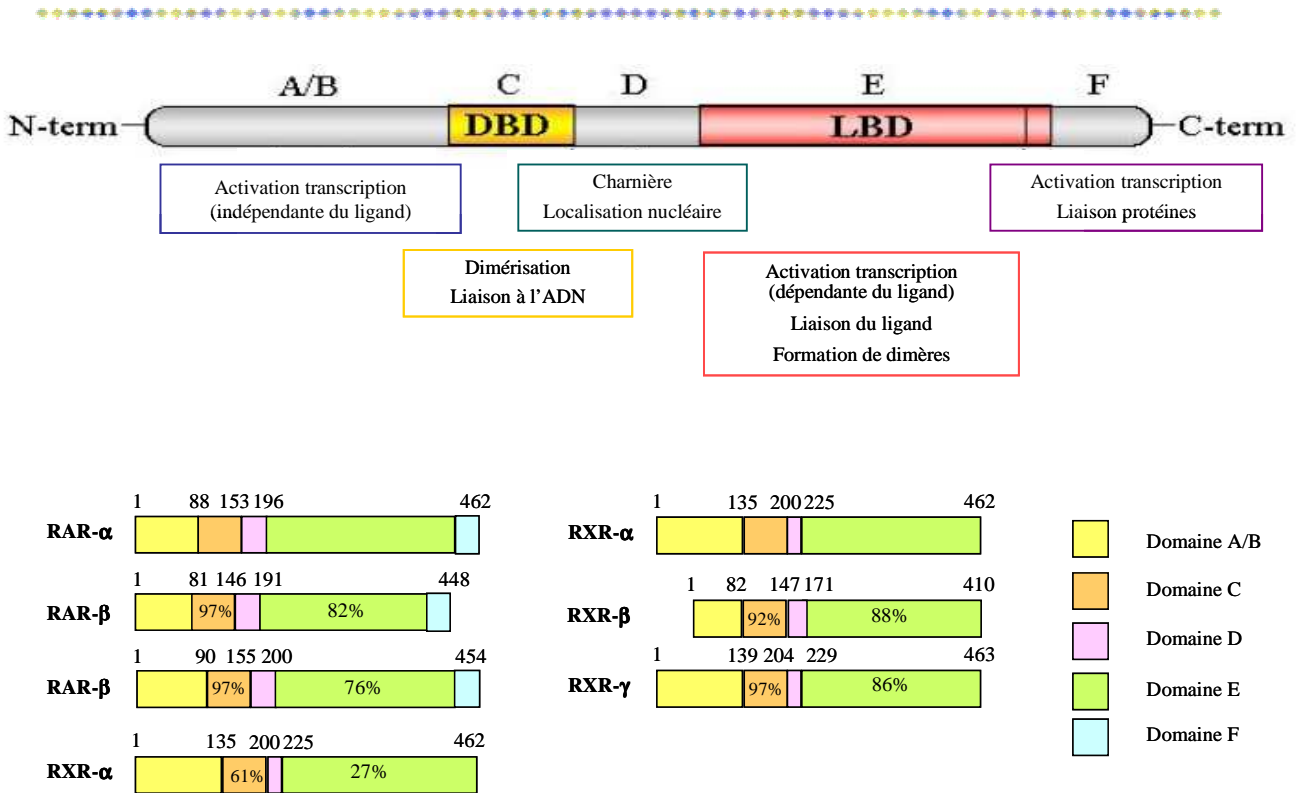


Figure 29 : Modélisation et comparaison des structures protéiques des récepteurs nucléaires RAR et RXR.

Les RAR et les RXR possèdent une structure similaire à celle des autres récepteurs nucléaires : domaine A/B, C (DBD : DNA binding domain), D, E (LBD : ligand binding domain) et F. Les RXR sont dépourvus de ce dernier. Ces domaines présentent des variations qui définissent la spécificité des récepteurs. Les pourcentages d'homologie des deux domaines les plus conservés (C et E) sont représentés en fonction de l'isoforme α , et ceci pour les formes humaines des récepteurs RAR et RXR. D'après (Gronemeyer H. et al., 2004, Mangelsdorf D.J. et al., 1990).

2.3 Les éléments de réponse aux RAR et aux RXR

Les RAR et les RXR se fixent sur l'ADN sur des séquences appelées éléments de réponse (RE), les RARE ou les RXRE.

Ces séquences régulatrices sont représentées par deux demi-sites, dont la séquence canonique est 5'-Pu (purine)G(G/A/T)(T/A)CA-3' (Figure 30). Pour les récepteurs nucléaires, cette séquence peut être répétée de façon directe (DR pour direct repeat), de façon inverse (IR pour inverted repeat), de façon « retournée » (séquence 5'→3' devient 3'→5') (ER pour everted repeat) ou sous forme de palindrome (PAL) (Baniahmad A. et al., 1990, Bugge T.H. et al., 1992, Graupner G. et al., 1989, Mader S. et al., 1993, Naar A.M. et al., 1991, Park H.Y. et al., 1993, Tini M. et al., 1993, Umesono K. et al., 1988). Dans le cas spécifique des récepteurs aux rétinoïdes, la répétition de cette séquence se fait généralement de façon directe. Les deux demi-sites sont séparés par 1 (DR1), 2 (DR2) ou 5 (DR5) nucléotides (Leid M. et al., 1992, Mangelsdorf D.J. et Evans R.M., 1995), et chaque partenaire du dimère reconnaît une des

deux moitiés de la séquence de l'élément de réponse. L'espacement entre les deux moitiés du site de liaison est spécifique du dimère qui va se fixer. En effet, une séquence DR1 fixe plutôt les homodimères RXR/RXR, alors que les séquences DR2 et DR5 fixent plutôt les hétérodimères RAR/RXR (Naar A.M. *et al.*, 1991, Umesono K. *et al.*, 1991). Cependant des hétérodimères RAR/RXR peuvent également se fixer sur des séquences DR1, mais dans ce cas ils présenteront une activité inhibitrice.

La fixation des hétérodimères se fait selon une polarité bien précise : le partenaire RXR se lie au niveau 5' du demi-site DR5 ou DR2 alors que le partenaire RAR se fixe en 3', et pour une séquence DR1 la polarité est inversée (Kurokawa R. *et al.*, 1993, Perlmann T. *et al.*, 1993, Zechel C. *et al.*, 1994).

Cependant, les variations qui existent entre les éléments de réponse ne suffisent pas à elles seules à déterminer quel dimère va s'y fixer, et, de plus, d'autres données sont nécessaires pour déterminer quelle isoforme de RAR ou de RXR se fixera sur l'élément de réponse. En effet, les différences du site de liaison à l'ADN des trois isoformes de RAR sont mineures. De plus, les constructions de promoteurs n'ont pas permis de définir la sélectivité réelle d'un isotype par rapport à un autre sur un élément de réponse (Rossant J. *et al.*, 1991, Sucov H.M. *et al.*, 1990). En réalité, la fixation d'un dimère sur un élément de réponse dépendrait plutôt des isoformes présentes dans le type cellulaire ou le tissu étudié, ainsi que des co-activateurs ou des co-répresseurs.

De même, des éléments de réponse fortement dégénérés (dits « non consensus ») peuvent lier des dimères, ce qui serait dû à une puissante stabilisation de la fixation du dimère par des contacts protéine/protéine avec d'autres protéines liées à l'ADN (Petkovich M., 1992).

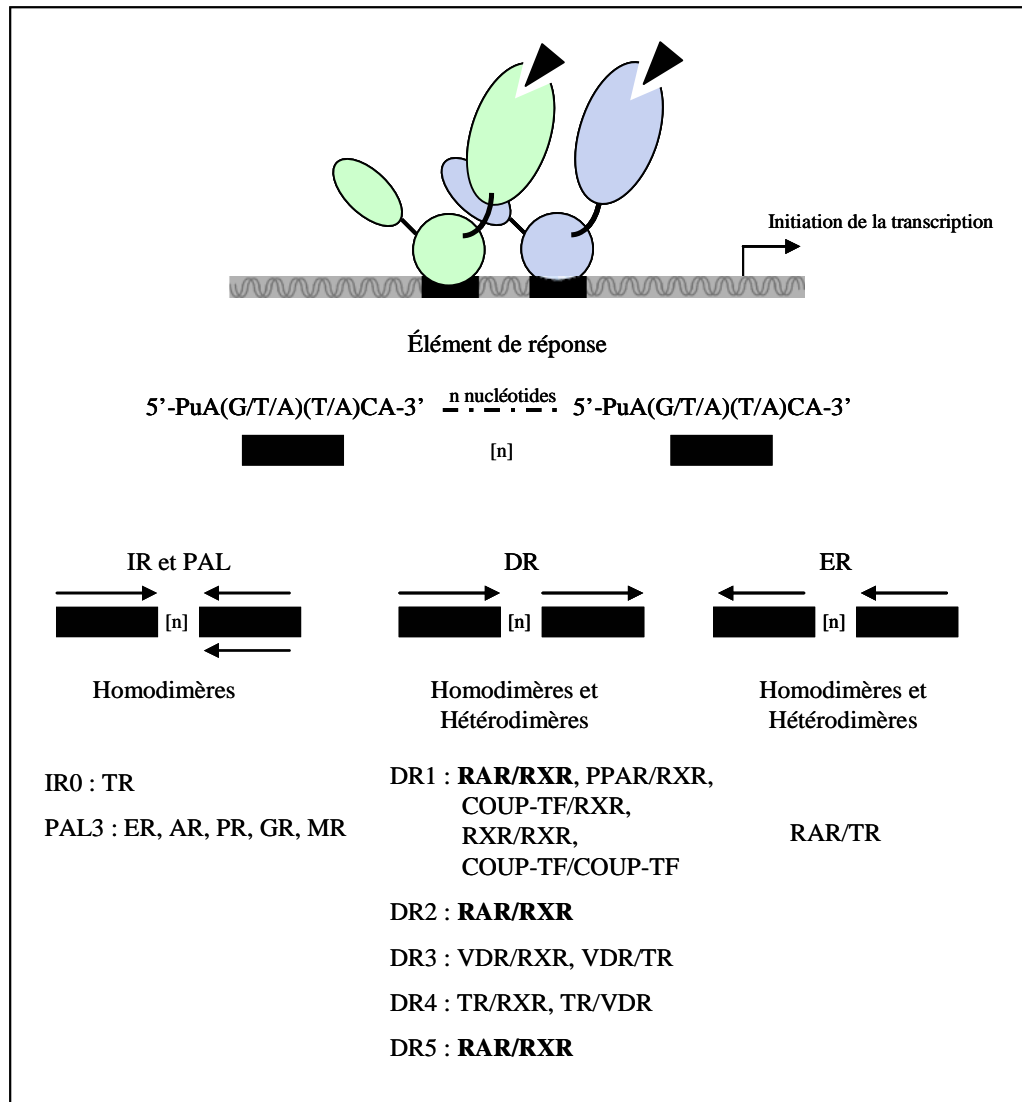


Figure 30 : Schématisation des différents types d'élément de réponse reconnus par les récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires reconnaissent des séquences ADN présentes sous forme de deux demi-sites de séquence consensus 5'-PuG(G/A/T)(T/A)CA-3'. Ces séquences sont soit répétées de façon directe (DR), soit de façon inversée (IR), soit de façon « retournée » (ER) ou sous forme de palindrome (PAL). L'arrangement de ces séquences (répétition et espacement entre les deux demi-sites) sélectionne le dimère qui va pouvoir s'y fixer.

La particularité de l'hétérodimère RAR/RXR par rapport aux autres hétérodimères faisant intervenir RXR est d'être « non permissif ». En effet, pour les autres hétérodimères, la fixation d'un agoniste sur l'un des deux monomères peut suffire à induire la dimérisation, l'activation et la fixation du dimère sur l'ADN. La liaison de l'agoniste sur le deuxième partenaire peut donc en théorie potentialiser l'activation du dimère (Forman B.M. *et al.*, 1995, Mukherjee R. *et al.*, 1997). En ce qui concerne le dimère RAR/RXR, la liaison de l'agoniste au récepteur RAR est une condition nécessaire et suffisante à l'activation du dimère (Vivat V. *et al.*, 1997). Cependant, la liaison du ligand au RXR peut potentialiser l'activation du dimère,

mais uniquement si celui-ci a été au préalable activé par un agoniste RAR. En fait, l'agoniste RAR induit des changements conformationnels permettant de libérer le domaine de liaison du ligand du RXR (Kurokawa R. *et al.*, 1994), ce dont est incapable le récepteur RXR.

2.4 Localisation des récepteurs RAR et RXR

Les récepteurs nucléaires présentent des profils spatio-temporels bien particuliers. En effet, ces récepteurs sont retrouvés dans quasiment tous les tissus, mais leur profil est restreint selon les isotypes étudiés. Par exemple, alors que RAR- α 1 est exprimé de façon ubiquitaire, RAR- α 2 semble être localisé spécifiquement dans les intestins et les poumons, et être présent sous forme de traces dans les autres tissus (Leroy P. *et al.*, 1991). De la même manière, RAR- β 2 a été retrouvé principalement dans les reins, le cœur, les tissus épithéliaux (comme la trachée) et les muscles squelettiques, alors que RAR- β 1 et - β 3 sont plutôt localisés dans le cerveau, les poumons et la peau. RAR- γ 1 est l'isoforme γ prédominante dans la peau, et les isoformes γ 1 et γ 2 sont plutôt exprimées au cours de l'embryogenèse (Kastner P. *et al.*, 1990). L'isoforme γ a également été retrouvée dans des régions chondrogéniques (Petkovich P.M. *et al.*, 1984, Ruberte E. *et al.*, 1990).

Les récepteurs RXR présentent quant à eux un profil d'expression différent de celui des RAR. L'isoforme RXR- α est fortement exprimée dans le foie (Mangelsdorf D.J. *et al.*, 1990) et les intestins (Rowe A. *et al.*, 1991). RXR- β est plutôt exprimé dans le système nerveux central (Hamada K. *et al.*, 1989, Mangelsdorf D.J. *et al.*, 1990). RXR- γ présente un profil beaucoup plus restreint : il est majoritairement exprimé dans certaines parties du cerveau ainsi que dans la glande pituitaire (Chiang M.Y. *et al.*, 1998, Haugen B.R. *et al.*, 1997).

2.5 Mécanismes endogènes de régulation des récepteurs RAR et RXR

2.5.1 Phosphorylation

L'activité des récepteurs nucléaires est modulée par la fixation du ligand, mais aussi par l'intégration de différentes voies de signalisation par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation, mais aussi l'acétylation et l'ubiquitinylation (Denner L.A. *et al.*, 1990, Fu M. *et al.*, 2004, Jones B.B. *et al.*, 1991, Rochette-Egley C. *et al.*, 1991). La phosphorylation intervient essentiellement au niveau des domaines AF-1, AF-2 et du domaine de liaison à l'ADN, contenant plusieurs motifs de phosphorylation par des kinases. RAR et RXR sont donc les substrats d'une multitude de kinases, notamment les CDK

(cyclin dépendant kinase), MAPK, PKA et PKC [pour revue voir (Rochette-Egly C., 2003)]. Ces modifications vont permettre de moduler très finement l'activité des récepteurs nucléaires, de manière positive ou négative. Elles régulent ainsi les phénomènes de liaison à l'ADN, la fixation du ligand, la dimérisation, ou le recrutement des co-facteurs. Ainsi, RAR- α et RAR- γ sont phosphorylés au niveau de leur domaine A/B par la sous-unité CDK7 du facteur général de transcription TFIID (Bastien J. *et al.*, 2000, Rochette-Egly C. *et al.*, 1997). Cette étape de phosphorylation joue un rôle important dans l'activation de la transcription médiée par ces récepteurs (Keriel A. *et al.*, 2002). Dans le cas de RAR- γ , la phosphorylation par TFIID n'est pas suffisante et un second résidu situé dans la même région A/B doit être phosphorylé en réponse aux rétinoïdes par la MAPK p38 pour que cette isoforme soit transcriptionnellement active (Gianni M. *et al.*, 2002a, Gianni M. *et al.*, 2002b). Cette seconde phosphorylation constitue un signal de dégradation du récepteur par le protéasome, et est donc un moyen de régulation fine de la durée de la transcription. Ces phosphorylations semblent moduler l'activité du récepteur en contrôlant le recrutement et la dissociation de protéines et différents complexes (Bour G. *et al.*, 2005). RAR- α , quant à lui, peut également être phosphorylé par la PKA au niveau de la sérine 369 située au niveau du LBD. Cette phosphorylation module également de manière positive l'activité transcriptionnelle du récepteur (Huggenvik J.I. *et al.*, 1993, Rochette-Egly C. *et al.*, 1995). RAR- β peut également être phosphorylé au niveau des résidus sérines mais les kinases qui en sont responsables ne sont pas déterminées.

Les RXR sont également la cible de plusieurs kinases. Par exemple, RXR- α est phosphorylé au niveau de son domaine A/B (sérine 22), phosphorylation qui est nécessaire à l'effet anti-prolifératif des rétinoïdes (Bastien J. *et al.*, 2002). Il est également hyperphosphorylé par les JNK en réponse à un stress (Adam-Stitah S. *et al.*, 1999, Tarrade A. *et al.*, 2005).

La phosphorylation peut conduire au contraire à l'inhibition de l'activation de certains récepteurs nucléaires, comme c'est le cas notamment de RXR- α lorsqu'il est phosphorylé par les MAPK. Cette phosphorylation bloque l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère RAR/RXR (Lee H.Y. *et al.*, 2000, Matsushima-Nishiwaki R. *et al.*, 2001).

La phosphorylation peut également être réalisée sur les complexes co-activateurs ou co-répresseurs, ce qui modifie l'activité transcriptionnelle des récepteurs (Hong S.H. et Privalsky M.L., 2000).

Enfin, certains travaux indiquent que la phosphorylation des récepteurs pourrait jouer un rôle important dans le développement de certains cancers. En effet, dans la plupart des tumeurs,

les voies de signalisation des MAPK et Akt peuvent être constitutivement activées et conduire ainsi à l'hyperphosphorylation des récepteurs. Dans ce contexte, il a été effectivement montré que la phosphorylation de RXR par les MAPKs était corrélée à l'activation de la croissance de certains carcinomes hépatiques (Matsushima-Nishiwaki R. *et al.*, 2001). L'acquisition de la résistance aux rétinoïdes dans certains cancers pourrait également résulter d'une dysrégulation des voies de phosphorylation. En effet, une activation forte et continue des JNK par la voie Ras dans les cellules cancéreuses pulmonaires contribue à une signalisation aberrante *via* la phosphorylation et la dégradation de RAR- α (Srinivas H. *et al.*, 2005). L'inhibition sélective des JNK restaure dans ce cas l'effet anti-prolifératif des rétinoïdes.

2.5.2 Ubiquitylation et dégradation par le protéasome

Dans les cellules eucaryotes, le système ubiquitine-protéasome est le mécanisme majeur permettant la dégradation de protéines ciblées. Les récepteurs RAR et RXR peuvent ainsi être dégradés (Kopf E. *et al.*, 2000). En réponse à la fixation du ligand sur RAR, à la dimérisation et à la phosphorylation, les récepteurs, ainsi que leurs co-activateurs peuvent être ubiquitylés et dégradés par le protéasome 26S (Gianni M. *et al.*, 2002b, Gianni M. *et al.*, 2006, Kopf E. *et al.*, 2000).

Le rôle exact du protéasome dans la transcription régulée par les RAR n'est pas encore bien défini. Cependant, de plus en plus de preuves jouent en faveur de la nécessité de la fonction protéolytique du protéasome dans l'activité transcriptionnelle de RAR. En effet, ceci permettrait soit de limiter l'action des RAR, soit de faciliter l'induction d'un nouveau cycle d'initiation de la transcription, avec le recrutement de nouveaux récepteurs sur le promoteur des gènes cibles. De plus, le protéasome semble jouer un rôle dans le contrôle de la transcription, mais indépendamment de sa fonction protéolytique. En effet, les sous-unités ATPases du complexe régulateur 19S pourraient modifier la structure des composants du complexe transcriptionnel afin de faciliter leur fixation ou leur relargage du promoteur. Par exemple, SUG-1, une des six ATPases de la sous-unité 19S du protéasome, interagit avec RAR et est un élément crucial pour la transcription des gènes cibles de RAR (Bour G. *et al.*, 2007, Gianni M. *et al.*, 2002a).

2.6 Exemple d'un hétéropartenaire de RXR : les PPARs

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont des facteurs de transcription activés par des ligands, et appartiennent à la superfamille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes. PPAR- α (NR1C1) a été le premier isotype décrit en tant que récepteur activé par les activateurs de proliférateurs de peroxyosomes, ce qui a donné son nom à cette famille de récepteurs (Issemann I. et Green S., 1990). Deux isoformes supplémentaires ont ensuite été caractérisées : PPAR- β/δ (NR1C2) et PPAR- γ (NR1C3) (Dreyer C. *et al.*, 1992). Les rôles de ces différents isotopes sont en relation avec leur localisation. En effet, PPAR- α , principalement localisé dans des tissus présentant un taux élevé de catabolisme des acides gras (dont le foie, les reins ou le cœur), intervient dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Lefebvre P. *et al.*, 2006). Cet isotype active le catabolisme des acides gras, stimule la gluconéogénèse et la synthèse de corps cétoniques et il est impliqué dans le contrôle de l'assemblage des lipoprotéines, principalement dans le foie (Kersten S. *et al.*, 1999, Reddy J.K. et Hashimoto T., 2001, Staels B. *et al.*, 1995, Vu-Dac N. *et al.*, 1995). PPAR- α stimule également le catabolisme du cholestérol. De plus, il atténue les réponses inflammatoires (Devchand P.R. *et al.*, 1996, Kersten S. *et al.*, 2001, Staels B. *et al.*, 1998). Les fibrates, comme le gemfibrozil, le clofibrate et le fenofibrate qui sont utilisés pour traiter les hypertriglycémies, représentent des agonistes de PPAR- α . De plus, ces agonistes engendrent des activités anti-inflammatoires, qui pourraient expliquer leurs propriétés dans la protection du système cardiovasculaire (Berger J.P. *et al.*, 2005).

PPAR- β/δ est nécessaire au développement embryonnaire des intestins et du placenta, et il est également impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique grâce à la stimulation de gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras et de la thermogénèse adaptative (Barak Y. *et al.*, 2002, Nadra K. *et al.*, 2006, Peters J.M. *et al.*, 2000, Varnat F. *et al.*, 2006, Wang Y.X. *et al.*, 2003). De plus, PPAR- β/δ joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation, et la réparation tissulaire (Di-Poi N. *et al.*, 2002, Letavernier E. *et al.*, 2005, Michalik L. et Wahli W., 2006, Tan N.S. *et al.*, 2001).

PPAR- γ est l'acteur principal de la différenciation des tissus adipeux et permet le maintien des fonctions spécifiques des adipocytes, comme le stockage lipidique (He W. *et al.*, 2003, Koutnikova H. *et al.*, 2003, Rosen E.D. *et al.*, 2000, Tontonoz P. *et al.*, 1993). De plus, cet isotype est nécessaire à la survie des adipocytes différenciés (Imai T. *et al.*, 2004). Enfin, PPAR- γ est impliqué dans le métabolisme glucidique *via* la sensibilisation de l'action de

l'insuline et intervient donc dans les métabolismes lipidique et glucidique (Rieusset J. *et al.*, 2002, Rosen E.D. *et al.*, 1999, Savage D.B. *et al.*, 2003, Wu Z. *et al.*, 1999). Comme pour PPAR- α , l'activation de PPAR- γ limite l'inflammation, ce qui implique des applications potentielles dans le domaine de l'athérosclérose et du diabète (Ricote M. *et al.*, 1998). Parmi les composés synthétiques qui activent PPAR- γ , les thiazolinedinediones (TZDs) dont la rosiglitazone, la pioglitazone ou la troglitazone sont utilisés en tant que sensibilisateurs à l'insuline pour traiter l'hyperglycémie du diabète de type II (Bajaj M. *et al.*, 2003, Bays H. *et al.*, 2004, Mayerson A.B. *et al.*, 2002).

2.7 Régulation de la transcription de gènes cibles par les RAR et RXR

2.7.1 Mécanisme

Les agonistes des récepteurs RAR et RXR entrent librement dans la cellule par dissolution dans les couches phospholipidiques (diffusion passive). La fixation du ligand sur son récepteur aboutit à son activation, qui se traduit par la dimérisation du récepteur et sa fixation sur son élément de réponse. Ce mécanisme d'activation général n'est pas pour autant systématique, puisqu'il existe des dimères déjà fixés sur l'ADN, sans pour autant avoir été activés par un ligand. Ces dimères n'activent cependant pas la transcription, car les co-répresseurs qui y sont fixés la répriment (Aranda A. et Pascual A., 2001, Glass C.K. et Rosenfeld M.G., 2000). La dimérisation et la fixation du dimère RAR/RXR sur l'ADN sont tout de même facilitées lorsqu'un agoniste est fixé sur son récepteur, ce qui permet d'obtenir la formation d'une interface dimérique stable (Depoix C. *et al.*, 2001).

Lorsque l'ADN n'est pas en phase de transcription, il est compacté en une structure fortement organisée. La structure RAR/RXR liée à des co-répresseurs recrute des complexes de haut poids moléculaires avec une activité HDAC (Histone Désacétylase), qui augmente l'interaction des parties N-terminales des histones avec l'ADN nucléosomal. Ainsi, pour activer la transcription d'un gène, les récepteurs doivent moduler la structure répressive de la chromatine, afin de recruter la machinerie transcriptionnelle. Ces changements sont permis grâce à la fixation du ligand sur son récepteur, qui induit la dissociation des co-répresseurs et le recrutement des co-activateurs. Ceci va permettre d'augmenter l'acétylation des nucléosomes (activité HAT, Histone Acétyltransférase). Ainsi, l'ADN va se retrouver décompacté, et le positionnement de la machinerie transcriptionnelle sera facilité. La molécule d'ARN est alors synthétisée par l'ARN polymérase (**Figure 31**).

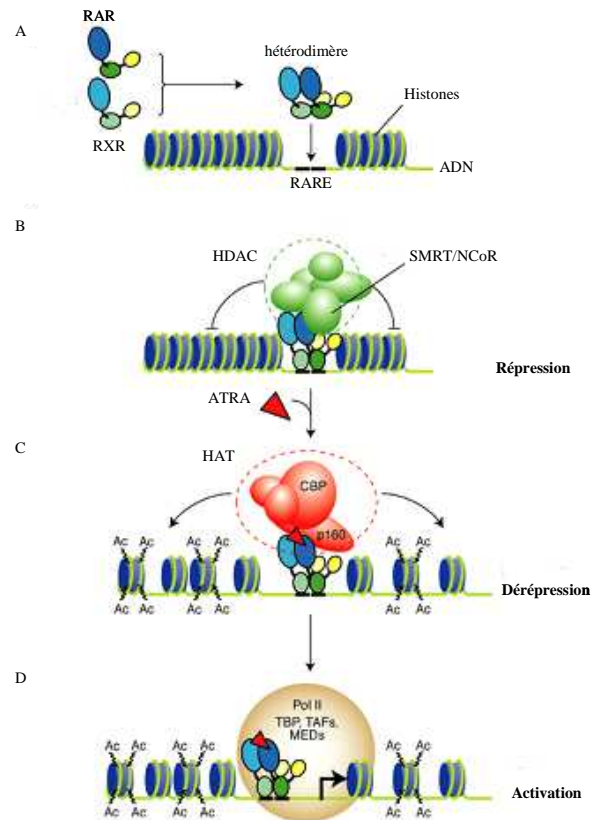


Figure 31 : Activation de la transcription par les récepteurs aux rétinoïdes

En absence de ligand, les dimères RAR/RXR peuvent se trouver liés à l'ADN au niveau du promoteur de gènes cibles, couplés à un système de co-répresseurs (A). Cette configuration active des enzymes qui compactent l'ADN et qui empêchent l'initiation de la transcription, les HDAC ou histones désacétylases (B). Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur RAR, les changements de conformation du dimère entraînent le déplacement de l'ensemble des corépresseurs (NCoR/SMRT), et les co-activateurs sont recrutés (kinases, P160, HMT/CARM-1...). Cette structure active les enzymes à activité acétyltransférase (HAT) ainsi que des kinases ou des complexes protéiques permettant la décompaction de l'ADN (SWI/SNF) (C). Dans un dernier temps, les co-activateurs se dissocient du complexe et la machinerie transcriptionnelle est recrutée (RNA pol II et facteurs généraux de la transcription : TFIIF, TAF...), ce qui permet d'initier la transcription des gènes cibles (D). D'après (Clarke N. et al., 2004).

À l'échelle moléculaire, l'activation des récepteurs RAR et RXR, induite par la fixation du ligand au niveau du LBD, se caractérise par des modifications conformationnelles de ce domaine. Lorsque le ligand pénètre dans la poche hydrophobe du LBD, l'hélice H12 qui pointe vers l'extérieur en absence de ligand se replie et referme la cavité en établissant des ponts salins avec d'autres hélices (Bourguet W. et al., 1995, Renaud J.P. et al., 1995). Cette hélice H12 établit des contacts directs avec le ligand et, de façon imagée, scelle le couvercle de la poche à ligand, ce qui stabilise sa liaison. Ce réarrangement est accompagné d'une compaction générale du LBD, entraînant la stabilisation des dimères sur leurs éléments de réponse, et rend ainsi accessible certains sites de phosphorylation (Wurtz J.M. et al., 1996).

Enfin et surtout, ces modifications conformationnelles créent une nouvelle interface de fixation pour les co-activateurs après le relarguage des co-répresseurs.

2.7.2 Gènes cibles de RAR et de RXR

Des éléments de réponse RARE ont été identifiés au niveau des promoteurs d'un grand nombre de gènes cibles des rétinoïdes, impliqués dans une multitude de fonctions. Le RARE « classique », ou DR5, a été détecté au niveau du gène RAR- β lui-même (de The H. *et al.*, 1990), de CYP26 (Loudig O. *et al.*, 2000) et de plusieurs gènes à homéodomaine (Dupe V. *et al.*, 1997, Qian A. *et al.*, 2000). Des éléments de réponse DR2 ont été localisés dans le promoteur des CRABP (Durand B. *et al.*, 1992, Smith W.C. *et al.*, 1991). Le seul élément de réponse DR1 liant des homodimères RXR a été identifié au niveau du promoteur de CRBP II de rat (Mangelsdorf D.J. *et al.*, 1991).

2.8 Effets non génomiques des récepteurs RAR et RXR

2.8.1 Inhibition des facteurs de transcription pro-inflammatoires

Comme nous l'avons vu précédemment, les dimères RAR/RXR sont capables de moduler la fréquence de l'initiation de la transcription de gènes cibles grâce à leur liaison sur un élément de réponse spécifique. Mais ces dimères peuvent également affecter l'efficacité d'autres voies de signalisation, de manière positive ou négative, par des mécanismes qui ne sont pas entièrement connus à ce jour. L'exemple le plus connu est celui de la répression de la voie AP-1 par les rétinoïdes. Comme les glucocorticoïdes le font par l'intermédiaire des GR, les rétinoïdes diminuent l'activation de la transcription induite par c-Jun par l'intermédiaire de RAR (Schule R. *et al.*, 1991). Bien que Schule ait initialement montré que seul RAR était capable d'inhiber l'activité d'AP-1, d'autres études ont clairement prouvé que les rétinoïdes en étaient également capables (Guerin E. *et al.*, 1997, Lee H.Y. *et al.*, 1996, Schroen D.J. et Brinckerhoff C.E., 1996, Zacheis D. *et al.*, 1999). D'autres auteurs ont également montré que l'expression des deux récepteurs, RAR et RXR, était nécessaire à l'inhibition d'AP-1 (Li Y. *et al.*, 1999). Les bases moléculaires de cet antagonisme réciproque n'ont cependant pas encore été élucidées [pour revue voir (Altucci L. et Gronemeyer H., 2001)]. De même, les isoformes de RAR ou RXR impliquées semblent dépendre du type cellulaire étudié, puisque par exemple dans des kératinocytes, l'effet anti-AP-1 est imputable à RAR- γ (Goyette P. *et al.*, 2000), alors que dans les cellules HeLa, ce serait plutôt RAR- α ou RXR- α (Agadir A. *et al.*,

1997), et que l'inhibition de la croissance cellulaire par les rétinoïdes dans les cancers du cou, de la tête ou du poumon serait due à l'isotype RAR- β (Li Y. *et al.*, 1998, Seewaldt V.L. *et al.*, 1995, Sheikh M.S. *et al.*, 1994, Wan H. *et al.*, 1999). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, certains rétinoïdes synthétiques pouvant inhiber sélectivement l'activité AP-1 sans stimuler la transcription, ou même en inhibant l'activité RAR-dépendante ont été caractérisés (Chen J.Y. *et al.*, 1995, Young M.R. *et al.*, 1999).

Certains effets anti-tumoraux des rétinoïdes ont été montrés comme reposant uniquement sur l'activité anti-AP-1. C'est notamment le cas dans certains modèles de carcinogenèse induite chimiquement (Huang C. *et al.*, 1997).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition d'AP-1 par les rétinoïdes (**Figure 32**).

- La première est l'interférence de RAR avec la liaison d'AP-1 sur l'ADN (**Figure 32a**). En effet, la fixation des dimères c-Jun est inhibée par RAR- α *in vitro*, via une interaction physique directe entre RAR et c-Jun (Schule R. *et al.*, 1991).
- Le deuxième mécanisme implique la compétition pour les co-activateurs (**Figure 32b**). En effet, certains co-activateurs sont communs à RAR et à AP-1, comme par exemple CBP (Kamei Y. *et al.*, 1996) ou SRC-1 (Lee H.Y. *et al.*, 1998). Ce phénomène est appelé « squelching ».
- Le troisième mécanisme est l'interférence avec les voies activant AP-1 (**Figure 32c**). Ainsi, JNK, protéine qui active la phosphorylation et l'activation d'AP-1, est une cible potentielle de RAR (Caelles C. *et al.*, 1997), bien que cet effet anti-AP-1 semble dépendre du potentiel transactivateur de RAR (Lee H.Y. *et al.*, 1999). Ainsi, l'ATRA inhibe l'activité JNK dans les cellules de la crête neurale (Li J. *et al.*, 2001). De même, les rétinoïdes semblent capables d'activer MKP-1 (MAP kinase phosphatase-1), qui joue un rôle crucial dans l'activation de plusieurs kinases, dont JNK ou p38. Ce mécanisme a été démontré dans les cellules mésangiales (Xu Q. *et al.*, 2002) et les cellules endothéliales (Gonzales M. *et al.*, 1999).
- Le quatrième mécanisme possible est l'interférence avec l'expression des composants d'AP-1. En effet, Perez *et al.* ont rapporté l'inhibition de l'expression de c-Fos par l'ATRA dans les cellules pituitaires (Perez P. *et al.*, 1993).
- Enfin, RAR peut également interagir sur la dimérisation entre c-Jun et c-Fos (**Figure 32d**), comme il l'a été montré dans les cellules HeLa, mais pas les cellules COS. Le mécanisme exact de cette inhibition n'est pas encore élucidé (Zhou X.F. *et al.*, 1999).

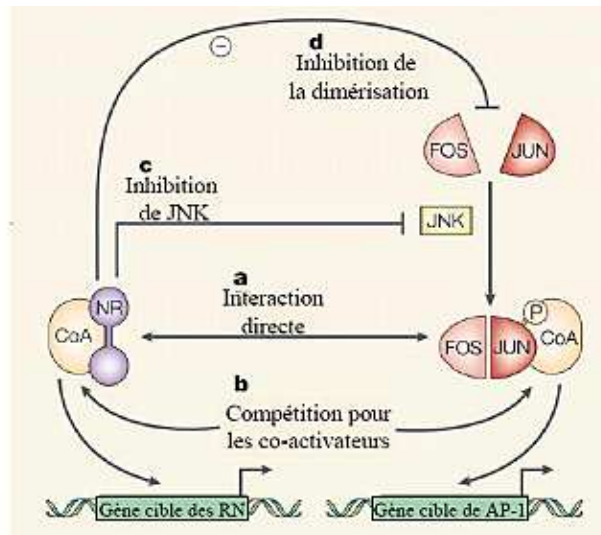


Figure 32 : Transrépression des facteurs de transcription pro-inflammatoires par les récepteurs aux rétinoïdes : exemple avec AP-1.

Ce schéma représente plusieurs hypothèses pouvant expliquer la transrépression des dimères AP-1 par les récepteurs aux rétinoïdes. Ces différents mécanismes ne sont pas exclusifs et dépendent du type cellulaire, de l'agoniste impliqué, de la composition du dimère AP-1, ainsi que de la structure du promoteur.

a/ interaction directe entre RAR ou RXR et les composants formant AP-1.

b/ compétition pour les co-activateurs en commun.

c/ inhibition de la voie des MAPK aboutissant à l'activation d'AP-1.

d/ inhibition de la dimérisation des composants formant AP-1.

D'après (Altucci L. et Gronemeyer H., 2001).

Le mécanisme d'inhibition d'AP-1 par les récepteurs aux rétinoïdes ou les récepteurs nucléaires a été très bien documenté. Cependant, ce n'est pas le seul facteur de transcription pro-inflammatoire à être inhibé par les rétinoïdes, puisque NF- κ B et NF-IL-6 le sont également, comme nous l'avons vu dans le chapitre (1.5.6.2). Les rétinoïdes peuvent inhiber NF- κ B de plusieurs manières, bien que les mécanismes employés soient moins bien définis. Ainsi, dans les lignées cellulaires de procarcinome (PC3) ou les cellules HeLa, qui sont toutes deux des lignées cellulaires surexprimant NF- κ B, le traitement par des rétinoïdes (MX3350-1 ou CD2325, deux agonistes synthétiques de RAR- γ) inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B par une inhibition du facteur IKK (Bayon Y. *et al.*, 2003). L'inhibition de NF- κ B ainsi que le mécanisme employé semble dépendre fortement du type cellulaire étudié. D'autre part, il a été démontré que le facteur NF-IL-6 pouvait également être inhibé par RAR. Par exemple, dans des kératinocytes humains, le TTNPB et le tazarotène diminuent l'activation de MRP-8 (Migration inhibitory factor-related protein-8) sous le contrôle de NF-IL-6 par une interaction entre ce dernier et RAR.

2.8.2 Activation d'autres facteurs de transcription

L'augmentation de la transcription de certains gènes peut également être due à la formation d'« enhanceosomes », c'est-à-dire de complexes multiprotéiques regroupant des facteurs de transcription, des protéines co-activatrices et structurales, dont l'intégrité est nécessaire à l'obtention d'une réponse optimale. Des effets synergiques avec d'autres facteurs de transcription ont notamment été obtenus avec SF-1 au niveau du promoteur d'oct-3/4 (Barnea E. et Bergman Y., 2000) ou avec GABP et Sp1 au niveau de celui de CD18 dans les cellules myéloïdes (Bush T.S. *et al.*, 2003). Ces effets résultent a priori du recrutement coopératif de co-régulateurs, de complexes de remodelage de la chromatine ou de la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur. Ainsi, différentes voies de signalisation peuvent coopérer afin d'aboutir à l'activation d'un même gène cible.

2.9 Synthèse sur l'apport thérapeutique des rétinoïdes

Les effets transcriptionnels des rétinoïdes et de leurs récepteurs sont multiples. Ils peuvent ainsi contrôler le taux de transcription en initiant l'assemblage de complexes macromoléculaires, ce qui facilite l'initiation de la transcription. Plusieurs questions restent cependant à élucider, concernant notamment celle de la contribution de l'activité transrépressive des rétinoïdes ou de leurs récepteurs dans les activités anti-inflammatoires des rétinoïdes.

Les rétinoïdes sont des molécules très prometteuses, tant en thérapie, qu'en prévention, notamment des cancers. Cependant, il reste de nombreuses barrières à franchir avant de généraliser leur utilisation, en commençant par la résolution des problèmes de toxicité et de résistance. Ainsi, afin de limiter leur toxicité, de nouveaux rétinoïdes synthétiques avec des sélectivités plus restreintes pour les récepteurs ont été développés et doivent être testés. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus avec le LGD1069, agoniste sélectif de RXR. Celui-ci présente en effet une toxicité moindre, et des propriétés anti-tumorales élevées dans plusieurs types de cancers. Il serait également possible de combiner les rétinoïdes avec d'autres thérapies, afin de diminuer les doses de chaque médicament et donc leurs effets secondaires. Enfin, la possibilité de cibler l'apport des molécules de rétinoïdes dans les tissus à traiter permettrait de délivrer une quantité appropriée de rétinoïdes dans ces tissus sans toucher aux tissus environnants, diminuant ainsi la toxicité générale. De plus, au vu des effets destructeurs des rétinoïdes notamment sur le cartilage ou l'os, il est important de cibler ces

molécules dans l'organisme. Des études ont ainsi montré que l'inhalation de 13-cis RA inhibait efficacement l'apparition de cancers du poumon chez le rat (Dahl A.R. *et al.*, 2000). L'encapsulation des rétinoïdes en liposomes est également en cours d'essai et semble conférer aux agonistes une plus forte stabilité et une plus faible toxicité. L'idée de cibler sélectivement un tissu en utilisant des immunoliposomes portant des anticorps dirigés contre des marqueurs de surface cellulaire est également testée. Quelques études ciblant le traitement des mélanomes par du fenrétinide encapsulé ont ainsi montré des effets anti-tumoraux intéressants (Pagnan G. *et al.*, 1999, Raffaghello L. *et al.*, 2003).

3 Effet des rétinoïdes en physiopathologie articulaire

Les rétinoïdes ont été testés avec succès dans plusieurs modèles expérimentaux de polyarthrite. Cependant, d'autres auteurs ont apporté des résultats contradictoires dans les mêmes modèles animaux.

3.1 Études cellulaires

Les premiers résultats *in vitro* publiés sur les effets des rétinoïdes dans les cellules articulaires ont montré que l'ATRA diminue la production de collagénase dans des fibroblastes synoviaux et des explants de cartilage articulaire de lapin induits par du PMA (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1982). De même, dans des fibroblastes synoviaux issus de patients arthritiques, l'ATRA diminue la production de collagénase et de PGE₂ (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1980).

Dernièrement, des auteurs ont également testé l'action de plusieurs rétinoïdes (ATRA, 9-cis RA, 13-cis RA, 4-HPR) sur des chondrocytes humains provenant de patients arthrosiques (Ho L.J. *et al.*, 2005). Les auteurs ont ainsi montré que les rétinoïdes inhibent efficacement l'expression et la production du TNF- α , ainsi que la production des MMP-1 et -13. Cette inhibition pourrait être consécutive à la répression de la voie AP-1, ainsi qu'à l'inhibition des kinases p38 et JNK.

3.2 Arthropathies expérimentales

Des études expérimentales ont été effectuées sur des rates sensibilisées au collagène de type II ou de l'adjuvant complet de Freund (ACF) en présence de 13-cis RA (agoniste RAR) ou de 4-HPR (4 hydroxyphénylrétinamide, agoniste RAR- α/β) (Trentham D.E. et

Brinckerhoff C.E., 1982). Les résultats sont variables suivant le rétinoïde concerné : le 13-cis RA aggrave l'incidence et la sévérité de l'arthrite et ne modifie pas les productions de PGE₂ et de la collagénase. En revanche, le 4-HPR inhibe la production de PGE₂, et plus faiblement celle de la collagénase, bien qu'il aggrave les autres paramètres liés à l'arthrite (diamètre du genou, score radiographique, diminution du poids). D'autres expérimentations ont été menées par la même équipe sur des rats immunisés à l'ACF et traités avec du 13-cis RA. Ce traitement diminue la sévérité de la maladie, les lésions secondaires, ainsi que la production de collagénase (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1983). Ces derniers travaux ont été confirmés sur des rats sensibilisés aux parois de streptocoques et traités par du 4-HPR, (Haraoui B. *et al.*, 1985). Ce traitement a en effet permis l'inhibition de la production de MMPs et de PGE₂ dans la synoviale avec une efficacité variable suivant qu'il était administré avant, en même temps, ou après l'induction de l'arthrite. De même, l'équipe de Hanglow a confirmé ces résultats sur des rats induits à l'ACF et traités par du Ro-23-6457 et du Ro-23-2895 (Hanglow A.C. *et al.*, 1990, Hanglow A.C. *et al.*, 1989). Dans ces modèles, les taux d'IL-1 dans les surnageants de culture de cellules spléniques sont fortement diminués, ainsi que l'œdème des pattes des animaux.

Par la suite, d'autres auteurs ont testé des rétinoïdes plus sélectifs, dans le but de réduire les effets indésirables des rétinoïdes. Ils ont ainsi utilisé l'Am-80, agoniste de RAR- α et de RAR- β sur des rats induits au collagène ou à l'ACF (Kuwabara K. *et al.*, 1996, Nagai H. *et al.*, 1999). Cet agoniste semble plus efficace que le 13-cis RA sur l'arthrite induite au collagène (diminution de la production d'IL-6, ainsi que de la production d'anticorps anti-collagène II), alors qu'il aggrave la pathologie induite à l'ACF. Un autre agoniste de RAR- α et RAR- β , le TAC-101 (Miyagawa N. *et al.*, 2003) a confirmé les résultats encourageants chez les souris immunisées au collagène, alors qu'un agoniste RAR- γ , le BMS-189961, n'a pas montré d'effet probant sur ce même modèle (Beehler B, résultats non publiés).

Paradoxalement, les travaux de Beehler en 2003 ont montré quant à eux que l'utilisation d'un antagoniste de RAR, le BMS-189453, diminuerait également la production de MMP-1, ainsi que celles des MMP-3 et -13 (Beehler B.C. *et al.*, 2003) chez des souris induites au collagène ou des rats sensibilisés aux parois de streptocoques. Cependant, l'antagoniste de RAR utilisé maintient une activité anti-AP-1, comme d'autres rétinoïdes, par laquelle il diminue la production des MMPs.

Enfin, plus récemment, l'équipe de Nozaki a testé l'action de l'ATRA sur des souris immunisées au collagène, avec des résultats très positifs (Nozaki Y. *et al.*, 2006). En effet, les

auteurs ont montré que le traitement par les rétinoïdes diminue le score histopathologique des animaux, l'incidence de la pathologie, l'infiltration des macrophages ainsi que la production de cytokines (IL-6, TNF- α), sans pour autant en expliquer le mécanisme.

L'utilisation de différents rétinoïdes engendre donc des résultats très variables, qui dépendent de nombreux paramètres, dont le moment d'administration de la molécule, le sexe des animaux, la molécule elle-même, sa sélectivité pour une isoforme ou un isotype donné, mais également la dose injectée et l'agent utilisé pour induire l'arthrite.

En résumé (**Tableau 4**), dans trois modèles d'arthrite chez le rat (CIA, arthrite induite au collagène, ACF, arthrite induite à l'adjuvant complet de Freund, SCWA, arthrite induite aux parois de streptocoques) pour lesquels les animaux ont été traités par du 4-HPR ou du 13-cis RA, la production de collagénase est clairement inhibée (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1983, Haraoui B. *et al.*, 1985, Trentham D.E. et Brinckerhoff C.E., 1982). Dans deux de ces modèles (ACF et SCWA), les rétinoïdes diminuent également les symptômes de la maladie (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1983, Haraoui B. *et al.*, 1985). Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus sur des rats immunisés au collagène et traités par du 4-HPR ou du 13-cis RA, pour lesquels le traitement n'a pas engendré d'effet bénéfique (Trentham D.E. et Brinckerhoff C.E., 1982). L'explication de cette variation de réponse aux rétinoïdes pourrait s'expliquer par le profil variable des agents inducteurs de l'arthrite utilisés dans les différents modèles de la pathologie. En effet, selon l'agent utilisé, la réponse immunitaire peut varier. Par exemple, l'arthrite induite au collagène est un modèle de synovite chronique développée en association avec une réponse cellulaire immune et une production d'anticorps anti-collagène (Trentham D.E., 1984). En revanche, l'arthrite induite à l'adjuvant ou aux parois de streptocoques est caractérisée par une invasion chronique de lymphocytes T, probablement indépendante de la réactivité du collagène de type II (Kayashima K. *et al.*, 1978). Elle est également caractérisée par une prolifération des fibroblastes synoviaux, ainsi qu'une invasion de l'os et du cartilage adjacent. Puisque les rétinoïdes sont connus pour augmenter l'immuno-réactivité et inhiber l'inflammation, il est envisageable qu'ils agissent différemment selon chaque modèle expérimental d'arthrite, à cause des différences qui existent au cours du développement de la pathologie.

Néanmoins, la plupart de ces expérimentations, confirmées par les derniers essais chez la souris, apporte des preuves de l'intérêt de l'utilisation des rétinoïdes sur les mécanismes pathologiques impliqués au cours de l'inflammation chronique.

Tableau 4 : Récapitulatif des essais de traitement menés sur les arthropathies par des rétinoïdes.
 CIA : arthrite induite au collagène ; ACF : arthrite induite à l'adjuvant complet de Freund ; SCWA : arthrite induite aux parois de streptocoques ; CRP : protéine C réactive.

Rétinoïde utilisé	Modèle expérimental	Résultats obtenus	Référence
Agonistes peu/pas sélectifs			
13- <i>cis</i> RA (pan RAR) et 4-HPR (RAR-β/γ)	Rats, CIA	Aggravation de l'arthrite, ↓ MMP	(Trentham D.E. et Brinckerhoff C.E., 1982)
13- <i>cis</i> RA (pan RAR)	Rats, ACF	↓ MMP, ↓ symptômes maladie	(Brinckerhoff C.E. <i>et al.</i> , 1983)
4-HPR (RAR-β/γ)	Rats, SCWA	↓ MMP, ↓ symptômes maladie	(Haraoui B. <i>et al.</i> , 1985)
Ro-23-6457 Ro-23-2895	Rats, ACF	↓ taux d'IL-1, ↓ œdème des pattes	(Hanglow A.C. <i>et al.</i> , 1990, Hanglow A.C. <i>et al.</i> , 1989)
4-HPR (RAR-β/γ)	Essai clinique de phase II	Légère ↓ de la CRP	(Gravallese E.M. <i>et al.</i> , 1996)
13- <i>cis</i> RA (pan RAR)	Rats, CIA	Légère ↓ IL-6, incidence de l'arthrite, œdème	(Kuwabara K. <i>et al.</i> , 1996)
ATRA (pan RAR)	Souris, CIA	↓ incidence arthrite, scores histologiques, infiltration macrophagique, production IL-6, IL-12, TNF-α	(Nozaki Y. <i>et al.</i> , 2006)
Agonistes sélectifs			
Am-80 (RAR-α/[β])	Rats, CIA	↓ taux d'IL-6, ↓ antigènes anti-coll II	(Kuwabara K. <i>et al.</i> , 1996)
Am-80 (RAR-α/[β])	Souris, CIA	↓ sévérité de l'arthrite, développement maladie, altération histopathologiques	(Nagai H. <i>et al.</i> , 1999)
TAC-101 (RAR-α/β)	Souris, CIA	↓ antigènes anti-coll II, ↓ destruction osseuse, œdème	(Miyagawa N. <i>et al.</i> , 2003)
BMS-189-961 (RAR-γ)	Souris, CIA	Pas d'effet	Beehler, résultats non publiés
Antagoniste RAR			
BMS-189-453 (antagoniste RAR)	Souris, CIA Rats, SCWA	↓ score clinique, ↓ destruction articulation, ↓ MMP	(Beehler B.C. <i>et al.</i> , 2003)

3.3 Études cliniques

À ce jour, une seule étude clinique a été menée sur des patients arthritiques (Gravallese E.M. *et al.*, 1996). Ces derniers ont reçu une dose de 300 mg par jour de 4-HPR, avec des résultats très mitigés. En effet, de nombreux effets indésirables ont été observés, et les bénéfices étaient modérés. Après traitement, les patients ont subi une biopsie de la synoviale, à partir de laquelle les taux de MMPs ont été étudiés. Seule une modeste diminution de la protéine C réactive sérique a été observée, et les expressions de la collagénase et de la stromélysine induites par l'inflammation n'ont pas été réduites. Ce manque de résultat pourrait être expliqué par l'état avancé de la pathologie dont souffraient les patients au moment de l'inclusion dans l'étude clinique. En effet, les études expérimentales sont réalisées sur des animaux présentant des symptômes correspondant à une arthrite en cours de développement, alors que les patients sont déjà très atteints, avec des taux de médiateurs pro-inflammatoires très élevés, ainsi qu'une perte de l'intégrité des articulations.



Matériel et Méthodes

1 Origine des prélèvements articulaires

Les fibroblastes synoviaux de rat sont obtenus stérilement à partir du paquet cellulograisieux infrapatellaire et les chondrocytes à partir de têtes fémorales délogées de la capsule fémorale, provenant de rats Wistar mâles sains (130-150 grammes ; Charles River, L'Arbresle, France) euthanasiés selon les normes d'expérimentation animale en vigueur (dislocation cervicale sous anesthésie générale : kétamine [Rhône-Mérieux, Lyon, France] et acépromazine [Sanofi Santé Animale, Paris, France]) approuvées par notre comité éthique local.

Les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes humains sont obtenus à partir de pièces opératoires prélevées lors d'interventions chirurgicales (arthroplastie de la hanche ou du genou) chez des patients arthrosiques. Le cartilage est pelé afin de prélever uniquement la couche supérieure de cartilage, visuellement intacte. La synoviale, quant à elle, est séparée des tissus fibreux et graisseux. Les parties prélevées sont alors fragmentées afin de faciliter la digestion enzymatique.

2 Isolement et culture des fibroblastes synoviaux et des chondrocytes

Après plusieurs rinçages avec une solution stérile de NaCl à 0,9 % contenant 1 % d'antibiotiques (pénicilline G Sodium [100 unités/ml] et streptomycine sulfate [100 µg/ml], Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), les fragments de synoviale sont digérés une nuit à 37°C dans une solution stérile à 1,5 mg/ml de collagénase B (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) et 1,5 mg/ml de dispase (Invitrogen) pour l'obtention des fibroblastes synoviaux. Les copeaux de cartilage (Homme) ou les têtes fémorales entières (rat) sont digérés pendant 2 heures à 37°C dans une solution à 2 mg/ml de pronase (Sigma, St Quentin Fallavier, France) puis une nuit à 37°C dans une solution à 1,5 mg/ml de collagénase B (Roche Molecular) pour l'obtention des chondrocytes.

Le lendemain, les culots cellulaires sont recueillis par centrifugation à 240g pendant 5 minutes, puis remis en suspension et en culture dans du milieu de culture Dulbecco's modified Eagle (DMEM)/NUT MIX F12, (Sigma) supplémenté avec 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 250 ng/ml d'amphotéricine B (Invitrogen) et 10 % (v/v) de sérum de veau foetal inactivé (SVF ; Invitrogen). Pour l'ensemble des expériences, la concentration en SVF dans le milieu de

culture complet a été abaissée à 1 %. Les cellules sont cultivées en normoxie dans des flacons de culture de 75 cm² à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

Les cellules humaines utilisées pour les expériences proviennent de pools de 3 patients, afin de limiter l'effet de la variabilité interindividuelle. Les caractéristiques principales des patients ainsi que l'origine anatomique du cartilage sont résumées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Composition des pools de cellules humaines utilisées lors de nos expérimentations.

	Âge	Sexe	Genou/Hanche
Synoviocytes			
Pool 1	79	F	Genou
	77	F	Genou
	77	H	Genou
Chondrocytes			
Pool 1	56	F	Genou
	73	F	Genou
	81	F	Genou
Pool 2	53	H	Genou
	81	H	Hanche
	79	F	Genou
Pool 3	76	F	Genou
	60	H	Hanche
	61	F	Genou

Afin que le phénotype chondrocytaire soit conservé, toutes les expériences sont réalisées sur des chondrocytes en passage 1 ou 2. Les fibroblastes synoviaux, quant à eux, sont utilisés en passage 4, afin de sélectionner uniquement les cellules de type B, fibroblastiques, par rapport aux cellules de type A, macrophagiques, qui sont éliminées lors des premiers passages. Les phénotypes des cellules ont été caractérisés à l'aide de marqueurs des chondrocytes différenciés [collagène IIA1 (Gouttenoire J. *et al.*, 2004)] et de chondrocytes dédifférenciés ou hypertrophiques [respectivement collagène IA2 et XA1 (Gouttenoire J. *et al.*, 2004)], ainsi que de marqueurs des fibroblastes synoviaux [synoviline (Gao B. *et al.*, 2006) et cadhérine-11 (Rosengren S. *et al.*, 2007)], ou des synoviocytes macrophagiques [CD-14 (Schutt C., 1999)]. Des synoviales non inflammatoires de rat ont également été utilisées comme étant représentatives de la coexistence des deux populations cellulaires.

Lorsque le tapis cellulaire atteint 90 % de confluence, les cellules sont soit trypsinées pour être multipliées, soit directement mises en expérimentation dans des plaques ou des flacons de culture lorsque les analyses nécessitent une population cellulaire importante.

3 Plan expérimental

3.1 Modèle cellulaire

Afin de reproduire une réponse pro-inflammatoire, les chondrocytes ou les fibroblastes synoviaux sont stimulés par une concentration de 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante de rat ou humaine (R&D Systems, Lille, France) pendant des temps allant de 5 minutes à 24 heures.

3.2 Molécules étudiées

Dans ces conditions expérimentales, l'effet des rétinoïdes sur la réponse des cellules à l'IL-1 β est mesuré en utilisant les molécules suivantes : un agoniste naturel de RAR, l'acide *all-trans* rétinoïque (ATRA, Sigma), à des concentrations allant de 1 nM à 10 μ M, un agoniste naturel de RXR, l'acide 9-*cis*-rétinoïque (9-*cis*-RA, Sigma) à 1 μ M, et un agoniste synthétique de RXR, le BMS-649 (gracieusement fourni par Bristol-Myers Squibb, Wallingford, Connecticut, USA, par l'intermédiaire de C. Rochette-Egly, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France) à 0,3 μ M. De plus, l'effet d'agonistes synthétiques sélectifs des isotypes de RAR a été évalué par l'utilisation des composés suivants : le BMS-753 pour RAR- α , le BMS-453 pour RAR- β , et le BMS-961 pour RAR- γ à des concentrations de 0,1 et 1 μ M (gracieusement fournis par Bristol-Myers Squibb, par l'intermédiaire de C. Rochette-Egly). Toutes ces molécules sont préalablement diluées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma), et utilisées à l'abri de la lumière, afin de limiter leur isomérisation. Les témoins correspondants ont été mis en présence de 0,1 % de DMSO.

3.3 Études de régulation

L'actinomycine D (ACTD, Sigma), inhibiteur de la transcription, a permis d'évaluer l'impact de l'ATRA sur la stabilité des transcrits. Pour ceci, les cellules stimulées par l'IL-1 β ont été mises en présence des rétinoïdes pendant 4 heures, puis 3 μ M d'actinomycine ont été ajoutés dans le milieu de culture. Le traitement a été arrêté après 3 heures supplémentaires d'incubation. Les témoins correspondants ont été mis en présence de 0,2 % de DMSO.

3.4 Études de modulation de la voie des MAPKs

Afin d'étudier l'effet de l'ATRA sur l'activation de la voie des MAPKs, les cellules ont été stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β en présence ou non d'1 μ M d'ATRA, et la phosphorylation de p38-MAPK, SAPK/JNK et ERK_{1/2} a été évaluée par western-blot après 5, 15 ou 30 minutes respectivement. La contribution possible d'ERK_{1/2} dans l'activation d'AP-1 a été étudiée par une expérience de TransAm[®] sur des extraits nucléaires de cellules pré-incubées pendant une heure avec 10 μ M de PD-98059 (inhibiteur d'ERK_{1/2}), puis stimulées pendant 30 minutes par de l'IL-1 β .

4 Contrôle de la viabilité cellulaire

4.1 Principe

La cytotoxicité des traitements est évaluée par le test au MTT (méthyl-thiazol-tétrazolium) qui reflète l'activité déshydrogénase mitochondriale optimale (Hansen M.B. *et al.*, 1989). Ainsi, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (Sigma) pénètre dans les cellules avant d'être réduit par la succinate déshydrogénase en cristaux pourpres de formazan que l'on peut quantifier, après solubilisation, par la lecture de l'absorbance à 580 nm. Cette coloration pourpre est donc proportionnelle à l'activité des déshydrogénases mitochondriales de sorte que la réduction des sels de tétrazolium est un bon indicateur de la viabilité cellulaire.

4.2 Réalisation

La solution de MTT (5 mg/ml) est préparée dans du PBS avant d'être stérilisée. Le test est réalisé sur des cellules cultivées en plaques 96 puits. Les cellules stimulées 6 heures ou 24 heures par l'IL-1 β , en présence ou non des agonistes RAR ou RXR, sont incubées avec 10 μ l de solution de MTT dans 100 μ l de milieu de culture par puits, pendant 4 heures à 37°C. Le milieu est alors éliminé, puis les cellules sont lysées pendant 24 heures à 37°C par ajout de 100 μ l d'une solution à 20 % de SDS dans le N,N'-diméthylformamide (DMF), afin de solubiliser les cristaux de formazan formés. L'absorbance est lue à 580 nm sur un lecteur de microplaques Multiskan[®] (Labsystems, Montigny-le-Bretonneux, France) par comparaison à un blanc réactif contenant le milieu de culture additionné de MTT et de DMSO.

5 Étude de l'expression des ARNm d'intérêt

5.1 Préparation des ARNs totaux

Au moment optimal de chaque expérience, les plaques de culture cellulaire sont rincées au PBS puis conservées à -80°C. L'extraction des ARNs totaux est effectuée sur colonnes grâce au kit d'extraction RNeasy® (Qiagen, Courtabœuf, France), selon les recommandations du constructeur. Le principe est basé sur la fixation sélective de l'ARN sur un gel de silice. Brièvement, les cellules sont lysées dans un tampon (350 µl de tampon RLT additionné d'1 % de β-mercaptoéthanol, par puits de plaque 12 puits) riche en sels et en isothiocyanate de guanidine, fortement dénaturant, ce qui inactive également les ribonucléases et permet de conserver les ARNs. Après ajout de 350 µl d'éthanol 70 % (v/v), le lysat est homogénéisé par pipetages successifs, puis transféré sur la colonne de silice. L'ensemble est alors centrifugé 15 secondes à 8000g, puis les ARNs fixés sur la colonne sont lavés successivement par 700 µl de tampon RW1, riche en sels, puis deux fois par 500 µl de tampon RPE, afin d'éliminer au mieux les sels, les protéines et les éventuels contaminants. Entre chaque étape de lavage, une centrifugation de 15 secondes à 8000g est réalisée. Enfin, l'élution des ARNs est effectuée par l'ajout de 25 µl d'eau ultra pure, exempte de RNase.

Les ARNs sont alors dosés par spectrophotométrie aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm grâce à un spectrophotomètre Shimadzu™ UV-1601 (Sciences Tec, Les Ulis, France). La quantité d'acide nucléique, exprimée en ng/µl, est déterminée suivant la formule :

$$C = \frac{A(260) \times \varepsilon \times V_t}{V_e} \quad (\text{ng}/\mu\text{L})$$

A_{260} : absorbance à 260 nm

V_t : volume total de l'échantillon en µl

V_e : volume dosé en µl

ε : coefficient d'extinction molaire en ng/µl, spécifique de chaque type d'acide nucléique.

ε (ADNs monocaténares) : 33

ε (ADNs bicaténares) : 50

ε (ARNs) : 40

La pureté des ARNs est estimée par le calcul du rapport A_{260} / A_{280} . Ce rapport doit être idéalement compris entre 1,8 et 2.

La qualité des ARNs est également contrôlée par migration électrophorétique d'un microgramme de chaque échantillon sur un gel d'agarose à 1 % (p/v) (**Figure 33**). Le gel est préparé dans du tampon TBE 1X (90 mM Tris, 90 mM Borate [pH 8], 2 mM EDTA

[Éthylène-diamine-tétra-acétate]) contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (agent intercalant de l'ADN). Avant d'être déposés, les échantillons sont dilués dans du tampon de charge (50 % de glycérol, 50 % de TBE) contenant 0,002 % de bleu de bromophénol. La migration est réalisée à un voltage constant de 80 volts pendant 30 minutes environ. Les ARNs sont visualisés sous rayonnement ultraviolet grâce à un transilluminateur GelDoc2000 (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Ceci permet de vérifier que les ARNs ne sont pas dégradés (absence de traînées ou « smear ») et qu'ils sont tous dilués de la même manière (même intensité des bandes entre tous les échantillons). Les ARNs totaux sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

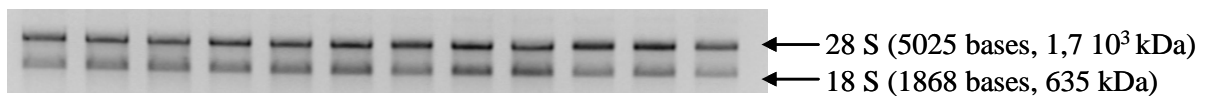


Figure 33 : Gel d'agarose à 1 % montrant les bandes correspondant aux sous-unités 18S et 28S des ARNs ribosomiques.

5.2 Transcription inverse (RT)

Elle a pour but de transcrire l'ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc), grâce à la transcriptase inverse, enzyme utilisant des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) pour former la chaîne d'ADN complémentaire à celle d'ARNm servant de matrice. Cette enzyme va ajouter des dNTP à l'extrémité 3' d'une amorce déjà appariée à la matrice. Dans nos expériences, nous utilisons des hexanucléotides, qui sont des amorces aléatoires. Les ARNs sont d'abord chauffés 5 minutes à 65°C afin de faciliter l'accessibilité des amorces par une dénaturation préalable de l'ARN. Puis ils sont refroidis rapidement en les mettant dans la glace, afin d'empêcher la renaturation des ARNs. Enfin, la synthèse d'ADNc est réalisée à partir d'ARNs totaux dans un milieu réactionnel de 20 µl. La quantité d'ARNs totaux idéalement utilisée est de 2 µg. Cependant, certaines expériences n'ont pas permis d'extraire autant d'ARNs (notamment les expériences utilisant des tissus humains ou de rat). Dans ce cas, la quantité d'ARN utilisée a été ramenée à celle correspondant à l'échantillon le moins concentré de l'expérimentation, avec un minimum de 500 ng. Le milieu réactionnel comprend le tampon d'incubation de RT (tampon Tris/HCl 250 mM à pH 8,3, contenant 375 mM de KCl et 15 mM de MgCl₂, Invitrogen), le mélange de dNTP (5 mM), des amorces aléatoires (0,2 µg/µl), du DTT (100 mM) et 200 unités de transcriptase inverse M-MLV (Moloney Murine Leukæmia Virus reverse transcriptase, Invitrogen). Les tubes contenant le mélange réactionnel sont incubés pendant 90 minutes à 37°C (transcription des ARNs totaux en

ADNc) puis 5 minutes à 95°C (arrêt de la réaction par inactivation de l'enzyme). Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

5.3 Choix des amorces

Le choix des amorces spécifiques d'un gène s'effectue à partir des séquences d'ADNc mises à disposition dans les bases de données nucléotidiques mondiales disponibles sur le site internet : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Les amorces ont une longueur d'environ 20 nucléotides et sont choisies pour amplifier une zone de la séquence codante d'une centaine de paires de bases. Le choix des amorces (longueur, pourcentage en guanosines et cytosines, température de fusion) est réalisé grâce au logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) et la qualité des amorces (spécificité des amorces, taille du fragment obtenu) est testée grâce au logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Dans la mesure du possible, les couples d'amorces sont choisis de part et d'autre d'un intron, afin de pouvoir distinguer une éventuelle co-amplification d'ADN génomique contaminant. Pour chaque couple d'amorces, la température d'hybridation est optimisée. Les caractéristiques des amorces et les conditions de PCR utilisées pour les cellules humaines ou de rat sont respectivement indiquées dans le **Tableau 6** et le **Tableau 7**.

Tableau 6 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés dans les expériences sur les cellules humaines : séquences, températures d'hybridation et numéros d'accension GenBank.

Gènes étudiés (humain)	Séquences (5'-3')	Numéro d'accension GenBank	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)
RP29	S: 5'- AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTC TAC TG-3' AS: 5'-AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA-3'	NM_001032	107	59
Cadhérine-11	S: 5'-GTG CCT GAG AGG TCC AAT GT-3' AS: 5'-TGC TTC CAC CGA AAA ATA GG-3'	NM_001797	134	59
CD14	S: 5'-AGC CTA GAC GTC AGC CAC AA-3' AS: 5'-CTT GGC TGG CAG TCC TTT AG-3'	NM_000591	138	60
Collagène IA2	S: 5'-GGC AAC AGC AGG TTC CAC TTA-3' AS: 5'-GGC GTG ATG GCT TAT TTG TT-3'	NM_000089	105	59
Collagène IIA1	S: 5'-ACA CTG GGA CTG TCC TCT GC-3' AS: 5'-GGC AGT CTT TCA CGT CTT CA-3'	NM_001844	53	62
Collagène XA1	S: 5'-AAT GCC CAC AGG CAT AAA AG-3' AS: 5'-AGG ACT TCC GTA GCC TGG TT-3'	NM_000493	186	60
iNOS	S: 5'-ACA AGC CTA CCC CTC CAG AT-3' AS: 5'-TCC CGT CAG TTG GTA GGT TC-3'	NM_000625	157	59
IL-1 β	S: 5'-GGA CAA GCT GAG GAA GAT CG-3' AS: 5'- TCG TTA TCC CAT GTG TCG AA-3'	NM_000576	120	57
IL-6	S: 5'-GGC TGA AAA AGA TGG ATG CT-3' AS: 5'-GCT CTG GCT TGT TCC TCA CT-3'	NM_000600	141	59
MMP-1	S: 5'-AGG TCT CTG AGG GTC AAG CA-3' AS: 5'-CTG GTT GAA AAG CAT GAG CA-3'	NM_002421	111	57
MMP-3	S: 5'-GCA GTT TGC TCA GCC TAT CC-3' AS: 5'-GAG TGT CGG AGT CCA GCT TC-3'	NM_002422	213	59
MMP-9	S: 5'-CAT CGT CAT CCA GTT TGG TG-3' AS: 5'-AGG GAC CAC AAC TCG TCA TC-3'	NM_004994	140	58
MMP-13	S: 5'-TGG TGG TGA TGA AGA TGA TTT G-3' AS: 5'-TCT AAG CCG AAG AAA GAC TGC-3'	NM_002427	161	57
RAR- α	S: 5'-ACC AGA TTA CCC TTC TCA AGG-3' AS: 5'-GGT ACC GCG TGC AGA TT-3'	NM_000964	64	58
RAR- β	S: 5'-TCT TAA TGA AAA TCA CAG ATC TCC GC-3' AS: 5'-CCA GGA ATT TCC ATT TTC AAG G-3'	NM_000965	81	58
RAR- γ	S: 5'-TGG CTA CCA AGT GCA TCA TC-3' AS: 5'-AAT GCT GAG CCC TGT AAA GC-3'	NM_000966	70	60
RXR- α	S: 5'-TAG TCG CAG ACA TGG ACA CC-3' AS: 5'-TTC ACC TGG GTG GAG AAA TC-3'	BD391691	57	61
RXR- β	S: 5'- TCC CAC ACT TTT CCT CCT TG-3' AS: 5'-TCA ATG GAT CGG TGT GAA AA-3'	NM_021976	99	58
RXR- γ	S: 5'-CTG CAC CGG GCA GGG TGG AAT-3' AS: 5'-CTG GAC GGA AAC CGA GCG GTG-3'	AF_059312	65	66
Synovioline	S: 5'-TGG CTC ACG CCT ACT ACC TC-3' AS: 5'-CAC TCC CGT TCC ACA AGA A-3'	NM_0324131	142	62
TNF- α	S: 5'-CTC CTC ACC CAC ACC ATG-3' AS: 5'-GGA AGA CCC CTC CCA GAT AG-3'	NM_000594	151	59

Tableau 7 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés dans les expériences sur les cellules de rat : séquences, températures d'hybridation et numéros d'accèsion GenBank.

Gènes étudiés (rat)	Séquences (5'-3')	Numéro d'accèsion GenBank	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)
RP29	S: 5'- AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTC TAC TG-3' AS: 5'-AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA-3'	NM_012876	107	59
Cadhérine-11	S: 5'-TTG GCA GCA AGT ATC CAA TG-3' AS: 5'-GGG TTG TTC TCT TCC CCA GT-3'	XM_341639	56	58
CD14	S: 5'-CCG GGA ACT GAC TCT TGA AA-3' AS: 5'-CAG TTC TGC GAG CCA GGT AT-3'	NM_021744	139	60
Collagène IA2	S: 5'-TTG ACC CTA ACC AAG GAT GC-3' AS: 5'-CAC CCC TTC TGC GTT GTA TT-3'	AF_121217	197	58
Collagène IIA1	S: 5'-TCC CTC TGG TTC TGA TGG TC-3' AS: 5'-CTC TGT CTC CAG ATG CAC CA-3'	L_48440	161	59
Collagène XA1	S: 5'-ATA TCC TGG GGA TCC AGG TC-3' AS: 5'-TGG GTC ACC CTT AGA TCC AG-3'	AJ_131848	241	59
iNOS	S: 5'- AAT GCG GAA GGT CAT GGC-3' AS: 5'- CGA CTT TCC TGT CTC AGT AGC AAA-3'	NM_012611	66	60
IL-1 β	S: 5'-CTT CCC CAG GAC ATG CTA GG-3' AS: 5'-CAA AGG CTT CCC CTG GAG AC-3'	NM_031512	63	60
IL-6	S: 5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3' AS: 5'-ACA GTG CAT CAT CGC TGT TC-3'	NM_012589	161	59
MMP-3	S: 5'- GCT CAT CCT ACC CAT TGC AT-3' AS: 5'- GCT TGT GCA TCA GCT CCA TA-3'	NM_133523	219	58
MMP-9	S: 5'-CCA CCG AGC TAT CCA CTC AT-3' AS: 5'-GTC CGG TTT CAG CAT GTT TT-3'	NM_031055	159	58
MMP-13	S: 5'- AGG CCT TCA GAA AAG CCT TC-3' AS: 5'-GAG CTG CTT GTC CAG GTT TC-3'	XM_343345	226	58
RAR- α	S: 5'- ACC AGA TTA CCC TTC TCA AGG -3' AS: 5'-GGT ACC GCG TGC AGA TT-3'	NM_031528	65	58
RAR- β	S: 5'- TCT TAA TGA AAA TCA CAG ATC TCC GC-3' AS: 5'-CCA GGA ATT TCC ATT TTC AAG G-3'	XM_223843	81	58
RAR- γ	S: 5'- AGT GCT ATC TGC CTC ATC T-3' AS: 5'-TTG TCC ACC TTC TCG GGT TC-3'	XM_001062412	62	57
RXR- α	S: 5'-GAA GCG TAC TGC AAA CAC AAG-3' AS: 5'-CAG CCG GAG CAG CAG CTT GG-3'	NM_012805	66	62
RXR- β	S: 5'-CTT CAT GTG CAC AGA AAC T-3' AS: 5'-TCT GTC AGC ACC CGA TCA AA-3'	NM_206849	68	55
RXR- γ	S: 5'-CTG CAC CGG GCA GGG TGG AAT-3' AS: 5'-CTG GAC GGA AAC CGA GCG GTG-3'	NM_031765	65	66
Synovioline	S: 5'-GTC TGC GCA ACA TAC ACA CA-3' AS: 5'-GAG GCCAGG ACA GTG AGG TA-3'	XM_001075008	74	60
TNF- α	S: 5'-AGC CCT GGT ATG AGC CCA TGT A-3' AS: 5'-CCG GAC TCC GTG ATG TCT AAG T-3'	NM_012675	107	59

5.4 Réaction de polymérisation en chaîne : PCR quantitative en temps réel

5.4.1 Principe

Il s'agit d'une méthode d'amplification des ADNc par polymérisation en chaîne permettant de quantifier les amplicons au fur et à mesure de leur formation grâce à l'incorporation d'un agent intercalant fluorescent (**Figure 34**). Les ADNc sont soumis à différentes phases de température et de durée déterminées, représentées sur la **Figure 35**. Tout d'abord, la polymérase est activée lors d'un cycle de 15 minutes à 95°C (**I**), puis l'amplification des ADNc est rendue possible par la succession de plusieurs phases : la phase

.....

IIa, de dénaturation des ADN double brins (10 secondes à 95°C), la phase **IIb**, d'hybridation des amorces (20 secondes à la température optimale d'hybridation spécifique au couple d'amorces utilisé), et la phase **IIc**, d'élongation (1 seconde pour 20 paires de bases, avec un minimum de 10 secondes, à 72°C). La phase **II** est répétée 40 fois. Enfin, les échantillons sont soumis à une augmentation constante de 0,1°C par seconde à partir de 5°C au dessus de la température d'hybridation et jusqu'à 95°C, afin d'établir la courbe de fusion. Cette courbe permet de déterminer la température de fusion (T_m) de chaque produit de PCR, 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 est obtenue en traçant la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température, et en choisissant le point maximum de la courbe. Le pic obtenu doit être unique, afin de garantir qu'il n'y a pas eu de contamination génomique, et pour s'assurer que les amorces utilisées sont spécifiques du gène que l'on souhaite amplifier.

En suivant en temps réel l'émission de fluorescence, corrélée à la fixation du fluorophore sur l'ADN double brin, en fonction du nombre de cycles de PCR, on obtient une sigmoïde. Le logiciel de pilotage de l'appareil (Light Cycler 3 Front Screen Version 3.5, Idaho Technology Inc., Salt Lake City, Utah, USA) calcule alors le C_t , défini comme le nombre de cycles («point de sortie»), correspondant au moment à partir duquel la fluorescence devient détectable à la fin de la phase d'élongation de la PCR. Chaque expérience inclut des contrôles positif et négatif de la réaction, et les C_t sont convertis en nanogrammes d'ADN grâce à des courbes de calibration réalisées sur des dilutions en série de quantités connues de produits de PCR du gène étudié. Le niveau du transcrit du gène de ménage choisi, la protéine ribosomale S29 (RP29) est déterminé en parallèle pour chaque échantillon et les données sont exprimées en tant que rapport du niveau de l'ARNm de chaque gène d'intérêt sur celui du gène RP29. De plus, l'efficacité de PCR est calculée pour chaque expérience, grâce à la formule $E=10^{-1/\text{pente}}$. Celle ci doit idéalement être comprise entre 1,8 et 2 ($E=2$ pour une pente de -3,32), ce qui reflète le bon déroulement de la PCR, et en particulier un doublement de la quantité de matériel à chaque cycle.

Les résultats de PCR ont également été calculés avec une autre méthode, permettant de s'assurer de la validité de nos résultats. Cette deuxième méthode est la méthode des delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) avec correction de Pfaffl (Pfaffl M.W., 2001). L'avantage de cette méthode, par rapport à la méthode des $\Delta\Delta C_t$ sans correction [ou méthode de Livak, (Livak K.J. et Schmittgen T.D., 2001)], est de prendre en compte l'efficacité de chaque PCR, et d'être plus exacte notamment lorsque les efficacités de PCR sont éloignées, ou lorsque les différences

entre échantillons traités et témoins sont faibles (Fleige S. *et al.*, 2006). La comparaison de ces deux méthodes de calcul est présentée en addendum de ce manuscrit avec pour exemple trois graphiques de résultats.

Le calcul est le suivant :

$$R = \frac{(E_{\text{gène cible}})^{\Delta Ct (\text{témoin-traité})}}{(E_{\text{gène de réf.}})^{\Delta Ct (\text{témoin-traité})}}$$

Avec E représentant l'efficacité de chaque PCR.

L'allure de la courbe de suivi de la fluorescence et de la courbe de fusion sont représentées sur la **Figure 36**.

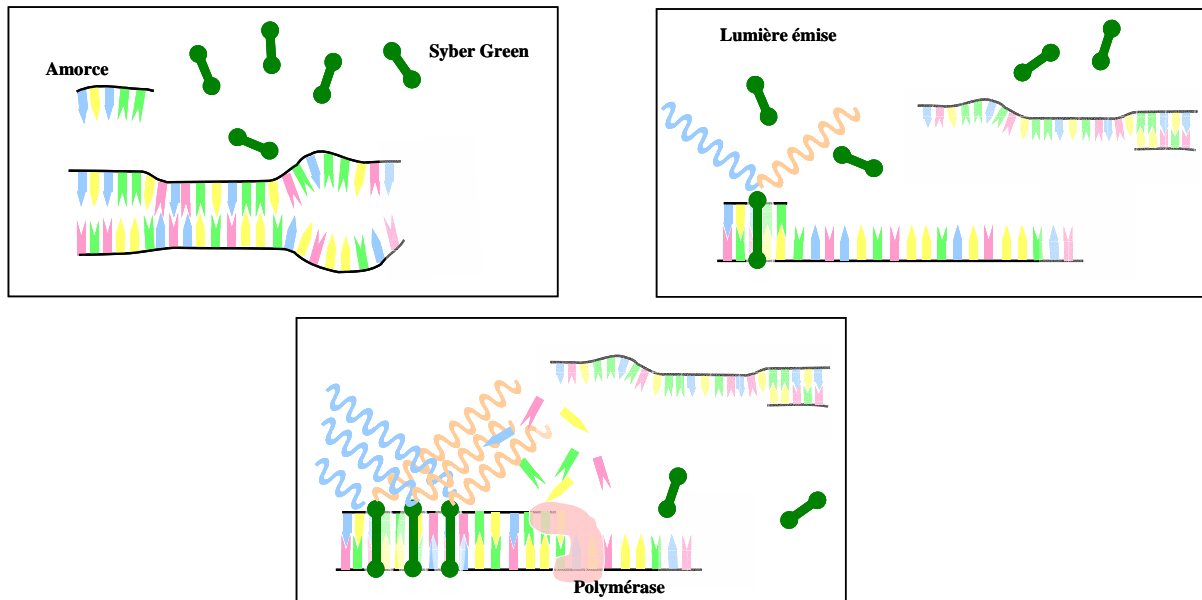


Figure 34 : Principe de la PCR quantitative en temps réel utilisant comme agent intercalant le Syber Green.

Le fluorophore s'insère au niveau de l'ADN s'il est sous forme double brin, et fluoresce une fois fixé à l'ADN. L'intensité de la fluorescence recueillie est proportionnelle à la quantité de fluorophore insérée au niveau de l'ADN.

D'après <http://www.thaiscience.com>

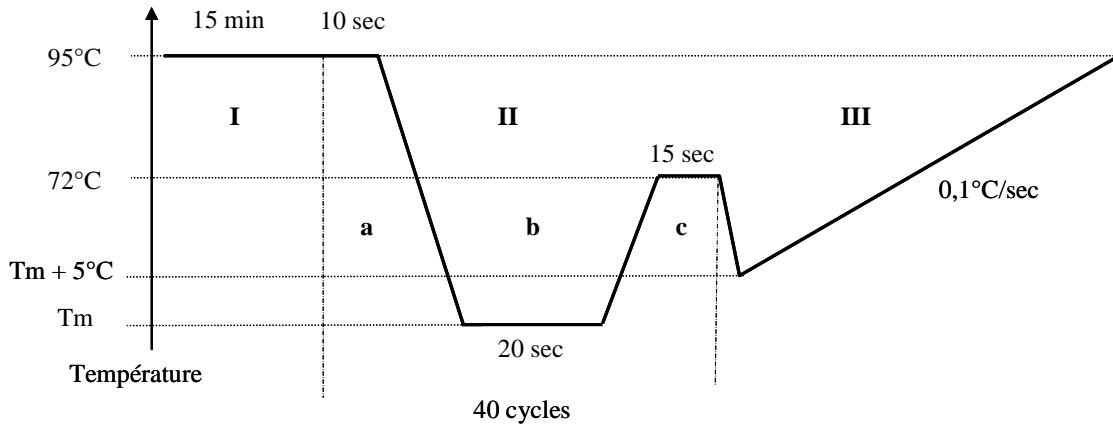


Figure 35 : Programmation des cycles thermiques pour la PCR quantitative en temps réel. La phase **I** correspond à la phase d'activation de l'enzyme, la phase **II** correspond à la phase d'amplification et la phase **III** correspond à la courbe de fusion. La phase **II** est subdivisée en phase de dénaturation de l'ADN (**a**), en phase d'hybridation des amorces (**b**), et en phase d'élongation (**c**). Les valeurs données en exemple correspondent à un amplicon de 125 paires de bases.

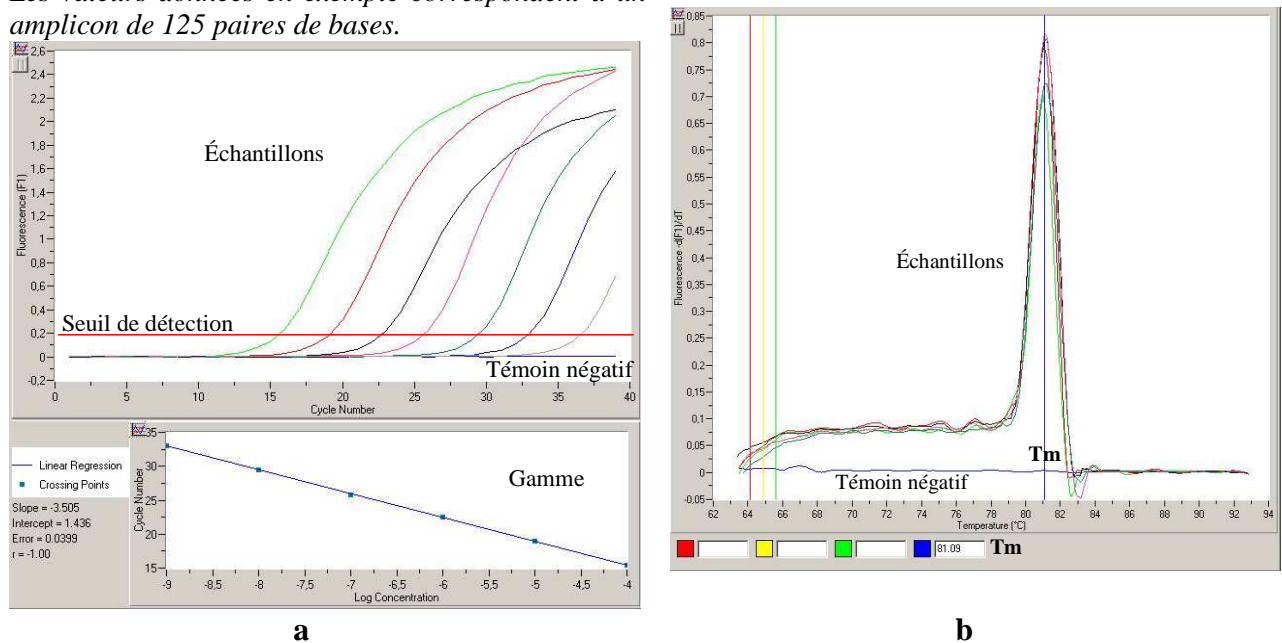


Figure 36 : Vues du logiciel d'analyse de qPCR Thermocycler.

a : Émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles effectués. Les échantillons, la gamme, ainsi que le témoin négatif sont soumis à 40 cycles de PCR. Le point de sortie est mesuré comme étant le nombre de cycles à partir duquel le seuil de fluorescence devient détectable par le logiciel. Ce seuil est représenté ici par une ligne rouge.

b : Courbe de fusion : dérivée de la fluorescence en fonction de la température. Le T_m correspond à la température à laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. Il est spécifique du couple d'amorces utilisé.

5.4.2 Réalisation

Le fluorophore utilisé dans nos expériences est le SYBR Green I (Qiagen). La réaction de PCR est réalisée en tubes capillaires dans un thermocycleur Lightcycler™ 1.5 (technologie LightCycler Roche Molecular Diagnostics™, **Figure 37**). Le mélange réactionnel est composé

de 10 µl de Master mix system[®] 2X (Quantitect SYBR Green PCR Buffer[™] [Qiagen]) contenant du Tris-Cl, du KCl, du (NH₄)₂SO₄, 15 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, la HotStarTaq[™] ADN Polymérase et le SYBR Green I), 0,5 µM de chacune des 2 amorces et 2 µl d'ADNc préalablement dilué (ou d'eau exempte de RNase pour le témoin négatif).



Figure 37 : Thermocycleur *Lightcycler*[™] à capillaires (Roche Molecular Diagnostics) permettant le suivi en temps réel de l'amplification des ADNc.

5.5 Analyse des fragments amplifiés

Afin de vérifier la taille des produits d'amplification obtenus, les amplicons sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 2 % (p/v) préparé dans du tampon TBE 1X (cf. 5.1). Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous rayonnement ultraviolet, et la taille des fragments est comparée à un marqueur de taille connue (100 paires de bases, Invitrogen, **Figure 38**).

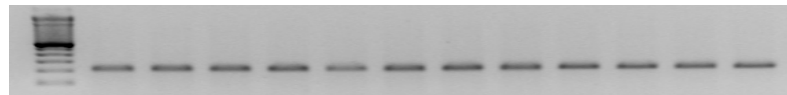


Figure 38 : Gel d'agarose à 2 % montrant le résultat d'une migration électrophorétique d'ADNc préalablement amplifiés par PCR quantitative en temps réel. La visualisation d'une bande unique à la taille déterminée grâce au marqueur de taille permet de vérifier que le fragment amplifié est celui désiré.

6 Étude de l'expression des protéines d'intérêt

6.1 Extraction de protéines totales

Au moment indiqué dans les expériences, le tapis cellulaire est rincé avec du PBS ne contenant ni Ca²⁺ ni Mg²⁺, puis gratté dans du bleu de Laemmli (tampon de lyse, Sigma) (Laemmli U.K., 1970) à raison de 300 µl par puits pour une plaque 6 puits. Ce tampon 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) contient 2 % de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate, détergent anionique), 10 % de glycérol (augmente les tensions de surface et stabilise les interactions protéine-

protéine), 5 % de β -mercaptoéthanol et 0,002 % de bleu de bromophénol (colorant). Le lysat ainsi obtenu est soumis aux ultrasons pendant 5 secondes avec une intensité ne dépassant pas 30 % du signal maximum de la sonde GM70 (Bandelin Sonopuls, Strasbourg, France), afin de réduire la viscosité des échantillons, de rompre les membranes des cellules, et de diminuer les interactions protéines/ADN. Puis les extraits protéiques sont centrifugés une minute à 10000g et chauffés 5 minutes à 95°C avant d'être déposés sur gel, ce qui dénature les protéines en brisant les liaisons faibles intramoléculaires et élimine donc les structures tertiaires. Le SDS procure un environnement riche en charges négatives afin de les solvater et prévenir la précipitation, et également afin de permettre la migration des protéines uniquement selon leur taille, et le composant sulfhydryle empêche la reformation de ponts disulfure. Le glycérol, quant à lui, augmente la densité de l'échantillon par rapport au tampon dans la partie supérieure du réservoir du gel, facilitant ainsi le dépôt des échantillons.

6.2 Électrophorèse

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (Laemmli U.K., 1970) dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le gel est divisé en 2 parties, le gel supérieur, dit d'isotachophorèse ou de concentration, est composé d'un mélange de 5 % d'acrylamide-bis-acrylamide, dilué dans un tampon composé de 0,1 % de SDS, de tampon 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), de persulfate d'ammonium (APS) et de TEMED (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine). Le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre qui va pouvoir relier les monomères d'acrylamide. Le gel inférieur, dit monophasique ou gel de séparation, est composé d'un mélange d'acrylamide-bis-acrylamide en proportion variable, correspondant à la réticulation désirée, qui dépend de la taille des protéines à étudier. Ce mélange d'acrylamide-bis-acrylamide est dilué dans un tampon composé de 0,1 % de SDS, de tampon 0,75 M Tris-HCl à pH 8,8, d'APS et de TEMED. Le gel de concentration pallie aux problèmes liés aux faibles quantités de protéines et au volume non négligeable déposé dans les puits en concentrant le dépôt en des bandes protéiques très fines qui migreront dans le gel de séparation. Ce dernier contient une proportion d'acrylamide de 5 %. Le fait que le SDS rende les protéines uniformément chargées négativement permet leur migration uniquement selon la taille, donc leur masse moléculaire. L'intensité constante du champ électrique à laquelle sont soumises les protéines est de 30 mA par gel de 100 cm², dans un tampon de migration contenant un tampon 25 mM Tris-HCl, 3,5 mM SDS et 0,192 M glycine. La

migration est réalisée jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bord inférieur du gel. Pour chaque électrophorèse effectuée, un marqueur biotinylé (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) est déposé afin de vérifier la taille des protéines détectées.

6.3 Électrotransfert en phase semi-liquide

Après séparation en gel, les protéines sont transférées sur un support immobilisant, une membrane de Fluorure de PolyVinylidène (PVDF, Millipore, Molsheim, France), préalablement activée une minute dans du méthanol. La membrane et le gel sont placés entre plusieurs feuilles de papier Whatman préalablement imbibées dans du tampon de transfert 25 mM Tris-HCl, 100 mM glycine et 20 % méthanol (Towbin H. *et al.*, 1979). Le transfert est effectué pendant une heure à une intensité constante de 80 mA par gel (0,8 mA/cm²) (Biorad).

6.4 Immunorévélation

Afin de limiter les interactions non spécifiques, la membrane de PVDF est incubée quelques heures dans du tampon de blocage, composé de 5 % (p/v) de lait en poudre écrémé dilué dans du tampon TBST (Tris Buffered Saline Tween : 50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl (pH 7,6) et 0,1 % Tween 20). Les protéines du lait vont saturer les sites de fixation non spécifiques et favoriser la fixation des anticorps sur les protéines d'intérêt. Après 3 lavages de 5 minutes dans du TBST, ayant pour objectif de réduire le bruit de fond, l'anticorps primaire (IgG) dilué dans du TBST contenant 5 % (p/v) d'albumine bovine sérique (BSA) est ajouté pendant une nuit à 4°C. Pour chaque anticorps, la dilution choisie a été optimisée, à savoir **1:4000** pour la β -actine (Stressgen Biotechnology Corporation, Michigan, USA), **1:2000** pour RAR- α , - β et - γ , RXR- α , - β et - γ (Santa Cruz Biotechnologies, Tebu, Le Perray en Yvelines, France), **1:1000** pour P-p38 (Cell Signaling), **1:500** pour p42/44 et P-p42/44 (Cell Signaling), c-Jun et P-c-Jun (Cell Signaling), et pour P-SAPK/JNK (Cell Signaling). Les anticorps anti-RAR, RXR, p42/44, P-SAPK/JNK, P-p38, β -actine et P-c-Jun sont des anticorps polyclonaux obtenus chez le lapin, l'anticorps anti-P-p42/44 est un anticorps monoclonal obtenu chez le lapin, et l'anticorps anti-c-Jun est un anticorps monoclonal obtenu chez la souris.

Le lendemain, après 3 lavages dans du TBST, la membrane est incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris couplé à la peroxydase du raifort (HRP, Horse-radish peroxidase, Cell Signaling) dilué au 1:2000 dans du TBST contenant 5 % de lait en poudre écrémé, ainsi qu'un anticorps anti-biotine couplé à la

HRP dilué au 1:1000 qui va se fixer sur les protéines du marqueur de taille biotinyllé. Après 3 lavages dans du TBST et 3 rinçages à l'eau distillée, l'activité de la peroxydase est révélée par un substrat chimioluminescent dérivé du luminol à l'aide du kit Lumiglo® (Lumiglo®, Cell Signaling). En présence de peroxyde d'hydrogène, l'HRP convertit le luminol en dianion intermédiaire excité qui émet secondairement de la lumière en retournant à son état basal. Le signal lumineux est quantifié grâce à un analyseur de chimioluminescence GeneGnome (Syngene, Saint Quentin-en-Yvelines, France), qui comprend une caméra CCD pour la capture d'images et un système d'analyse d'images GeneTools (Syngene) pour l'analyse densitométrique. Les intensités lumineuses des protéines d'intérêt sont rapportées aux intensités correspondant à la β -actine, protéine de référence d'expression stable dans toutes les expériences effectuées au sein du laboratoire.

7 Étude de la production des médiateurs de l'inflammation

7.1 Dosage des nitrites

7.1.1 Principe

La production de NO est évaluée indirectement par le dosage colorimétrique des ions nitrites dans les surnageants de culture selon la méthode de Griess (Green L.C. *et al.*, 1982) adaptée en microplaques. En milieu acide, les nitrites réagissent avec une amine aromatique, le sulfanilamide pour former l'ion diazonium. En présence de dihydrochlorhydrate de N-(1-naphtyl) éthylène diamine (α -naphtylamine), il se forme un composé diazoïque de couleur rose dont l'intensité est évaluée par la mesure de l'absorbance à 550 nm (**Figure 39**).

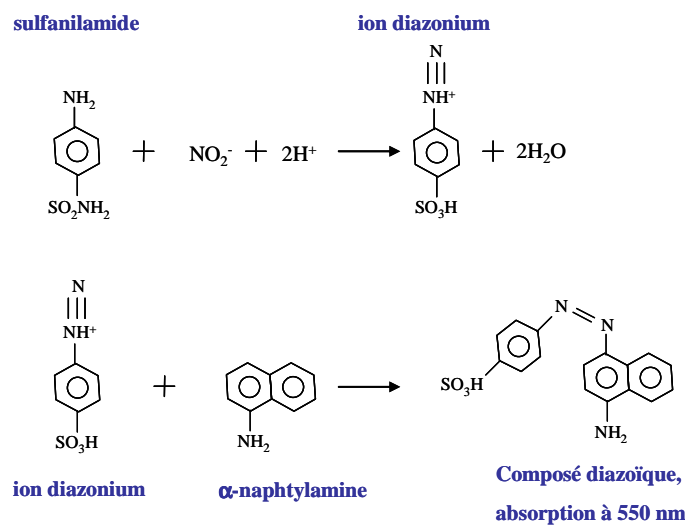


Figure 39 : Réaction biochimique mise en œuvre lors du dosage des nitrites par la méthode de Griess.

7.1.2 Réalisation

Brièvement, 100 µl de surnageant des échantillons à analyser sont mélangés à 100 µl de solution de Griess (mélange v/v d'une solution aqueuse à 0,1 % [p/v] de dichlorhydrate de naphthyléthylène diamine et d'une solution à 1 % [p/v] de sulfanilamide dans de l'H₃PO₄ à 5 %). La coloration rose est lue à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Multiskan™ (Labsystems). Les concentrations en nitrites sont calculées à partir d'une gamme étalon de 0 à 50 µM de nitrites de sodium, réalisée à partir d'une solution mère à 50 mM. La limite de quantification de cette méthode a été déterminée à 1 µM dans nos conditions expérimentales.

7.2 Dosages immuno-enzymatiques de la production du TNF-α et de l'IL-6

Les productions de TNF-α ou d'IL-6 ont été mesurées par une méthode immuno-enzymatique de type « ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) sandwich » (R&D Systems™, Abingdon, Angleterre). Ces coffrets réactifs utilisent respectivement des anticorps monoclonaux anti-TNF-α ou anti-IL-6, fixés au fond des puits d'une plaque 96 puits. Les échantillons contenant les cytokines à doser, de rat ou humaines suivant l'expérience, sont ajoutés dans les puits, puis, après un temps d'incubation d'une heure permettant le contact anticorps-antigène, un anticorps secondaire polyclonal marqué à la peroxydase de Raifort est ajouté. La coloration finale est lue à 450 nm sur le lecteur Multiskan™ après addition d'un mélange de 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine et de peroxyde d'hydrogène, utilisé comme substrat chromogène. Les absorbances obtenues sont comparées à celles de gammes d'étalonnage préparées par dilutions en série de cytokines recombinantes homologues fournies dans le kit. La limite de détection est de 1,6 pg/ml pour le TNF-α humain, 5 pg/ml pour le TNF-α de rat, 0,7 pg/ml pour l'IL-6 humaine, et 21 pg/ml pour l'IL-6 de rat.

7.3 Étude de la production des médiateurs de l'inflammation par la technique de « cytokine array »

7.3.1 Principe

La technique des puces à cytokines fait appel à des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont immobilisés des anticorps dirigés contre un grand nombre de médiateurs (RayBio Human Cytokine Array VI et VII, RayBiotech®, fournis par Tebu). Chaque médiateur est identifiable

par sa position sur la membrane, conçue pour détecter simultanément 60 protéines, incluant des cytokines, des chémokines, des facteurs de transcription et des facteurs angiogéniques. La liste des médiateurs détectés sur chacune des membranes est indiquée dans le **Tableau 8**. La sensibilité de cette méthode de type sandwich est augmentée par l'utilisation d'un système d'amplification de type streptavidine-biotine (conjugué biotinylé et HRP couplée à la streptavidine, **Figure 41**). Les limites de détection sont également indiquées dans le **Tableau 8** (données fabricant).

Tableau 8 : Nature et localisation des protéines détectables sur les puces à cytokines Raybiotech®. Les limites de détection correspondantes sont indiquées en pg/ml entre parenthèses.

POS : emplacement des témoins positifs

NEG : emplacement des témoins négatifs

Membrane VI

<i>POS</i>	<i>POS</i>	<i>NEG</i>	<i>NEG</i>	<i>Blanc</i>	angiogénine (10)	BDNF (100)	BLC (10)	BMP-4 (100000)	BMP-6 (10000)	CK-β8-1 (1000)	CNTF (320)	EGF (1)	Eotaxine (1)
<i>POS</i>	<i>POS</i>	<i>NEG</i>	<i>NEG</i>	<i>Blanc</i>	angiogénine (10)	BDNF (100)	BLC (10)	BMP-4 (100000)	BMP-6 (10000)	CK-β8-1 (1000)	CNTF (320)	EGF (1)	Eotaxine (1)
Eotaxine 2 (1)	Eotaxine 3 (320)	FGF-6 (1000)	FGF-7 (1)	Fit-3 Ligand (1)	Fractaline (1600)	GCP-2 (100)	GDNF (100)	GM-CSF (100)	I-309 (1000)	IFN-γ (100)	IGFBP-1 (1)	IGFBP-2 (10)	IGFBP-4 (1000)
Eotaxine 2 (1)	Eotaxine 3 (320)	FGF-6 (1000)	FGF-7 (1)	Fit-3 Ligand (1)	Fractaline (1600)	GCP-2 (100)	GDNF (100)	GM-CSF (100)	I-309 (1000)	IFN-γ (100)	IGFBP-1 (1)	IGFBP-2 (10)	IGFBP-4 (1000)
IGF-1 (10)	IL-10 (10)	IL-13 (100)	IL-15 (100)	IL-16 (1)	IL-1α (1000)	IL-1β (100)	IL-1Ra (10)	IL-2 (25)	IL-3 (100)	IL-4 (1)	IL-5 (1)	IL-6 (1)	IL-7 (100)
IGF-1 (10)	IL-10 (10)	IL-13 (100)	IL-15 (100)	IL-16 (1)	IL-1α (1000)	IL-1β (100)	IL-1Ra (10)	IL-2 (25)	IL-3 (100)	IL-4 (1)	IL-5 (1)	IL-6 (1)	IL-7 (100)
Leptine (100)	LIGHT (1)	MCP-1 (3)	MCP-2 (100)	MCP-3 (1000)	MCP-4 (100)	M-CSF (1)	MDC (1000)	MIG (1)	MIP-1δ (100)	MIP-3a (100)	NAP-2 (100)	NT-3 (20)	PARC (1000)
Leptine (100)	LIGHT (1)	MCP-1 (3)	MCP-2 (100)	MCP-3 (1000)	MCP-4 (100)	M-CSF (1)	MDC (1000)	MIG (1)	MIP-1δ (100)	MIP-3a (100)	NAP-2 (100)	NT-3 (20)	PARC (1000)
PDGF-BB (1000)	RANTES (2000)	SCF (10)	SDF-1 (2000)	TARC (100)	TGF-β1 (200)	TGF-β3 (100)	TNF-α (10)	TNF-β (1000)	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>POS</i>
PDGF-BB (1000)	RANTES (2000)	SCF (10)	SDF-1 (2000)	TARC (100)	TGF-β1 (200)	TGF-β3 (100)	TNF-α (10)	TNF-β (1000)	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>POS</i>

Membrane VII

<i>POS</i>	<i>POS</i>	<i>NEG</i>	<i>NEG</i>	<i>Blanc</i>	Adiponectine (10000)	AgRP (10000)	Angiopoïétine-2 (10000)	Amphiréguline (100)	Axl (10000)	b-FGF (10000)	B-NGF (10000)	BTC (1000)	CCL-28 (100000)
<i>POS</i>	<i>POS</i>	<i>NEG</i>	<i>NEG</i>	<i>Blanc</i>	Adiponectine (10000)	AgRP (10000)	Angiopoïétine-2 (10000)	Amphiréguline (100)	Axl (10000)	b-FGF (10000)	B-NGF (10000)	BTC (1000)	CCL-28 (100000)
CTACK (100)	Dkk (10000)	EGFR (10000)	ENA-78 (1)	Fas/TNFRSF6 (100000)	FGF-4 (1000)	FGF-9 (100)	GCSF (2000)	GITR-Ligand (100000)	GITR (1000)	GRO (1000)	GRO-α (1000)	hCC-4 (1000)	HGF (200)
CTACK (100)	Dkk (10000)	EGFR (10000)	ENA-78 (1)	Fas/TNFRSF6 (100000)	FGF-4 (1000)	FGF-9 (100)	GCSF (2000)	GITR-Ligand (100000)	GITR (1000)	GRO (1000)	GRO-α (1000)	hCC-4 (1000)	HGF (200)
ICAM-1 (100000)	ICAM-3 (10000)	IGFBP-3 (1000)	IGFBP-6 (1000)	IGF-ISR (10000)	IL-1 R4/ST2 (1000)	IL-1 RI (1000)	IL-11 (100000)	IL-12 p40 (1000)	IL-12 p70 (100)	IL-17 (1000)	IL-2Rα (10)	IL-6R (10)	IL-8 (1)
ICAM-1 (100000)	ICAM-3 (10000)	IGFBP-3 (1000)	IGFBP-6 (1000)	IGF-ISR (10000)	IL-1 R4/ST2 (1000)	IL-1 RI (1000)	IL-11 (100000)	IL-12 p40 (1000)	IL-12 p70 (100)	IL-17 (1000)	IL-2Rα (10)	IL-6R (10)	IL-8 (1)
I-TAC (10000)	Lymphotoctine (100000)	MIF (100)	MIP-1α (20)	MIP-1β (10)	MIP-3β (1000)	MIP-α (10000)	NT-4 (2)	Ostéoprotégérine (100)	OncostatineM (100)	PIGF (100)	Sgp130 (100)	sTNF-RII (10)	sTNF-RI (100)
I-TAC (10000)	Lymphotoctine (100000)	MIF (100)	MIP-1α (20)	MIP-1β (10)	MIP-3β (1000)	MIP-α (10000)	NT-4 (2)	Ostéoprotégérine (100)	OncostatineM (100)	PIGF (100)	Sgp130 (100)	sTNF-RII (10)	sTNF-RI (100)
TECK (10000)	TIMP-1 (100)	TIMP-2 (1)	Thrombopoïétine (100)	TRAIL-R3 (100)	TRAIL-R4 (1000)	uPAR	VEGF (100)	VEGF-D (10000)	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>POS</i>
TECK (10000)	TIMP-1 (100)	TIMP-2 (1)	Thrombopoïétine (100)	TRAIL-R3 (100)	TRAIL-R4 (1000)	uPAR	VEGF (100)	VEGF-D (10000)	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>Blanc</i>	<i>POS</i>

7.3.2 Réalisation

La détection des cytokines sur les membranes est réalisée à partir des surnageants de culture de fibroblastes synoviaux humains, selon les recommandations du fournisseur. Les membranes sont tout d'abord incubées avec 2 ml de tampon de blocage durant 30 minutes à température ambiante. Puis, après élimination du tampon de blocage, 1,2 ml de surnageant sont ajoutés sur chaque membrane, pour une incubation d'une heure à température ambiante. Les membranes sont alors lavées trois fois 5 minutes avec 2 ml de tampon de lavage I, puis 2 fois 5 minutes avec 2 ml de tampon de lavage II. Le cocktail de 60 anticorps conjugués et biotinylés, dilué 250 fois, est alors ajouté sur chaque membrane pendant une heure à température ambiante. Après une deuxième série de lavages, les membranes sont incubées avec une solution contenant la streptavidine conjuguée à l'HRP, diluée au 1:1000 pendant 2 heures. L'étape de détection est réalisée après une dernière série de lavages grâce à l'addition du substrat chimioluminescent de la peroxydase, puis les membranes sont placées entre 2 feuilles plastiques, dans une cassette à fond noir, et en présence d'un film photosensible (Kodak, Sigma). Après une période d'exposition de durée variable, permettant la détection de tous les spots tout en minimisant le bruit de fond, le film autoradiographique est plongé dans un bain de révélation (Kodak), un bain de lavage (eau) puis dans une solution fixatrice (Kodak). L'analyse densitométrique de chaque spot est réalisée à l'aide du logiciel d'analyse d'image GeneTools (Syngene) sur l'appareil d'acquisition d'images G:Box (Syngene), et les niveaux protéiques sont estimés par la normalisation de l'intensité de chaque spot par rapport à celle des témoins positifs fixés sur les membranes (**Figure 40**). Le principe de cette technique est illustré par la **Figure 41**.

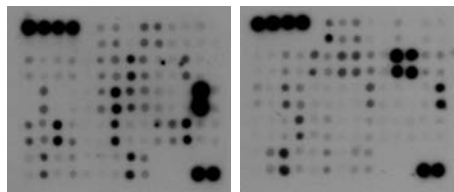


Figure 40 : Exemple de révélation par film autoradiographique d'une puce à cytokines.

Les témoins positifs sont situés en haut à gauche (4 spots) et en bas à droite (2 spots) et sont entourés de témoins négatifs où aucun anticorps n'a été préfixé. Membrane VI à gauche et membrane VII à droite.

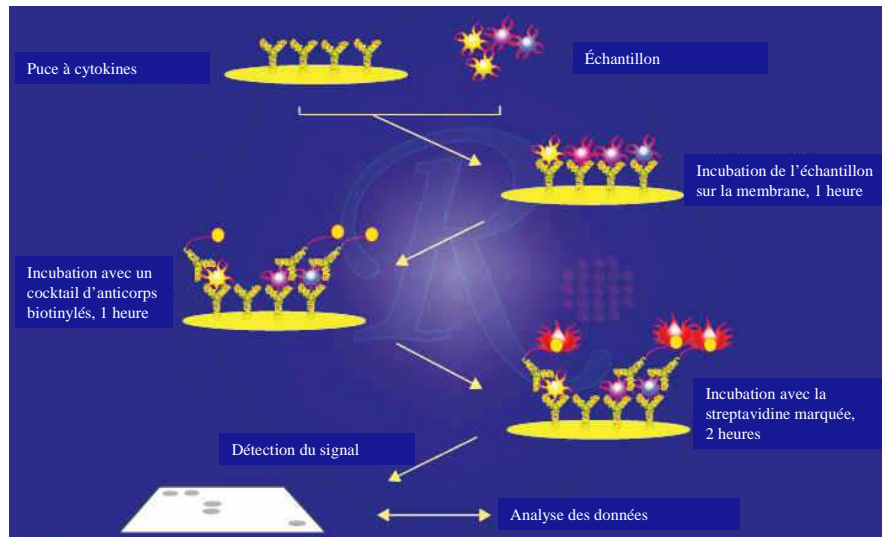


Figure 41 : Principe du déroulement de la réaction immunoenzymatique sur une puce à cytokines. Les anticorps spécifiques des molécules recherchées sont pré-hybridés sur la membrane. L'échantillon est ajouté sur chaque membrane, et chaque molécule considérée comme un antigène se lie spécifiquement à l'anticorps immobilisé. Un cocktail d'anticorps secondaires biotinylés est ajouté, ceux-ci se fixent au second épitope de l'antigène formant un complexe anticorps-antigène. Après l'ajout de streptavidine marquée, la détection du signal lumineux est réalisée sur un film autoradiographique, puis l'intensité des spots lumineux est mesurée et rapportée à celle des témoins positifs.

<http://www.raybiotech.com>.

7.4 Dosage de l'activité métalloprotéase totale

Après stimulation des chondrocytes de rat ou humains pendant 24 heures à 37°C par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue, en présence ou non d'ATRA (1 μ M), l'activité totale MMP est quantifiée dans le surnageant de culture par une méthode spectrofluorométrique (Knight C.G. *et al.*, 1992). Les expériences sont réalisées dans des plaques 96 puits à bords noirs, afin d'éviter la diffraction dans les puits voisins (BD Falcon™, Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France). Brièvement, les MMPs sous forme latente sont activées par l'ajout de 50 μ l de 4-aminophénylmercurique acétate (APMA [Sigma] 1,5 mM dans du tampon 50 mM Tris-HCl [pH 7,5], et du tampon de réaction contenant 15 mM de NaCl et 5 mM de CaCl₂) aux 50 μ l de surnageant de culture. Ensuite, 50 μ l du substrat MMP fluorogénique DNP-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-NH₂ (Calbiochem, Nottingham, Angleterre) sont ajoutés, à une concentration finale de 30 μ M. Après 4 heures d'incubation à 37°C dans l'obscurité, le clivage du substrat par les MMPs est mesuré grâce à un spectrofluorimètre FLUOstar Optima™ (BMG Labtechnologies, Champsigny-sur-Marne, France) en mesurant l'intensité de fluorescence à 360 nm après excitation à 280 nm. Le

substrat MMP fluorogénique utilisé est clivé majoritairement par les MMP-2, -1, -3 et -13. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence.

8 Analyse de l'activité de facteurs de transcription

8.1 Les puces à facteurs de transcription

La technique des puces à facteurs de transcription fait appel à des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont immobilisées des séquences oligonucléotidiques (séquences consensus) complémentaires des éléments de réponse à ces facteurs sur l'ADN. Elles permettent donc de mesurer simultanément l'activation de plusieurs facteurs à partir d'un même extrait de protéines nucléaires.

8.1.1 Extraction des protéines nucléaires

L'extraction des protéines nucléaires est réalisée grâce au kit commercial TransAm[®] (Active Motif Europe, Rixensart, Belgique), selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, après une stimulation par l'IL-1 β pendant 30 minutes, en présence ou non d'ATRA (1 μ M), les fibroblastes synoviaux de rat cultivés en flacons de 75 cm² sont rincés avec du PBS froid additionné d'inhibiteurs de phosphatases (PIB). Ensuite, les cellules sont grattées sur un lit de glace dans du PBS/PIB (afin de limiter les modifications protéiques de type expression, protéolyse, déphosphorylation, ...), puis transférées dans des tubes froids, et centrifugées pendant 5 minutes à 300g et à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans un tampon hypotonique afin de libérer le contenu cellulaire et un détergent est ajouté pour faciliter la solubilisation des protéines cytoplasmiques. Après centrifugation pendant 30 secondes à 14000g et à 4°C, le culot, contenant les noyaux, est dissout dans un tampon de lyse hypertonique contenant 1 μ M de DTT et des inhibiteurs de protéases. Le surnageant, contenant, les protéines nucléaires solubles est recueilli après centrifugation pendant 10 minutes à 14000g et à 4°C, puis il est aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

8.1.2 Quantification des protéines nucléaires

La concentration protéique de chaque extrait nucléaire est déterminée grâce à un kit commercial utilisant de l'acide bicinchoninique comme réactif (BCA[™] protein assay kit, Sigma). Brièvement, les échantillons sont dilués 5 fois dans de l'eau distillée, puis 10 μ l sont

déposés par puits de plaque 96 puits. Ensuite, 200 µl d'un mélange de 50 volumes de réactif A (carbonate de sodium - bicarbonate de sodium -BCA- tartrate de sodium -NaOH 0,1 M, Sigma) et d'un volume de réactif B (CuSO₄-5 H₂O-4 %, Sigma) sont ajoutés dans chaque puits, et la plaque est alors agitée 5 secondes avant d'être mise à incuber 30 minutes à 37°C. La formation de complexes BCA-cuivre-protéines de couleur violette est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques MultiskanTM (Labsystems). Les concentrations des échantillons sont calculées grâce à une courbe de calibration allant de 0 à 1 mg/ml, utilisant comme standard l'albumine sérique bovine (BSA, Sigma). Le dosage BCA est linéaire entre 0,2 et 1 mg/ml (données fabricant).

8.1.3 Principe des puces à facteurs de transcription

Les membranes utilisées (TranSignal Protein/DNA Array I, Panomics, Vignate-Milano, Italie) permettent de détecter 56 facteurs de transcription différents, listés dans le Tableau 9. Pour ce faire, 56 séquences d'ADN, complémentaires des sites de fixation des facteurs de transcription sur l'ADN, sont hybridées sur la membrane (**Figure 42**). Les extraits nucléaires sont mélangés à une solution contenant les séquences consensus des éléments de réponse aux facteurs de transcription marquées par la biotine. Les facteurs de transcription présents dans les échantillons se fixent aux séquences d'ADN marquées correspondantes, et les sondes restées libres sont éliminées. Puis l'ADN marqué est séparé des protéines par dénaturation de ces dernières à la chaleur, et est déposé sur les membranes. Les séquences complémentaires appariées sont ensuite détectées grâce à l'addition d'un conjugué marqué à la streptavidine-HRP. La solution de détection engendre un signal lumineux, détecté sur un film photosensible, et l'intensité des spots obtenus est mesurée sur l'appareil G:Box et analysée grâce au logiciel GeneTools (Syngene). Les intensités lumineuses des spots d'intérêt sont normalisées par celle des spots correspondant aux témoins positifs, et les différences entre les échantillons sont considérées comme significatives dès lors que leur induction ou leur inhibition dépasse un facteur 2.

Tableau 9 : Nature et localisation des facteurs de transcription détectés sur la membrane I Panomics®.

Les cases grisées représentent les témoins positifs et les cases laissées blanches les témoins négatifs de l'expérience.

AP-1 (1)	AP-1 (1)	AP-2 (1)	AP-2 (1)	AR	AR	Brn-3	Brn-3	CEBP (1)	CEBP (1)	CBF	CBF	CDP	CDP	c-Myb	c-Myb	AP-1 (2)	AP-1 (2)
AP-1 (1)	AP-1 (1)	AP-2 (1)	AP-2 (1)	AR	AR	Brn-3	Brn-3	CEBP (1)	CEBP (1)	CBF	CBF	CDP	CDP	c-Myb	c-Myb	AP-1 (2)	AP-1 (2)
CREB (1)	CREB (1)	E2F-1	E2F-1	EGR (1)	EGR (1)	ER	ER	Ets (1)	Ets (1)	Ets-1/Poa-3 (1)	Ets-1/Poa-3 (1)	FAST-1	FAST-1	GAS/ISRE	GAS/ISRE	AP-2 (2)	AP-2 (2)
CREB (1)	CREB (1)	E2F-1	E2F-1	EGR (1)	EGR (1)	ER	ER	Ets (1)	Ets (1)	Ets1/Poa3 (1)	Ets1/Poa3 (1)	FAST-1	FAST-1	GAS/ISRE	GAS/ISRE	AP-2 (2)	AP-2 (2)
GATA	GATA	GR/PR	GR/PR	HNF-4 (1)	HNF-4 (1)	IRF-1	IRF-1	MEF-1 (1)	MEF-1 (1)	MEF-2 (1)	MEF-2 (1)	Myc/Max	Myc/Max	NF-1 (1)	NF-1 (1)		
GATA	GATA	GR/PR	GR/PR	HNF-4 (1)	HNF-4 (1)	IRF-1	IRF-1	MEF-1 (1)	MEF-1 (1)	MEF-2 (1)	MEF-2 (1)	Myc/Max	Myc/Max	NF-1 (1)	NF-1 (1)		
NFAT-1 (1)	NFAT-1 (1)	NF-E1/YY1	NF-E1/YY1	NF-E2 (1)	NF-E2 (1)	NFkB (1)	NFkB (1)	OCT (1)	OCT (1)	p53 (1)	p53 (1)	Pax-5 (1)	Pax-5 (1)	Pbx-1	Pbx-1		
NFAT-1 (1)	NFAT-1 (1)	NF-E1/YY1	NF-E1/YY1	NF-E2 (1)	NF-E2 (1)	NFkB (1)	NFkB (1)	OCT (1)	OCT (1)	p53 (1)	p53 (1)	Pax-5 (1)	Pax-5 (1)	Pbx-1	Pbx-1		
Pii-1 (1)	Pii-1 (1)	PPAR (1)	PPAR (1)	PRE	PRE	RAR/DR-5	RAR/DR-5	RXR/DR-1	RXR/DR-1	SIE	SIE	Smad/SBE	Smad/SBE	SMAD-3/4	SMAD-3/4		
Pii-1 (1)	Pii-1 (1)	PPAR (1)	PPAR (1)	PRE	PRE	RAR/DR-5	RAR/DR-5	RXR/DR-1	RXR/DR-1	SIE	SIE	Smad/SBE	Smad/SBE	SMAD-3/4	SMAD-3/4		
Sp-1	Sp-1	SRE	SRE	Stat-1	Stat-1	Stat-3	Stat-3	Stat-4	Stat-4	Stat-5	Stat-5	Stat-6	Stat-6	TFIID	TFIID		
Sp-1	Sp-1	SRE	SRE	Stat-1	Stat-1	Stat-3	Stat-3	Stat-4	Stat-4	Stat-5	Stat-5	Stat-6	Stat-6	TFIID	TFIID		
TR	TR	TR/DR-4	TR/DR-4	USF-1 (1)	USF-1 (1)	VDR/DR-3	VDR/DR-3	HSE	HSE	MRE	MRE						
TR	TR	TR/DR-4	TR/DR-4	USF-1 (1)	USF-1 (1)	VDR/DR-3	VDR/DR-3	HSE	HSE	MRE	MRE						

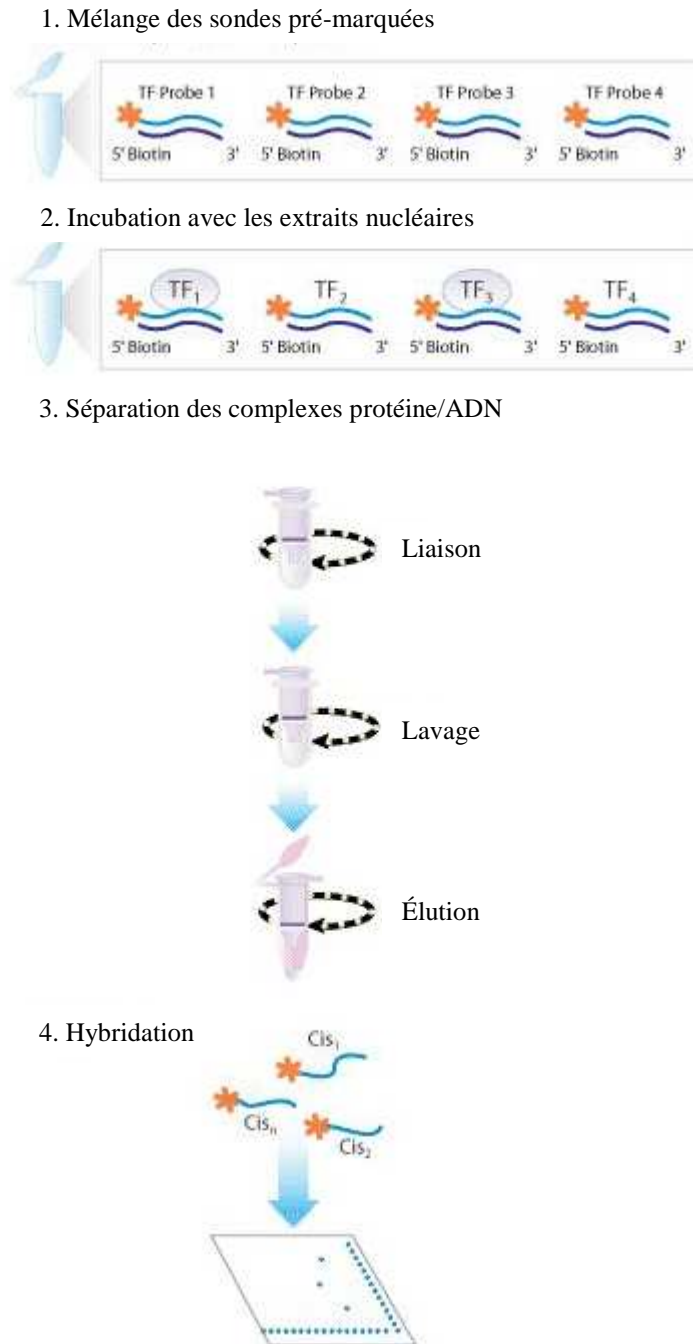


Figure 42 : Représentation schématique de l'expérience de « puces à facteurs de transcription ».

Les sondes, séquences ADN consensus correspondant aux éléments de réponse des facteurs de transcription à étudier, sont préalablement marquées à la biotine, puis sont mises en contact avec les extraits nucléaires. Les complexes ADN/protéines se forment, puis l'ensemble est déposé sur une colonne permettant d'éliminer par lavage les sondes non hybridées. L'élué permet de récupérer les complexes ADN/protéines, puis ceux-ci sont dissociés. Enfin, les sondes marquées libérées des protéines sont ajoutées sur une membrane où sont disposées des séquences ADN complémentaires aux séquences des sondes.

D'après <http://www.panomics.com>

8.1.4 Réalisation

Dans un premier temps, les membranes sont conditionnées par ajout de 25 ml de tampon de prétraitement I à 45°C pendant 5 minutes, puis de 25 ml de tampon de prétraitement II à 45°C pendant 10 minutes. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois 30 secondes avec de l'eau distillée, puis incubées pendant 2 heures à 42°C avec du tampon d'hybridation. Les extraits nucléaires (5 µg) sont mis en contact avec les sondes marquées pendant 30 minutes à 15°C. Afin d'éliminer les sondes qui n'ont pas fixé de protéines, les échantillons sont placés sur une colonne préalablement conditionnée avec du tampon d'incubation. Les colonnes sont incubées 30 minutes dans la glace, puis différents lavages permettent d'éliminer les sondes restées libres. Enfin, un tampon d'éluion est ajouté, et une centrifugation d'une minute à 9700g permet de recueillir les sondes marquées liées aux facteurs de transcription. Les sondes marquées sont dénaturées par chauffage à 95°C pendant 3 minutes, puis sont déposées 2 minutes dans la glace. La dernière étape, l'hybridation, met en contact les sondes marquées et les séquences ADN complémentaires fixées sur la membrane pendant une nuit à 42°C. Le lendemain, après plusieurs lavages, les membranes sont incubées pendant 15 minutes avec du tampon de blocage à température ambiante, puis 20 µl de conjugué streptavidine-HRP sont ajoutés sur chaque membrane pendant 15 minutes à température ambiante. Après 3 lavages successifs de 8 minutes à température ambiante avec du tampon de lavage, 20 ml de tampon de détection sont ajoutés, et les membranes sont incubées 5 minutes à température ambiante. Enfin, 250 µl de solution I, 250 µl de solution II, et 2 ml de solution III sont ajoutés sur les membranes. Celles-ci sont placées entre 2 feuilles plastiques, dans une cassette à fond noir, avec un film autoradiographique. Le temps d'exposition est ajusté afin que les spots correspondant aux contrôles positifs présentent un signal d'intensité égale tout en minimisant le bruit de fond. Un exemple de résultat d'une puce à facteurs de transcription est présenté sur la **Figure 43**.

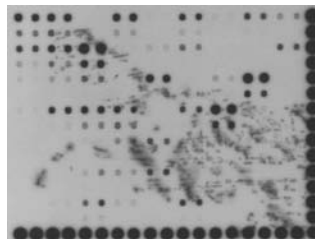


Figure 43 : Exemple de révélation par film autoradiographique d'une puce à facteurs de transcription (TranSignal Protein/DNA Array I). Les témoins positifs sont situés au niveau de la dernière colonne et de la dernière ligne.

8.2 Mesure de l'activation de facteurs de transcription par méthode immunoenzymatique (TransAm[®])

L'étude des effets des rétinoïdes sur l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et NF-IL-6 a été réalisée par une méthode ELISA (TransAm[®], Active Motif Europe, Rixensart, Belgique), à partir de protéines nucléaires extraites de chondrocytes de rat ou humains, ou de fibroblastes synoviaux de rat. Cette méthode fait appel à la technologie « sandwich » dans laquelle le facteur de transcription se lie à un oligonucléotide correspondant à la séquence consensus de son élément de réponse, immobilisé au fond d'un puits de plaque de microtitration, puis est révélé à l'aide d'un anticorps primaire et d'un conjugué marqué à la peroxydase du raifort (HRP).

Brièvement, entre 2 et 10 μ g de protéines nucléaires extraites et dosées par les techniques mentionnées précédemment (*cf.* 8.1.1 et 8.1.2), contenant les facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et NF-IL-6 sont ajoutés dans un volume de 20 μ l dans un puits d'une plaque 96 puits, où sont fixés des oligonucléotides correspondant à l'élément de réponse à AP-1 TRE (TPA-response element, 5'-TGAGTCA-3'), à l'élément de réponse à NF- κ B (5'-GGGACTTTC-3') et à l'élément de réponse à NF-IL-6 (5'-GCAAT-3'). Après une heure d'incubation à température ambiante sous légère agitation, les puits sont lavés trois fois avec du tampon de lavage (100 mM PBS à pH 7,5, 500 mM de NaCl et 1 % de Tween 20), puis sont incubés pendant une heure à température ambiante avec un anticorps primaire dirigé contre c-Jun (1:500^{ème}), c-Fos (1:1000^{ème}), p65 (NF- κ B) (1:1000^{ème}) ou contre NF-IL-6 (1:1500^{ème}). Après 3 autres lavages, la présence des complexes éléments de réponse / NF- κ B ou NF-IL-6 ou AP-1 est révélée par une incubation d'une heure à température ambiante avec un anticorps secondaire conjugué à l'HRP. Après 4 derniers lavages, 100 μ l de solution de développement (solution du substrat 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine dilué dans du DMSO à 1 %) sont ajoutés à chaque puits et la réaction est stoppée après 5 minutes d'incubation dans l'obscurité par l'ajout de 100 μ l d'H₂SO₄ à 0,5 M. La quantité de protéines NF- κ B (p65), NF-IL-6 ou AP-1 (c-Jun ou c-Fos) contenue dans les extraits nucléaires est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 450 nm sur le lecteur de microplaques Multiskan[™] (Labsystems). La spécificité de cette expérience est contrôlée par la démonstration que l'addition d'un excès de sonde native (20 pmol/puits) inhibe la liaison des facteurs de transcription au fond des puits, alors qu'un excès de sonde mutée est inactif sur la fixation des facteurs de transcription dans les puits.

9 Mesure de l'activité Histone Désacétylase

L'activité Histone Désacétylase (HDAC) a été étudiée dans des protéines nucléaires extraites de fibroblastes synoviaux de rat par une méthode colorimétrique (BioVision, Mountain View, Californie, USA), selon les recommandations du fournisseur. Dans ce kit, les échantillons sont incubés avec un substrat chromogénique comportant une chaîne latérale de lysines acétylées. La désacétylation de ce substrat génère un chromophore qui réagit avec la solution de développement (« Lysine Developer ») pour produire une coloration jaune dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie.

Brièvement, 10 µg d'extraits de protéines nucléaires ou totales sont dilués dans 85 µl d'eau et sont déposés dans un puits de plaque 96 puits. Des contrôles positifs (extraits nucléaires de cellules HeLa fournis dans le kit, connus pour développer une forte activité HDAC), ainsi que des contrôles négatifs (échantillon de l'expérimentation auquel est ajouté de la trichostatine, inhibiteur d'activité HDAC) sont également déposés dans les puits voisins. Après avoir ajouté le tampon de réaction contenant le substrat acétylé, la plaque est incubée pendant une heure à 37°C. Ensuite, la réaction de désacétylation est stoppée par ajout de 10 µl de lysine developer. Après une incubation supplémentaire de 30 minutes à 37°C, l'intensité de la coloration est mesurée sur un lecteur de microplaques à 405 nm. L'activité HDAC (µM de produit formé/mg de protéines nucléaires/minute) est calculée grâce à une gamme de standard désacétylé réalisée dans les mêmes conditions que l'expérience.

10 Invalidation de l'expression des isotypes RAR par la technique des siRNA

10.1 Dessin des siRNAs

Les siRNAs, ARNs double brins de 19 paires de bases, ont été dessinés par la société Eurogentech (Seraing, Belgique), et les séquences utilisées sont les suivantes (5'-3') :

-RAR-α : GCA-GUU-UCG-GAA-GAG-AUA-G / ACU-AUC-UCU-UCC-GAA-CUG-C

-RAR-β : CUA-GCU-ACU-GGC-UUC-AAG-A / UCU-UGA-AGC-CAG-UAG-CUA-G

-RAR-γ : GCC-UUC-UUC-CUU-UAC-CUC-C / GGA-GGU-AAA-GGA-AGA-AGG-C

Ils sont conservés à -20°C, aliquotés à 0,2 µg/ml, soit 10 µM.

10.2 Transfection transitoire

Lorsque les fibroblastes synoviaux de rat atteignent 50 % de confluence, ils sont transfectés avec de l'X-tremeGENE (Roche Molecular). Ce polymère possède une très grande densité de charge cationique et permet une complexation de l'ARN par formation de liaisons ioniques. Lorsqu'un excès de polymère est ajouté à l'ARN, des complexes macromoléculaires chargés positivement sont formés et ces lipoplexes sont alors capables d'interagir avec les membranes plasmiques des cellules, avant d'être endocytés.

La transfection est réalisée avec des siRNA-RAR- α , - β et - γ à une concentration finale de 40 nM, dans du milieu de culture dépourvu de SVF, d'antibiotiques et d'antifongique. Le réactif X-tremeGENE est dilué dans ce milieu de culture, puis il est ajouté au tube contenant les siRNAs également dilués dans du milieu de culture sans SVF. Le mélange est incubé 15 minutes avant d'être réparti dans les plaques de culture préalablement lavées au PBS. Deux heures plus tard, le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu de culture à 2 % de SVF. 24 heures plus tard, les cellules sont stimulées par IL-1 β en présence ou non d'ATRA pendant 6 heures.

11 Étude statistique

Les données sont exprimées par la moyenne \pm écart-type pour trois expériences indépendantes. Les comparaisons entre les échantillons ont été réalisées par l'analyse de la variance (ANOVA), suivie d'un test *post-hoc* de Fischer PLSD (protected least-square difference), grâce au logiciel Statview[®] 5.0 (SAS Institute Inc., USA). Une valeur de P inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.





Résultats

Chapitre 1 : Études préliminaires

1 Caractérisation des populations cellulaires

1.1 Population synoviocytaire

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les phénotypes des cellules en culture, afin de nous assurer qu'il s'agissait de fibroblastes synoviaux et que la culture n'était pas contaminée par des macrophages. Nous avons donc mesuré les niveaux d'ARNm de la synovioline et de la cadhérine-11 (marqueurs des synoviocytes) et du CD14 (marqueur des macrophages) (**Figure 44**). Les fibroblastes synoviaux de rat (**Figure 44A**) ou humains (**Figure 44C**) en passage P4 expriment de façon importante la synovioline et la cadhérine-11, mais très peu le marqueur macrophagique CD14. Dans les synoviales de rat, choisies comme représentatives des cellules synoviales résidentes (macrophages et synoviocytes), l'expression de CD14 est importante, comme celles de la synovioline et de la cadhérine-11 (**Figure 44B**). Ces résultats confirment que notre population cellulaire est représentative de fibroblastes synoviaux, ce qui est cohérent avec le pourcentage très faible de cellules de type macrophagique rapporté après plusieurs repiquages successifs de cellules par digestion enzymatique de tissu synovial (Bonnet C. *et al.*, 1995, Fahmi H. *et al.*, 2002).

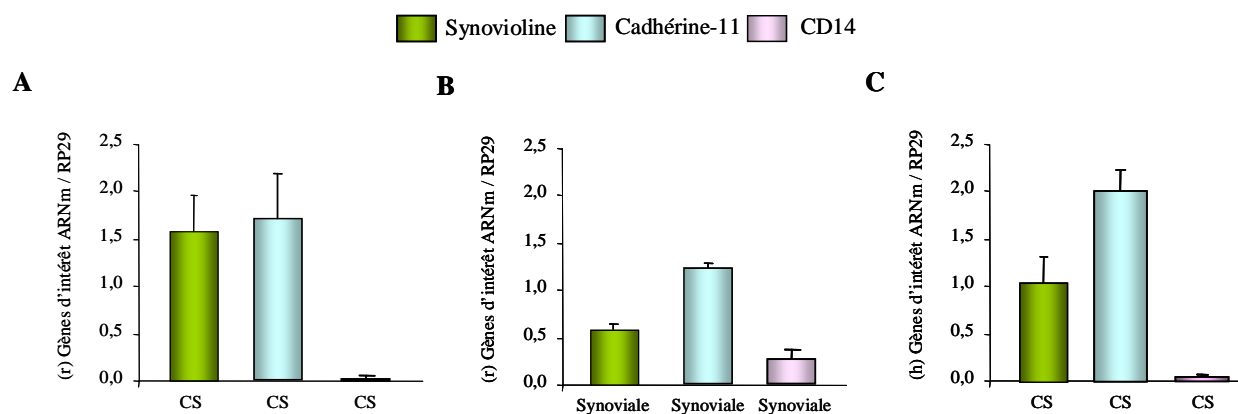


Figure 44 : Caractérisation de la population cellulaire synoviocytaire.

Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules synoviales (CS) de rat (A), de synoviales de rat (B) ou de cellules synoviales humaines (C) en 4^{ème} passage ou de synoviales de rat non inflammatoires, puis ont été mesurés par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm de trois points expérimentaux indépendants de la synovioline et de la cadhérine-11 (marqueurs des synoviocytes) ou du CD-14 (marqueur cellulaire de surface des cellules macrophagiques) normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29.

1.2 Population chondrocytaire

Nous avons également étudié le phénotype des populations chondrocytaires en mesurant les niveaux d'ARNm des collagènes de type IIA1 (marqueur des chondrocytes), IA2 (marqueur des chondrocytes dédifférenciés) et XA1 (marqueur des chondrocytes hypertrophiques). Les chondrocytes de rat en passage P2 expriment de façon importante le collagène de type II, très peu le collagène de type I et pas du tout le collagène de type X (**Figure 45A**). Ceci démontre que cette population cellulaire est exempte de chondrocytes hypertrophiques ou dédifférenciés. Dans les chondrocytes humains, le collagène de type II est également exprimé de façon importante, alors que le collagène de type X n'a pas été détecté (**Figure 45B**). Cependant, nous avons également observé une forte expression du collagène de type I (**Figure 45B**). Ces résultats suggèrent que la population humaine comprend des cellules dédifférenciées, ce qui peut s'expliquer par l'origine arthrosique des prélèvements.

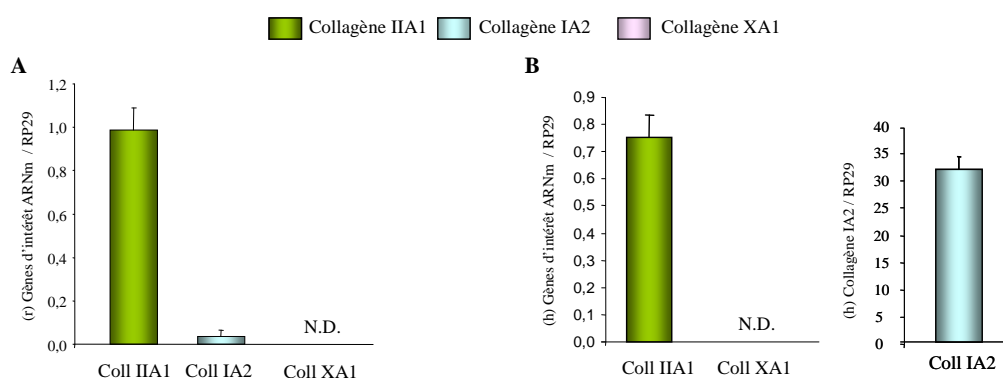


Figure 45 : Caractérisation de la population cellulaire chondrocytaire.

Les ARN totaux ont été extraits à partir de chondrocytes de rat (A) ou humains (B) en 2^{ème} passage puis ont été mesurés par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm de trois points expérimentaux indépendants des collagènes de type IA2, IIA1 et XA1 (respectivement marqueurs des chondrocytes dédifférenciés, « normaux » et hypertrophiques) normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. ND : non détectable.

2 Vérification de la fonctionnalité de l'ATRA et du 9-cis RA dans notre système expérimental

Dans un second temps, nous avons vérifié la fonctionnalité des principaux rétinoïdes utilisés, par la mesure de leur capacité à induire l'expression de gènes cibles. Les fibroblastes synoviaux de rat ont été incubés pendant 6 heures en présence de 1 μ M d'ATRA ou de 9-cis RA, concentrations utilisées par la suite dans nos expériences. Comme le montre la **Figure 46**, le 9-cis RA et l'ATRA induisent fortement l'expression du gène cible de RAR, RAR- β , par rapport au témoin (respectivement 25 et 35 fois). Ces résultats démontrent que, aux

concentrations utilisées, l'ATRA et le 9-cis RA sont bien capables de déclencher des événements RAR dépendants.

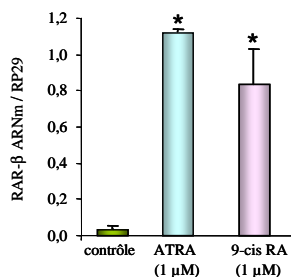


Figure 46 : Effet des rétinoïdes sur l'expression de RAR-β (gène cible RAR).

Les cellules sont incubées pendant 6 heures en présence d'1 μM d'ATRA ou de 9-cis RA. Le niveau d'ARNm de RAR-β est mesuré par RT-PCR en temps réel et normalisé sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type de trois valeurs. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$.

3 Tests de viabilité cellulaire

Comme le montre la **Figure 47**, ni l'ATRA, ni le 9-cis RA, ni le BMS-649 n'induisent de mortalité significative aux concentrations choisies dans les différents types cellulaires : fibroblastes synoviaux de rat (**Figure 47A**) ou humains (**Figure 47B**), chondrocytes de rat (**Figure 47C**) ou humains (**Figure 47D**).

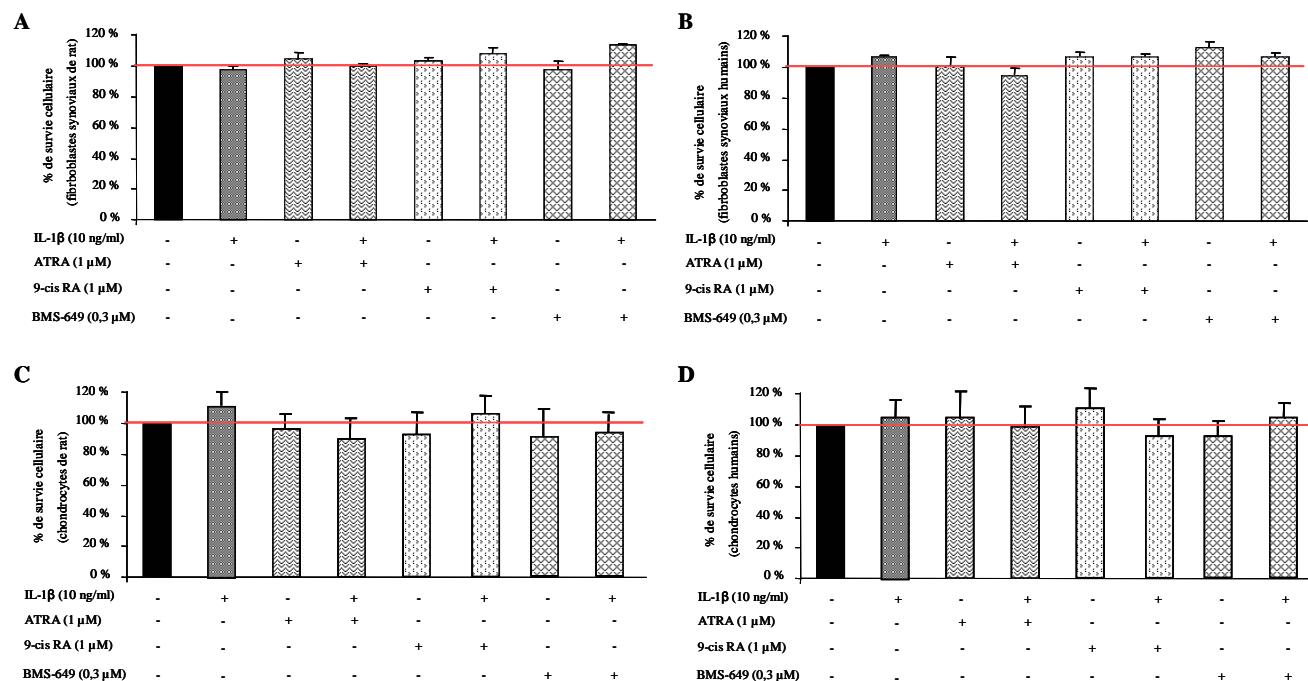


Figure 47 : Effet des rétinoïdes sur la viabilité de cellules articulaires stimulées par de l'IL-1 recombinante homologue.

(A) fibroblastes synoviaux de rat, (B) fibroblastes synoviaux humains, (C) chondrocytes de rat, (D) chondrocytes humains.

Les cellules sont stimulées pendant 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue, en présence ou non d'1 μM d'ATRA, d'1 μM de 9-cis RA ou de 0,3 μM de BMS-649. Puis le réactif MTT est ajouté pendant 4 heures supplémentaires, et la lecture de l'absorbance à 580 nm est effectuée après 24 heures de dissolution des cristaux de formazan dans du SDS/DMF. Les résultats sont représentés en pourcentage de survie des cellules par rapport aux cellules témoins.

Chapitre 2 : Étude des potentialités anti-cytokines des rétinoïdes dans les fibroblastes synoviaux de rat

1 Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des récepteurs RAR et RXR

1.1 Récepteurs RAR

Comme présenté dans la **Figure 48**, tous les isotypes de RAR sont exprimés sous forme de transcrits (ARNm) (**Figure 48A**) et de protéines (**Figure 48B**) dans les fibroblastes synoviaux de rat, en conditions basales. En réponse à une stimulation de 6 à 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue, leur expression est diminuée de 30 à 55 % pour l'isotype - α , de 15 à 60 % pour l'isotype - β et de 10 à 25 % pour l'isotype - γ .

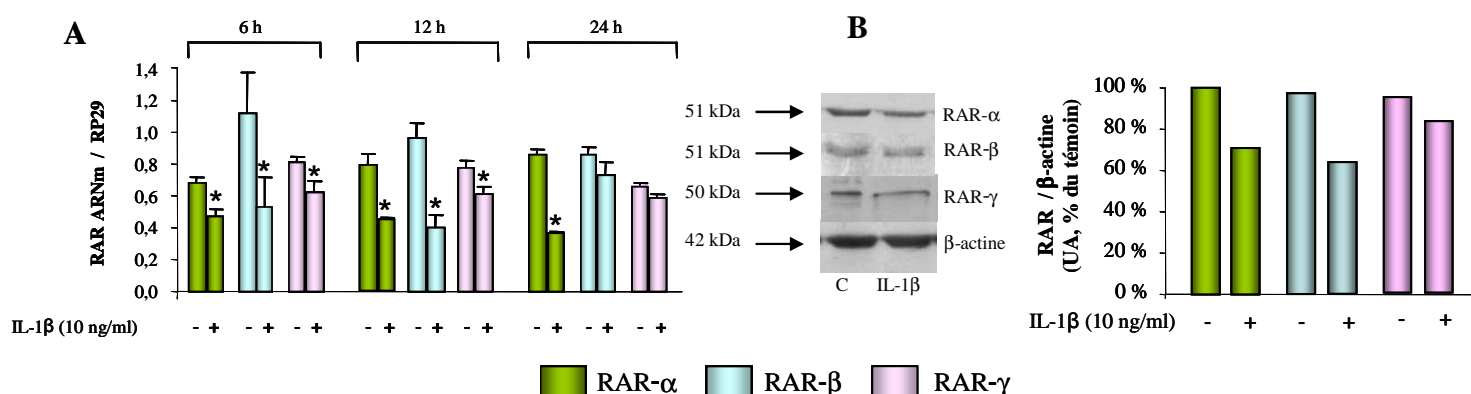


Figure 48 : Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des isotypes RAR dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 6, 12 ou 24 heures pour l'expression génique (A) et pendant 24 heures (C pour contrôle) pour l'expression protéique (B). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm quantifiés par RT-PCR en temps réel de trois points expérimentaux indépendants, normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$. Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'expression des protéines RAR- α , RAR- β et RAR- γ normalisée sur celle de la β -actine (B).

1.2 Récepteurs RXR

Les récepteurs RXR- α et RXR- β sont également exprimés en conditions basales dans les fibroblastes synoviaux de rat sous forme de transcrits (ARNm) (**Figure 49A**) et de protéines (**Figure 49C**). L'expression de RXR- α et RXR- β n'est pas affectée par la stimulation par l'IL-1 β . En revanche, l'isotype RXR- γ n'a pu être mis en évidence par aucune des techniques

employées (**Figure 49B**). Les amorces utilisées pour étudier l'expression de RXR- γ par PCR ont été testées avec succès sur des tissus (cortex, tissu adipeux, de cœur) connus pour exprimer l'isoforme - γ (**Figure 49B**) ce qui démontre que l'absence d'expression synoviocytaire de RXR- γ n'est pas due à un manque de spécificité des amorces.

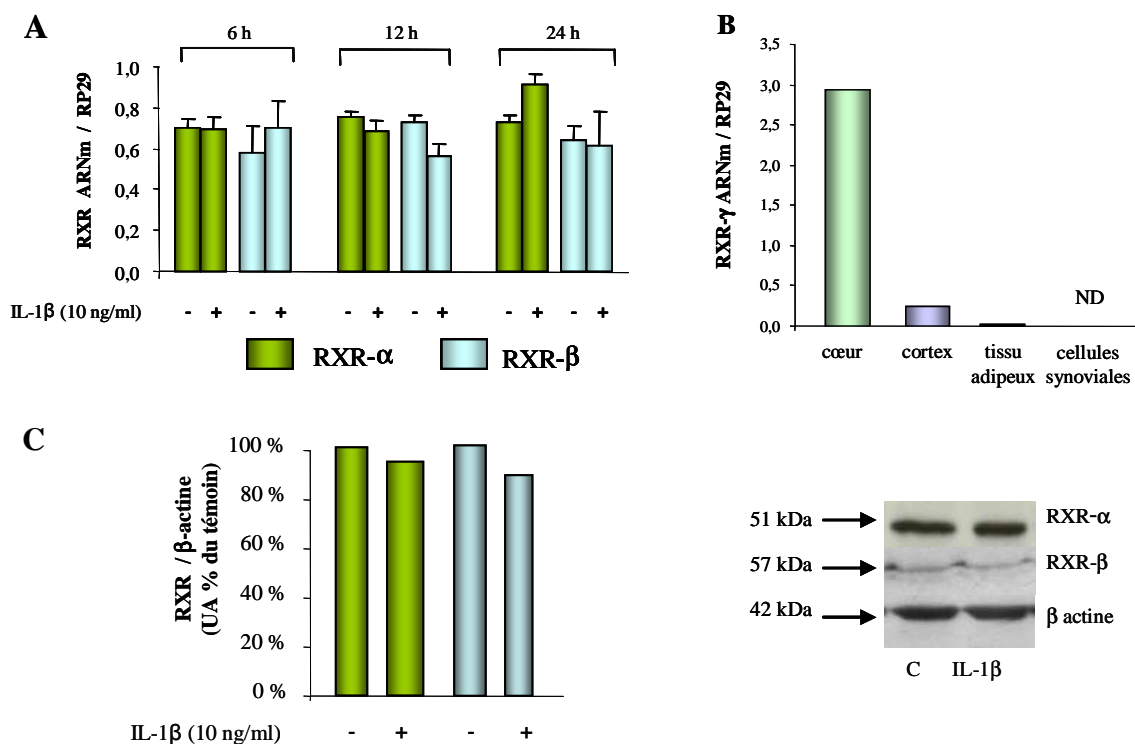


Figure 49: Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des isotypes RXR dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 6, 12 ou 24 heures pour l'expression génique (A) et pendant 24 heures (C pour contrôle) pour l'expression protéique (C). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm quantifiés par RT-PCR en temps réel de trois points expérimentaux indépendants, normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'expression des protéines RXR- α et RXR- β normalisée sur celle de la β -actine (C). (B) Contrôle de l'expression génique de RXR- γ dans des tissus cibles chez le rat, et absence d'expression dans les cellules synoviales (non détectable : ND).

2 Effet des rétinoïdes sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires

2.1 Effet de l'acide 9-cis rétinoïque (9-cis RA, co-agoniste RAR/RXR)

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du rétinoïde activant à la fois les récepteurs RAR et RXR, le 9-cis RA, dans notre système. Les fibroblastes synoviaux de rat ont été stimulés pendant 6 ou 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M de 9-cis RA (**Figure 50**). Les niveaux d'ARNm correspondant à

l'IL-1 β , au TNF- α , et à l'IL-6, ainsi que les médiateurs correspondants ne sont pas détectés en conditions basales, mais sont fortement exprimés en réponse à l'IL-1 β . Bien que les niveaux d'ARN stimulés par l'IL-1 β du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 semblent comparables, le taux d'induction de ces gènes par l'IL-1 β est cependant 11 fois supérieur pour l'IL-6 que pour le TNF- α , et 55 fois plus élevé pour l'IL-6 que pour l'IL-1 β . De plus, en réponse à l'IL-1, la production de cytokines est 1000 fois supérieure pour l'IL-6 que pour le TNF- α .

Le 9-cis RA n'affecte ni le niveau basal des ARNm des gènes d'intérêt (**Figure 50A**) ni de la production des médiateurs correspondants (**Figure 50B**). En revanche, dans les fibroblastes synoviaux stimulés par l'IL-1 β , le 9-cis RA diminue l'expression du TNF- α , de l'IL-6 ou de l'IL-1 β de 70 à 80 %, et la production de TNF- α ou d'IL-6 de 30 à 80 % par rapport aux contrôles. Dans notre système expérimental, la production d'IL-1 β n'a pas pu être mesurée à cause du stimulus utilisé (IL-1 β recombinante homologue).

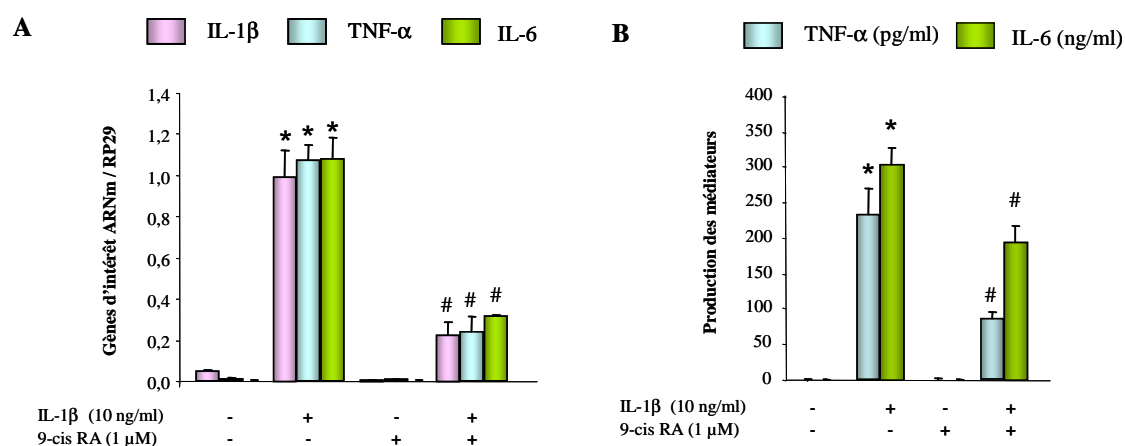


Figure 50 : Effet de l'acide 9-cis rétinolique sur les cytokines induites par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 6 heures (expression génique) ou 24 heures (production des médiateurs), en présence ou non d'1 μ M de 9-cis RA (co-agoniste RAR/RXR). Le niveau d'ARNm du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β est mesuré par RT-PCR en temps réel et normalisé sur celui de la protéine ribosomale RP29 (A), et la production de TNF- α (pg/ml) et d'IL-6 (ng/ml) est étudiée par dosage ELISA dans les surnageants de culture (B). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$, et par rapport aux cellules stimulées par de l'IL-1 β par le symbole # : $P < 0,05$.

2.2 Effet d'une co-stimulation par l'acide 9-cis rétinolique (9-cis RA) et un agoniste PPAR- γ (Rosi)

Comme PPAR est l'hétéropartenaire de RXR, nous avons recherché si un agoniste PPAR- γ (rosiglitazone ou Rosi) pouvait potentialiser les effets anti-cytokines du 9-cis RA. Les fibroblastes synoviaux de rat ont été stimulés pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non de 10 μ M de Rosi et/ou 1 μ M de 9-cis RA (**Figure 51**). La concentration de 10 μ M de rosiglitazone (Rosi) a déjà été démontrée au laboratoire comme étant susceptible d'activer les PPARs dans les cellules articulaires de rat (Bianchi A. *et al.*, 2005, Moulin D. *et al.*, 2005). La stimulation des cellules par l'IL-1 β induit l'expression des deux cytokines pro-inflammatoires étudiées (TNF- α et IL-6). La Rosi seule n'a pas d'effet sur l'expression induite du TNF- α (**Figure 51A**), alors qu'elle augmente l'expression induite de l'IL-6 d'environ deux fois (**Figure 51B**). Le 9-cis RA seul inhibe l'expression induite des deux cytokines, de 30 à 50 % (**Figure 51A et B**), mais le co-traitement par la Rosi et le 9-cis RA ne potentialise pas son effet inhibiteur sur l'expression du TNF- α et antagonise même son effet sur l'expression de l'IL-6. Cette expérience démontre que le 9-cis RA et la Rosi n'agissent pas de façon synergique sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires et qu'ils peuvent même exercer des effets contraires. Ceci suggère que l'action anti-cytokine du 9-cis RA serait indépendante de PPAR.

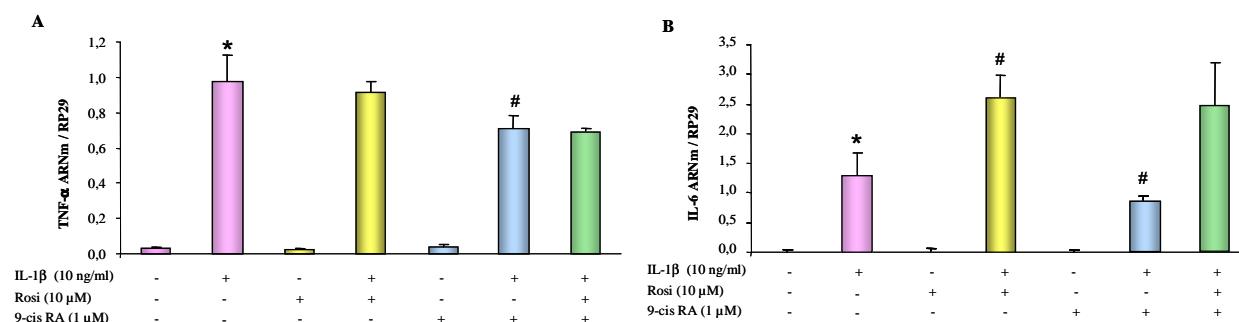


Figure 51 : Effet du co-traitement par la rosiglitazone (Rosi) et l'acide 9-cis rétinolique (9-cis RA) sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 6 heures en présence ou non de 10 μ M de Rosi (agoniste PPAR- γ) et/ou d'1 μ M de 9-cis RA (co-agoniste RAR/RXR). Les niveaux d'ARNm du TNF- α (A) et de l'IL-6 (B) sont mesurés par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des valeurs issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$, et par rapport aux cellules stimulées par l'IL-1 β par le symbole # : $P < 0,05$.

2.3 Effet de l'acide tout-trans rétinolique (ATRA, agoniste RAR) et du BMS-649 (agoniste RXR)

Les résultats précédents ayant démontré que le 9-cis RA diminuait la production induite de cytokines pro-inflammatoires indépendamment de PPAR, nous avons étudié la contribution respective des récepteurs RAR et RXR dans cet effet.

Les fibroblastes synoviaux de rat ont été stimulés pendant 6 ou 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue, en présence ou non d'un agoniste RAR, l'ATRA, et/ou d'un agoniste RXR, le BMS-649. L'ATRA et/ou le BMS-649 ne modifient pas l'expression basale des gènes d'intérêt (**Figure 52A et A'**), ni la production des médiateurs correspondants (**Figure 52B et B'**). Dans les fibroblastes synoviaux stimulés par IL-1 β , l'ATRA (agoniste RAR) diminue l'expression (ARNm) des trois cytokines de 70 à 80 % (**Figure 52A et A'**) ainsi que la production des médiateurs correspondants de 30 à 80 % (**Figure 52B et B'**). Le BMS-649 (agoniste RXR) n'induit qu'un effet inhibiteur faible sur l'expression et la production du TNF- α (25 %) et sur l'expression de l'IL-1 β (35 %), et ne modifie ni l'expression ni la production d'IL-6. Une co-incubation par l'ATRA et le BMS-649 amène à des résultats identiques par rapport à une stimulation par l'ATRA seul sur l'expression des cytokines, ou même augmente la production d'IL-6 (**Figure 52A, A', B et B'**). Ces résultats suggèrent que l'effet anti-cytokine du 9-cis RA ne serait pas secondaire à l'activation du dimère PPAR/RXR, car dans ce cas le BMS-649 aurait dû reproduire ces effets. Il semble également que l'effet inhibiteur du 9-cis RA ne soit pas dû au dimère RAR/RXR, auquel cas la co-stimulation par l'ATRA et le BMS-649 aurait potentialisé l'effet inhibiteur de l'ATRA.

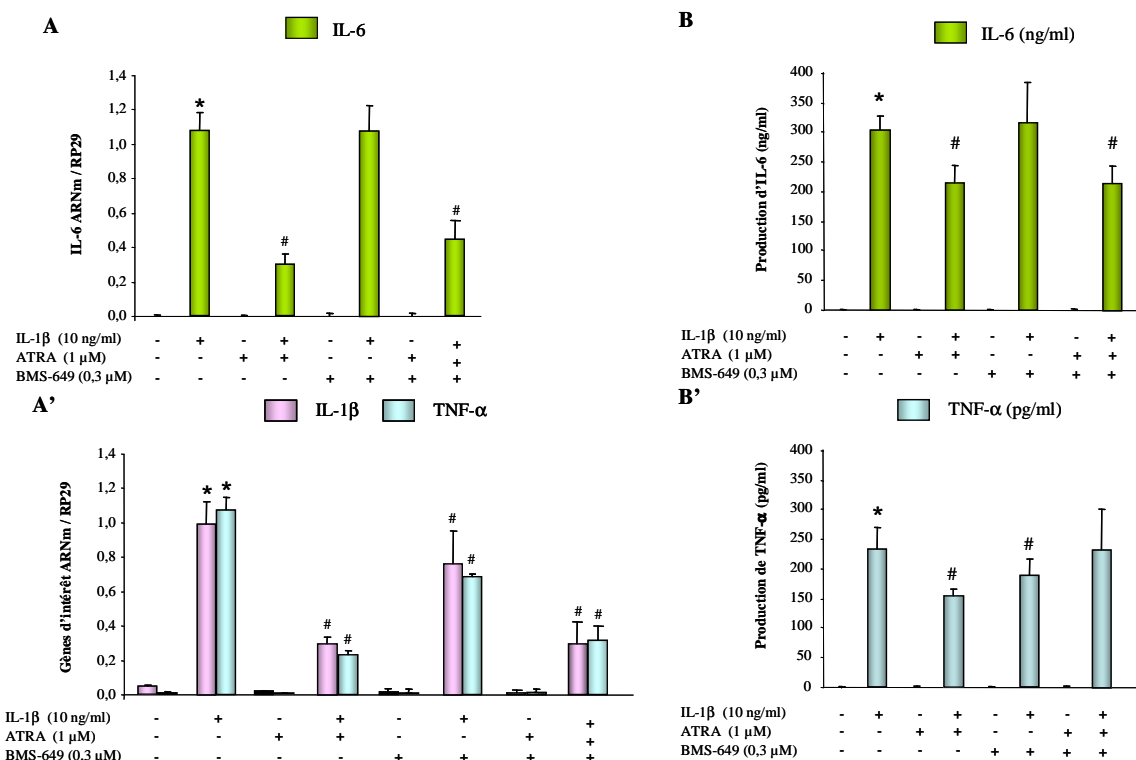


Figure 52 : Effet des rétinoïdes sur les cytokines induites par l'IL-1β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue pendant 6 heures (expression génique) ou 24 heures (production des médiateurs), en présence ou non d'1 μM d'ATRA (agoniste RAR) et/ou de 0,3 μM de BMS-649 (agoniste RXR). Les niveaux d'ARNm du TNF-α, de l'IL-1β (A) et de l'IL-6 (A') sont mesurés par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29 et les productions de l'IL-6 (ng/ml) (B) et du TNF-α (pg/ml) (B') sont étudiées par dosage ELISA dans les surnageants de culture. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type des valeurs issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : P<0,05, et par rapport aux cellules stimulées par de l'IL-1β par le symbole # : P<0,05.

2.4 Effet dose de l'ATRA

L'effet inhibiteur de l'ATRA étant comparable à celui du 9-cis RA, nous avons exploré les potentialités pharmacologiques liées à l'activation des récepteurs RAR. Les fibroblastes synoviaux de rat ont été stimulés pendant 6 ou 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue en présence ou non de concentrations croissantes d'ATRA (Figure 53). L'IL-1β induit l'expression du TNF-α (Figure 53A), de l'IL-6 (Figure 53B) et de l'IL-1β (Figure 53C), dont ni les transcrits ni les médiateurs ne sont détectés en conditions basales. L'ATRA exerce un effet inhibiteur dose-dépendant sur l'expression induite des transcrits des cytokines, mais également, à partir d'1 μM, sur la production des médiateurs correspondants.

Pour la suite des expériences, nous avons choisi la dose d'1 μM , qui permet d'obtenir un effet inhibiteur significatif sur l'expression et la production des cytokines étudiées, tout en limitant la probabilité d'apparition d'effets non spécifiques (indépendants d'une cytotoxicité, cf. **Figure 47**) associés aux fortes concentrations de ligands.

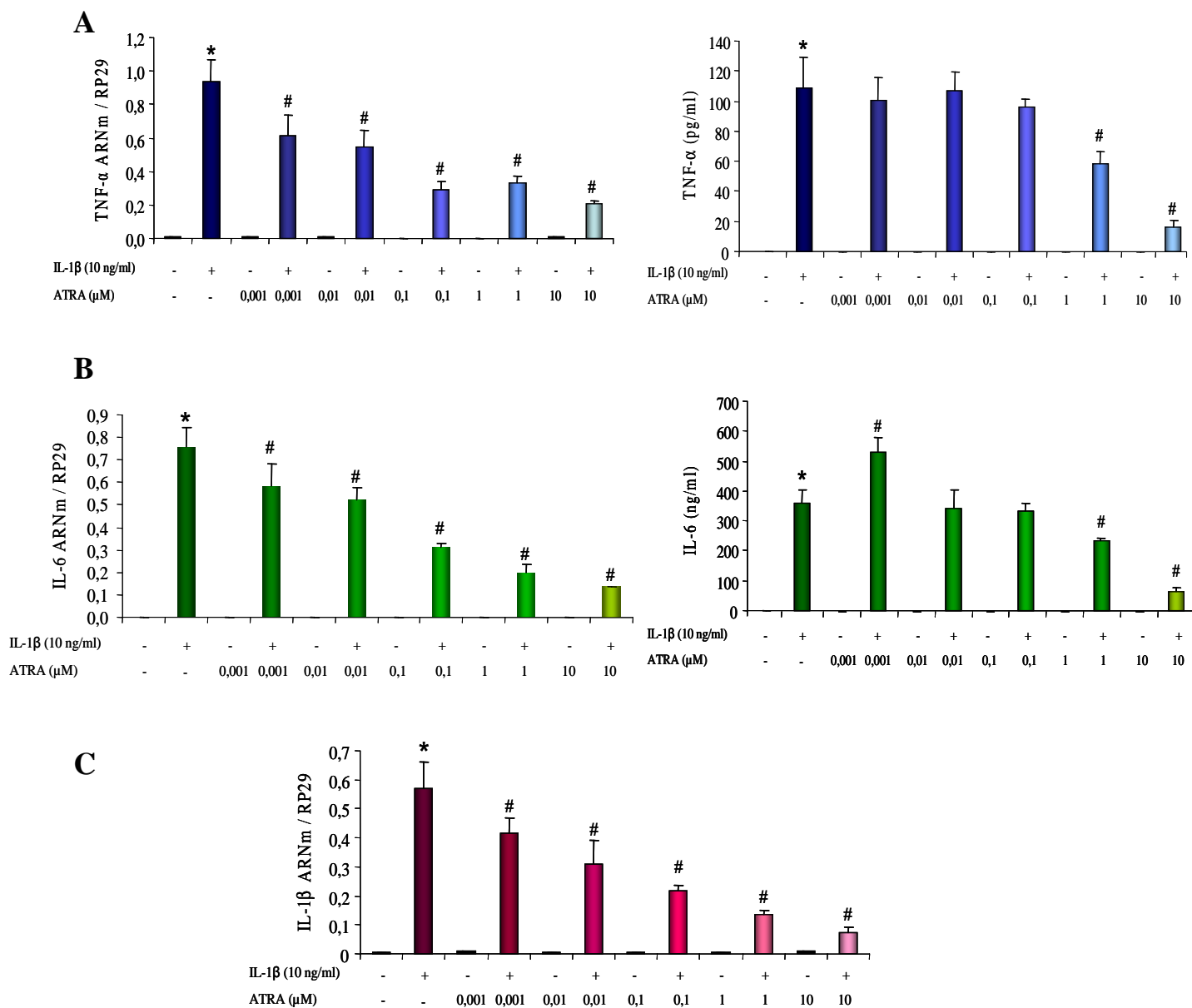


Figure 53 : Effet-dose de l'ATRA sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 6 heures (expression génique) ou 24 heures (production des médiateurs) en présence ou non d'ATRA (0,001 à 10 μM). Les niveaux d'ARNm du TNF- α (A), de l'IL-6 (B) et de l'IL-1 β (C) sont quantifiés par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. La production de TNF- α et d'IL-6 est mesurée par dosage ELISA dans les surnageants de culture (A et B). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm ou des médiateurs de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$, et par rapport aux cellules stimulées par de l'IL-1 β par le symbole # : $P < 0,05$.

3 Effet de l'ATRA sur la régulation des cytokines pro-inflammatoires induites l'IL-1 β

3.1 Effet de l'ATRA sur la régulation transcriptionnelle

Nous avons ensuite cherché à savoir si les effets inhibiteurs de l'ATRA pouvaient être dus à une modification de la stabilité des ARNm du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β . Le **Tableau 10** confirme l'effet inducteur de l'IL-1 β et l'effet inhibiteur de l'ATRA sur les expressions du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β au temps 0 (T0). Après 3 heures d'incubation (T3) avec de l'actinomycine (ACTD), tous les niveaux d'ARNm sont diminués par rapport à ceux mesurés à T0, ce qui correspond à la dégradation naturelle des ARNm au cours du temps. Cependant, le pourcentage de décroissance des ARNm est comparable que les échantillons stimulés par l'IL-1 aient été ou non incubés avec l'ATRA (environ 97 % pour le TNF- α , 63 % pour l'IL-1 β et 20 % pour l'IL-6). Ceci indique que l'inhibition de l'expression induite du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β par l'ATRA ne résulte pas d'une diminution de la stabilité des ARNm correspondants.

Tableau 10 : Effet de l'ATRA sur la régulation transcriptionnelle impliquée dans la répression des cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont pré-stimulées pendant 4 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. La transcription est alors stoppée au temps 0 (T0) par l'addition de 3 μ M d'actinomycine D (ACTD), et les niveaux d'ARNm du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β sont évalués au temps 0 (T0) et après 3 heures (T3) par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARN de trois points expérimentaux indépendants.

ACTD	TNF- α ARNm / RP29		IL-6 ARNm / RP29		IL-1 β ARNm / RP29	
	T 0	T 3	T 0	T 3	T 0	T 3
Témoin	0,32 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	24 $10^{-5} \pm 4 10^{-5}$	8 $10^{-5} \pm 1 10^{-5}$	0,07 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01
IL-1 β	5,61 \pm 1,17	0,14 \pm 0,02	0,72 \pm 0,18	0,59 \pm 0,05	1,40 \pm 0,49	0,50 \pm 0,08
ATRA + IL-1 β	2,37 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	0,12 \pm 0,02	0,32 \pm 0,05	0,12 \pm 0,02

3.2 Effet de l'ATRA sur la régulation traductionnelle

Afin d'examiner si l'effet suppresseur de l'ATRA sur les expressions induites du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β est dépendante ou non d'une synthèse protéique *de novo*, les fibroblastes synoviaux ont été stimulés pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante

homologue, en présence ou non d'1 μM d'ATRA et de 30 μM de cycloheximide (CHX, inhibiteur de l'étape de traduction). Le **Tableau 11** confirme les effets opposés de l'IL-1 β et de l'ATRA sur l'expression du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β , mais démontre également que l'effet stimulant de l'IL-1 β est inhibé par le CHX, et requiert donc une néo-synthèse protéique. Par conséquent, il n'est pas possible d'interpréter les résultats de l'ATRA en présence du CHX, puisque le stimulus cytokinique n'est plus efficace.

Tableau 11 : Effet de l'ATRA sur la régulation traductionnelle des cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 β .

Les fibroblastes synoviaux sont stimulés pendant 6 heures (T6) par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μM d'ATRA et 30 μM de cycloheximide (CHX). Les niveaux d'ARNm du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β sont évalués par RT-PCR en temps réel et normalisés par celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARN de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par * : $P < 0,05$, par rapport aux cellules stimulées par IL-1 β , par # : $P < 0,05$, par rapport aux cellules non stimulées par IL-1 β et traitées par CHX, par † : $P < 0,05$.

CHX	TNF- α ARNm / RP29		IL-6 ARNm / RP29		IL-1 β ARNm / RP29	
	T 6 (sans CHX)	T 6 (avec CHX)	T 6 (sans CHX)	T 6 (avec CHX)	T 6 (sans CHX)	T 6 (avec CHX)
Témoin	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
IL-1 β	1,32 \pm 0,12 *	0,35 \pm 0,01 †	0,74 \pm 0,01 *	0,03 \pm 0,01 †	1,26 \pm 0,10 *	0,03 \pm 0,01 †
ATRA	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,03 \pm 0,03	0,01 \pm 0,01
ATRA + IL-1 β	0,29 \pm 0,03 #	0,31 \pm 0,01	0,30 \pm 0,04 #	0,02 \pm 0,04	0,23 \pm 0,02 #	0,03 \pm 0,01

4 Effet de l'ATRA sur l'ensemble des facteurs de transcription activés par l'IL-1 β

La capacité de l'ATRA à supprimer les effets activateurs de l'IL-1 β sur de nombreux facteurs de transcription a été étudiée par la technique des puces à oligonucléotides. Les fibroblastes synoviaux de rat sont stimulés pendant 30 minutes par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μM d'ATRA. L'analyse des extraits nucléaires montre qu'un grand nombre de facteurs de transcription est activé par l'IL-1 β , dont les facteurs pro-inflammatoires AP-1 et NF- κB , mais également des facteurs intervenant dans la prolifération cellulaire, comme myc-max ou ETS-1 (E26 Transformation-specific Sequence), dans la médiation des effets de l'interféron, comme STAT-3 et -4 (signal transducer and activator of transcription), ou dans les métabolismes glucidique et lipidique, comme USF-1 (upstream stimulatory factor-1) (**Figure 54** et **Tableau 12A**).

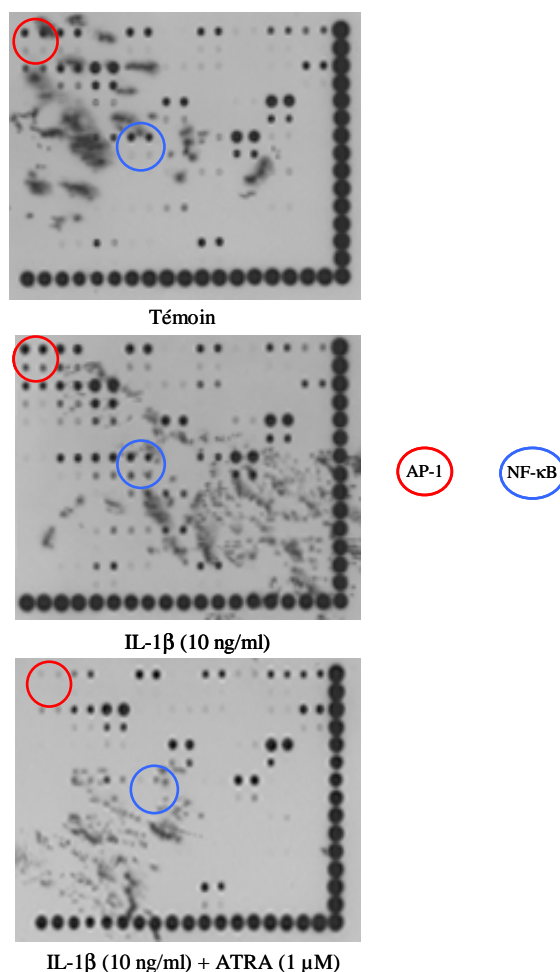


Figure 54 : Effet de l'ATRA sur l'activation de nombreux facteurs de transcription dans des fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées pendant 30 minutes par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. L'activation des facteurs de transcription est étudiée sur des extraits nucléaires par la technique des puces à facteurs de transcription (Panomics).

L'effet de l'ATRA sur les cellules stimulées par l'IL-1 β diffère suivant les facteurs de transcription étudiés. En effet, l'activité de quelques facteurs de transcription est induite par l'ATRA, comme celle de facteurs intervenant dans la différenciation ou la prolifération cellulaire (respectivement MRE [Myb regulatory element] et CDP [CCAAT displacement protein]) (**Figure 54** et **Tableau 12A**). Cependant, l'ATRA réprime également l'activité d'un grand nombre de facteurs de transcription (**Figure 54** et **Tableau 12B**). Ces facteurs sont notamment AP-1 et NF- κ B, mais également des facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire, comme ETS-1 et CREB (cAMP response element binding protein), ou encore dans les métabolismes glucidique et lipidique, comme HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) ou USF-1. Le mécanisme par lequel l'ATRA inhibe les cytokines pro-inflammatoires pourrait donc notamment être lié à l'inhibition des deux facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B.

Tableau 12 : Facteurs de transcription dont l'activité est au moins doublée ou diminuée de moitié par la stimulation par l'IL-1 β ou sous l'effet de l'ATRA.

n. d. : non déterminable : les valeurs de densitométrie n'ont pas pu être mesurées à cause du bruit de fond non homogène sur la membrane.

CDP : CCAAT displacement protein ; *CREB* : cAMP response element binding protein ; *ETS-1* : E26 Transformation-specific Sequence ; *GAS/ISRE* : gamma-interferon activation site/alpha-interferon-stimulated response element ; *HNF4* : hepatocyte nuclear factor 4 ; *MRE* : Myb regulatory element ; *Pax-5* : paired box ; *STAT* : signal transducer and activator of transcription ; *USF-1* : upstream stimulatory factor-1.

Facteurs de transcription	IL-1 β vs contrôle	ATRA + IL-1 β vs IL-1 β
Facteurs intervenant dans l'inflammation		
AP-1	↑ 500 %	↓ 97 %
NF- κ B	↑ 600 %	↓ 80 %
Facteurs intervenant dans la prolifération, la croissance ou la différenciation cellulaire		
ETS-1	↑ 600 %	↓ 90 %
CREB	/	↓ 80 %
myc-max	↑ 1700 %	↓ 75 %
Pax-5	/	↓ 75 %
E2F1	/	↓ 65 %
ETS	/	↓ 60 %
MRE	/	↑ n. d.
CDP	/	↑ 400 %
Facteurs intervenant dans la médiation intracellulaire des effets des interférons		
STAT-1	↑ 600 %	↓ 70 %
STAT-3	↑ 700 %	↓ n. d.
STAT-4	↑ 200 %	↓ n. d.
GAS/ISRE	/	↑ n. d.
Facteurs intervenant dans les métabolismes du glucose et de l'insuline		
HNF4	↑ 100 %	↓ 80 %
USF-1	↑ 1600 %	↓ n. d.

5 Contribution des isotypes RAR aux effets anti-cytokines des rétinoïdes

Les résultats précédents suggèrent que les effets inhibiteurs des rétinoïdes (ATRA et 9-cis RA) ne sont pas dépendants de l'activation du récepteur RXR, puisque l'agoniste RXR ne potentialise pas leurs effets et est inefficace lorsqu'il est utilisé seul. Nous avons donc essayé de démontrer la contribution d'un ou plusieurs isotypes RAR dans les effets de l'ATRA, par

l'utilisation d'agonistes sélectifs de RAR : le BMS-753, agoniste RAR- α , le BMS-453, agoniste RAR- β et le BMS-961, agoniste RAR- γ .

5.1 Effet d'agonistes sélectifs de RAR sur l'expression d'un gène cible : RAR- β

Afin de vérifier la fonctionnalité des agonistes RAR sélectifs dans notre système expérimental, nous avons testé leur capacité à induire l'expression d'un gène cible dépendant de RAR : RAR- β .

Les fibroblastes synoviaux de rat ont été incubés pendant 6 heures en présence de 0,1 μ M de chacun des agonistes sélectifs RAR. L'expression de RAR- β est augmentée de 2 à 20 fois sous l'effet de l'un ou l'autre des agonistes sélectifs RAR, avec un effet maximal pour l'agoniste RAR- γ (**Figure 55**). Ce résultat démontre que, aux concentrations utilisées, les agonistes sont capables de déclencher des événements RAR dépendants, même si leur pouvoir transactivateur semble variable d'un isotype à l'autre.

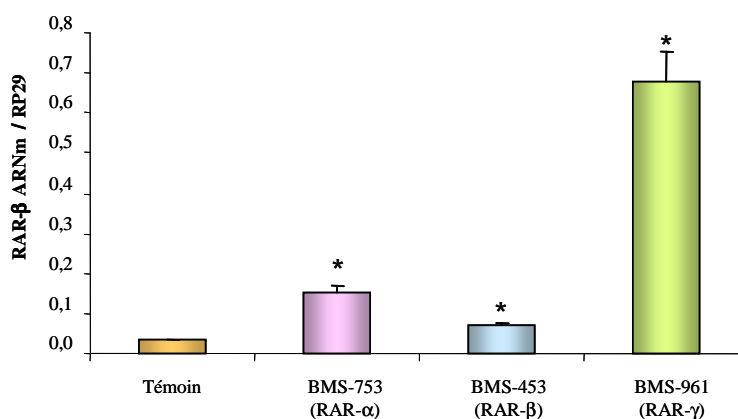



Figure 55 : Effet des agonistes sélectifs de RAR sur l'expression de RAR- β (gène cible RAR). Les cellules sont incubées pendant 6 heures en présence de 0,1 μ M d'agonistes sélectifs de RAR : le BMS-753, agoniste RAR- α , le BMS-453, agoniste RAR- β et le BMS-961, agoniste RAR- γ . Le niveau d'ARNm de RAR- β est évalué par RT-PCR en temps réel et normalisé sur celui de la protéine ribosomale RP-29. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport au témoin sont indiquées par * : $P < 0,05$.

5.2 Effet des agonistes sélectifs de RAR sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β

Aux concentrations efficaces sur l'expression de RAR- β , nous avons étudié l'effet des agonistes RAR sur l'expression des trois cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 β .



Les fibroblastes synoviaux ont été stimulés pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence d'1 μ M d'ATRA, ou de 0,1 ou 1 μ M d'agonistes sélectifs RAR (*Figure 56*). À l'instar des expériences précédentes, les effets stimulants de l'IL-1 β et inhibiteurs de l'ATRA s'opposent sur l'expression des trois cytokines. Comme le montre la *Figure 56*, aucun des agonistes sélectifs de RAR ne reproduit les effets inhibiteurs de l'ATRA à des concentrations de 0,1 ou 1 μ M.

Ces résultats suggèrent indirectement que les isotypes RAR- α , RAR- β et RAR- γ ne contribuent pas aux effets inhibiteurs de l'ATRA sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β , dans les fibroblastes synoviaux de rat.

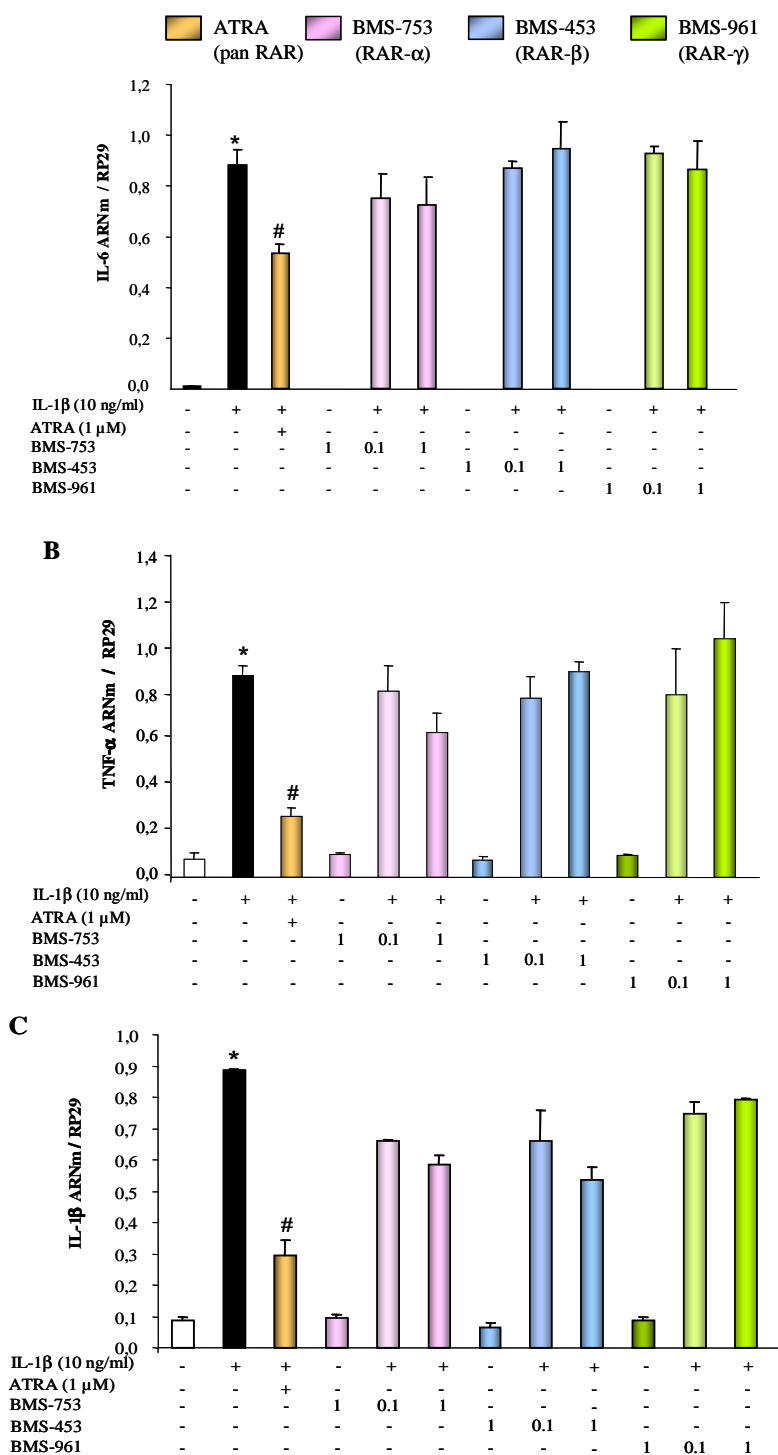


Figure 56 : Effet d'agonistes sélectifs de RAR sur les expressions du TNF-α, de l'IL-6 et de l'IL-1β induites par l'IL-1β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue en présence ou non d'1 μM d'ATRA ou de 0,1 ou 1 μM des agonistes sélectifs RAR (BMS-753, agoniste RAR-α, BMS-453, agoniste RAR-β, BMS-961, agoniste RAR-γ). Les niveaux d'ARNm du TNF-α (A), de l'IL-6 (B) et de l'IL-1β (C) sont évalués par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type des niveaux d'ARN de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par * : P<0,05 et par rapport aux cellules stimulées par IL-1β par # : P<0,05.

5.3 Effet de l'invalidation de l'expression des isotypes RAR sur l'expression d'un gène cible RAR

Afin de compléter l'étude de la contribution des isotypes RAR dans les effets de l'ATRA, nous avons utilisé une stratégie d'ARN interférence. Avant de tester les siRNA spécifiques d'isotypes sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires, nous avons contrôlé leur efficacité et leur spécificité sur l'expression des isotypes de RAR dans les fibroblastes synoviaux de rat. Dans cette expérience, les cellules sont transfectées pendant 24 heures avec 50 nM de chacun des siRNA, puis l'expression de RAR- α , RAR- β et RAR- γ est étudiée après 6 heures de stimulation par l'ATRA. La transfection de chaque siRNA inhibe l'expression de l'isotype RAR correspondant (**Figure 57**).

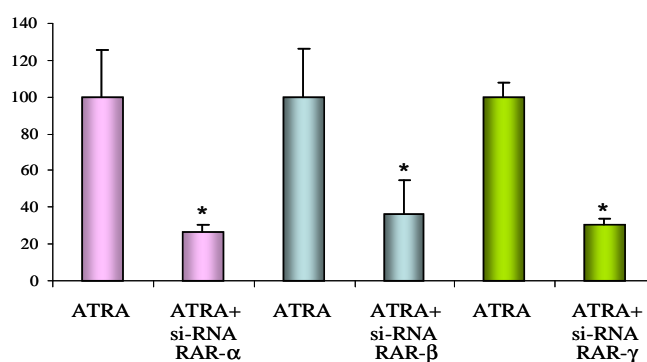


Figure 57 : Effet de l'invalidation de l'expression des isotypes de RAR sur l'expression de l'isotype RAR correspondant dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont transfectées pendant 24 heures par 50 nM de chaque siRNA sélectif d'un isotype RAR, puis incubées pendant 6 heures avec 1 μ M d'ATRA. Les niveaux d'ARNm de RAR- α , RAR- β et RAR- γ sont évalués par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport à l'ATRA sont indiquées par * : $P < 0,05$.

5.4 Effet de l'invalidation de l'expression des isotypes RAR sur l'effet inhibiteur l'ATRA sur les cytokines pro-inflammatoires

Les fibroblastes synoviaux sont transfectés avec 50 nM de siRNA dirigés contre chacun des isotypes RAR, puis stimulés pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence d'1 μ M d'ATRA (**Figure 58**). En présence des siRNA, l'effet stimulant de l'IL-1 β est moins important sur l'induction du TNF- α (**Figure 58B**), mais il reste aussi efficace sur l'expression de l'IL-6 et de l'IL-1 β (**Figure 58A et B**) qu'en l'absence de transfection de siRNA. Cependant, quel que soit le siRNA RAR utilisé, l'ATRA réprime aussi

efficacement l'expression des cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 β (**Figure 58**). Ces résultats renforcent l'idée que l'effet inhibiteur de l'ATRA sur les expressions stimulées du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β est indépendant de RAR.

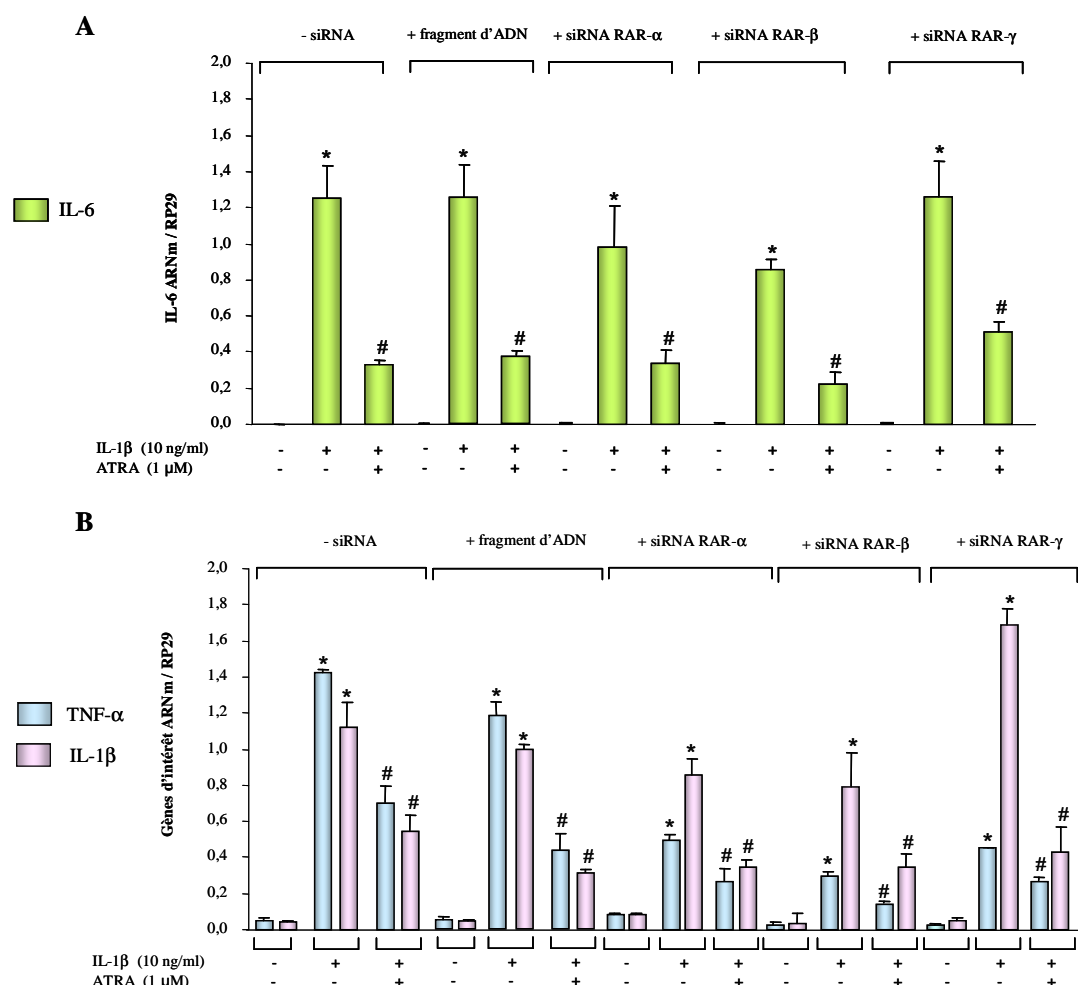


Figure 58 : Effet de l'inactivation de l'expression des isotypes RAR sur l'effet inhibiteur de l'ATRA sur les cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-1 dans les fibroblastes synoviaux de rat. Les cellules sont transfectées pendant 24 heures par 50 nM de chaque siRNA sélectif d'un isotype RAR ou 50 nM d'un fragment d'ADN, puis stimulées pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. Les niveaux d'ARNm de l'IL-6 (A), du TNF- α , et de l'IL-1 β (B) sont évalués par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARNm de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par * : $P < 0,05$ et par rapport aux cellules stimulées par IL-1 β par # : $P < 0,05$.

6 Effet de l'ATRA sur l'activation de la cascade des MAPK induite par l'IL-1 β

Nous avons recherché l'effet de l'ATRA sur des MAPK potentiellement activées par l'IL-1 β , qui pourraient être responsables de l'activation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires étudiées.

6.1 Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de P38 MAPK induite par l'IL-1 β

Comme le montre la **Figure 59**, la phosphorylation de P38 MAPK est maximale après 5 à 15 minutes de stimulation par l'IL-1 β , puis l'intensité du signal décroît, pour augmenter de nouveau après 6 heures de stimulation. Cependant, l'ATRA ne diminue pas la phosphorylation de P38 MAPK au moment où elle est maximale (5 minutes de stimulation par l'IL-1 β) (**Figure 60**). Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres durées de stimulation par l'IL-1 β (données personnelles). Ces résultats démontrent que, si la voie P38 MAPK est activée efficacement par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat, elle ne semble pas impliquée dans l'effet suppresseur de l'ATRA sur l'expression induite des cytokines pro-inflammatoires.

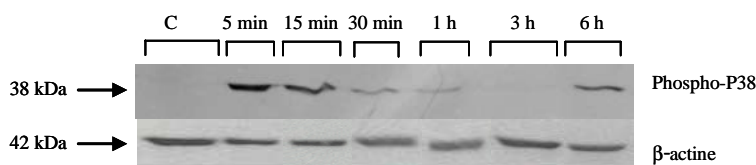


Figure 59 : Cinétique de phosphorylation de la P38 MAPK dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β .

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue (C pour contrôle) pendant 5 minutes à 6 heures. L'expression protéique de P38 MAPK sous sa forme phosphorylée, ainsi que celle de la β -actine sont déterminées aux temps indiqués par western blot.

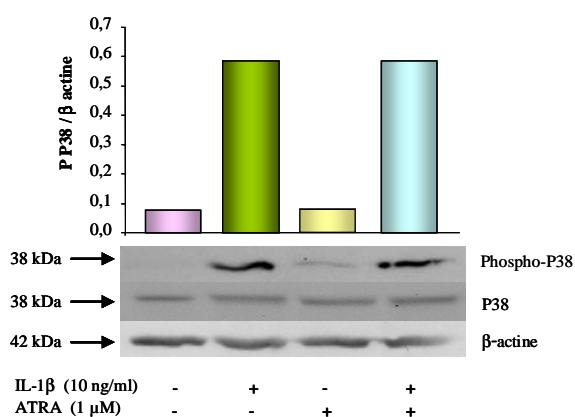


Figure 60 : Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de la P38 MAPK induite par l'IL-1 β dans des fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 5 minutes en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. L'expression protéique de la protéine P38 MAPK phosphorylée ou non phosphorylée et celle de la β -actine sont évaluées par western blot. Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'expression de la protéine phospho-P38 normalisée par celle de la β -actine.

6.2 Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de JNK induite par l'IL-1 β

Comme le montre la **Figure 61**, la phosphorylation de SAPK/JNK est également maximale après 5 à 15 minutes de stimulation par l'IL-1 β . Cependant, contrairement à P38 MAPK, il n'existe pas d'activation « retardée » de cette voie de signalisation. Au moment où la phosphorylation de SAPK/JNK est maximale (15 minutes de stimulation par l'IL-1 β), l'ATRA n'a aucun effet inhibiteur sur cette voie de signalisation (**Figure 62**). Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres durées de stimulation par l'IL-1 β (données personnelles). Comme précédemment, ces résultats suggèrent que la voie SAPK/JNK n'est pas impliquée dans l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'expression induite des cytokines pro-inflammatoires.

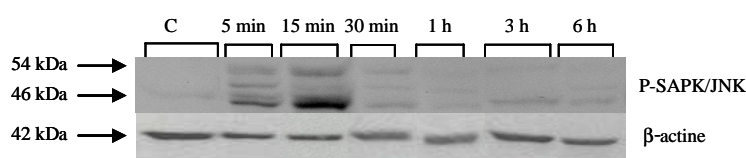


Figure 61 : Cinétique de phosphorylation de SAPK/JNK dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β .

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue (C pour contrôle) pendant 5 minutes à 2 heures. L'expression protéique de JNK sous ses formes phosphorylées de 46 ou 54 kDa, ainsi que celle la β -actine, sont déterminées aux temps indiqués par western blot.

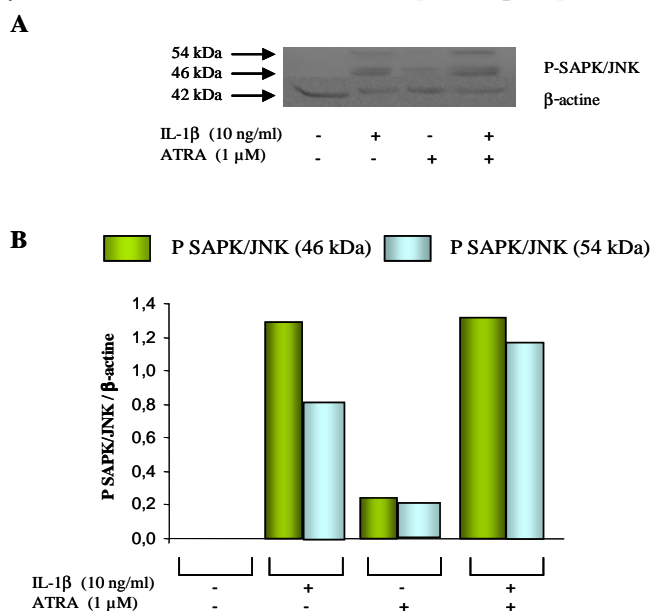


Figure 62 : Effet de l'ATRA sur la phosphorylation de JNK induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 15 minutes en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. L'expression protéique des formes phosphorylées de 46 ou 54 kDa de SAPK/JNK et celle de la β -actine sont évaluées par western blot (A). Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'expression des protéines phospho-JNK1 et phospho-JNK2 normalisée sur celle de la β -actine (B).

6.3 Effet de l'ATRA sur la phosphorylation d'ERK_{1/2} induite par l'IL-1 β

Comme le montre la **Figure 63**, la phosphorylation d'ERK_{1/2} est maximale après 5 à 30 minutes de stimulation par l'IL-1 β . Comme pour SAPK/JNK, il n'existe pas d'activation retardée de cette voie de signalisation (**Figure 63**). Après 5 ou 15 minutes de stimulation par l'IL-1 β , l'ATRA n'a pas d'effet sur la phosphorylation d'ERK_{1/2} (données personnelles). Cependant, après 30 minutes de stimulation, l'ATRA diminue significativement la phosphorylation des sous-unités p42 et p44 alors qu'il est sans effet sur l'expression des formes non phosphorylées correspondantes (**Figure 64**). L'ATRA pourrait donc réguler la voie ERK en inhibant sa phosphorylation. Les facteurs de transcription régulés par la voie ERK pourraient ainsi être inhibés, tout comme les cytokines pro-inflammatoires sous leur contrôle.

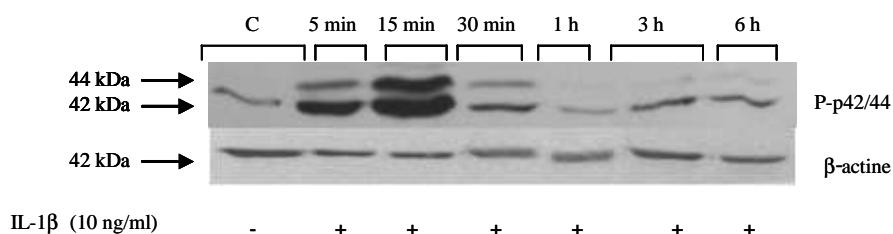


Figure 63 : Cinétique de phosphorylation d'ERK_{1/2} dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β .

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue (C pour contrôle), pendant 5 minutes à 6 heures. L'expression protéique d'ERK_{1/2} sous sa forme phosphorylée, ainsi que celle de la β -actine, sont déterminées aux temps indiqués par western blot.

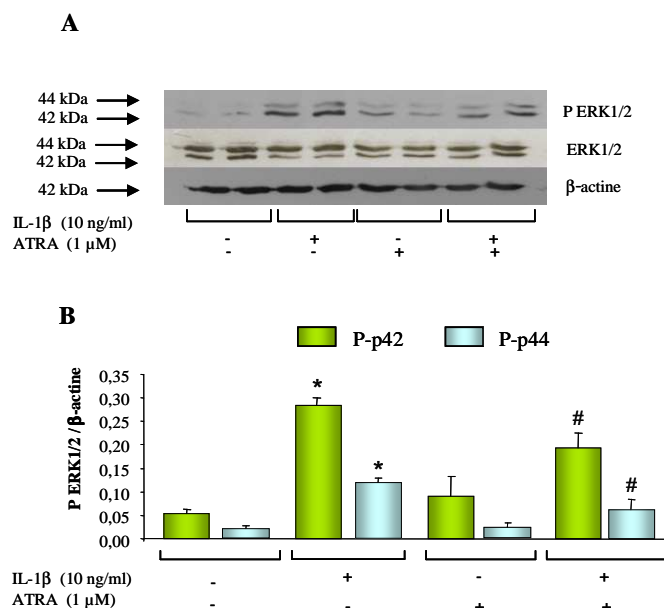


Figure 64 : Effet de l'ATRA sur la phosphorylation d'ERK_{1/2} induite par l'IL-1β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue pendant 30 minutes en présence ou non d'1 μM d'ATRA. L'expression protéique des formes phosphorylées ou non de p42 et de p44 et celle de la β-actine sont évaluées par western blot (A). Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'expression des protéines phospho-ERK1 et phospho-ERK2 normalisée sur celle de la β-actine (B). Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type de valeurs issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport au témoin sont indiquées par * : P<0,05 et par rapport aux cellules stimulées par # : P<0,05.

7 Étude de l'implication de la voie ERK_{1/2} dans les effets anti-inflammatoires de l'ATRA

7.1 Validation de l'inhibition de la phosphorylation d'ERK_{1/2} par le PD-98059

Une expérience contrôle a permis de montrer que, à la concentration testée, le PD-98059 prévient efficacement la phosphorylation d'ERK_{1/2} induite par l'IL-1β dans nos conditions expérimentales (**Figure 65**).

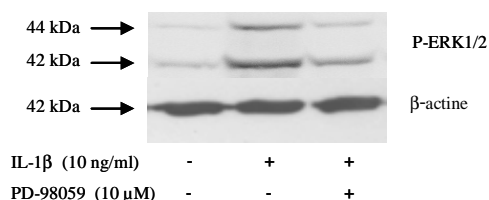


Figure 65 : Inhibition de la phosphorylation d'ERK_{1/2} par le PD-98059 dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont pré-incubées avec 10 μM de PD-98059 (inhibiteur de la voie ERK) pendant une heure, puis stimulées avec 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue pendant 30 minutes. L'expression protéique des formes phosphorylées p42 et p44 et celle de la β-actine sont évaluées par western blot.

7.2 Contribution de la voie ERK_{1/2} aux effets anti-TNF- α et anti-IL-6 de l'ATRA

Nous avons ensuite recherché si l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par l'ATRA pouvait être liée à l'inhibition de la voie ERK_{1/2}. Les fibroblastes synoviaux sont pré-traités pendant une heure par 10 μ M de PD-98059, un inhibiteur de la voie ERK_{1/2}, puis stimulés pendant 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. Le dosage de TNF- α et d'IL-6 a été réalisé dans les surnageants de culture. La stimulation par l'IL-1 β pendant 24 heures induit fortement la production de TNF- α et d'IL-6 (**Figure 66**). L'ATRA réduit significativement la production des deux cytokines, ce qui confirme les résultats précédents. Le PD-98059, quant à lui, inhibe de la même manière que l'ATRA la production d'IL-6 (**Figure 66A**), mais, au contraire, augmente fortement celle du TNF- α (**Figure 66B**). La baisse de la production d'IL-6 pourrait donc s'expliquer par l'inhibition de la voie ERK_{1/2}, contrairement à la chute de production de TNF- α , qui en est indépendante.

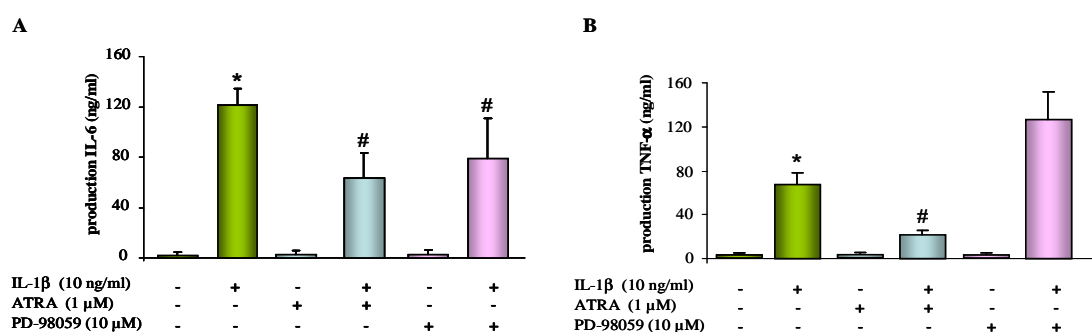


Figure 66 : Contribution de la voie ERK_{1/2} à l'inhibition de la production de TNF- α et d'IL-6 induite par l'ATRA dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1.

Les cellules sont pré-stimulées pendant 1 heure par 10 μ M de PD-98059, puis stimulées pendant 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. La production d'IL-6 en ng/ml (**A**) et de TNF- α (**B**) est mesurée par dosage ELISA dans les surnageants de culture. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des A₄₅₀ issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport au témoin sont indiquées par * : P<0,05 et par rapport aux cellules stimulées par # : P<0,05.

7.3 Contribution de la voie ERK_{1/2} aux effets inhibiteurs de l'ATRA sur les facteurs de transcription induits par l'IL-1

Les trois cytokines pro-inflammatoires étudiées ici sont fortement réprimées par l'ATRA, et elles sont principalement activées par des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme NF- κ B, AP-1 et NF-IL-6. Nous avons donc étudié l'effet de l'ATRA sur ces derniers, et étudié l'impact de l'inhibition de la voie ERK_{1/2} sur l'activation de ces facteurs. Les

fibroblastes synoviaux ont été pré-incubés pendant une heure avec un inhibiteur de la voie ERK_{1/2} (PD-98059), puis ont été stimulés pendant 30 minutes (NF-κB) ou 4 heures (NF-IL-6, AP-1) par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue, en présence ou non d'1 μM d'ATRA.

7.3.1 Contribution d'ERK_{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation d'AP-1

La stimulation par l'IL-1β pendant 4 heures induit l'activation de c-Jun et c-Fos de 10 et 2 fois respectivement (**Figure 67**) par rapport aux contrôles respectifs. En présence d'ATRA, comme de PD-98059, l'effet stimulant de l'IL-1β sur c-Jun est réduit de 40 à 60 %, alors que l'activation de c-Fos n'est affectée que par le pré-traitement par 10 μM de PD-98059, et non par l'ATRA (**Figure 67**).

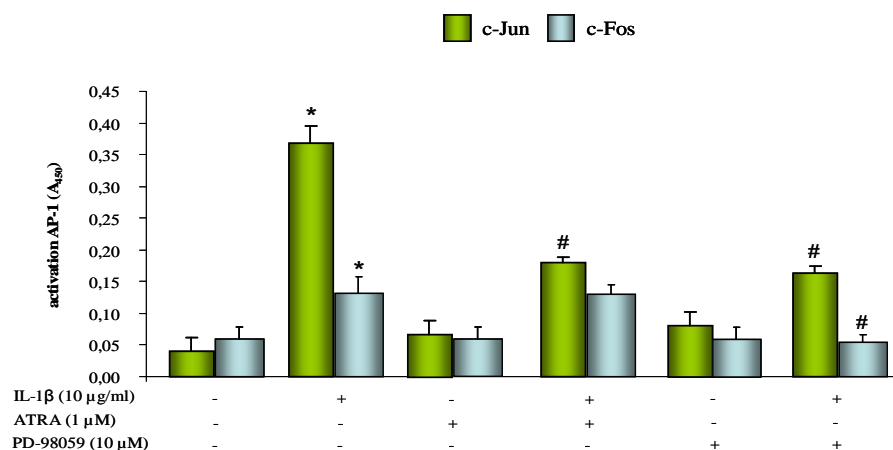


Figure 67 : Contribution de la voie ERK_{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 induite par l'IL-1β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

L'activation de c-Jun et de c-Fos est mesurée dans les extraits nucléaires de fibroblastes synoviaux de rat par un dosage ELISA basé sur le kit TransAm®. Les cellules ont été pré-traitées par 10 μg/ml de PD-98059 pendant une heure, puis stimulées pendant 4 heures en présence ou non d'1 μM d'ATRA. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type des A₄₅₀ issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport au témoin sont indiquées par * : P<0,05 et par rapport aux cellules stimulées par # : P<0,05.

7.3.2 Contribution d'ERK_{1/2} à l'effet de l'ATRA sur l'activation de NF-κB

La stimulation par l'IL-1β pendant 30 minutes induit l'activation de NF-κB (p65) par 1,6 fois (**Figure 68**) par rapport au contrôle. En présence de PD-98059 ou d'ATRA, l'effet stimulant de l'IL-1β sur NF-κB (p65) n'est pas modifié (**Figure 68**). Une stimulation plus longue par l'IL-1β n'engendre pas d'augmentation significative de l'activité de NF-κB, ni de variation par le PD-98059 ou l'ATRA. On peut noter que, contrairement à AP-1, l'activation de NF-κB est transitoire, puisqu'après 4 heures de stimulation par l'IL-1, il n'y a quasiment

plus de différence entre l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1 et le contrôle (résultats non présentés).

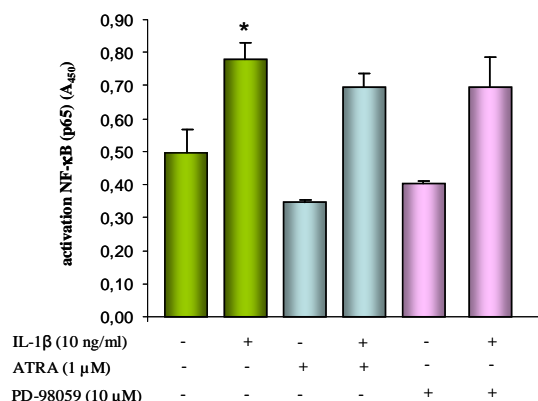


Figure 68 : Contribution de la voie ERK_{1/2} et effet de l'ATRA sur l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

L'activation de NF- κ B (p65) est mesurée dans les extraits nucléaires nucléaires de fibroblastes synoviaux de rat par un dosage ELISA basé sur le kit TransAm[®]. Les cellules ont été pré-traitées par 10 μ g/ml de PD-98059 pendant une heure, puis stimulées pendant 4 heures en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des A₄₅₀ issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport au témoin sont indiquées par * : P<0,05 et par rapport aux cellules stimulées par # : P<0,05.

7.3.3 Contribution d'ERK_{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation de NF-IL-6

La stimulation par l'IL-1 β pendant 4 heures induit l'activation de NF-IL-6 par 5,6 fois (Figure 69) par rapport au contrôle. En présence de PD-98059 ou d'ATRA, l'effet stimulant de l'IL-1 β sur NF-IL-6 est réduit de 30 % et de 45 % respectivement, indiquant que l'inhibition d'ERK_{1/2} induit la répression de NF-IL-6 (Figure 69).

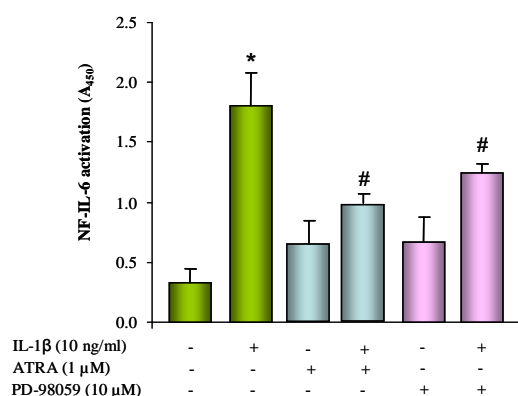


Figure 69 : Contribution de la voie ERK_{1/2} à l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation de NF-IL-6 induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

L'activation de NF-IL-6 est mesurée dans les extraits nucléaires nucléaires de fibroblastes synoviaux de rat par un dosage ELISA basé sur le kit TransAm[®]. Les cellules ont été pré-traitées par 10 μ g/ml de PD-98059 pendant une heure, puis stimulées pendant 4 heures en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des A₄₅₀ issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport au témoin sont indiquées par * : P<0,05 et par rapport aux cellules stimulées par # : P<0,05.

8 Effet de l'ATRA sur l'inhibition de l'activité histone désacétylase induite par l'IL-1 β : résultats préliminaires

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'ATRA sur la modulation de l'activité HDAC par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat. Pour ceci, les protéines nucléaires ont été extraites à partir de cellules stimulées pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. Les premières expériences n'ont cependant pas permis d'obtenir de résultats reproductibles (**Figure 70**). En effet, une expérience a suggéré que l'ATRA à 1 μ M augmentait fortement (environ 7 fois) l'activité basale HDAC (**Figure 70A**). Or, dans une seconde expérience une activité HDAC basale beaucoup plus élevée a été mesurée (25 contre 0,5 μ M/mg de protéines/minute dans la première expérience) (**Figure 70B**), sans aucun effet de l'ATRA. Dans cette seconde expérience, aucune variation de l'activité HDAC n'a été observée en réponse à l'IL-1 β . Des études complémentaires seront donc nécessaires afin de comprendre les causes de cette variation de l'activité basale HDAC, avant de pouvoir déterminer si l'ATRA a un effet sur ce processus biologique. Des témoins (positif: extrait nucléaire de cellules HeLa, négatif: échantillon de l'expérimentation additionné de trichostatine, inhibiteur d'HDAC) fournis dans le kit nous ont permis de nous assurer du bon fonctionnement du dosage.

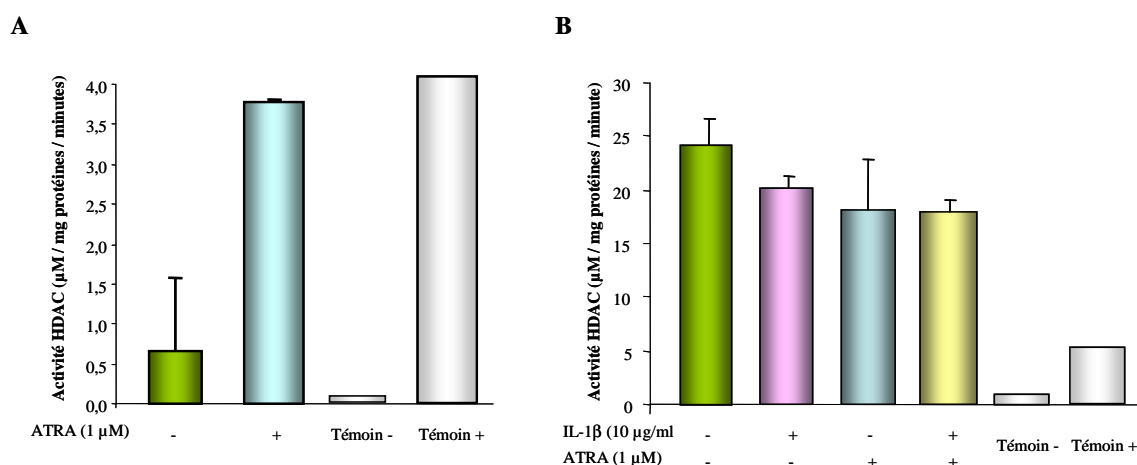


Figure 70 : Effet de l'ATRA sur l'inhibition de l'activité HDAC induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Les cellules sont stimulées ou non pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β en présence d'1 μ M d'ATRA. L'activité HDAC est mesurée dans les extraits de protéines nucléaires par une méthode de dosage colorimétrique (Biovision). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des activités HDAC de trois points expérimentaux indépendants. Les témoins de l'expérimentation sont réalisés avec un échantillon de l'expérience additionné de trichostatine (1 mM, témoin négatif), ou avec un extrait nucléaire de cellules HeLa (5 mg/ml, témoin positif).

Chapitre 3 : Étude préliminaire des potentialités anti-cytokines des rétinoïdes dans les fibroblastes synoviaux humains

1 Expression basale et effet de l'IL-1 sur l'expression des récepteurs RAR et RXR dans les fibroblastes synoviaux humains

Comme présenté dans la **Figure 71**, tous les isotypes de RAR et RXR sont exprimés sous forme d'ARNm dans les conditions basales, sauf l'isotype RXR- γ (non détectable : ND). En réponse à une stimulation de 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β , comme pour les fibroblastes synoviaux de rat, l'expression de RAR- α et de RAR- γ est diminuée respectivement de 80 et 45 % (**Figure 71A**). Cependant, l'expression de RAR- β n'est pas modifiée par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux humains.

Contrairement aux fibroblastes synoviaux de rat, pour lesquels la stimulation par l'IL-1 β ne modifie pas l'expression des récepteurs RXR, l'expression de RXR- α est fortement réprimée (70 %) en conditions pro-inflammatoires (**Figure 71B**), alors que l'expression de RXR- β reste inchangée.

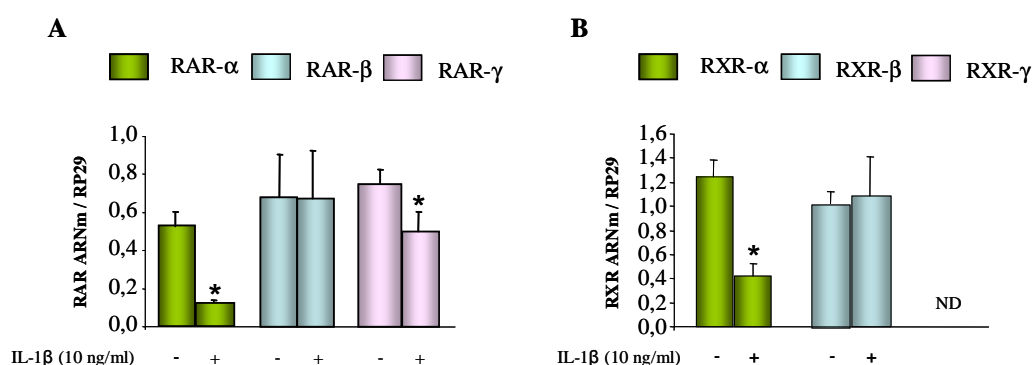


Figure 71 : Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des isotypes RAR et RXR dans les fibroblastes synoviaux humains.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue pendant 6 heures. Les niveaux d'ARNm de RAR- α , - β , - γ (A) et de RXR- α et - β (B) sont évalués par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des niveaux d'ARN de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par * : $P < 0,05$.

2 *Effet de l'ATRA et du 9-cis RA sur l'expression des cytokines induites par l'IL-1 β*

Pour vérifier si les résultats obtenus dans les fibroblastes synoviaux de rat sont extrapolables aux fibroblastes synoviaux humains, nous avons testé l'effet des deux rétinoïdes pour lesquels nous avons observé des effets anti-cytokines importants, l'ATRA et le 9-cis RA. Les fibroblastes synoviaux humains ont donc été stimulés pendant 6 ou 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA ou de 9-cis RA. L'expression de trois cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-1 β) et la production du TNF- α et de l'IL-6 ont été étudiées.

Les transcrits correspondant à l'IL-1 β et à l'IL-6 ne sont pas détectables dans les conditions basales, mais sont fortement induits par l'IL-1 β . Celui du TNF- α est, quant à lui, faiblement exprimé dans les cellules non stimulées, mais il est également induit sous l'effet de l'IL-1 β . Les deux rétinoïdes étudiés inhibent l'expression du TNF- α et de l'IL-6 induite par l'IL-1 β (**Figure 72A**), mais, à l'inverse des résultats obtenus sur les cellules de rat, ils potentialisent l'expression de l'IL-1 β induite par l'IL-1 (**Figure 72B**). L'effet stimulant des rétinoïdes sur l'IL-1 β n'a pas pu être vérifié sur la production du médiateur puisque l'utilisation de cette cytokine humaine recombinante comme agent de stimulation perturberait le dosage.

En revanche, de façon cohérente avec leurs effets inhibiteurs sur le niveau d'ARNm de l'IL-6, l'ATRA et le 9-cis RA diminuent la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-1 β . Cependant, les deux rétinoïdes ont tendance à augmenter la production de TNF- α induite par l'IL-1 β , contrairement aux effets inhibiteurs obtenus sur l'expression du messager correspondant.

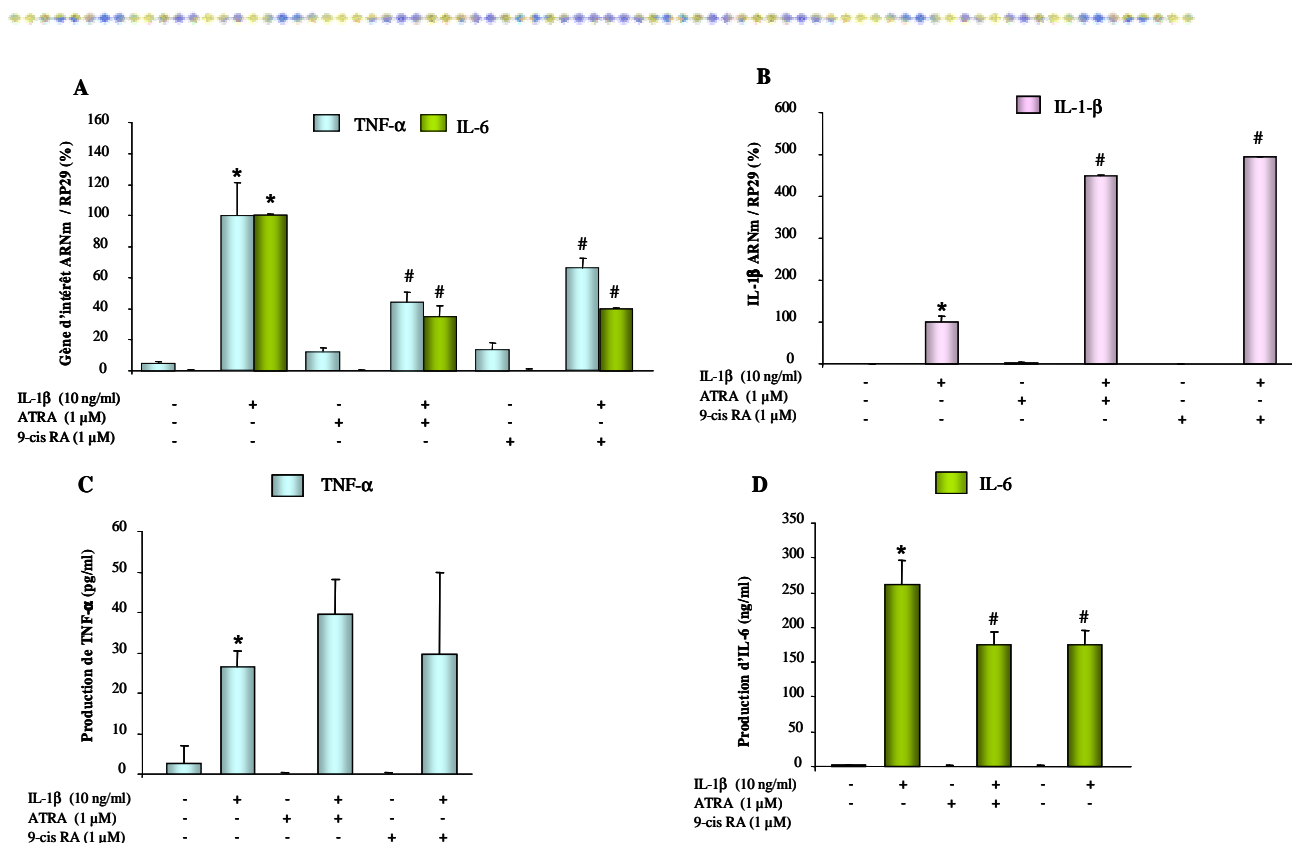


Figure 72 : Effet des rétinoïdes sur les cytokines induites par l'IL-1β dans les fibroblastes synoviaux humains.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue pendant 6 heures (expression génique) ou 24 heures (production des médiateurs) en présence ou non d'1 μM d'ATRA (agoniste RAR) ou d'1 μM de 9-cis RA (co-agoniste RAR/RXR). Les niveaux d'ARNm du TNF-α, de l'IL-6 (A) et de l'IL-1β (B) sont évalués par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne du pourcentage de variation, étant donné que la stimulation par l'IL-1β correspondant à 100 %, ± écart-type des valeurs issues de trois points expérimentaux indépendants. La production du TNF-α (C) et de l'IL-6 (D) est étudiée par dosage ELISA dans les surnageants de culture. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type des valeurs issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : P<0,05, et par rapport aux cellules stimulées par de l'IL-1β par le symbole # : P<0,05.

3 Analyse par puces à protéines des effets de l'ATRA et du 9-cis RA sur la production de médiateurs synoviocytaires induits par l'IL-1β

Afin d'étudier simultanément l'effet des agonistes RAR sur un grand nombre de médiateurs, nous avons utilisé la technique des puces à protéines. Les fibroblastes synoviaux humains ont été stimulés pendant 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue, en présence ou non d'1 μM d'ATRA ou de 9-cis RA. Comme le montre la **Figure 73**, parmi les médiateurs dont la sécrétion est fortement stimulée par l'IL-1β, on retrouve l'IL-6 (**Figure 73**). L'expression de l'IL-1β est difficilement interprétable en raison de son utilisation comme agent de stimulation, mais la production stimulée de TNF-α n'est pas retrouvée (**Figure 73**).

Cette discordance pourrait être due à la sensibilité des anticorps immobilisés sur la membrane aux récepteurs solubles capables de masquer le TNF- α , puisque des résultats similaires ont été rapportés pour des chondrocytes humains stimulés par de l'IL-1 α recombinante humaine [(De Ceuninck F. *et al.*, 2004, Deffaud J. *et al.*, 2008 (sous presse))].

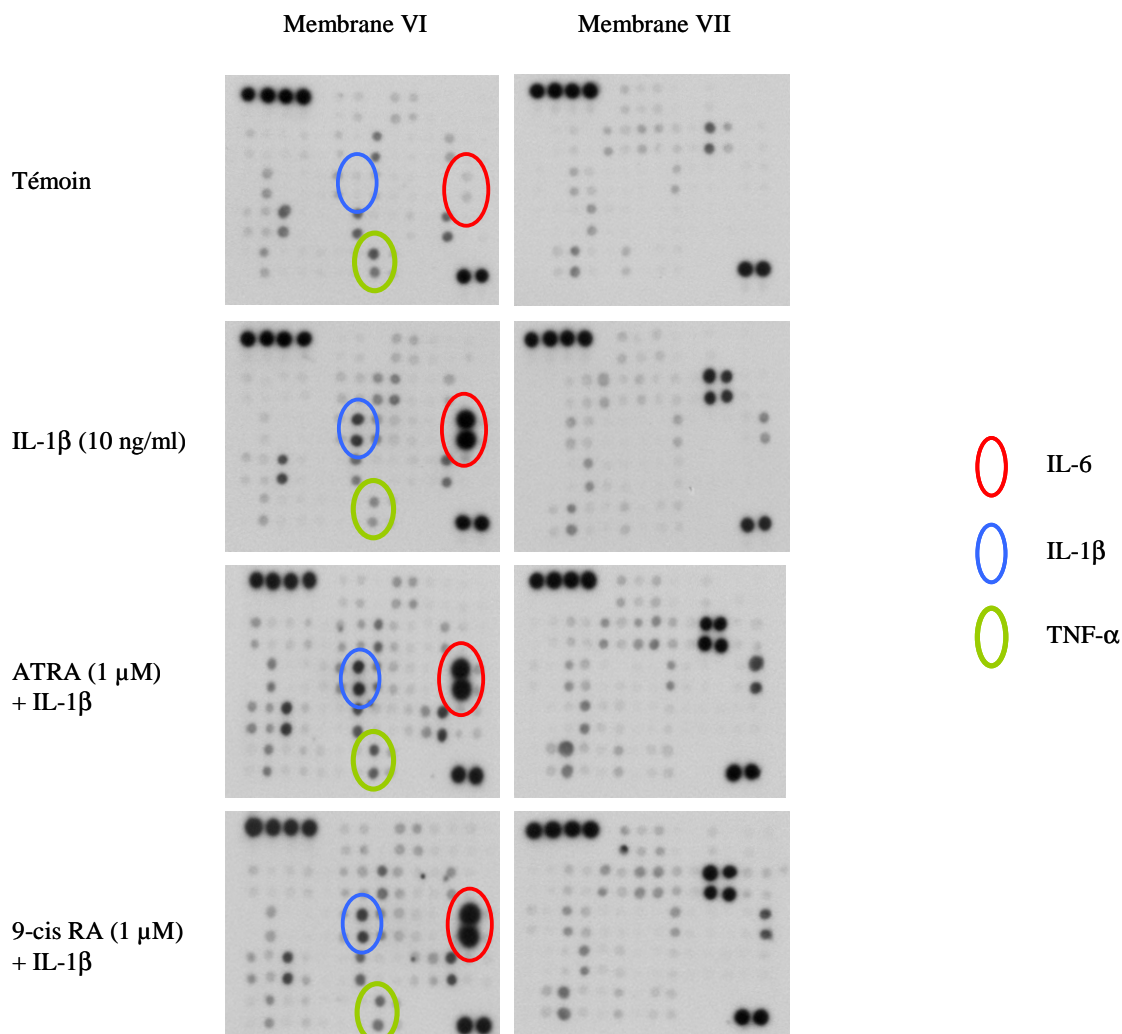


Figure 73 : Effet des rétinoïdes sur la production de médiateurs induits par la stimulation par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux humains.

Les cellules sont stimulées pendant 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA ou de 9-cis RA. La production des médiateurs est évaluée dans les surnageants de culture par la technique des puces à protéines (Ray Biotech[®]), après analyse densitométrique de l'intensité de chaque spot. Les niveaux protéiques sont estimés par normalisation de l'intensité de chaque spot par rapport aux contrôles positifs. Les résultats sont représentés en pourcentage d'augmentation ou de diminution induits par l'IL-1 par rapport au témoin ou par l'ATRA et l'IL-1 par rapport à l'IL-1.

Beaucoup d'autres médiateurs sont produits en réponse à la stimulation par l'IL-1 β , dont des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1Ra (IL-1 Receptor antagonist), des facteurs de croissance, comme le GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), des facteurs pro-apoptotiques, comme Fas, ou des chimiokines, comme ENA-78 (epithelial

neutrophil activating protein-78) ou l'IL-8, GRO (growth related oncogene) ou GRO- α (**Tableau 13A**). Seule l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, a une production diminuée par l'IL-1 (**Tableau 13A**). L'analyse des résultats obtenus en présence des rétinoïdes met en évidence les points suivants (**Tableau 13B et C**) :

- l'ATRA et le 9-cis RA contrecarrent l'effet inhibiteur de l'IL-1 β sur la production de l'IL-10 ;
- l'ATRA et le 9-cis RA diminuent l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production de GM-CSF ;
- l'ATRA et le 9-cis RA potentialisent l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production de nombreuses chimiokines (IL-8 et MIP-3 α en particulier) à l'exception d'ENA-78 pour laquelle un effet inhibiteur modéré est observé ;
- l'ATRA et le 9-cis RA stimulent la production de leptine, même si cette dernière n'est pas affectée par l'IL-1 β .

En revanche, l'effet inhibiteur modéré de l'ATRA sur la production d'IL-6 induite par l'IL-1 β n'est pas retrouvé, ce qui pourrait s'expliquer, au moins en partie, par l'intensité des spots correspondant à l'IL-6 sur la membrane, dont le signal semble saturé. Les variations modérées qui sont induites par l'ATRA ne seraient alors plus visibles.

Tableau 13 : Principaux médiateurs dont la production est modulée par l'IL-1 β (A), l'ATRA (B) ou le 9-cis RA (C) dans les fibroblastes synoviaux humains.

ENA-78 : epithelial neutrophil activating protein-78 ; GCP2 : granulocyte chemotactic protein-2 ; GDNF : glial cell-line-derived neurotrophic factor ; GM-CSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor ; GRO : growth related oncogene ; LIGHT : lymphotoxin, inducible expression, competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed on T-lymphocytes ; MCP : monocyte chemotactic protein ; MIP : macrophage inflammatory protein ; NAP2 : neutrophil-activating protein2 ; RANTES : regulated upon activation, normal T cell expressed secreted ; TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand ; VEGF : vascular endothelial growth factor.

A

Médiateur	↑ par IL-1 β (% d'augmentation vs contrôle)	↓ par IL-1 β (% diminution vs contrôle)
Cytokines pro-inflammatoires		
IL-6	220 %	
IL-2	25 %	
Cytokines anti-inflammatoires		
IL-1Ra	40 %	
IL-10		20 %
Facteurs de croissance		
GM-CSF	75 %	
VEGF	20 %	
VEGFD	20 %	
Chimiokines		
GRO- α	115 %	
ENA-78	75 %	
IL-8	65 %	
GRO	60 %	
GCP2	25 %	
MIP-1 β	20 %	
MIP-3 β	20 %	
Cytokines favorisant l'apoptose		
Fas	30 %	
TRAILR3	20 %	
Cytokines intervenant dans le métabolisme osseux		
Ostéoprotégérine	20 %	
Cytokines anti-angiogéniques		
thrombospondine	20 %	

B

Médiateur	↑ par ATRA (% d'augmentation ATRA+IL-1 vs IL-1)	↓ par ATRA (% de diminution ATRA+IL-1 vs IL-1)
Médiateurs anti-inflammatoires		
IL-10	40 %	
TIMP-2	20 %	
Facteurs de croissance		
GCSF	30 %	
GM-CSF		30 %
Chimiokines		
IL-8	50 %	
MIP-3 α	40 %	
RANTES	20 %	
MCP-1	20 %	
NAP2	20 %	
Eotaxine	20 %	
ENA78		20 %
Cytokines favorisant l'apoptose		
IL-7	20 %	
LIGHT	20 %	
Adipokine		
Leptine	35 %	

C

Méiateur	↑ par 9-cis RA (% d'augmentation 9-cis RA+IL-1 vs IL-1)	↓ par 9-cis RA (% de diminution 9-cis RA+IL-1 vs IL-1)
Cytokine anti-inflammatoire		
IL-10	30 %	
Facteurs de croissance		
GCSF	30 %	
GM-CSF		20 %
Chimiokines		
MIP-3 α	30 %	
MIP-1 δ	20 %	
IL-8	25 %	
ENA78		20 %
Facteur neurotrophique		
GDNF	20 %	
Adipokine		
Leptine	25 %	

Chapitre 4 : Étude comparative des potentialités anti-cataboliques et anti-inflammatoires de l'ATRA dans les chondrocytes de rat ou humains

1 Expression basale et effet de l'IL-1 β sur l'expression des récepteurs RAR et RXR dans les chondrocytes

Afin d'étudier l'expression basale des récepteurs RAR et RXR et de déterminer l'effet de l'IL-1 β sur celle-ci, les chondrocytes de rat et humains sont stimulés pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue.

Comme présenté dans la **Figure 74**, les ARNm correspondant à tous les isotypes de RAR et aux isoformes RXR- α et - β sont détectés dans les chondrocytes de rat (**Figure 74A et B**) et humains (**Figure 74A' et B'**), en condition basale, alors que l'isotype RXR- γ est absent. Dans les chondrocytes de rat, en réponse à une stimulation de 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue, les niveaux d'ARNm des isotypes RAR sont diminués de 25 % pour les isotypes - α et - γ , et de 55 % pour l'isotype - β (**Figure 74A**). Dans les cellules humaines, les niveaux des ARNm de RAR- α et de RAR- γ ne sont pas affectés par la stimulation par IL-1 β , alors que l'expression de RAR- β est diminuée de 30 % (**Figure 74A'**). Pour les deux espèces, les niveaux d'ARNm de RXR- α et RXR- β ne sont pas affectés par la stimulation par l'IL-1 β (**Figure 74B et B'**).

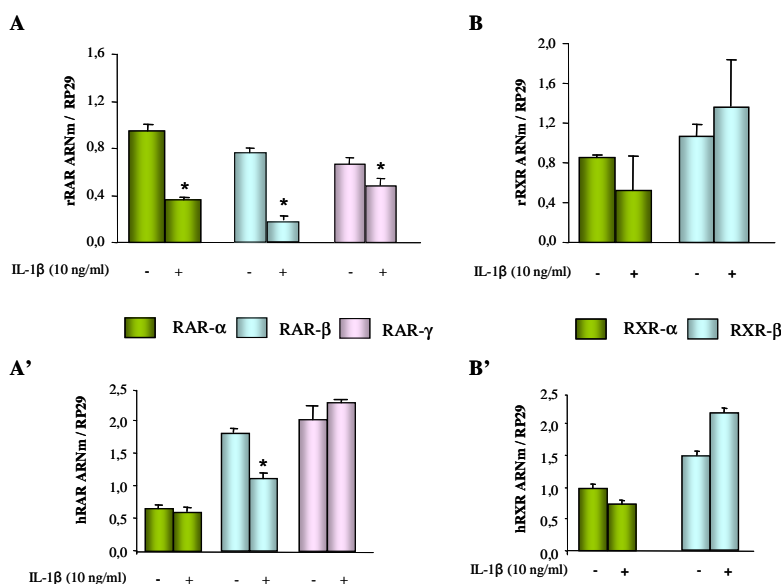


Figure 74 : Effet de l'IL-1β sur l'expression des isotypes RAR et RXR dans les chondrocytes de rat ou humains.

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue pendant 6 heures. Les niveaux d'ARNm des isotypes RAR de rat (A) et humains (A') et RXR de rat (B) et humains (B') sont quantifiés par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type des niveaux d'ARN de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : P<0,05.

2 Effet de l'ATRA sur la voie du NO inducible dans des chondrocytes stimulés par IL-1β

Nous avons étudié l'effet des rétinoïdes sur la voie du NO induite par l'IL-1β, choisie comme étant représentative d'une réponse pro-inflammatoire dans les chondrocytes. Nous avons testé l'effet du rétinoïde le plus efficace sur l'inhibition des cytokines dans les fibroblastes synoviaux de rat, l'ATRA (agoniste RAR). Les chondrocytes ont donc été stimulés pendant 6 heures par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue en présence ou non de 0,3 ou 1 μM d'ATRA.

Comme présenté dans la **Figure 75**, le transcrite d'iNOS n'est pas détecté en condition basale mais est fortement induit par la stimulation à l'IL-1β pour les deux espèces (**Figure 75A et A'**). De manière cohérente, la production de nitrites dans les surnageants de culture est faible ($2,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$ pour les cellules de rat) ou indétectable (cellules humaines) en condition basale, mais elle est fortement augmentée par la stimulation par l'IL-1β dans les chondrocytes de rat ($23,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$) (**Figure 75B**) et devient détectable ($2,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$) dans les chondrocytes humains (**Figure 75B'**). Ces résultats démontrent que l'IL-1β stimule la voie du NO plus activement dans les cellules de rat que dans les cellules humaines. Dans les chondrocytes

stimulés par l'IL-1 β , l'ATRA diminue l'expression d'iNOS de 60 à 65 % dans les cellules de rat (**Figure 75A**'), et de 20 à 45 % dans les cellules humaines (**Figure 75A'**), alors que la production de nitrite diminue de 20 à 30 % pour les cellules de rat (**Figure 75B**), et devient même inférieure aux témoins dans les cellules humaines (**Figure 75B'**). Ces effets inhibiteurs sont du même ordre pour les deux concentrations testées.

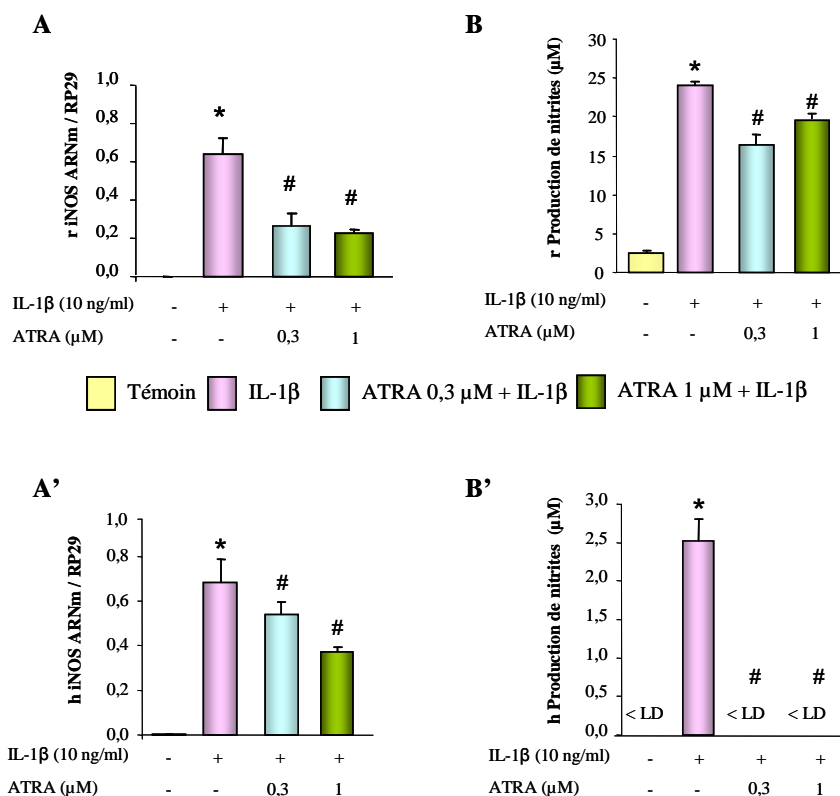


Figure 75 : Effet de l'ATRA sur la voie du NO inductible dans des chondrocytes de rat ou humains stimulés par l'IL-1 β .

Les cellules sont stimulées par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non de 0,3 ou 1 μ M d'ATRA (agoniste RAR). Le niveau d'ARNm d'iNOS dans les cellules de rat (A) ou humaines (A') est évalué après 6 heures de stimulation par l'IL-1 β par RT-PCR en temps réel et normalisé sur celui de la protéine ribosomale RP29. La production de nitrites dans les cellules de rat (B) ou humaines (B') est évaluée dans les surnageants de culture après 24 heures de stimulation par l'IL-1 β par la méthode de Griess. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des valeurs issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$, et par rapport aux cellules stimulées par de l'IL-1 β par le symbole # : $P < 0,05$. LD : Limite de détection.

3 Effet de l'ATRA sur l'expression et l'activité des MMPs induites par l'IL-1 β

Afin de déterminer l'effet des rétinoïdes sur l'expression et l'activité des MMPs induites par l'IL-1 β , les chondrocytes ont été stimulés pendant 6 ou 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non de 0,3 ou 1 μ M d'ATRA.

Comme présenté dans la **Figure 76**, les ARNm correspondant aux MMP-3 (**Figure 76A et A'**), -9 (**Figure 76B et B'**) et -13 (**Figure 76C et C'**) ne sont pas détectés en condition basale pour les deux espèces, mais sont induits suite à la stimulation par l'IL-1 β recombinante homologue. Dans les chondrocytes de rat stimulés par l'IL-1 β , l'induction par l'ATRA de l'expression des MMPs est de 1,4 fois pour MMP-3 (**Figure 76A**), de 2,2 fois pour MMP-13 (**Figure 76C**) et de 5,5 fois pour MMP-9 (**Figure 76B**) par rapport à une stimulation par l'IL-1 β seule. Au contraire, dans les cellules humaines stimulées par l'IL-1 β , l'ATRA ne modifie pas les niveaux d'expression de la MMP-3 (**Figure 76A'**) ou de la MMP-13 (**Figure 76C'**), et diminue même le niveau d'expression de la MMP-9 (**Figure 76B'**). Pour les deux espèces, l'effet de l'ATRA est du même ordre pour les deux concentrations testées. Ces résultats démontrent que les effets de l'ATRA sur la réponse à l'IL-1 β sont différents, voire opposés selon l'espèce étudiée pour les trois MMPs étudiées. En ce qui concerne l'expression de MMP-1, celle-ci n'a pu être mesurée que dans les cellules humaines, puisque les cellules de rat expriment une unique collagénase interstitielle partageant 86 % d'homologie avec la MMP-13 (Freije J.M. *et al.*, 1994, Henriot P. *et al.*, 1992, Schorpp M. *et al.*, 1995) mais pas avec la MMP-1 (Schorpp M. *et al.*, 1995). Dans les chondrocytes humains, le niveau d'ARNm de la MMP-1 n'est pas détectable en condition basale (**Figure 76E'**) mais est fortement induit par l'IL-1 β . Dans les chondrocytes humains stimulés par l'IL-1 β , l'expression de MMP-1 est diminuée de moitié en présence de 0,3 ou 1 μ M d'ATRA. L'activation des MMPs est mesurée, comme indiqué dans la partie « Matériel et Méthodes », après l'activation des pro-enzymes, et représente donc l'ensemble des enzymes sous forme activée et sous forme latente. Comme présenté dans la **Figure 76D et D'**, la stimulation par l'IL-1 β des chondrocytes de rat et humains augmente l'activité des MMPs de trois fois. Dans les cellules stimulées par l'IL-1 β , l'ATRA ne modifie pas l'activité MMP dans les chondrocytes de rat (**Figure 76D**), alors qu'il inhibe l'activité MMP dans les cellules humaines de façon dose-dépendante (**Figure 76D'**). Tous ces résultats suggèrent que les potentialités de l'ATRA sur les cellules humaines ne peuvent pas être extrapolées à partir des données obtenues chez le rat.

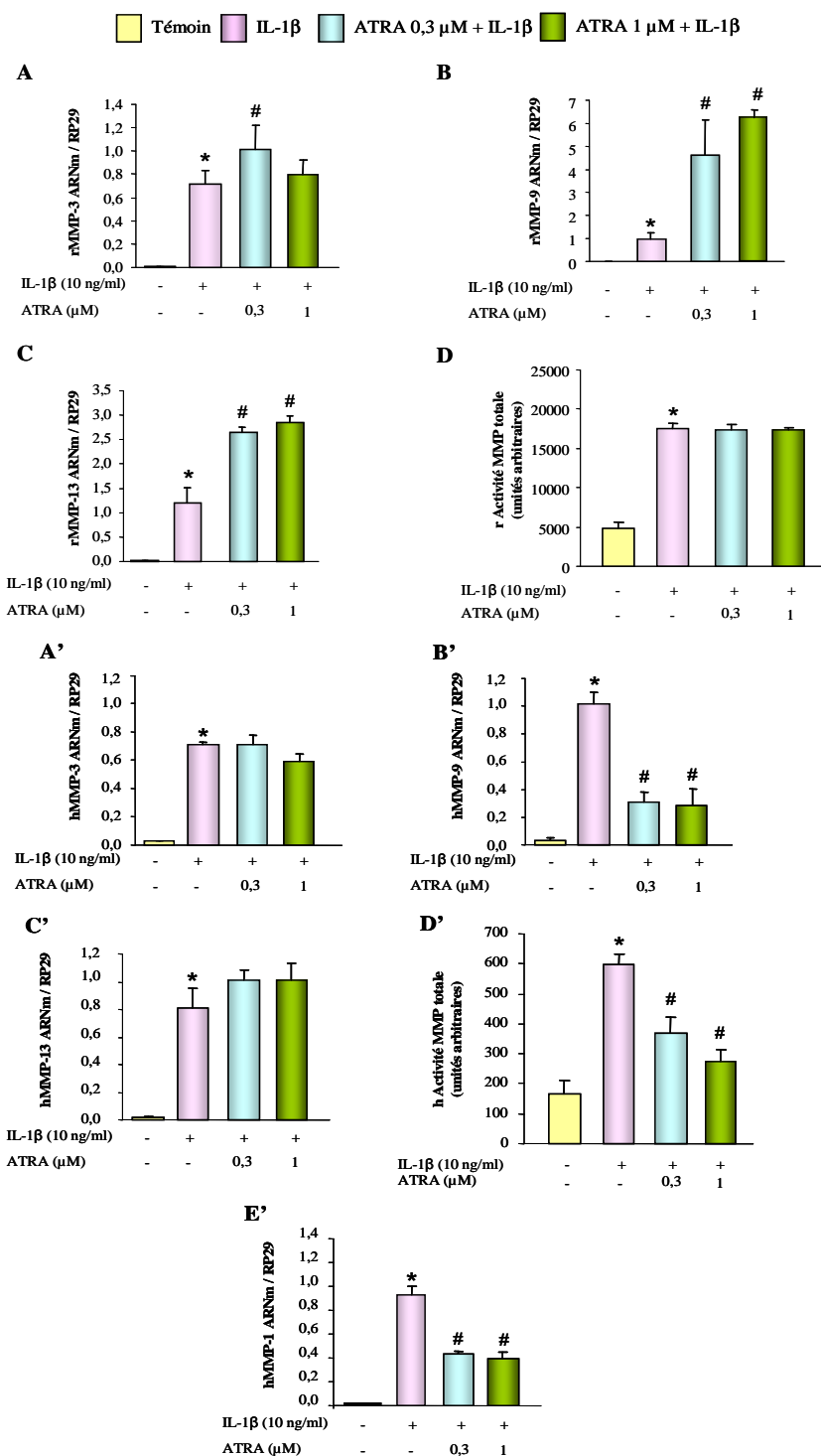


Figure 76 : Effet de l'ATRA sur l'expression et l'activité des MMPs induites par l'IL-1β dans les chondrocytes de rat ou humains.

Les cellules sont stimulées pendant 6 ou 24 heures par 10 ng/ml d'IL-1β recombinante homologue en présence ou non de 0,3 ou 1 μM d'ATRA. Les niveaux d'ARNm des MMP-3 (A et A'), -9 (B et B'), -13 (C et C') et -1 (E') sont évalués par RT-PCR en temps réel et normalisés sur celui de la protéine ribosomale RP29. L'activité totale des MMPs est analysée par une technique fluorométrique, grâce au substrat DNP-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-NH₂ ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$) (D et D'). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type des valeurs issues de trois points expérimentaux indépendants. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$, et par rapport aux cellules stimulées par de l'IL-1β par le symbole # : $P < 0,05$.

4 Effet de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 induite par l'IL-1 β dans les chondrocytes

Nous avons vu que l'ATRA exerçait des effets différents sur l'activité MMP totale selon l'espèce choisie, puisque l'ATRA inhibe fortement l'activité MMP induite par l'IL-1 β dans les chondrocytes humains, alors qu'il ne la modifie pas dans les cellules de rat. L'activation des MMPs pouvant être induite *via* le facteur de transcription AP-1, et ce facteur de transcription étant modulable dans d'autres types cellulaires par les rétinoïdes (dont les fibroblastes synoviaux de rat), nous avons voulu vérifier l'effet de l'ATRA sur AP-1 dans les chondrocytes.

Les chondrocytes ont été stimulés pendant 30 minutes par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. Comme présenté dans la **Figure 77**, la stimulation par l'IL-1 β permet de multiplier par deux la quantité de protéines c-Jun présentes dans les extraits nucléaires de chondrocytes de rat (**Figure 77A**) ou humains (**Figure 77B**). Ces résultats nous permettent de conclure que l'IL-1 β active efficacement la voie AP-1 dans les deux systèmes expérimentaux. L'ATRA (à 1 μ M) ne permet pas d'inhiber l'activation de c-Jun basale ou induite par l'IL-1 β dans les chondrocytes, et ceci quelque soit l'espèce. La différence de résultats entre l'activité MMP totale des chondrocytes de rat et des chondrocytes humains ne peut donc pas s'expliquer par une inhibition de l'activation d'AP-1 dans les chondrocytes humains.

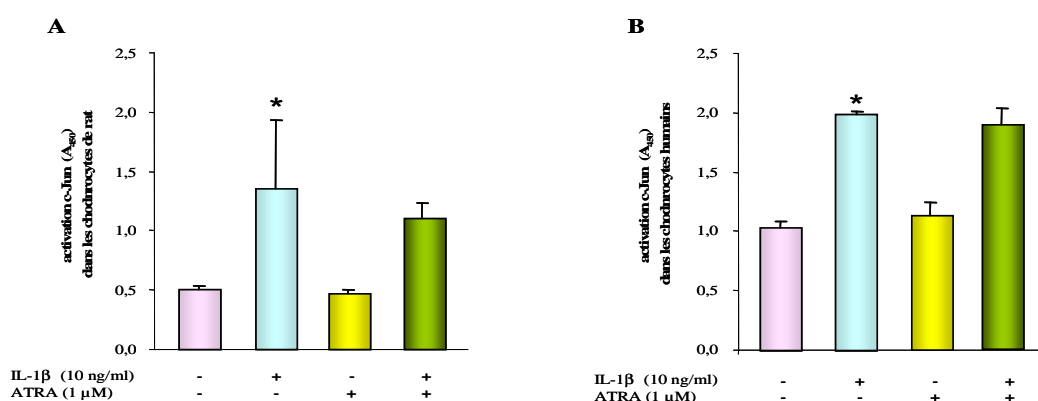


Figure 77 : Effet de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 dans les chondrocytes de rat ou humains. Les chondrocytes de rat (A) et humains (B) sont stimulés pendant 30 minutes par 10 ng/ml d'IL-1 β recombinante homologue en présence ou non d'1 μ M d'ATRA. L'activation de c-Jun est mesurée dans des extraits nucléaires par un dosage ELISA basé sur le kit TransAm[®]. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type pour trois expériences indépendantes. Les différences statistiquement significatives par rapport aux témoins sont indiquées par le symbole * : $P < 0,05$.



Discussion

1 Expression des récepteurs RAR et RXR dans les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes stimulés par l'IL-1 β

Au cours de ce travail, nous avons démontré que tous les isotypes RAR et RXR, excepté l'isotype RXR- γ , sont exprimés dans les fibroblastes synoviaux et des chondrocytes de rat ou humains. L'expression d'autres récepteurs nucléaires a d'ailleurs déjà été montrée dans les fibroblastes synoviaux ou les chondrocytes de rat ou humains, comme PPAR- α (Bordji K. *et al.*, 2000, Boyault S. *et al.*, 2001, Okamoto H. *et al.*, 2005, Simonin M.A. *et al.*, 2002), PPAR- β (Moulin D. *et al.*, 2005), PPAR- γ (Afif H. *et al.*, 2007, Bordji K. *et al.*, 2000, Boyault S. *et al.*, 2001, Simonin M.A. *et al.*, 2002) ou ROR- α (Bordji K. *et al.*, 2000). Ceci est cohérent avec le fait que ces mêmes récepteurs ont été détectés dans des chondrocytes humains issus de patients arthrosiques (Chaturvedi P. *et al.*, 2006), comme 42 autres récepteurs nucléaires.

RAR- α est considéré comme l'isotype le plus ubiquitaire (Germain P. *et al.*, 2006a). RAR- β est détecté de façon plus restreinte, notamment dans le tissu cardiaque, pulmonaire, ou hépatique, et RAR- γ est surtout exprimé dans l'épiderme (Germain P. *et al.*, 2006a). Cependant ce dernier a également été mis en évidence dans des lignées cellulaires mésenchymateuses et cartilagineuses chez des embryons de souris (Ruberte E. *et al.*, 1990), ce qui suggère que cet isotype pourrait être exprimé non seulement au cours du développement, mais également dans les tissus articulaires matures.

Concernant les isotypes RXR, nos résultats confirment les études montrant que RXR- β est présent dans tous les tissus de l'organisme, et complètent les données disponibles sur la localisation de RXR- α , jusqu'à présent limitée au foie, à l'intestin, aux reins et à l'épiderme (Germain P. *et al.*, 2006b). RXR- γ , fortement exprimé dans la peau et les tissus d'origine mésenchymateuse, n'a cependant pas été mis en évidence dans les fibroblastes synoviaux ou les chondrocytes. Cette absence d'expression a déjà été rapportée dans les cellules de Küpffer (Ohata M. *et al.*, 1997), les chondrocytes humains (Chaturvedi P. *et al.*, 2006) ainsi que les cellules musculaires lisses bronchiques (Day R.M. *et al.*, 2006), suggérant ainsi que RXR- γ présente un profil d'expression plus restreint que les autres isotypes.

En réponse à une stimulation par l'IL-1 β , l'expression des isotypes varie selon le type cellulaire et l'espèce étudiés. En effet, dans les cellules de rat stimulées par l'IL-1 β , l'expression de tous les isotypes RAR est réprimée. En revanche, dans les fibroblastes synoviaux humains, les expressions de RAR- α et - γ sont diminuées, alors que dans les

chondrocytes humains, seule l'expression de RAR- β est inhibée. L'expression des isotypes RXR- α et - β reste inchangée dans tous les types cellulaires, à l'exception des fibroblastes synoviaux humains dans lesquels l'expression de RXR- β est fortement inhibée par l'IL-1.

Ces résultats ne sont pas en contradiction avec les données de la littérature, suggérant que l'IL-1 β modulerait l'expression de ces récepteurs nucléaires de façon variable suivant le modèle expérimental étudié. Ainsi, des souris transgéniques surexprimant le gène de l'IL-1 β expriment plus faiblement le transcrite de RAR- γ que les animaux contrôles, sans modification des autres isotypes RAR (Bry K. et Lappalainen U., 2006). À l'inverse, la stimulation par l'IL-1 β augmente les expressions de RAR- β et RXR- β induites par l'ATRA dans des cellules intestinales de rat (Nikawa T. *et al.*, 2001). Ceci suggère que ***l'IL-1 β régule l'expression des isotypes RAR et RXR de façon tissu et/ou espèce dépendante***. L'inhibition de l'expression de RAR par l'IL-1 pourrait être consécutive à l'activation de p38MAPK ou de JNK, deux MAPKs connues pour accroître la phosphorylation de RAR, et le catabolisme de RAR qui en découle, et ceci par la voie du système ubiquitine/protéasome (Gianni M. *et al.*, 2002a, Srinivas H. *et al.*, 2005).

Dans notre système expérimental, on peut donc supposer que l'expression de RAR (et donc des gènes sous son contrôle) serait défavorisée par rapport à celle de RXR, ce qui pourrait influencer la réponse aux agonistes de ces récepteurs. La potentialité de l'IL-1 β à inhiber l'expression des récepteurs nucléaires n'est pas propre à RAR, puisque par exemple l'expression de PPAR- γ est également inhibée par l'IL-1 β dans les chondrocytes de rat (Bordji K. *et al.*, 2000) ou humains (Afif H. *et al.*, 2007), tout comme l'expression du récepteur LXR- α dans les cellules rénales de souris (Wang Y. *et al.*, 2005). Cependant, les agonistes PPAR- γ restent actifs en conditions inflammatoires, notamment parce que l'expression de PPAR- γ est augmentée par ces agonistes (données du laboratoire). Il est important de souligner que l'expression des récepteurs RAR est fortement induite par les rétinoïdes, puisque les trois isotypes RAR possèdent un élément de réponse RARE dans leurs promoteurs (de The H. *et al.*, 1990). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'expression du récepteur RAR- β est, par exemple, multipliée plus de 20 fois par l'ATRA ou le 9-cis RA. Ceci suggère que, malgré l'effet inhibiteur de l'IL-1 sur leur expression, il reste suffisamment de récepteurs RAR exprimés lors d'une co-stimulation par un de leurs agonistes, pour déclencher des réponses pharmacologiques.

Les récepteurs RAR et RXR- α et - β étant détectés dans les cellules articulaires de rat ou humaines, il est envisageable d'étudier les potentialités anti-inflammatoires des rétinoïdes et/ ou des réxinoïdes dans notre système.

Les concentrations des principales molécules qui ont été testées, l'ATRA, le 9-cis RA et le BMS-649, sont de l'ordre de la micromole. Ces concentrations sont plus élevées que les constantes d'affinité pour RAR (Allenby G. *et al.*, 1993) ou pour RXR (Egea P.F. *et al.*, 2002). Cependant, il est important de souligner qu'il existe un écart entre les capacités de liaison des agonistes sur des récepteurs nucléaires purifiés et leurs capacités à transactiver les récepteurs chimériques GAL-4 (Allegretto E.A. *et al.*, 1993). De plus, les concentrations de rétinoïdes utilisées ont été sélectionnées en considérant que des doses plus importantes de rétinoïdes sont nécessaires pour activer la machinerie cellulaire que pour transactiver des construits chimériques. Ces concentrations (1 μ M pour l'ATRA et le 9-cis RA et 0,3 μ M pour le BMS-649) sont relativement proches de celles qui ont été rapportées comme biologiquement actives dans les cellules d'origine articulaire (Ohata M. *et al.*, 1997) ou non (Idres N. *et al.*, 2005), alors que des doses plus faibles se sont avérées sans effet sur la production des médiateurs dans notre système expérimental.

2 Potentialités anti-cytokines des rétinoïdes dans les fibroblastes synoviaux

Dans les fibroblastes synoviaux, nous avons choisi d'étudier trois cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , qui sont représentatives parce qu'elles jouent un rôle clé dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde et sont induites par un stimulus cytokinique [pour revue voir (Connell L. et McInnes I.B., 2006)].

En effet, la synoviale est une source importante de cytokines dans l'articulation, et les fibroblastes synoviaux issus de patients poly-arthritiques sont caractérisés par un déséquilibre entre la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (Firestein G.S. *et al.*, 1994). Dans notre système expérimental, nous avons étudié l'impact de trois rétinoïdes, l'ATRA (agoniste RAR), le 9-cis RA (co-agoniste RAR/RXR) et le BMS-649 (agoniste RXR). Dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β , nous avons démontré que l'ATRA et le 9-cis RA ont des propriétés anti-cytokines importantes, alors que le BMS-649, utilisé seul ou en co-stimulation avec l'ATRA, s'avère inefficace. Ces données sont comparables à celles obtenues dans les cellules fibroblastiques avec de l'ATRA (Lafyatis R. *et al.*, 1990, West-Mays J.A. *et al.*, 1999, Zitnik R.J. *et al.*, 1994), ou dans les macrophages stimulés par du

PMA, du LPS ou de l'IL-1 β en présence d'ATRA ou de 9-cis RA (Motomura K. *et al.*, 2001, Xu J. et Drew P.D., 2006). À l'inverse, des agonistes RXR ont montré leur capacité à réduire la production de médiateurs de l'inflammation, en potentialisant les effets d'agonistes PPAR (Desreumaux P. *et al.*, 2001, Uchimura K. *et al.*, 2001) ou RAR (Kurokawa R. *et al.*, 1995) dans des systèmes expérimentaux variés. De plus, il a été récemment démontré qu'un agoniste RXR pouvait augmenter l'acétylation des histones H4, et que ceci contribuerait à la régulation des promoteurs des MMP-1 et -13 dans des lignées de chondrosarcome (Nagpal S. *et al.*, 1997). Dans notre système expérimental, nous n'avons démontré aucune synergie sur la suppression des cytokines par la co-stimulation par l'ATRA et le BMS-649, alors qu'un co-agoniste RAR/RXR (9-cis RA) était aussi efficace qu'un agoniste RAR (ATRA).

*Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires induite par l'IL-1 β n'est pas dépendante de l'activation du récepteur RXR, et que la liaison des agonistes sur RAR pourrait représenter un évènement clé dans la régulation de l'expression de ces cytokines. Bien qu'étant plus rarement observée que celle des dimères RAR/RXR, l'existence des homodimères RAR/RAR a été démontrée par des expériences de gel retard (Schrader M. *et al.*, 1993). Il est donc théoriquement possible d'observer des réponses biologiques ne dépendant que de l'activation de RAR.*

Les résultats obtenus dans les fibroblastes synoviaux de rat ont pu être confirmés en partie dans les fibroblastes synoviaux humains. En effet, les expressions du TNF- α et de l'IL-6 induites par l'IL-1 β sont réprimées par l'ATRA ou le 9-cis RA. En revanche, l'expression de l'IL-1 β est fortement induite par les deux rétinoïdes. Ces résultats ne sont pas surprenants, puisqu'il a été montré que l'ATRA pouvait réprimer l'expression de l'IL-1 β dans certains types cellulaires, comme dans les fibroblastes (Zitnik R.J. *et al.*, 1994) ou les macrophages (Motomura K. *et al.*, 2001), ou l'induire dans d'autres types cellulaires, comme les kératinocytes ou les monocytes (Blanton R.A. *et al.*, 1989, Matikainen S. *et al.*, 1991, Trechsel U. *et al.*, 1985). D'après certains auteurs, l'induction de l'expression de l'IL-1 β pourrait être due à la présence d'un élément de réponse RARE dans son promoteur (de The H. *et al.*, 1990, Largman C. *et al.*, 1989). Cependant, d'autres auteurs considèrent qu'aucune séquence consensus n'a pu réellement être mise en évidence dans le promoteur de l'IL-1 et impliquent plutôt la formation d'un complexe ternaire entre RAR, sp1 (un autre facteur de transcription ubiquitaire chez les mammifères), et une séquence riche en GC du promoteur pour expliquer l'effet inducteur de l'ATRA (Husmann M. *et al.*, 2000). ***Le promoteur de***

l'IL-1 β semble donc être régulé différemment par l'ATRA selon le type cellulaire et/ou l'espèce étudié.

Les résultats obtenus sur l'expression du TNF- α n'ont cependant pas pu être confirmés par le dosage du médiateur correspondant par ELISA. Cette incohérence entre l'effet de l'ATRA sur l'expression et la production du TNF- α pourrait indiquer que les rétinoïdes régulent cette cytokine de façon post-transcriptionnelle. En effet, il a déjà été démontré que l'ATRA augmentait l'expression (Flannery C.R. *et al.*, 1999) et la production (Holback S. *et al.*, 2008) de la TACE, enzyme qui clive le pro-TNF- α en protéine mature qui est ensuite sécrétée. Cette induction serait en partie dépendante de l'activation de PKC, mais l'existence d'un tel mécanisme reste à démontrer dans notre système.

L'effet de l'ATRA sur la production du TNF- α n'a pas pu être confirmé par la technique des puces à protéines, dans laquelle la stimulation par l'IL-1 β n'a pas provoqué d'augmentation de la production de cette cytokine. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer cette discordance entre les deux techniques : tout d'abord, la réponse aux cytokines pro-inflammatoires varie suivant les patients (De Ceuninck F. *et al.*, 2004). Or les expérimentations ont été effectuées sur deux pools différents de trois patients (un pool pour les dosages ELISA et un pool pour les puces à protéines), qui peuvent ne pas répondre de la même manière aux stimuli inflammatoires. Ensuite, il est important de noter que des cellules issues d'articulations de patients arthrosiques peuvent avoir une réponse à un stimulus catabolique plus faible que celles issues de patients sains (Fan Z. *et al.*, 2005). Cependant, sur la puce à protéines, plusieurs protéines pro-inflammatoires, dont des chémokines ou l'IL-6, qui sont généralement induites en même temps que le TNF- α , ont été détectées en réponse à la stimulation par l'IL-1 β . Une diminution de réponse des cellules semble donc peu probable et incite à poser l'hypothèse que le TNF- α a bien été produit et excrété par les cellules, mais qu'il n'a pas été détecté par la méthode. Une explication possible est que le TNF- α pourrait se combiner avec des récepteurs solubles dans les surnageants de culture, ce qui le rendrait indétectable par les anticorps immobilisés sur la membrane (Levine S.J., 2004). Ces résultats suggèrent soit que les puces à protéines possèdent une capacité de détection de certaines cytokines pro-inflammatoires limitée (la puce est 10 fois moins sensible au TNF- α que la méthode ELISA), soit qu'elles sont plus sensibles aux inhibiteurs endogènes des cytokines que d'autres méthodes de dosage, en particulier pour le TNF- α . La discordance entre les deux techniques a également été observée pour le dosage de l'IL-6. En effet, l'inhibition médiée par l'ATRA observée par la méthode ELISA n'a pas été retrouvée par la technique des puces

à protéines. Ceci pourrait être dû à la réponse explosive à l'IL-1, qui, à cause de la technique utilisant une révélation sur film photosensible, conduirait à la saturation de l'intensité lumineuse des spots de la membrane, en défaveur d'une détection de faibles variations.

Nous avons ensuite étudié plus particulièrement les mécanismes d'action de l'ATRA, le rétinoïde qui s'est révélé le plus efficace dans les fibroblastes synoviaux de rat, sur la régulation transcriptionnelle des cytokines. Dans les cellules stimulées par l'IL-1 β , l'exposition à l'actinomycine D ne change pas le taux de décroissance des ARNm des cytokines en présence d'ATRA. *Ces résultats montrent que l'ATRA n'inhibe pas l'expression des cytokines par une diminution de la stabilité des transcrits.* Ces résultats sont cependant en contradiction avec ceux obtenus dans les macrophages de rat stimulés par du LPS (Motomura K. *et al.*, 2001), ce qui démontre bien que *les mécanismes mis en jeu par l'ATRA dépendent des conditions expérimentales (type cellulaire, agent stimulateur...).*

En utilisant la technique TransAm[®], nous avons ensuite démontré que l'ATRA réduit l'activité transcriptionnelle de NF-IL-6 et AP-1 dans les fibroblastes synoviaux de rat, mais pas celle de NF- κ B (p65). Les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression du TNF- α et de l'IL-1 β (Firestein G.S. et Manning A.M., 1999), alors que NF-IL-6 participe de façon majeure à celle de l'IL-6 (Wedel A. et Ziegler-Heitbrock H.W., 1995) (**Figure 78**). L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF-IL-6 par l'ATRA a déjà été montrée dans les cellules de sarcomes de Kaposi (Nagpal S. *et al.*, 1997), comme c'est également le cas pour d'autres agonistes RAR, comme le TTNPB ou le tazarotène, dans les cellules HeLa stimulées par de l'IFN- γ (DiSepio D. *et al.*, 1997). Dans tous les cas, l'inhibition du facteur NF-IL-6 engendre l'inhibition de la production d'IL-6, comme dans notre système.

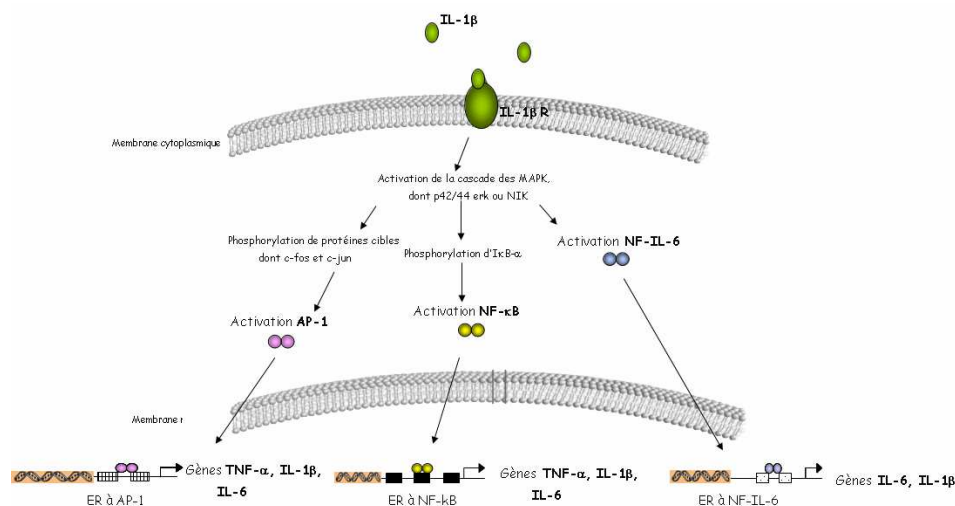


Figure 78 : Induction de l'expression du $TNF-\alpha$, de l' $IL-1\beta$ et de l' $IL-6$ dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l' $IL-1\beta$.

La cascade d'activation fait intervenir des MAPKs, qui vont elles-mêmes activer des facteurs de transcription comme AP-1, NF- κ B et NF-IL-6.

Les rétinoïdes induisent également des effets anti-prolifératifs ou anti-inflammatoires par une réduction de l'activation de la voie AP-1 [pour revue voir (Pfahl M., 1993)]. Ainsi, le récepteur RAR peut, après fixation de l'ATRA, inhiber l'expression de MMP-1 en interagissant physiquement avec c-Jun, un composant majeur du dimère AP-1, dans les fibroblastes synoviaux de lapin (Schroen D.J. et Brinckerhoff C.E., 1996). D'autre part, l'ATRA, comme d'autres rétinoïdes, peut interagir avec la liaison d'AP-1 sur son élément de réponse (Ho L.J. *et al.*, 2005, Pfahl M., 1993, Schule R. *et al.*, 1990). Les rétinoïdes peuvent également inhiber la voie NF- κ B, *in vivo* chez des souris déficientes en vitamine A (Austena L.M. *et al.*, 2004) ou dans des cellules THP1 (Chen Q. *et al.*, 2002), par une interaction physique du facteur de transcription avec le récepteur RAR ligandé. Lors de nos expériences, nous avons obtenu des effets contradictoires de l'ATRA sur NF- κ B suivant la technique employée, pour les mêmes temps de stimulation. En effet, pour les expériences de puces à facteurs de transcription, l'activation de NF- κ B était augmentée de 800 % par la stimulation par l' $IL-1\beta$, et réduite de 80 % par l'action de l'ATRA. En revanche, pour les expériences de TransAm[®], nous avons démontré une activation de NF- κ B par l' $IL-1\beta$ de 80 %, et une absence d'effet de l'ATRA. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les éléments de réponse à NF- κ B fixés sur la membrane des puces à facteurs de transcription reconnaissent tous les dimères NF- κ B (p50/p65, p50/p50, p65/c-Rel, ...), alors que les anticorps utilisés lors des expériences de TransAm[®] ne reconnaissent que les dimères contenant la sous-unité p65. L'inhibition de NF- κ B par l'ATRA observée sur les puces à protéines pourrait donc être due à

un dimère autre que p50/p65, plus conventionnel. Cette hypothèse pourrait être vérifiée, par exemple avec des expériences de TransAm® contenant des anticorps spécifiques d'autres sous-unités de NF- κ B, ou avec des expériences de gel retard. Il sera également nécessaire de vérifier si ces résultats sont applicables aux cellules humaines.

Les potentialités inhibitrices de l'ATRA sur AP-1 et NF-IL-6 observées dans nos conditions expérimentales pourraient donc fournir une explication plausible de ses effets suppresseurs sur l'expression du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β (Figure 79).

Il est important de noter que les effets inhibiteurs de l'ATRA sur les trois facteurs de transcription ne sont pas reproduits par le BMS-649 (données personnelles), ce qui suggère que cette inhibition serait soit dépendante de RAR, soit secondaire à une interaction directe de l'ATRA avec les facteurs de transcription.

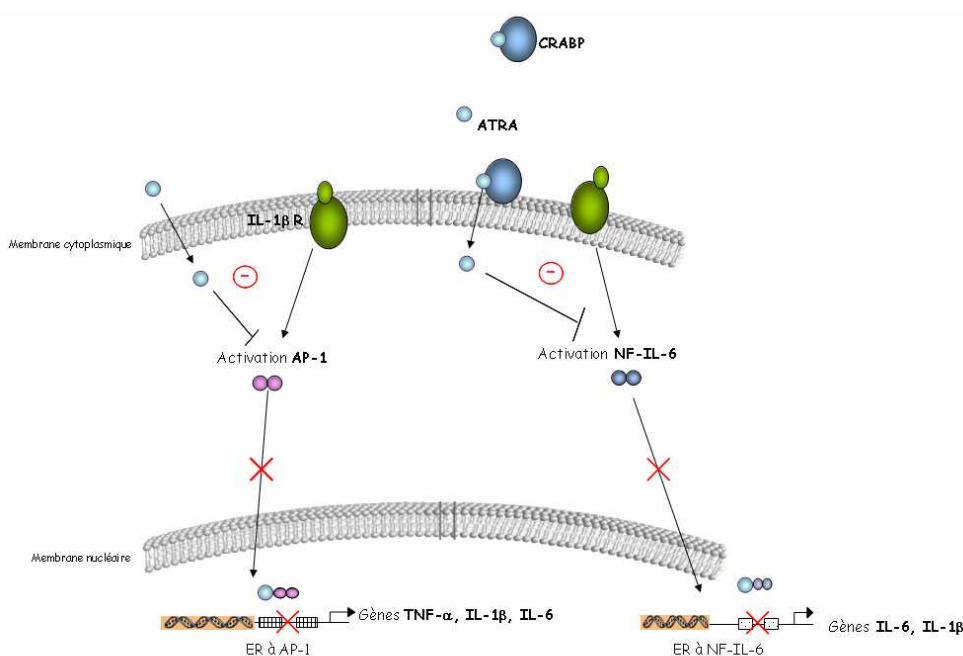


Figure 79 : Effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation de l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1 β

Afin d'examiner si les effets anti-cytokines de l'ATRA dépendent ou non de l'activation du récepteur RAR, nous avons ensuite développé deux stratégies complémentaires :

- nous avons essayé de reproduire les effets de l'ATRA en utilisant des agonistes sélectifs des isotypes RAR : le BMS-753 pour RAR- α , le BMS-453 pour RAR- β , et le BMS-961 pour RAR- γ .
- nous avons évalué les conséquences de l'inactivation des récepteurs RAR- α , - β et - γ par ARN interférence sur les effets de l'ATRA.

De façon inattendue, les agonistes RAR ne sont pas capables de reproduire les effets de l'ATRA, et l'inhibition des isotypes RAR s'avère sans incidence sur l'action suppressive de l'ATRA.

L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un effet anti-cytokine de l'ATRA indépendant de l'activation de RAR dans les fibroblastes synoviaux de rat.

Enfin, nous avons déterminé l'implication des MAP kinases dans les effets inhibiteurs de l'ATRA sur les facteurs de transcription et les cytokines pro-inflammatoires. Comme prévu pour notre type cellulaire fibroblastique, nous avons montré que la phosphorylation des différentes MAP kinases étudiées (SAPK/JNK, p38, ERK_{1/2}) était induite par une stimulation à l'IL-1 β dans notre système expérimental. Cependant, l'ATRA n'affecte ni la phosphorylation de p38 ni celle de JNK. En revanche, il inhibe significativement la phosphorylation d'ERK_{1/2} après 30 minutes de stimulation par l'IL-1 β , ce qui diffère des résultats rapportés dans les chondrocytes humains. En effet, dans ce type cellulaire, il a été montré que l'ATRA inhibait la production d'IL-1 β et de TNF- α par une diminution de la phosphorylation de p38 et une inhibition de c-Jun (Ho L.J. *et al.*, 2005). Ceci confirme l'importance du type cellulaire pour l'interprétation des résultats.

Dans les fibroblastes synoviaux, l'activation d'ERK_{1/2} est un événement précoce induit par l'IL-1 β (Lu H.T. *et al.*, 2007, Thiel M.J. *et al.*, 2007), et un niveau élevé de P-ERK a été rapporté dans la synoviale de patients arthritiques par rapport à des individus sains (Meyer L.H. et Pap T., 2005). De plus, l'administration d'inhibiteurs sélectifs de la voie des MAPK MEK/ERK a récemment montré une diminution des taux de P-ERK dans les tissus articulaires, et une réduction de la sévérité des lésions dans une arthrite expérimentale (Thiel M.J. *et al.*, 2007).

Dans notre système expérimental, l'inhibiteur de MEK1 (le PD-98059) reproduit les effets suppresseurs de l'ATRA sur l'IL-6, à des concentrations inhibant fortement la phosphorylation d'ERK_{1/2}. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition importante de la voie ERK_{1/2} par l'ATRA pourrait participer à ses effets suppresseurs sur la production d'IL-6 induite par l'IL-1. En revanche, l'inhibiteur de MEK1 ne reproduit pas les effets anti-TNF- α de l'ATRA, ce qui laisse supposer que cette inhibition ne serait pas dépendante de la voie ERK_{1/2}.

Les facteurs de transcription NF-IL-6, AP-1 et NF- κ B possèdent des sites de liaison sur le promoteur de l'IL-6, mais leur contribution respective aux effets stimulateurs de l'IL-1 sur l'expression de l'IL-6 semble variable dans les fibroblastes synoviaux (Georganas C. *et al.*,

2000, Miyazawa K. *et al.*, 1998). En effet, dans notre système expérimental, nous avons démontré que l'activation des voies de NF-IL-6, AP-1 et NF- κ B par l'IL-1 était maximale à différents temps (4 heures ou 30 minutes). Ces cinétiques d'activation pourraient expliquer les résultats discordants trouvés dans la littérature sur les cellules humaines. En effet, dans nos expériences nous confirmons l'absence d'activation de NF-IL-6 ou de c-Jun après 30 minutes de stimulation par l'IL-1 (Georganas C. *et al.*, 2000), mais une forte activation de ces deux voies après 4 heures de stimulation (Miyazawa K. *et al.*, 1998). Aux temps optimaux d'activation, nous avons démontré que l'ATRA supprimait l'activation des voies NF-IL-6 et AP-1, mais non celle de NF- κ B (p65), et que cet effet était reproduit par l'inhibiteur d'ERK_{1/2} (PD-98059). Ces résultats démontrent que la voie NF- κ B (p65) n'est pas la cible de l'ATRA ni d'ERK_{1/2} dans notre type cellulaire. Au contraire, les effets inhibiteurs du PD-98059 montrent qu'en plus de la voie de régulation classique par JNK (Hall J.P. *et al.*, 2007, Han Z. *et al.*, 2001), AP-1 est également activable par ERK dans les fibroblastes synoviaux (Barchowsky A. *et al.*, 2000, Han Z. *et al.*, 2001, Morel J.C. *et al.*, 2002) et pourrait contribuer à la production d'IL-6 induite en réponse à l'IL-1 (Miyazawa K. *et al.*, 1998). Ce résultat est cohérent avec la régulation de MMP-1 par l'IL-1 dans les fibroblastes synoviaux de lapin, où un effet suppresseur du PD-98059, mais pas de l'inhibiteur de p38 (SB203580), suggère que la voie ERK_{1/2} intervient dans la phosphorylation et l'activation de c-Jun (Barchowsky A. *et al.*, 2000). Le troisième facteur de transcription, NF-IL-6, peut être activé par de nombreux signaux biologiques, mais contient également un site de phosphorylation par les MAP kinases fortement conservé (Nakajima T. *et al.*, 1993), qui régule sa translocation nucléaire en réponse à des facteurs de croissance (Piwien-Pilipuk G. *et al.*, 2002). Nos résultats démontrent que l'activation de NF-IL-6 dépend de l'activation d'ERK_{1/2}, ce qui a déjà été décrit dans la littérature avec les effets différenciateurs de l'adiponectine sur des fibroblastes pré-adipocytaires (Park B.H. *et al.*, 2004). Une telle répression de NF-IL-6 pourrait contribuer aux effets inhibiteurs du PD-98059 sur l'expression de l'IL-6, puisque le blocage de NF-IL-6 dans les cellules de sarcome de Kaposi diminue la production d'IL-6 (Nagpal S. *et al.*, 1997). Ainsi, nos résultats démontrent ***qu'ERK_{1/2} contribue à l'activation d'AP-1 et de NF-IL-6 induite par l'IL-1 dans les fibroblastes synoviaux.*** De plus, nos expériences suggèrent que ***les effets suppresseurs de l'ATRA sur ces facteurs de transcription pourraient impliquer l'inhibition de la phosphorylation d'ERK_{1/2} (Figure 80).*** Ce mécanisme est cohérent avec les capacités des rétinoïdes à induire la plupart de leurs effets anti-inflammatoires par la réduction de l'activation des voies AP-1 [pour revue voir (Pfahl M.,

1993)] ou NF-IL-6 (Nagpal S. *et al.*, 1997), même si ces résultats restent à confirmer dans d'autres types cellulaires.

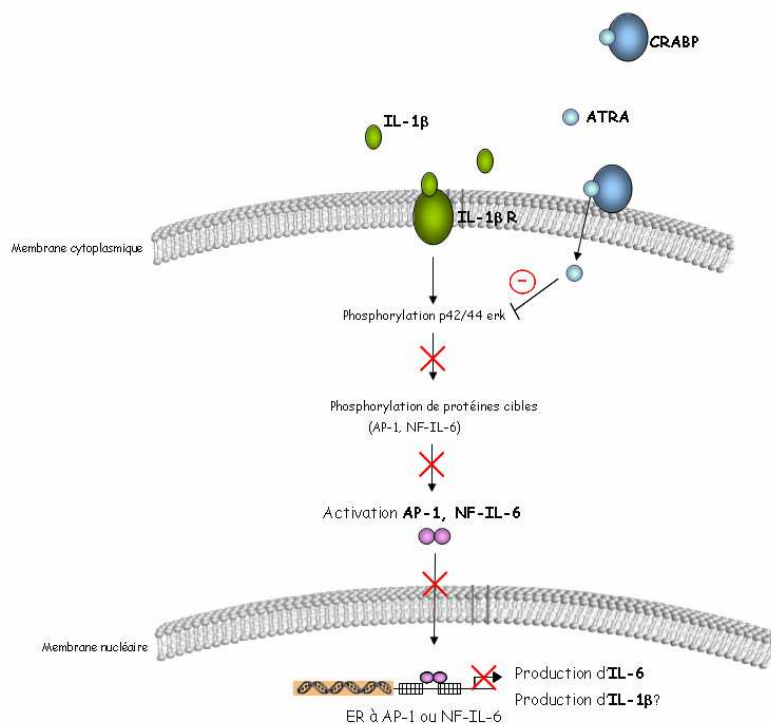


Figure 80 : Contribution d'ERK_{1/2} dans l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 et de NF-IL-6 dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1β.

En conclusion, nous avons démontré que l'ATRA, mais ni les agonistes sélectifs de RAR, ni l'agoniste de RXR, possède des effets inhibiteurs puissants sur la production de trois cytokines pro-inflammatoires fortement impliquées dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.

Malgré l'expression de tous les isotopes RAR et RXR (mis à part RXR-γ) dans les fibroblastes synoviaux, les effets inhibiteurs de l'ATRA sur deux des facteurs de transcription étudiés (AP-1 et NF-IL-6) sont indépendants de RAR. De plus, l'ATRA inhibe la phosphorylation d'ERK_{1/2} sans affecter celles des voies p38 MAPK et SAPK/JNK, ce qui pourrait expliquer l'inactivation de la voie AP-1 et NF-IL-6. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur les potentialités anti-arthritiques de ce composé, d'autant que nous ne pouvons pas exclure un effet additionnel de l'ATRA sur l'activité histone désacétylase, qui est réduite dans le tissu synovial de patients arthrosiques ou arthritiques (Huber L.C. *et al.*, 2007).

Ces effets anti-inflammatoires de l'ATRA obtenus indépendamment des récepteurs RAR pourraient être intéressants du point de vue thérapeutique, au vu des effets

indésirables associés à l'activation de ces récepteurs et plus particulièrement de RAR- γ

Cependant, ils sont également une limite à son utilisation car il serait très difficile de démontrer qu'il ne s'agit pas d'effets non spécifiques, susceptibles d'atteindre des cibles cellulaires non souhaitées. De façon surprenante, nous n'avons pas démontré d'efficacité des agonistes RAR- α et RAR- β , alors qu'ils étaient fonctionnels dans notre système expérimental, même s'il reste à démontrer que les effets observés dans les cellules de rat sont extrapolables aux cellules humaines. Les résultats préliminaires démontrent, en effet, que l'action de l'ATRA sur la production stimulée d'IL-1 est très différente dans les cellules humaines, ce qui souligne les limites de notre travail mais obère également la portée des potentialités anti-arthritiques rapportées dans les modèles animaux (rat principalement).

3 Propriétés anti-cataboliques et anti-inflammatoires de l'ATRA dans les chondrocytes

Lors de ce travail, nous avons choisi d'étudier la voie inductible du NO dans les chondrocytes. Cette voie est considérée comme très représentative de la réponse inflammatoire chondrocytaire, car les chondrocytes produisent plus de NO que les macrophages en réponse à un stimulus inflammatoire (Evans C.H. *et al.*, 1996). Cette surproduction de NO contribue à l'inhibition de la synthèse des composants matriciels, et des inhibiteurs de la NO synthase réduisent les lésions cartilagineuses au cours d'arthrites ou d'arthroses expérimentales (Jouzeau J.Y. *et al.*, 1999).

Dans notre système expérimental, l'IL-1 β a stimulé de façon importante l'expression d'iNOS dans les chondrocytes des deux espèces, bien que la production correspondante de nitrites ait été plus importante dans les cellules de rat que dans les cellules humaines. Sur la base des données publiées, la modulation de la voie du NO par les rétinoïdes est très variable et conduit parfois à des résultats contradictoires. En effet, l'ATRA inhibe l'expression d'iNOS et/ou la production de NO dans plusieurs types cellulaires exposés à des stimuli inflammatoires très variés (Becherel P.A. *et al.*, 1996, Datta P.K. et Lianos E.A., 1999, Dheen S.T. *et al.*, 2005, Hirokawa K. *et al.*, 1994, Kang M.K. *et al.*, 2004, Mehta K. *et al.*, 1994, Motomura K. *et al.*, 1997, Oh G.S. *et al.*, 2001, Yang J.Y. *et al.*, 2002). De plus, l'ATRA réprime la voie inductible du NO chez des souris développant une arthrite (Nozaki Y. *et al.*, 2006) ou des rats développant des glomérulonéphrites d'origine immune (Datta P.K. *et al.*, 2001). À l'inverse, l'ATRA induit la synthèse d'iNOS dans des lignées monocytaires (Austena L.M. et Ross A.C., 2001, Dugas N. *et al.*, 1996) ou cancéreuses (Ghigo D. *et al.*, 1998, Martin J.H. *et al.*, 2000). D'autre part, il stimule la voie inductible du NO chez des rats développant un choc

septique (Devaux Y. *et al.*, 2000), ce qui participerait d'ailleurs à l'augmentation de la mortalité chez les animaux traités. Même si l'origine de ces différences demeure inconnue, l'effet inhibiteur de l'ATRA sur l'expression induite d'iNOS dans les chondrocytes est cohérent avec ses propriétés anti-arthritiques dans les modèles animaux.

Nous avons également étudié l'effet de l'ATRA sur l'expression des MMP-1, -3, -9 et -13, ainsi que sur l'activité MMP totale. Dans nos conditions, les chondrocytes de rat et humains expriment les ARNm des MMP-3, -9 et -13 en réponse à une stimulation par l'IL-1 β , ce qui confirme l'effet inducteur bien connu de cette cytokine sur les MMPs (Borden P. *et al.*, 1996, Flannery C.R. *et al.*, 1999, Gouze J.N. *et al.*, 2006, Kubota T. *et al.*, 1998, Madhavan S. *et al.*, 2006, Nguyen Q. *et al.*, 1992, Reboul P. *et al.*, 1996). L'expression de MMP-1 n'a pu être étudiée que dans les chondrocytes humains, car les chondrocytes de rat expriment une collagénase interstitielle partageant 86 % d'homologie avec MMP-13 (Feige U. *et al.*, 1989, Henriot P. *et al.*, 1992, Schorpp M. *et al.*, 1995), mais pas avec MMP-1 (Schorpp M. *et al.*, 1995). L'expression de MMP-1 dans les chondrocytes humains est également stimulée par l'IL-1 β .

Dans les cellules de rat, l'ATRA potentialise les effets de l'IL-1 sur les MMP-3 et -13, et ce dès la plus faible concentration testée, alors qu'il reste inefficace sur les cellules humaines. Ces résultats sont cohérents avec la capacité de l'ATRA à stimuler l'expression basale des MMPs, qui est sous le contrôle d'AP-1, dans des chondrocytes d'épiphyse de rat (Ballock R.T. *et al.*, 1994). Ces données sont plus surprenantes pour les cellules humaines, puisqu'il a été montré que l'ATRA induisait l'expression de MMP-3 dans les chondrocytes non stimulés (Flannery C.R. *et al.*, 1999), alors qu'il inhibait la production et l'activation de MMP-3 induite par des cytokines dans une lignée cellulaires de fibroblastes pulmonaires (Ho L.J. *et al.*, 2005). D'un autre côté, l'ATRA a été rapporté comme supprimant l'expression et l'activité de la MMP-13 induite par l'IL-1 β dans les chondrocytes humains (Ho L.J. *et al.*, 2005), dans le cartilage bovin (Shingleton W.D. *et al.*, 2000) ainsi que dans du cartilage de lapin stimulé par du PMA (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1982). Il faut souligner cependant que les effets inhibiteurs de l'ATRA sur l'expression de MMP-13 peuvent se transformer en des effets inducteurs, selon le temps d'incubation (Shingleton W.D. *et al.*, 2000), ce qui suggère que **le rôle régulateur de l'ATRA sur les MMPs est fortement dépendant des conditions expérimentales.**

L'effet le plus marqué de l'ATRA a été observé sur l'expression de MMP-9, qui est induite dans les cellules de rat, tout en étant très fortement réprimée dans les cellules humaines. Cet

effet inducteur sur MMP-9 a été rapporté dans la littérature dans des chondrocytes de poulet (Tong A. *et al.*, 2003), bien que l'ATRA ait également été montré comme étant inefficace sur l'expression de MMP-9 dans les macrophages hépatiques de rat (Motomura K. *et al.*, 2001). Encore une fois, ces résultats suggèrent que ***la régulation de l'expression de MMP-9 par l'ATRA est largement influencée par le type cellulaire ou l'espèce.***

Enfin, l'ATRA a réduit fortement l'expression de MMP-1 dans les chondrocytes humains. Ces résultats confirment ceux de Ho *et al.*, qui ont montré que l'ATRA inhibait l'expression, la production et l'activité de MMP-1 grâce au blocage des voies p38 et JNK dans ce type cellulaire (Ho L.J. *et al.*, 2005). De même, l'activité collagénase est inhibée par l'ATRA dans du cartilage de lapin stimulé par du PMA (Brinckerhoff C.E. *et al.*, 1982).

Les MMP-1 et -9, qui sont fortement réprimées par l'ATRA dans les chondrocytes humains, sont des enzymes contribuant activement au catabolisme des constituants du cartilage, dont le collagène de type II, l'agrécan, les protéoglycanes ou encore la fibronectine. La répression de ces enzymes est donc intéressante en termes de physiopathologie articulaire et pourrait s'accompagner d'effets chondroprotecteurs.

L'ensemble de ces résultats souligne que les potentialités pharmacologiques de l'ATRA sur les cellules humaines ne peuvent pas être extrapolées à partir des données obtenues chez le rat. Ceci est bien illustré par l'effet de l'ATRA sur MMP-9, fortement inducteur sur les cellules de rat et inhibiteur sur les cellules humaines. Ceci suggère que les potentialités thérapeutiques de l'ATRA pourraient être supérieures à ce qui peut être attendu à partir des cellules animales.

Il est également important de souligner que nous avons mis en évidence des différences flagrantes lors de la caractérisation des chondrocytes de rat et humains. En effet, l'expression de collagène de type II était importante dans les cellules des deux espèces, alors que celle du collagène de type X n'était pas détectable. En revanche, les chondrocytes de rat n'exprimaient pas du tout de collagène de type I, alors que les chondrocytes humains expriment fortement ce marqueur de dédifférenciation chondrocytaire. Cette différence est sûrement due au fait que les chondrocytes humains proviennent de patients arthrosiques. ***Les différences de réponse à l'ATRA selon l'espèce pourraient donc également provenir du fait que les cellules humaines sont déjà engagées sur la voie de la dédifférenciation, contrairement aux cellules de rat.***

Dans les chondrocytes des deux espèces, l'IL-1 β a stimulé l'activité MMP totale dans les surnageants de culture, confirmant ainsi que l'effet inducteur sur l'expression des MMPs est

bien traduit en des enzymes fonctionnelles. Dans nos conditions expérimentales, l'ATRA montre une différence évidente entre les deux espèces, car il n'a pas d'effet sur l'activité MMP dans les cellules de rat, alors qu'il l'inhibe significativement dans les cellules humaines. Il est important de noter que le substrat fluorogénique utilisé est surtout sensible à l'activité de clivage par MMP-2, et à un degré moindre par MMP-1, -3 et -13, et est donc surtout représentatif des gélatinases (Knight C.G. *et al.*, 1992). Ce résultat est cohérent avec l'important effet inhibiteur de l'ATRA sur MMP-9 dans les chondrocytes humains, et avec sa capacité à inhiber l'expression des MMP-2 et -9 induites par le PMA dans les lignées cellulaires de carcinome rénal (Roomi M.W. *et al.*, 2006). Comme l'ATRA inhibe également les activités MMP-1 et -13 dans les chondrocytes humains (Ho L.J. *et al.*, 2005), nos résultats suggèrent que l'ATRA pourrait être efficace pour réduire la dégradation du cartilage lors des arthropathies.

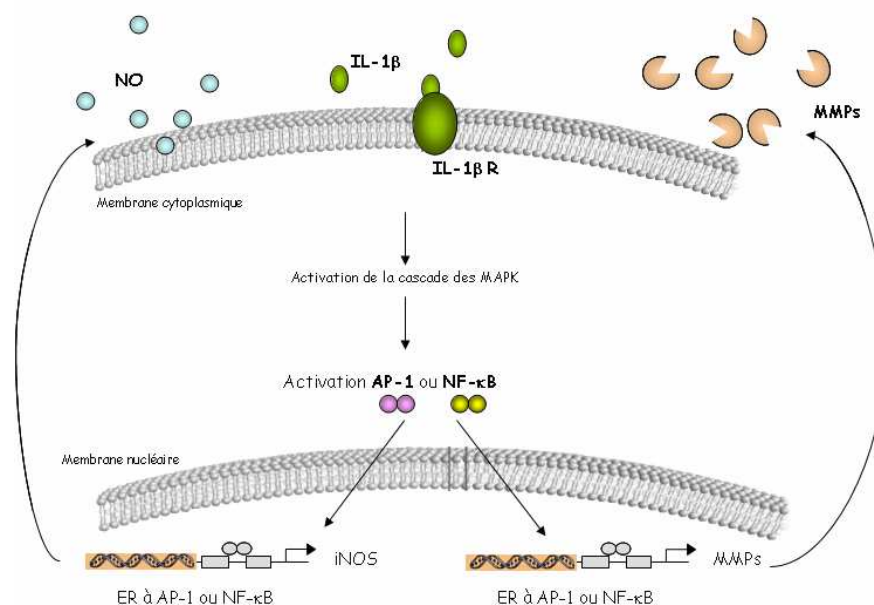


Figure 81 : La production du NO, ainsi que l'activation des MMPs peuvent être stimulées par l'IL-1β.

Après avoir engendré l'activation de la cascade des MAPKs, cette stimulation peut activer des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme AP-1 ou NF-κB, qui vont induire l'expression d'iNOS ou des MMPs.

Les effets anti-inflammatoires des rétinoïdes ont souvent été reliés à une inhibition de la voie AP-1, comme nous l'avons déjà vu (**Figure 81**). Cependant cette interaction dépend du type cellulaire étudié (Zhou X.F. *et al.*, 1999). De plus, certains antagonistes de RAR ont paradoxalement démontré des propriétés anti-AP-1 (Chen J.Y. *et al.*, 1995) qui se sont accompagnées d'effets anti-inflammatoires dans l'arthrite expérimentale (Beehler B.C. *et al.*, 2003). Dans les chondrocytes humains, les effets anti-AP-1 de l'ATRA co-existent avec

l'inhibition des activités p38 et JNK induites par l'IL-1 β , ce qui suggère que l'effet suppresseur de l'ATRA peut impliquer d'autres cibles en amont d'AP-1 (Ho L.J. *et al.*, 2005). Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons montré que l'IL-1 β augmente la translocation d'AP-1 vers le noyau dans les deux espèces, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet inhibiteur de l'ATRA sur ce paramètre, même après des temps d'incubation plus longs. Ces résultats ont été confirmés sur l'activation de c-Fos, ainsi que par des expériences de Western-Blot sur la phosphorylation de c-Jun (données personnelles). Nos résultats sont donc en faveur d'une régulation de ***l'expression d'iNOS et des MMPs par l'ATRA via des mécanismes n'impliquant pas la voie AP-1.*** D'autres voies de régulation sont donc à envisager. Il a été montré récemment que l'activation d'ERK1/2, ainsi que de NF- κ B était primordiale dans l'induction de l'expression des MMP-1 et -13 dans des chondrocytes humains stimulés par de l'IL-1 (Fan Z. *et al.*, 2006). D'autres études ont également montré que cette activation pouvait également dépendre de p38 et de JNK. L'étude de la voie d'activation des MAPK ainsi que de NF- κ B pourrait donc permettre d'expliquer les différences obtenues entre les cellules de rat et humaines.

En résumé, ce travail sur les chondrocytes a mis en évidence des effets très différents de l'ATRA entre les cellules de rat et les cellules humaines, surtout pour ce qui concerne la modulation de l'expression de MMP-9 ou de l'activité MMP totale. Ces résultats montrent que l'ATRA agit de façon espèce/spécifique, et que l'extrapolation de ces propriétés pharmacologiques à partir de cellules de rongeurs n'a que peu de pertinence en situation clinique.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence des propriétés anti-inflammatoires intéressantes dans les fibroblastes synoviaux (anti-cytokine) et dans les chondrocytes (diminution du NO et de l'activité MMP). Cependant, nous avons également démontré de fortes variations dans la régulation de ces paramètres suivant l'espèce étudiée (rat/Homme), qui ne permettent pas de rapporter les résultats observés chez le rat aux cellules humaines. De même, la toxicité qui peut être observée chez les animaux ne peut pas être extrapolée chez l'Homme, puisque par exemple l'Homme est plus sensible à l'acide 13-cis rétinolique que les singes et les lapins, tandis que les rongeurs y sont insensibles (Soprano D.R. et Soprano K.J., 1995). Ces différences peuvent s'expliquer, au moins en partie, par des variations pharmacocinétiques (clairance du produit, absorption par le placenta, production variable des métabolites...), mais cette remarque n'est pas applicable aux systèmes expérimentaux que nous avons utilisés.





Conclusions et Perspectives

Au cours de cette étude, nous avons montré que tous les isotypes de RAR et de RXR, excepté l'isotype RXR- γ , étaient présents dans les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes, de rat ou humains. La stimulation par l'IL-1 β entraînait plutôt une chute de l'expression des récepteurs RAR, et ne modifiait que peu l'expression des récepteurs RXR.

Concernant les fibroblastes synoviaux, nous avons montré que l'ATRA (agoniste RAR) et le 9-cis RA (co-agoniste RAR/RXR), contrairement au BMS-649 (agoniste RXR), inhibaient efficacement l'expression et la production des trois cytokines inflammatoires stimulées par l'IL-1 β (TNF- α , IL-1 β et IL-6) dans les cellules de rat. Les agonistes sélectifs des isotypes RAR n'ont pas permis de reproduire ces effets. Ceci suggère donc que i) les effets de ces rétinoïdes sont indépendants de l'isotype RXR, car les effets ne sont pas potentialisés par un agoniste RXR ; ii) ces effets sont également indépendants de l'isotype RAR, car non reproduits par les agonistes sélectifs de RAR.

Nous avons également démontré que l'ATRA inhibait l'activité transcriptionnelle de deux facteurs de transcription, AP-1 et NF-IL-6, ce qui pourrait participer à l'inhibition des cytokines étudiées.

Enfin, nous avons démontré que la phosphorylation d'ERK_{1/2}, MAPK qui régule l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires, était en partie inhibée par l'ATRA. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie ERK_{1/2} reproduisait les effets inhibiteurs de l'ATRA sur l'activation d'AP-1 et de NF-IL-6, ainsi que sur la production d'IL-6.

- Il reste cependant à s'assurer de la nature des dimères NF- κ B inhibés par l'ATRA dans les expériences de puces à protéines. Pour cela, il serait important d'utiliser d'autres anticorps spécifiques des différentes sous-unités de NF- κ B existantes.
- De plus, la régulation de l'expression du TNF- α par l'ATRA reste également à étudier, puisqu'elle ne semble pas dépendante de la voie ERK.

Comme nous avons vu que l'ATRA inhibait la phosphorylation d'ERK_{1/2} d'environ 30 à 50 % seulement, nous avons conclu que l'inhibition d'ERK_{1/2} participait en partie à la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoire. Un autre mécanisme susceptible d'expliquer les effets de l'ATRA indépendamment de RAR et d'ERK_{1/2} serait la modulation de l'activité histone désacétylase (HDAC). En effet, ces enzymes participent à la régulation de la transcription de gènes cibles en modifiant l'état d'acétylation de l'ADN (Gallinari P. *et al.*, 2007). Plus les histones sont désacétylés, plus l'ADN est compacté, et moins la machinerie transcriptionnelle a accès à l'ADN (**Figure 82**). Par exemple, dans des cellules embryonnaires

de souris, l'ATRA induit la compaction de la chromatine par une augmentation de l'activité HDAC, ce qui entraîne l'inhibition de la transcription du récepteur opioïde kappa (Park S.W. *et al.*, 2005). Il est donc théoriquement envisageable que l'ATRA puisse en faire de même dans notre type cellulaire sur le promoteur de gènes cibles des facteurs de transcription. Malheureusement, dans notre système expérimental, nous n'avons pas obtenu de résultats reproductibles sur l'effet de l'ATRA sur l'activité HDAC :

- Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'ATRA sur l'activité HDAC à d'autres temps de stimulation par l'IL-1 β et/ou en utilisant d'autres techniques plus sensibles, et de le comparer avec ceux engendrés par un activateur d'HDAC (théophylline), puis éventuellement de tester sa sensibilité à un inhibiteur d'HDAC (trichostatine).
- Il serait également intéressant de vérifier cette hypothèse directement sur les promoteurs des gènes cibles par immunoprécipitation de la chromatine avec des anticorps dirigés contre les histones H4.

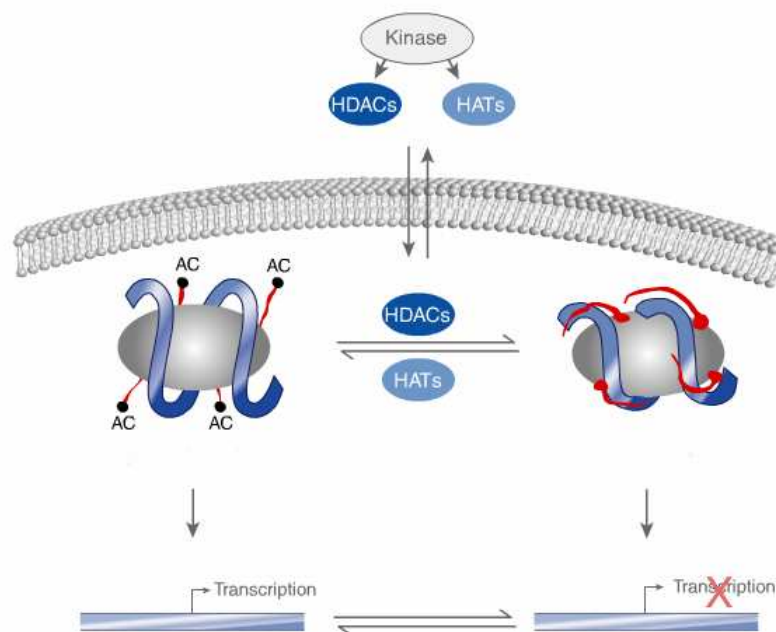


Figure 82 : Schématisation de la conséquence de l'état d'acétylation de la chromatine par les histones désacétylases (HDAC) et les histones acétyltransférases (HAT) sur la transcription des gènes cibles.

Une autre hypothèse possible pour expliquer les effets de l'ATRA serait que cet agoniste active les récepteurs ROR (retinoid-related orphan receptor). En effet, il a été montré que l'ATRA, en plus d'activer les récepteurs RAR, pouvait également être un agoniste de ROR- β (Stehlin-Gaon C. *et al.*, 2003). La famille des récepteurs ROR participe notamment à la répression de la réponse inflammatoire, puisqu'il inhibe des facteurs pro-inflammatoires

comme l'IL-6, l'IL-8 ou la cyclo-oxygénase-2 dans les cellules musculaires lisses humaines (Delerive P. *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de ROR- α inhibe la réponse inflammatoire dans les cellules vasculaires notamment par le biais d'une interférence négative avec la voie NF- κ B. En effet, ROR- α réduit la translocation de p65 dans les cellules musculaires lisses humaines (Delerive P. *et al.*, 2001).

- Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'un agoniste ROR (par exemple le CGP 52608) dans notre système expérimental, mais également d'étudier les conséquences d'une invalidation ou au contraire d'une surexpression de ce récepteur sur l'effet de l'ATRA.

De plus, grâce à la technique des puces à facteurs de transcription, nous avons mis en évidence la modulation d'activation d'une dizaine de facteurs de transcription par l'ATRA, en plus de l'inhibition de NF- κ B et AP-1. Ainsi, des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération étaient inhibés par l'ATRA, comme myc-max, E₂F₁ ou encore Pax-5. D'autres, impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse, étaient également inhibés par l'ATRA, comme ETS-1. Nous avons vu précédemment que la synoviale inflammatoire était le siège d'une forte prolifération cellulaire ainsi que d'une augmentation de la néo-angiogenèse, il serait donc important de confirmer ces résultats dans notre système expérimental et surtout d'étudier les effets des rétinoïdes en général sur ce paramètre dans l'arthrite expérimentale.

Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus sur les fibroblastes synoviaux de rat à ceux obtenus avec les fibroblastes synoviaux humains. Les résultats concernant les cellules de rat n'ont pas tous été confirmés dans les cellules humaines. En effet, alors que l'ATRA conserve ses propriétés inhibitrices sur l'expression et la production d'IL-6, il réduit uniquement l'expression du TNF- α sans affecter sa production, et induit fortement l'expression de l'IL-1 β . Il serait important d'essayer de comprendre cette variation inter-espèce :

- La modulation de l'activité de la TACE, l'enzyme de conversion du TNF- α en une protéine mature et sécrétée, par l'ATRA pourrait expliquer les différences observées entre l'expression et la production du TNF- α . Nous pourrions également comparer ces résultats chez le rat.
- Afin de s'assurer que, comme dans les cellules de rat, l'inhibition de l'expression du TNF- α et de l'IL-6 est indépendante des récepteurs RAR et RXR, il serait également

important de tester l'effet d'agonistes sélectifs de RAR et de RXR, ainsi que l'invalidation des isotypes dans ce système expérimental.

- Pour comparer les résultats obtenus dans les deux espèces, nous pourrions également nous intéresser à la régulation de l'activation des facteurs de transcription par l'ATRA, importante dans les cellules de rat. Une régulation différente pourrait en partie expliquer les résultats divergents entre les cellules de rat et les cellules humaines sur l'expression de l'IL-1 β .
- De plus, nous avons également étudié la modulation de la production de dizaines de protéines par l'ATRA par la technique des puces à protéines. Il serait important de confirmer ces résultats sur les protéines qui semblent intéressantes dans notre système expérimental. Par exemple, l'ATRA induit la production de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10 ou TIMP-2), pro-apoptotiques (IL-7 ou LIGHT), et inhibe celle de facteurs de croissance (GM-CSF).

Concernant les chondrocytes, notre étude a permis de mettre en évidence des variations d'effet de l'ATRA suivant l'espèce étudiée.

En effet, l'ATRA inhibait l'expression des MMP-1 et -9 ainsi que l'activité MMP totale dans les chondrocytes humains, alors qu'il induisait l'expression des MMP-3 et -13 dans les chondrocytes de rat, sans avoir d'effet sur l'activité MMP totale. Nous avons vu que cette variabilité ne pouvait pas être expliquée par une action différente de l'ATRA sur l'activation d'AP-1. Afin d'explorer les mécanismes mis en jeu par l'ATRA, il serait important de :

- Vérifier si les effets de l'ATRA sont dus ou non à l'activation de RAR ou de RXR dans ce type cellulaire. Nous pourrions donc tester l'effet d'agonistes sélectifs de RAR ou de RXR ainsi que l'inactivation de l'expression des isotypes de RAR ou de RXR.
- Explorer si les effets de l'ATRA pourraient être dus à l'interférence de l'ATRA avec la liaison d'AP-1 sur l'ADN plutôt qu'avec sa translocation vers le noyau. En effet, certains réxinoïdes ont démontré une capacité à induire l'activité HDAC, qui conduirait à la répression des expressions des MMP-1 et -13 dans des cellules SW-1353 issues de chondrosarcome (Burrage P.S. *et al.*, 2007). Cette induction de l'activité HDAC empêcherait la liaison d'AP-1 sur son promoteur.
- Comparer l'effet d'un inhibiteur et d'un activateur de l'activité HDAC dans les chondrocytes de rat ou humains.
- Étudier d'autres voies de signalisation que celle d'AP-1. Ainsi, l'activation de NF- κ B est impliquée dans les effets inducteurs de l'IL-1 β sur l'expression des MMP-1 (Fan

Z. *et al.*, 2006, Raymond L. *et al.*, 2007), -3 (Liacini A. *et al.*, 2002), -9 (Shakibaei M. *et al.*, 2007) ou -13 (Fan Z. *et al.*, 2006, Liacini A. *et al.*, 2002) dans les chondrocytes humains, alors que l'ATRA pourrait inhiber la voie NF- κ B dans d'autres types cellulaires (Li A. *et al.*, 2007).

En conclusion, nous avons mis en évidence des effets importants de l'ATRA sur les différents paramètres pro-inflammatoires étudiés (MMP, cytokines, NO) dans les fibroblastes et les chondrocytes. Cependant, nous avons démontré que ces effets diffèrent suivant l'espèce, et que ces effets semblent dus à l'activation de plusieurs cibles, dont les facteurs de transcription, et en amont la MAPK ERK_{1/2}.

Un paramètre important est l'absence d'effet des agonistes RAR sélectifs dans notre système expérimental, alors que des rétinoïdes sélectifs comparables avaient montré d'importants effets anti-arthritiques dans les modèles animaux (diminution des taux d'IL-6, de l'IL-1, des MMPs, de l'œdème des pattes, de la destruction osseuse...). Cependant, l'agoniste RAR- γ testé dans nos conditions expérimentales (BMS-189) n'avait pas permis d'améliorer les paramètres de l'inflammation dans un modèle de souris induites au collagène (Beehler, données non publiées). Les agonistes sélectifs de RAR efficaces contre l'inflammation sont rarement sélectifs d'un seul isotype, et il aurait donc pu être intéressant d'utiliser simultanément plusieurs agonistes sélectifs. Il faut cependant souligner que les rétinoïdes pourraient également exercer des effets anti-inflammatoires par le biais d'une modulation du système immunitaire (diminution du recrutement des neutrophiles, inhibition de l'apoptose induite par les lymphocytes T, diminution de la réponse aux IgG, ...) qui ne peuvent pas être reproduits dans les fibroblastes synoviaux en culture.

De plus, l'étude de l'implication des isotypes RAR ou RXR dans les effets des rétinoïdes *in vivo* est délicate. En effet, du fait de leur rôle primordial au cours de l'embryogénèse, l'inhibition des récepteurs RAR ou RXR chez les souris engendre d'importants problèmes de viabilité des fœtus (Ross S.A. *et al.*, 2000). De plus, l'inhibition d'un isotype donné n'induit pas de phénotype différent, à cause du haut degré de redondance fonctionnelle entre les différents isotypes (Mark M. *et al.*, 1999, Ross S.A. *et al.*, 2000). L'embryogénèse (notamment) est donc bien protégée par un système qui autorise l'absence d'un récepteur, grâce à la substitution de ses fonctions par un autre isotype. Il est donc difficile de connaître exactement le rôle de chaque isotype *in vivo*. Afin d'étudier l'implication des récepteurs RAR et RXR dans les effets des rétinoïdes au cours des arthropathies expérimentales, il serait

nécessaire de créer des animaux knock-out pour RAR ou RXR de façon conditionnelle, afin de ne pas perturber l'embryogénèse. De plus, il serait intéressant d'inhiber l'expression de ces récepteurs uniquement dans l'articulation. Ceci pourrait être envisageable par croisement d'animaux génétiquement modifiés pour les isotypes RAR avec des animaux exprimant le gène de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du collagène de type II (Ovchinnikov D.A. *et al.*, 2000), ce dernier étant spécifiquement exprimé dans les chondrocytes. Ces animaux pourraient faciliter la compréhension de l'implication des récepteurs au cours de l'arthrite expérimentale.

Le mode d'action des rétinoïdes en rhumatologie est donc difficilement analysable dans des systèmes complets (*in vivo*, variabilité selon le modèle d'arthrite ou difficulté d'obtenir des animaux KO par exemple) comme dans des systèmes plus simplifiés (*in vitro*, un seul type cellulaire).





Références bibliographiques

- Adam-Stitah S., Penna L., Chambon P., et Rochette-Egly C., Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases, *J Biol Chem*, **274**: 27; (1999), 18932-18941.
- Aderka D., Le J.M., et Vilcek J., IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice, *J Immunol*, **143**: 11; (1989), 3517-3523.
- Afif H., Benderdour M., Mfuna-Endam L., Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., Duval N., et Fahmi H., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 expression is diminished in human osteoarthritic cartilage and is downregulated by interleukin-1beta in articular chondrocytes, *Arthritis Res Ther*, **9**: 2; (2007), R31.
- Agadir A., Shealy Y.F., Hill D.L., et Zhang X., Retinyl methyl ether down-regulates activator protein 1 transcriptional activation in breast cancer cells, *Cancer Res*, **57**: 16; (1997), 3444-3450.
- Agarwal V.R., Bischoff E.D., Hermann T., et Lamph W.W., Induction of adipocyte-specific gene expression is correlated with mammary tumor regression by the retinoid X receptor-ligand LGD1069 (targretin), *Cancer Res*, **60**: 21; (2000), 6033-6038.
- Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T., Hirano T., et Kishimoto T., A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family, *Embo J*, **9**: 6; (1990), 1897-1906.
- Alaaeddine N., DiBattista J.A., Pelletier J.P., Cloutier J.M., Kiansa K., Dupuis M., et Martel-Pelletier J., Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha, *J Rheumatol*, **24**: 10; (1997), 1985-1994.
- Alam T., An M.R., et Papaconstantinou J., Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response, *J Biol Chem*, **267**: 8; (1992), 5021-5024.
- Alamanos Y. et Drosos A.A., Epidemiology of adult rheumatoid arthritis, *Autoimmun Rev*, **4**: 3; (2005), 130-136.
- Allegretto E.A., McClurg M.R., Lazarchik S.B., Clemm D.L., Kerner S.A., Elgort M.G., Boehm M.F., White S.K., Pike J.W., et Heyman R.A., Transactivation properties of retinoic acid and retinoid X receptors in mammalian cells and yeast. Correlation with hormone binding and effects of metabolism, *J Biol Chem*, **268**: 35; (1993), 26625-26633.
- Allenby G., Bocquel M.T., Saunders M., Kazmer S., Speck J., Rosenberger M., Lovey A., Kastner P., Grippo J.F., Chambon P., et et al., Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 1; (1993), 30-34.
- Alonzi T., Fattori E., Lazzaro D., Costa P., Probert L., Kollias G., De Benedetti F., Poli V., et Ciliberto G., Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis, *J Exp Med*, **187**: 4; (1998), 461-468.
- Alsayed Y., Uddin S., Mahmud N., Lekmine F., Kalvakolanu D.V., Minucci S., Bokoch G., et Platanius L.C., Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid, *J Biol Chem*, **276**: 6; (2001), 4012-4019.
- Altucci L. et Gronemeyer H., The promise of retinoids to fight against cancer, *Nat Rev Cancer*, **1**: 3; (2001), 181-193.
- Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Brown C.B., Kaushansky K., et Firestein G.S., Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha, *J Immunol*, **146**: 10; (1991), 3365-3371.
- Amin A.R., Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, **7**: 4; (1999), 392-394.
- Amin A.R. et Abramson S.B., The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis, *Curr Opin Rheumatol*, **10**: 3; (1998), 263-268.
- Amin A.R., Di Cesare P.E., Vyas P., Attur M., Tzeng E., Billiar T.R., Stuchin S.A., et Abramson S.B., The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase, *J Exp Med*, **182**: 6; (1995), 2097-2102.
- Anderson G.D., Hauser S.D., McGarity K.L., Bremer M.E., Isakson P.C., et Gregory S.A., Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis, *J Clin Invest*, **97**: 11; (1996), 2672-2679.
- Angel P. et Karin M., The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochim Biophys Acta*, **1072**: 2-3; (1991), 129-157.
- Angel P., Hattori K., Smeal T., et Karin M., The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1, *Cell*, **55**: 5; (1988), 875-885.
- Apfel C., Bauer F., Crettaz M., Forni L., Kamber M., Kaufmann F., LeMotte P., Pirson W., et Klaus M., A retinoic acid receptor alpha antagonist selectively counteracts retinoic acid effects, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 15; (1992), 7129-7133.
- Apte S.S., A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family, *Int J Biochem Cell Biol*, **36**: 6; (2004), 981-985.

- Apte S.S., Mattei M.G., et Olsen B.R., Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22, *Genomics*, **19**: 1; (1994), 86-90.
- Aranda A. et Pascual A., Nuclear hormone receptors and gene expression, *Physiol Rev*, **81**: 3; (2001), 1269-1304.
- Atsumi T., Ishihara K., Kamimura D., Ikushima H., Ohtani T., Hirota S., Kobayashi H., Park S.J., Saeki Y., Kitamura Y., et Hirano T., A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis, *J Exp Med*, **196**: 7; (2002), 979-990.
- Attur M.G., Dave M., Akamatsu M., Katoh M., et Amin A.R., Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**: 1; (2002), 1-4.
- Au R.Y., Al-Talib T.K., Au A.Y., Phan P.V., et Frondoza C.G., Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E(2) and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages, *Osteoarthritis Cartilage*; (2007),
- Aukrust P., Muller F., Ueland T., Svardal A.M., Berge R.K., et Froland S.S., Decreased vitamin A levels in common variable immunodeficiency: vitamin A supplementation in vivo enhances immunoglobulin production and downregulates inflammatory responses, *Eur J Clin Invest*, **30**: 3; (2000), 252-259.
- Austena L.M. et Ross A.C., Potentiation of interferon-gamma-stimulated nitric oxide production by retinoic acid in RAW 264.7 cells, *J Leukoc Biol*, **70**: 1; (2001), 121-129.
- Austena L.M., Carlsen H., Ertesvag A., Alexander G., Blomhoff H.K., et Blomhoff R., Vitamin A status significantly alters nuclear factor-kappaB activity assessed by in vivo imaging, *Faseb J*, **18**: 11; (2004), 1255-1257.
- Ayad S., Marriott A., Morgan K., et Grant M.E., Bovine cartilage types VI and IX collagens. Characterization of their forms in vivo, *Biochem J*, **262**: 3; (1989), 753-761.
- Aydelotte M.B. et Kuettner K.E., Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production, *Connect Tissue Res*, **18**: 3; (1988), 205-222.
- Aydelotte M.B., Greenhill R.R., et Kuettner K.E., Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism, *Connect Tissue Res*, **18**: 3; (1988), 223-234.
- Aydelotte M.B., Thonar E.J., Mollenhauer J., et Flechtenmacher J., Culture of chondrocytes in alginate gel: variations in conditions of gelation influence the structure of the alginate gel, and the arrangement and morphology of proliferating chondrocytes, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **34**: 2; (1998), 123-130.
- Baecklund E., Ekblom A., Sparen P., Feltelius N., et Klareskog L., Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case-control study, *Bmj*, **317**: 7152; (1998), 180-181.
- Baecklund E., Iliadou A., Askling J., Ekblom A., Backlin C., Granath F., Catrina A.I., Rosenquist R., Feltelius N., Sundstrom C., et Klareskog L., Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, **54**: 3; (2006), 692-701.
- Baeuerle P.A. et Henkel T., Function and activation of NF-kappa B in the immune system, *Annu Rev Immunol*, **12**; (1994), 141-179.
- Baeuerle P.A. et Baltimore D., NF-kappa B: ten years after, *Cell*, **87**: 1; (1996), 13-20.
- Bajaj M., Suraamornkul S., Pratipanawatr T., Hardies L.J., Pratipanawatr W., Glass L., Cersosimo E., Miyazaki Y., et DeFronzo R.A., Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes, *Diabetes*, **52**: 6; (2003), 1364-1370.
- Baldwin A.S., Jr., The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu Rev Immunol*, **14**; (1996), 649-683.
- Ballock R.T., Heydemann A., Wakefield L.M., Flanders K.C., Roberts A.B., et Sporn M.B., Inhibition of the chondrocyte phenotype by retinoic acid involves upregulation of metalloprotease genes independent of TGF-beta, *J Cell Physiol*, **159**: 2; (1994), 340-346.
- Baniahmad A., Steiner C., Kohne A.C., et Renkawitz R., Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site, *Cell*, **61**: 3; (1990), 505-514.
- Barak Y., Liao D., He W., Ong E.S., Nelson M.C., Olefsky J.M., Boland R., et Evans R.M., Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 1; (2002), 303-308.
- Barchowsky A., Frleta D., et Vincenti M.P., 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**: 10; (2000), 1469-1479.
- Barnea E. et Bergman Y., Synergy of SF1 and RAR in activation of Oct-3/4 promoter, *J Biol Chem*, **275**: 9; (2000), 6608-6619.
- Bastien J., Adam-Stitah S., Plassat J.L., Chambon P., et Rochette-Egly C., The phosphorylation site located in the A region of retinoic X receptor alpha is required for the antiproliferative effect of retinoic acid (RA) and the activation of RA target genes in F9 cells, *J Biol Chem*, **277**: 32; (2002), 28683-28689.

- Bastien J., Adam-Stitah S., Riedl T., Egly J.M., Chambon P., et Rochette-Egly C., TFIID interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7, *J Biol Chem*, **275**: 29; (2000), 21896-21904.
- Bayon Y., Ortiz M.A., Lopez-Hernandez F.J., Gao F., Karin M., Pfahl M., et Piedrafita F.J., Inhibition of I κ B kinase by a new class of retinoid-related anticancer agents that induce apoptosis, *Mol Cell Biol*, **23**: 3; (2003), 1061-1074.
- Bays H., Mandarino L., et DeFronzo R.A., Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach, *J Clin Endocrinol Metab*, **89**: 2; (2004), 463-478.
- Bazzoni F. et Beutler B., The tumor necrosis factor ligand and receptor families, *N Engl J Med*, **334**: 26; (1996), 1717-1725.
- Becherel P.A., Le Goff L., Ktorza S., Chosidow O., Frances C., Issaly F., Mencia-Huerta J.M., Debre P., Mossalayi M.D., et Arock M., CD23-mediated nitric oxide synthase pathway induction in human keratinocytes is inhibited by retinoic acid derivatives, *J Invest Dermatol*, **106**: 6; (1996), 1182-1186.
- Beehler B.C., Brinckerhoff C.E., et Ostrowski J., Selective retinoic acid receptor ligands for rheumatoid arthritis, *Curr Opin Investig Drugs*, **5**: 11; (2004), 1153-1157.
- Beehler B.C., Hei Y.J., Chen S., Lupisella J.A., Ostrowski J., Starrett J.E., Tortolani D., Tramposch K.M., et Reczek P.R., Inhibition of disease progression by a novel retinoid antagonist in animal models of arthritis, *J Rheumatol*, **30**: 2; (2003), 355-363.
- Benkoussa M., Nomine B., Mouchon A., Lefebvre B., Bernardon J.M., Formstecher P., et Lefebvre P., Limited proteolysis for assaying ligand binding affinities of nuclear receptors, *Recept Signal Transduct*, **7**: 4; (1997), 257-267.
- Benoit G., Altucci L., Flexor M., Ruchaud S., Lillehaug J., Raffelsberger W., Gronemeyer H., et Lanotte M., RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation, *Embo J*, **18**: 24; (1999), 7011-7018.
- Benya P.D. et Padilla S.R., Modulation of the rabbit chondrocyte phenotype by retinoic acid terminates type II collagen synthesis without inducing type I collagen: the modulated phenotype differs from that produced by subculture, *Dev Biol*, **118**: 1; (1986), 296-305.
- Berard J., Laboune F., Mukuna M., Masse S., Kothary R., et Bradley W.E., Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene, *Faseb J*, **10**: 9; (1996), 1091-1097.
- Berenbaum F., Signaling transduction: target in osteoarthritis, *Curr Opin Rheumatol*, **16**: 5; (2004), 616-622.
- Berger J.P., Akiyama T.E., et Meinke P.T., PPARs: therapeutic targets for metabolic disease, *Trends Pharmacol Sci*, **26**: 5; (2005), 244-251.
- Bianchi A., Moulin D., Sebillaud S., Koufany M., Galteau M.M., Netter P., Terlain B., et Jouzeau J.Y., Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, *Arthritis Res Ther*, **7**: 6; (2005), R1325-1337.
- Bigg H.F., Shi Y.E., Liu Y.E., Steffensen B., et Overall C.M., 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, *J Biol Chem*, **272**: 24; (1997), 15496-15500.
- Bird J.L., Wells T., Platt D., et Bayliss M.T., IL-1 beta induces the degradation of equine articular cartilage by a mechanism that is not mediated by nitric oxide, *Biochem Biophys Res Commun*, **238**: 1; (1997), 81-85.
- Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J., et Cerretti D.P., A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature*, **385**: 6618; (1997), 729-733.
- Blackwell N.M., Sembi P., Newson J.S., Lawrence T., Gilroy D.W., et Kabouridis P.S., Reduced infiltration and increased apoptosis of leukocytes at sites of inflammation by systemic administration of a membrane-permeable I κ Balpha repressor, *Arthritis Rheum*, **50**: 8; (2004), 2675-2684.
- Blanco F.J. et Lotz M., IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2, *Exp Cell Res*, **218**: 1; (1995), 319-325.
- Blanco F.J., Geng Y., et Lotz M., Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression, *J Immunol*, **154**: 8; (1995a), 4018-4026.
- Blanco F.J., Ochs R.L., Schwarz H., et Lotz M., Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am J Pathol*, **146**: 1; (1995b), 75-85.
- Blanton R.A., Kupper T.S., McDougall J.K., et Dower S., Regulation of interleukin 1 and its receptor in human keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 4; (1989), 1273-1277.

- Bongartz T., Sutton A.J., Sweeting M.J., Buchan I., Matteson E.L., et Montori V., Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials, *Jama*, **295**: 19; (2006), 2275-2285.
- Bonnet C., Bertin P., Cook-Moreau J., Chable-Rabinovitch H., Treves R., et Rigaud M., Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells, *Prostaglandins*, **50**: 3; (1995), 127-135.
- Boraschi D. et Tagliabue A., The interleukin-1 receptor family, *Vitam Horm*, **74**; (2006), 229-254.
- Borden P., Solymar D., Sucharczuk A., Lindman B., Cannon P., et Heller R.A., Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes, *J Biol Chem*, **271**: 38; (1996), 23577-23581.
- Bordji K., Grillasca J.P., Gouze J.N., Magdalou J., Schohn H., Keller J.M., Bianchi A., Dauca M., Netter P., et Terlain B., Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes, *J Biol Chem*, **275**: 16; (2000), 12243-12250.
- Boulton T.G., Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S.D., DePinho R.A., Panayotatos N., Cobb M.H., et Yancopoulos G.D., ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF, *Cell*, **65**: 4; (1991), 663-675.
- Bour G., Lalevee S., et Rochette-Egly C., Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors, *Trends Cell Biol*, **17**: 6; (2007), 302-309.
- Bour G., Plassat J.L., Bauer A., Lalevee S., et Rochette-Egly C., Vinexin beta interacts with the non-phosphorylated AF-1 domain of retinoid receptor gamma (RARgamma) and represses RARgamma-mediated transcription, *J Biol Chem*, **280**: 17; (2005), 17027-17037.
- Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H., et Moras D., Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha, *Nature*, **375**: 6530; (1995), 377-382.
- Bouysset M., Noel E., et Tebib J.G., [Rheumatoid arthritis: a general disease and local diseases], *Rev Prat*, **55**: 19; (2005), 2121-2133.
- Boyault S., Bianchi A., Moulin D., Morin S., Francois M., Netter P., Terlain B., et Bordji K., 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-1beta-induced IKK enzymatic activity and IkappaBalpha degradation in rat chondrocytes through a PPARgamma-independent pathway, *FEBS Lett*, **572**: 1-3; (2004), 33-40.
- Boyault S., Simonin M.A., Bianchi A., Compe E., Liagre B., Mainard D., Becuwe P., Dauca M., Netter P., Terlain B., et Bordji K., 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human chondrocytes by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation pathways, *FEBS Lett*, **501**: 1; (2001), 24-30.
- Brennan F.M., Chantry D., Jackson A., Maini R., et Feldmann M., Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis, *Lancet*, **2**: 8657; (1989), 244-247.
- Brewster M., Lewis E.J., Wilson K.L., Greenham A.K., et Bottomley K.M., Ro 32-3555, an orally active collagenase selective inhibitor, prevents structural damage in the STR/ORT mouse model of osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, **41**: 9; (1998), 1639-1644.
- Brinckerhoff C.E. et Harris E.D., Jr., Modulation by retinoic acid and corticosteroids of collagenase production by rabbit synovial fibroblasts treated with phorbol myristate acetate or poly(ethylene glycol), *Biochim Biophys Acta*, **677**: 3-4; (1981), 424-432.
- Brinckerhoff C.E., Coffey J.W., et Sullivan A.C., Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid, *Science*, **221**: 4612; (1983), 756-758.
- Brinckerhoff C.E., McMillan R.M., Dayer J.M., et Harris E.D., Jr., Inhibition by retinoic acid of collagenase production in rheumatoid synovial cells, *N Engl J Med*, **303**: 8; (1980), 432-436.
- Brinckerhoff C.E., Nagase H., Nagel J.E., et Harris E.D., Jr., Effects of all-trans-retinoic acid (retinoic acid) and 4-hydroxyphenylretinamide on synovial cells and articular cartilage, *J Am Acad Dermatol*, **6**: 4 Pt 2 Suppl; (1982), 591-602.
- Brocard J., Kastner P., et Chambon P., Two novel RXR alpha isoforms from mouse testis, *Biochem Biophys Res Commun*, **229**: 1; (1996), 211-218.
- Brockhaus M., Schoenfeld H.J., Schlaeger E.J., Hunziker W., Lesslauer W., et Loetscher H., Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 8; (1990), 3127-3131.
- Bry K. et Lappalainen U., Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: the role of interleukin 1beta in the regulation of inflammation-mediated pulmonary retinoic acid pathways in transgenic mice, *Semin Perinatol*, **30**: 3; (2006), 121-128.
- Bucala R., Ritchlin C., Winchester R., et Cerami A., Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts, *J Exp Med*, **173**: 3; (1991), 569-574.

- Buckwalter J.A., Maintaining and restoring mobility in middle and old age: the importance of the soft tissues, *Instr Course Lect*, **46**; (1997), 459-469.
- Buckwalter J.A., Kuettner K.E., et Thonar E.J., Age-related changes in articular cartilage proteoglycans: electron microscopic studies, *J Orthop Res*, **3**: 3; (1985), 251-257.
- Bufler P., Azam T., Gamboni-Robertson F., Reznikov L.L., Kumar S., Dinarello C.A., et Kim S.H., A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 21; (2002), 13723-13728.
- Bugge T.H., Pohl J., Lonnoy O., et Stunnenberg H.G., RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors, *Embo J*, **11**: 4; (1992), 1409-1418.
- Burger D., Rezzonico R., Li J.M., Modoux C., Pierce R.A., Welgus H.G., et Dayer J.M., Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines, *Arthritis Rheum*, **41**: 10; (1998), 1748-1759.
- Burk O., Mink S., Ringwald M., et Klempnauer K.H., Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors, *Embo J*, **12**: 5; (1993), 2027-2038.
- Burrage P.S., Mix K.S., et Brinckerhoff C.E., Matrix metalloproteinases: role in arthritis, *Front Biosci*, **11**; (2006), 529-543.
- Burrage P.S., Huntington J.T., Sporn M.B., et Brinckerhoff C.E., Regulation of matrix metalloproteinase gene expression by a retinoid X receptor-specific ligand, *Arthritis Rheum*, **56**: 3; (2007), 892-904.
- Bursavich M.G., Gilbert A.M., Lombardi S., Georgiadis K.E., Reifenberg E., Flannery C.R., et Morris E.A., 5'-Phenyl-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]thiadiazol]-2-one inhibitors of ADAMTS-5 (aggrecanase-2), *Bioorg Med Chem Lett*, **17**: 20; (2007a), 5630-5633.
- Bursavich M.G., Gilbert A.M., Lombardi S., Georgiadis K.E., Reifenberg E., Flannery C.R., et Morris E.A., Synthesis and evaluation of aryl thioxothiazolidinone inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2), *Bioorg Med Chem Lett*, **17**: 5; (2007b), 1185-1188.
- Busch C., Sakena P., Funa K., Nordlinger H., et Eriksson U., Tissue distribution of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein: use of monospecific antibodies for immunohistochemistry and cRNA for in situ localization of mRNA, *Methods Enzymol*, **189**; (1990), 315-324.
- Bush T.S., St Coeur M., Resendes K.K., et Rosmarin A.G., GA-binding protein (GABP) and Sp1 are required, along with retinoid receptors, to mediate retinoic acid responsiveness of CD18 (beta 2 leukocyte integrin): a novel mechanism of transcriptional regulation in myeloid cells, *Blood*, **101**: 1; (2003), 311-317.
- Butler D.M., Maini R.N., Feldmann M., et Brennan F.M., Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist, *Eur Cytokine Netw*, **6**: 4; (1995), 225-230.
- Caelles C., Gonzalez-Sancho J.M., et Munoz A., Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway, *Genes Dev*, **11**: 24; (1997), 3351-3364.
- Campbell I.K., Piccoli D.S., Roberts M.J., Muirden K.D., et Hamilton J.A., Effects of tumor necrosis factor alpha and beta on resorption of human articular cartilage and production of plasminogen activator by human articular chondrocytes, *Arthritis Rheum*, **33**: 4; (1990), 542-552.
- Campion G.V., Lebsack M.E., Lookabaugh J., Gordon G., et Catalano M., Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group, *Arthritis Rheum*, **39**: 7; (1996), 1092-1101.
- Cantorna M.T., Nashold F.E., et Hayes C.E., In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function, *J Immunol*, **152**: 4; (1994), 1515-1522.
- Cao Z., Umek R.M., et McKnight S.L., Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells, *Genes Dev*, **5**: 9; (1991), 1538-1552.
- Cardinaux J.R., Allaman I., et Magistretti P.J., Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes, *Glia*, **29**: 1; (2000), 91-97.
- Carman J.A., Pond L., Nashold F., Wassom D.L., et Hayes C.E., Immunity to *Trichinella spiralis* infection in vitamin A-deficient mice, *J Exp Med*, **175**: 1; (1992), 111-120.
- Caron J.P., Fernandes J.C., Martel-Pelletier J., Tardif G., Mineau F., Geng C., et Pelletier J.P., Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression, *Arthritis Rheum*, **39**: 9; (1996), 1535-1544.
- Chambon P., A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *Faseb J*, **10**: 9; (1996), 940-954.
- Chandrasekhar S., Harvey A.K., Hrubey P.S., et Bendele A.M., Arthritis induced by interleukin-1 is dependent on the site and frequency of intraarticular injection, *Clin Immunol Immunopathol*, **55**: 3; (1990), 382-400.

- Chang C.J., Chen T.T., Lei H.Y., Chen D.S., et Lee S.C., Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family, *Mol Cell Biol*, **10**: 12; (1990), 6642-6653.
- Charles P.J., Smeenk R.J., De Jong J., Feldmann M., et Maini R.N., Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials, *Arthritis Rheum*, **43**: 11; (2000), 2383-2390.
- Chaturvedi P., Pratta M., Steplewski K., Connor J., et Kumar S., Functional characterization of an orphan nuclear receptor, Rev-ErbAalpha, in chondrocytes and its potential role in osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, **54**: 11; (2006), 3513-3522.
- Chen J.Y., Penco S., Ostrowski J., Balaguer P., Pons M., Starrett J.E., Reczek P., Chambon P., et Gronemeyer H., RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation, *Embo J*, **14**: 6; (1995), 1187-1197.
- Chen Q., Ma Y., et Ross A.C., Opposing cytokine-specific effects of all-trans-retinoic acid on the activation and expression of signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 in THP-1 cells, *Immunology*, **107**: 2; (2002), 199-208.
- Chevalier X., Les médicaments de l'arthrose, *Médecine thérapeutique*, **5**: 8; (1999), 651-653.
- Chevalier X., Giraudeau B., Conrozier T., Marliere J., Kiefer P., et Goupille P., Safety study of intraarticular injection of interleukin 1 receptor antagonist in patients with painful knee osteoarthritis: a multicenter study, *J Rheumatol*, **32**: 7; (2005), 1317-1323.
- Chiang M.Y., Misner D., Kempermann G., Schikorski T., Giguere V., Sucof H.M., Gage F.H., Stevens C.F., et Evans R.M., An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression, *Neuron*, **21**: 6; (1998), 1353-1361.
- Choy E.H. et Panayi G.S., Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis, *N Engl J Med*, **344**: 12; (2001), 907-916.
- Chu C.Q., Field M., Feldmann M., et Maini R.N., Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, **34**: 9; (1991), 1125-1132.
- Chun J.S., Expression, activity, and regulation of MAP kinases in cultured chondrocytes, *Methods Mol Med*, **100**: (2004), 291-306.
- Cione E., Tucci P., Senatore V., Ioele G., et Genchi G., Binding of all-trans-retinoic acid to MLTC-1 proteins, *Mol Cell Biochem*, **276**: 1-2; (2005), 55-60.
- Cipolletta C., Jouzeau J.Y., Gegout-Pottie P., Presle N., Bordji K., Netter P., et Terlain B., Modulation of IL-1-induced cartilage injury by NO synthase inhibitors: a comparative study with rat chondrocytes and cartilage entities, *Br J Pharmacol*, **124**: 8; (1998), 1719-1727.
- Clarke N., Germain P., Altucci L., et Gronemeyer H., Retinoids: potential in cancer prevention and therapy, *Expert Rev Mol Med*, **6**: 25; (2004), 1-23.
- Clayton J.J., Nutraceuticals in the management of osteoarthritis, *Orthopedics*, **30**: 8; (2007), 624-629; quiz 630-621.
- Clegg D.O., Reda D.J., Harris C.L., Klein M.A., O'Dell J.R., Hooper M.M., Bradley J.D., Bingham C.O., 3rd, Weisman M.H., Jackson C.G., Lane N.E., Cush J.J., Moreland L.W., Schumacher H.R., Jr., Oddis C.V., Wolfe F., Molitor J.A., Yocum D.E., Schnitzer T.J., Furst D.E., Sawitzke A.D., Shi H., Brandt K.D., Moskowitz R.W., et Williams H.J., Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis, *N Engl J Med*, **354**: 8; (2006), 795-808.
- Cohen M.H., Hirschfeld S., Flamm Honig S., Ibrahim A., Johnson J.R., O'Leary J.J., White R.M., Williams G.A., et Pazdur R., Drug approval summaries: arsenic trioxide, tamoxifen citrate, anastrozole, paclitaxel, bexarotene, *Oncologist*, **6**: 1; (2001), 4-11.
- Cohen S., Bigazzi P.E., et Yoshida T., Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production, *Cell Immunol*, **12**: 1; (1974), 150-159.
- Cohen S., Hurd E., Cush J., Schiff M., Weinblatt M.E., Moreland L.W., Kremer J., Bear M.B., Rich W.J., et McCabe D., Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum*, **46**: 3; (2002), 614-624.
- Connell L. et McInnes I.B., New cytokine targets in inflammatory rheumatic diseases, *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **20**: 5; (2006), 865-878.
- Cope F.O., Staller J.M., Mahsem R.A., et Boutwell R.K., Retinoid-binding proteins are phosphorylated in vitro by soluble Ca²⁺- and phosphatidylserine-dependent protein kinase from mouse brain, *Biochem Biophys Res Commun*, **120**: 2; (1984), 593-601.
- Corvol M.T., *Biologie du cartilage de croissance*. Médecine thérapeutique 2. 1996. 46-53.

- Cui X., Hawari F., Alsaaty S., Lawrence M., Combs C.A., Geng W., Rouhani F.N., Miskinis D., et Levine S.J., Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding, *J Clin Invest*, **110**: 4; (2002), 515-526.
- Dahl A.R., Grossi I.M., Houchens D.P., Scovell L.J., Placke M.E., Imondi A.R., Stoner G.D., De Luca L.M., Wang D., et Mulshine J.L., Inhaled isotretinoin (13-cis retinoic acid) is an effective lung cancer chemopreventive agent in A/J mice at low doses: a pilot study, *Clin Cancer Res*, **6**: 8; (2000), 3015-3024.
- Dasgupta B., Corkill M., Kirkham B., Gibson T., et Panayi G., Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis, *J Rheumatol*, **19**: 1; (1992), 22-25.
- Datta P.K. et Lianos E.A., Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells, *Kidney Int*, **56**: 2; (1999), 486-493.
- Datta P.K., Reddy R.S., et Lianos E.A., Effects of all-trans-retinoic acid (atRA) on inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity and transforming growth factor beta-1 production in experimental anti-GBM antibody-mediated glomerulonephritis, *Inflammation*, **25**: 6; (2001), 351-359.
- Dawson M.I., Synthetic retinoids and their nuclear receptors, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **4**: 3; (2004), 199-230.
- Day R.M., Lee Y.H., Park A.M., et Suzuki Y.J., Retinoic acid inhibits airway smooth muscle cell migration, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **34**: 6; (2006), 695-703.
- Dayer J.M., The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)*, **42 Suppl 2**; (2003), ii3-10.
- Dayer J.M., Beutler B., et Cerami A., Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts, *J Exp Med*, **162**: 6; (1985), 2163-2168.
- De Ceuninck F., Dassencourt L., et Anract P., The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays, *Biochem Biophys Res Commun*, **323**: 3; (2004), 960-969.
- de The H., Vivanco-Ruiz M.M., Tiollais P., Stunnenberg H., et Dejean A., Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene, *Nature*, **343**: 6254; (1990), 177-180.
- Dean D.D. et Woessner J.F., Jr., Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases, *Biochem J*, **218**: 1; (1984), 277-280.
- Deffaud J., Kirchmeyer M., Domagala F., Ficheux H., Netter P., Bianchi A., et Jouzeau J.Y., Modulatory effect of rhein on IL-1-induced responses in human chondrocytes evaluated by antibody microarrays., *Biorheology*; (2008 (sous presse)),
- del Rincon I.D., Williams K., Stern M.P., Freeman G.L., et Escalante A., High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors, *Arthritis Rheum*, **44**: 12; (2001), 2737-2745.
- Delerive P., Monte D., Dubois G., Trottein F., Fruchart-Najib J., Mariani J., Fruchart J.C., et Staels B., The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response, *EMBO Rep*, **2**: 1; (2001), 42-48.
- Denner L.A., Weigel N.L., Maxwell B.L., Schrader W.T., et O'Malley B.W., Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation, *Science*, **250**: 4988; (1990), 1740-1743.
- Depoix C., Delmotte M.H., Formstecher P., et Lefebvre P., Control of retinoic acid receptor heterodimerization by ligand-induced structural transitions. A novel mechanism of action for retinoid antagonists, *J Biol Chem*, **276**: 12; (2001), 9452-9459.
- Descombes P. et Schibler U., A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA, *Cell*, **67**: 3; (1991), 569-579.
- Descombes P., Chojkier M., Lichtsteiner S., Falvey E., et Schibler U., LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein, *Genes Dev*, **4**: 9; (1990), 1541-1551.
- Desreumaux P., Dubuquoy L., Nutten S., Peuchmaur M., Englaro W., Schoonjans K., Derijard B., Desvergne B., Wahli W., Chambon P., Leibowitz M.D., Colombel J.F., et Auwerx J., Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies, *J Exp Med*, **193**: 7; (2001), 827-838.
- Devaux Y., Grosjean S., Seguin C., David C., Dousset B., Zannad F., Meistelman C., De Talance N., Mertes P.M., et Ungureanu-Longrois D., Retinoic acid and host-pathogen interactions: effects on inducible nitric oxide synthase in vivo, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **279**: 5; (2000), E1045-1053.
- Devchand P.R., Keller H., Peters J.M., Vazquez M., Gonzalez F.J., et Wahli W., The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control, *Nature*, **384**: 6604; (1996), 39-43.
- Dezube B.J., AIDS-related Kaposi sarcoma: the role of local therapy for a systemic disease, *Arch Dermatol*, **136**: 12; (2000), 1554-1556.
- Dheen S.T., Jun Y., Yan Z., Tay S.S., et Ling E.A., Retinoic acid inhibits expression of TNF-alpha and iNOS in activated rat microglia, *Glia*, **50**: 1; (2005), 21-31.

- Di-Poi N., Tan N.S., Michalik L., Wahli W., et Desvergne B., Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway, *Mol Cell*, **10**: 4; (2002), 721-733.
- Dicken C.H., Retinoids: a review, *J Am Acad Dermatol*, **11**: 4 Pt 1; (1984), 541-552.
- DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., et Karin M., A cytokine-responsive IkkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB, *Nature*, **388**: 6642; (1997), 548-554.
- Dinareello C.A., Biologic basis for interleukin-1 in disease, *Blood*, **87**: 6; (1996), 2095-2147.
- Ding C. et Jones G., Technology evaluation: MRA, Chugai, *Curr Opin Mol Ther*, **5**: 1; (2003), 64-69.
- Dingle J.T., The secretion of enzymes into the pericellular environment, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **271**: 912; (1975), 315-324.
- DiSepio D., Malhotra M., Chandraratna R.A., et Nagpal S., Retinoic acid receptor-nuclear factor-interleukin 6 antagonism. A novel mechanism of retinoid-dependent inhibition of a keratinocyte hyperproliferative differentiation marker., *J Biol Chem*, **272**: 41; (1997), 25555-25559.
- Dombrecht E.J., Van Offel J.F., Bridts C.H., Ebo D.G., Seynhaeve V., Schuerwegh A.J., Stevens W.J., et De Clerck L.S., Influence of simvastatin on the production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide by activated human chondrocytes, *Clin Exp Rheumatol*, **25**: 4; (2007), 534-539.
- Dougados M., Nguyen M., Berdah L., Mazieres B., Vignon E., et Lequesne M., Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the Chondromodulating Effect of Diacerein in OA of the Hip, *Arthritis Rheum*, **44**: 11; (2001), 2539-2547.
- Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., et Wahli W., Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors, *Cell*, **68**: 5; (1992), 879-887.
- Dugas N., Mossalayi M.D., Calenda A., Leotard A., Becherel P., Mentz F., Ouaz F., Arock M., Debre P., Dornand J., et Dugas B., Role of nitric oxide in the anti-tumoral effect of retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human promonocytic leukemic cells, *Blood*, **88**: 9; (1996), 3528-3534.
- Dupe V., Davenne M., Brocard J., Dolle P., Mark M., Dierich A., Chambon P., et Rijli F.M., In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE), *Development*, **124**: 2; (1997), 399-410.
- Durand B., Saunders M., Leroy P., Leid M., et Chambon P., All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs, *Cell*, **71**: 1; (1992), 73-85.
- Egea P.F., Mitschler A., et Moras D., Molecular recognition of agonist ligands by RXRs, *Mol Endocrinol*, **16**: 5; (2002), 987-997.
- Eguchi J., Koshino T., Takagi T., Hayashi T., et Saito T., NF-kappa B and I-kappa B overexpression in articular chondrocytes with progression of type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mouse knees, *Clin Exp Rheumatol*, **20**: 5; (2002), 647-652.
- Elmazar M.M. et Nau H., Potentiation of the teratogenic effects induced by coadministration of retinoic acid or phytanic acid/phytol with synthetic retinoid receptor ligands, *Arch Toxicol*, **78**: 11; (2004), 660-668.
- Evans C.H., Watkins S.C., et Stefanovic-Racic M., Nitric oxide and cartilage metabolism, *Methods Enzymol*, **269**; (1996), 75-88.
- Evans T.J., Moyes D., Carpenter A., Martin R., Loetscher H., Lesslauer W., et Cohen J., Protective effect of 55-but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of gram-negative sepsis, *J Exp Med*, **180**: 6; (1994), 2173-2179.
- Eyre D., Collagen of articular cartilage, *Arthritis Res*, **4**: 1; (2002), 30-35.
- Eyre D.R., Wu J.J., et Woods P., *Cartilage specific collagens. Structural studies*. Articular cartilage and osteoarthritis, ed. E. K.K.e. coll. 1992: Raven Press. 119-131.
- Fahmi H., Di Battista J.A., Pelletier J.P., Mineau F., Ranger P., et Martel-Pelletier J., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes, *Arthritis Rheum*, **44**: 3; (2001), 595-607.
- Fahmi H., Pelletier J.P., Di Battista J.A., Cheung H.S., Fernandes J.C., et Martel-Pelletier J., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**: 2; (2002), 100-108.
- Fan Z., Bau B., Yang H., Soeder S., et Aigner T., Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta, *Arthritis Rheum*, **52**: 1; (2005), 136-143.
- Fan Z., Yang H., Bau B., Soder S., et Aigner T., Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes, *Rheumatol Int*, **26**: 10; (2006), 900-903.

- Fanjul A., Dawson M.I., Hobbs P.D., Jong L., Cameron J.F., Harlev E., Graupner G., Lu X.P., et Pfahl M., A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation, *Nature*, **372**: 6501; (1994), 107-111.
- Farahat M.N., Yanni G., Poston R., et Panayi G.S., Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Ann Rheum Dis*, **52**: 12; (1993), 870-875.
- Farrell A.J., Blake D.R., Palmer R.M., et Moncada S., Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases, *Ann Rheum Dis*, **51**: 11; (1992), 1219-1222.
- Fawns H.T. et Landells J.W., Histochemical studies of rheumatic conditions. I. Observations on the fine structures of the matrix of normal bone and cartilage, *Ann Rheum Dis*, **12**: 2; (1953), 105-113.
- Feige U., Karbowski A., Rordorf-Adam C., et Pataki A., Arthritis induced by continuous infusion of hr-interleukin-1 alpha into the rabbit knee-joint, *Int J Tissue React*, **11**: 5; (1989), 225-238.
- Feldmann M., Pathogenesis of arthritis: recent research progress, *Nat Immunol*, **2**: 9; (2001), 771-773.
- Feldmann M., Brennan F.M., et Maini R.N., Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu Rev Immunol*, **14**; (1996), 397-440.
- Fell H.B., Synovocytes, *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, **12**; (1978), 14-24.
- Fenaux P., Chomienne C., et Degos L., All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia, *Semin Hematol*, **38**: 1; (2001), 13-25.
- Fernandes J., Tardif G., Martel-Pelletier J., Lascau-Coman V., Dupuis M., Moldovan F., Sheppard M., Krishnan B.R., et Pelletier J.P., In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression, *Am J Pathol*, **154**: 4; (1999), 1159-1169.
- Fernandes J.C., Martel-Pelletier J., et Pelletier J.P., The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology, *Biorheology*, **39**: 1-2; (2002), 237-246.
- Filippatos G., Ang E., Gidea C., Dincer E., Wang R., et Uhal B.D., Fas induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells in vitro, *BMC Cell Biol*, **5**; (2004), 6.
- Firestein G.S. et Manning A.M., Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease, *Arthritis Rheum*, **42**: 4; (1999), 609-621.
- Firestein G.S., Boyle D.L., Yu C., Paine M.M., Whisenand T.D., Zvaifler N.J., et Arend W.P., Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, **37**: 5; (1994), 644-652.
- Fisher G.J. et Voorhees J.J., Molecular mechanisms of retinoid actions in skin, *Faseb J*, **10**: 9; (1996), 1002-1013.
- FitzGerald O. et Bresnihan B., Synovial membrane cellularity and vascularity, *Ann Rheum Dis*, **54**: 6; (1995), 511-515.
- Flannery C.R., Little C.B., Hughes C.E., et Caterson B., Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases, *Biochem Biophys Res Commun*, **251**: 3; (1998), 824-829.
- Flannery C.R., Little C.B., Caterson B., et Hughes C.E., Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes, *Matrix Biol*, **18**: 3; (1999), 225-237.
- Fleige S., Walf V., Huch S., Prgomet C., Sehm J., et Pfaffl M.W., Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR, *Biotechnol Lett*, **28**: 19; (2006), 1601-1613.
- Fleischhauer K., Park J.H., DiSanto J.P., Marks M., Ozato K., et Yang S.Y., Isolation of a full-length cDNA clone encoding a N-terminally variant form of the human retinoid X receptor beta, *Nucleic Acids Res*, **20**: 7; (1992), 1801.
- Flora G., Lee Y.W., Nath A., Maragos W., Hennig B., et Toborek M., Methamphetamine-induced TNF-alpha gene expression and activation of AP-1 in discrete regions of mouse brain: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation, *Neuromolecular Med*, **2**: 1; (2002), 71-85.
- Foltz I.N., Gerl R.E., Wieler J.S., Luckach M., Salmon R.A., et Schrader J.W., Human mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli, *J Biol Chem*, **273**: 15; (1998), 9344-9351.
- Forman B.M., Umesono K., Chen J., et Evans R.M., Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors, *Cell*, **81**: 4; (1995), 541-550.
- Fradelizi D., [Cytokines: soluble factors in intercellular communication], *Med Trop (Mars)*, **58**: 4 Suppl; (1998), 427-432.
- Franchimont P. et Bassleer C., Effects of hormones and local growth factors on articular chondrocyte metabolism, *J Rheumatol Suppl*, **27**; (1991), 68-70.

- Francois M., Richette P., Tsagris L., Raymondjean M., Fulchignoni-Lataud M.C., Forest C., Savouret J.F., et Corvol M.T., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element, *J Biol Chem*, **279**: 27; (2004), 28411-28418.
- Francois M., Richette P., Tsagris L., Fitting C., Lemay C., Benallaoua M., Tahiri K., et Corvol M.T., Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway potentiates interleukin-1 receptor antagonist production in cytokine-treated chondrocytes, *Arthritis Rheum*, **54**: 4; (2006), 1233-1245.
- Freije J.M., Diez-Itza I., Balbin M., Sanchez L.M., Blasco R., Tolivia J., et Lopez-Otin C., Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas, *J Biol Chem*, **269**: 24; (1994), 16766-16773.
- Frisbie D.D., Ghivizzani S.C., Robbins P.D., Evans C.H., et McIlwraith C.W., Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene, *Gene Ther*, **9**: 1; (2002), 12-20.
- Fu M., Wang C., Zhang X., et Pestell R.G., Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis, *Biochem Pharmacol*, **68**: 6; (2004), 1199-1208.
- Gadher S.J. et Woolley D.E., Comparative studies of adherent rheumatoid synovial cells in primary culture: characterisation of the dendritic (stellate) cell, *Rheumatol Int*, **7**: 1; (1987), 13-22.
- Gallinari P., Di Marco S., Jones P., Pallaoro M., et Steinkuhler C., HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics, *Cell Res*, **17**: 3; (2007), 195-211.
- Galvin S.A., Gilbert R., Baker M., Guibal F., et Tuley M.R., Comparative tolerance of adapalene 0.1% gel and six different tretinoin formulations, *Br J Dermatol*, **139 Suppl 52**; (1998), 34-40.
- Gamage S.D., Bischoff E.D., Burroughs K.D., Lamph W.W., Gottardis M.M., Walker C.L., et Fuchs-Young R., Efficacy of LGD1069 (Targretin), a retinoid X receptor-selective ligand, for treatment of uterine leiomyoma, *J Pharmacol Exp Ther*, **295**: 2; (2000), 677-681.
- Gao B., Calhoun K., et Fang D., The proinflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase, in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway, *Arthritis Res Ther*, **8**: 6; (2006), R172.
- Gao W., Kumar S., Lotze M.T., Hanning C., Robbins P.D., et Gambotto A., Innate immunity mediated by the cytokine IL-1 homologue 4 (IL-1H4/IL-1F7) induces IL-12-dependent adaptive and profound antitumor immunity, *J Immunol*, **170**: 1; (2003), 107-113.
- Gartlehner G., Hansen R.A., Jonas B.L., Thieda P., et Lohr K.N., The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis, *J Rheumatol*, **33**: 12; (2006), 2398-2408.
- Genovese M.C., Cohen S., Moreland L., Lium D., Robbins S., Newmark R., et Bekker P., Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate, *Arthritis Rheum*, **50**: 5; (2004), 1412-1419.
- Georganas C., Liu H., Perlman H., Hoffmann A., Thimmapaya B., et Pope R.M., Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun, *J Immunol*, **165**: 12; (2000), 7199-7206.
- Germain P., Chambon P., Eichele G., Evans R.M., Lazar M.A., Leid M., De Lera A.R., Lotan R., Mangelsdorf D.J., et Gronemeyer H., International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors, *Pharmacol Rev*, **58**: 4; (2006a), 712-725.
- Germain P., Chambon P., Eichele G., Evans R.M., Lazar M.A., Leid M., De Lera A.R., Lotan R., Mangelsdorf D.J., et Gronemeyer H., International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors, *Pharmacol Rev*, **58**: 4; (2006b), 760-772.
- Ghigo D., Priotto C., Migliorino D., Geromin D., Franchino C., Todde R., Costamagna C., Pescarmona G., et Bosia A., Retinoic acid-induced differentiation in a human neuroblastoma cell line is associated with an increase in nitric oxide synthesis, *J Cell Physiol*, **174**: 1; (1998), 99-106.
- Gianni M., Bauer A., Garattini E., Chambon P., et Rochette-Egly C., Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation, *Embo J*, **21**: 14; (2002a), 3760-3769.
- Gianni M., Kopf E., Bastien J., Oulad-Abdelghani M., Garattini E., Chambon P., et Rochette-Egly C., Down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in retinoic acid-induced phosphorylation, degradation, and transcriptional activity of retinoic acid receptor gamma 2, *J Biol Chem*, **277**: 28; (2002b), 24859-24862.
- Gianni M., Parrella E., Raska I., Jr., Gaillard E., Nigro E.A., Gaudon C., Garattini E., et Rochette-Egly C., P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription, *Embo J*, **25**: 4; (2006), 739-751.
- Giguere V., Ong E.S., Segui P., et Evans R.M., Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid, *Nature*, **330**: 6149; (1987), 624-629.

- Gilbert A.M., Bursavich M.G., Lombardi S., Georgiadis K.E., Reifenberg E., Flannery C.R., et Morris E.A., 5-((1H-pyrazol-4-yl)methylene)-2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of ADAMTS-5, *Bioorg Med Chem Lett*, **17**: 5; (2007), 1189-1192.
- Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willis D., Chivers J., Paul-Clark M.J., et Willoughby D.A., Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties, *Nat Med*, **5**: 6; (1999), 698-701.
- Glass C.K., Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers, *Endocr Rev*, **15**: 3; (1994), 391-407.
- Glass C.K. et Rosenfeld M.G., The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors, *Genes Dev*, **14**: 2; (2000), 121-141.
- Glasson S.S., Askew R., Sheppard B., Carito B.A., Blanchet T., Ma H.L., Flannery C.R., Kanki K., Wang E., Peluso D., Yang Z., Majumdar M.K., et Morris E.A., Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice, *Arthritis Rheum*, **50**: 8; (2004), 2547-2558.
- Goldring M.B., Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases, *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **20**: 5; (2006), 1003-1025.
- Goldring M.B., Birkhead J.R., Suen L.F., Yamin R., Mizuno S., Glowacki J., Arbisser J.L., et Apperley J.F., Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes, *J Clin Invest*, **94**: 6; (1994), 2307-2316.
- Gonzales M., Haan K., Baker S.E., Fitchmun M., Todorov I., Weitzman S., et Jones J.C., A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation, *Mol Biol Cell*, **10**: 2; (1999), 259-270.
- Gottardis M.M., Bischoff E.D., Shirley M.A., Wagoner M.A., Lamph W.W., et Heyman R.A., Chemoprevention of mammary carcinoma by LGD1069 (Targretin): an RXR-selective ligand, *Cancer Res*, **56**: 24; (1996), 5566-5570.
- Goupille P., Giraudeau B., et Conrozier T., Safety and efficacy of intra-articular injection of IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) in patients with painful osteoarthritis of the knee: a multicenter double blind study., *Arthritis and Rheumatism*, **48**; (2003), S696-S697.
- Gouttenoire J., Valcourt U., Ronziere M.C., Aubert-Foucher E., Mallein-Gerin F., et Herbage D., Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage, *Biorheology*, **41**: 3-4; (2004), 535-542.
- Gouze J.N., Gouze E., Popp M.P., Bush M.L., Dacanay E.A., Kay J.D., Levings P.P., Patel K.R., Saran J.P., Watson R.S., et Ghivizzani S.C., Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta, *Arthritis Res Ther*, **8**: 6; (2006), R173.
- Goyette P., Allan D., Peschard P., Chen C.F., Wang W., et Lohnes D., Regulation of gli activity by all-trans retinoic acid in mouse keratinocytes, *Cancer Res*, **60**: 19; (2000), 5386-5389.
- Granger R.L., Hughes T.R., et Ramji D.P., Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines, *Biochim Biophys Acta*, **1501**: 2-3; (2000), 171-179.
- Graupner G., Wills K.N., Tzukerman M., Zhang X.K., et Pfahl M., Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity, *Nature*, **340**: 6235; (1989), 653-656.
- Gravallese E.M., Handel M.L., Coblyn J., Anderson R.J., Sperling R.I., Karlson E.W., Maier A., Ruderman E.M., Formelli F., et Weinblatt M.E., N-[4-hydroxyphenyl] retinamide in rheumatoid arthritis: a pilot study, *Arthritis Rheum*, **39**: 6; (1996), 1021-1026.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., et Tannenbaum S.R., Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal Biochem*, **126**: 1; (1982), 131-138.
- Grell M., Wajant H., Zimmermann G., et Scheurich P., The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 2; (1998), 570-575.
- Gronemeyer H., Gustafsson J.A., et Laudet V., Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily, *Nat Rev Drug Discov*, **3**: 11; (2004), 950-964.
- Guerin E., Ludwig M.G., Basset P., et Anglard P., Stromelysin-3 induction and interstitial collagenase repression by retinoic acid. Therapeutical implication of receptor-selective retinoids dissociating transactivation and AP-1-mediated transrepression, *J Biol Chem*, **272**: 17; (1997), 11088-11095.
- Guerne P.A., Zuraw B.L., Vaughan J.H., Carson D.A., et Lotz M., Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis, *J Clin Invest*, **83**: 2; (1989), 585-592.
- Guerne P.A., Blanco F., Kaelin A., Desgeorges A., et Lotz M., Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development, *Arthritis Rheum*, **38**: 7; (1995), 960-968.
- Guilak F., Ratcliffe A., Lane N., Rosenwasser M.P., et Mow V.C., Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis, *J Orthop Res*, **12**: 4; (1994), 474-484.
- Hai T. et Curran T., Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 9; (1991), 3720-3724.

- Hall J.P., Kurdi Y., Hsu S., Cuzzo J., Liu J., Telliez J.B., Seidl K.J., Winkler A., Hu Y., Green N., Askew G.R., Tam S., Clark J.D., et Lin L.L., Pharmacologic inhibition of tpl2 blocks inflammatory responses in primary human monocytes, synoviocytes, and blood, *J Biol Chem*, **282**: 46; (2007), 33295-33304.
- Hamada K., Gleason S.L., Levi B.Z., Hirschfeld S., Appella E., et Ozato K., H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 21; (1989), 8289-8293.
- Han Z., Boyle D.L., Chang L., Bennett B., Karin M., Yang L., Manning A.M., et Firestein G.S., c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis, *J Clin Invest*, **108**: 1; (2001), 73-81.
- Handel M.L., McMorro L.B., et Gravalles E.M., Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65, *Arthritis Rheum*, **38**: 12; (1995), 1762-1770.
- Hanglow A.C., Bachmann H., Rosenberger M., et Coffey J.W., Effects of a novel anti-inflammatory retinoid-like 2,4,6,8-nonatetraenoic acid on the immunological changes associated with adjuvant-induced arthritis, *Int J Immunopharmacol*, **12**: 7; (1990), 703-712.
- Hanglow A.C., Rosenberger M., Lovey A.J., Nemzek R., Welton A.F., et Coffey J.W., Anti-inflammatory and immuno-modulatory effects of novel retinoid-like 2,4,6,8-nonatetraenoic acids (NTA) in adjuvant-induced arthritis, *Agents Actions*, **27**: 3-4; (1989), 347-350.
- Hansen L.A., Sigman C.C., Andreola F., Ross S.A., Kelloff G.J., et De Luca L.M., Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy, *Carcinogenesis*, **21**: 7; (2000), 1271-1279.
- Hansen M.B., Nielsen S.E., et Berg K., Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J Immunol Methods*, **119**: 2; (1989), 203-210.
- Haraoui B., Wilder R.L., Allen J.B., Sporn M.B., Helfgott R.K., et Brinckerhoff C.E., Dose-dependent suppression by the synthetic retinoid, 4-hydroxyphenyl retinamide, of streptococcal cell wall-induced arthritis in rats, *Int J Immunopharmacol*, **7**: 6; (1985), 903-916.
- Hardingham T.E. et Fosang A.J., The structure of aggrecan and its turnover in cartilage, *J Rheumatol Suppl*, **43**: (1995), 86-90.
- Hashimoto H., Tomita N., Kunugiza Y., Nampei A., Morishita R., et Kaneda Y., NF-kB decoy oligodeoxynucleotides suppressed the progression of osteoarthritis in rat arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, **48**: (2003), S630.
- Hashimoto S., Takahashi K., Ochs R.L., Coutts R.D., Amiel D., et Lotz M., Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, **42**: 10; (1999), 2123-2131.
- Hashimoto S., Ochs R.L., Rosen F., Quach J., McCabe G., Solan J., Seegmiller J.E., Terkeltaub R., et Lotz M., Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 6; (1998), 3094-3099.
- Hata H., Sakaguchi N., Yoshitomi H., Iwakura Y., Sekikawa K., Azuma Y., Kanai C., Moriizumi E., Nomura T., Nakamura T., et Sakaguchi S., Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice, *J Clin Invest*, **114**: 4; (2004), 582-588.
- Haugen B.R., Brown N.S., Wood W.M., Gordon D.F., et Ridgway E.C., The thyrotrope-restricted isoform of the retinoid-X receptor-gamma1 mediates 9-cis-retinoic acid suppression of thyrotropin-beta promoter activity, *Mol Endocrinol*, **11**: 4; (1997), 481-489.
- Hauptmann B., Van Damme J., et Dayer J.M., Modulation of IL-1 inflammatory and immunomodulatory properties by IL-6, *Eur Cytokine Netw*, **2**: 1; (1991), 39-46.
- Hauselmann H.J., Oppliger L., Michel B.A., Stefanovic-Racic M., et Evans C.H., Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture, *FEBS Lett*, **352**: 3; (1994), 361-364.
- Haworth C., Brennan F.M., Chantry D., Turner M., Maini R.N., et Feldmann M., Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha, *Eur J Immunol*, **21**: 10; (1991), 2575-2579.
- Hayashi T., Sekine T., et Okamoto T., Identification of a new serine kinase that activates NF kappa B by direct phosphorylation, *J Biol Chem*, **268**: 35; (1993), 26790-26795.
- He W., Barak Y., Hevener A., Olson P., Liao D., Le J., Nelson M., Ong E., Olefsky J.M., et Evans R.M., Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 26; (2003), 15712-15717.
- Head K.A., Natural therapies for ocular disorders, part one: diseases of the retina, *Altern Med Rev*, **4**: 5; (1999), 342-359.
- Heinegard D. et Oldberg A., Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules, *Faseb J*, **3**: 9; (1989), 2042-2051.
- Hembry R.M., Bagga M.R., Reynolds J.J., et Hamblen D.L., Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis*, **54**: 1; (1995), 25-32.

- Henderson B. et Pettipher E.R., Comparison of the in vivo inflammatory activities after intra-articular injection of natural and recombinant IL-1 alpha and IL-1 beta in the rabbit, *Biochem Pharmacol*, **37**: 21; (1988), 4171-4176.
- Henriet P., Rousseau G.G., et Eeckhout Y., Cloning and sequencing of mouse collagenase cDNA. Divergence of mouse and rat collagenases from the other mammalian collagenases, *FEBS Lett*, **310**: 2; (1992), 175-178.
- Hering T.M., Regulation of chondrocyte gene expression, *Front Biosci*, **4**; (1999), D743-761.
- Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A., Stein R.B., Eichele G., Evans R.M., et Thaller C., 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor, *Cell*, **68**: 2; (1992), 397-406.
- Hill D.L. et Grubbs C.J., Retinoids and cancer prevention, *Annu Rev Nutr*, **12**; (1992), 161-181.
- Hing W.A., Sherwin A.F., et Poole C.A., The influence of the pericellular microenvironment on the chondrocyte response to osmotic challenge, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**: 4; (2002), 297-307.
- Hirano T., Nakajima K., et Hibi M., Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system, *Cytokine Growth Factor Rev*, **8**: 4; (1997), 241-252.
- Hirano T., Ishihara K., et Hibi M., Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors, *Oncogene*, **19**: 21; (2000), 2548-2556.
- Hirano T., Yasukawa K., Harada H., Taga T., Watanabe Y., Matsuda T., Kashiwamura S., Nakajima K., Koyama K., Iwamatsu A., et et al., Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature*, **324**: 6092; (1986), 73-76.
- Hirano T., Matsuda T., Turner M., Miyasaka N., Buchan G., Tang B., Sato K., Shimizu M., Maini R., Feldmann M., et et al., Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis, *Eur J Immunol*, **18**: 11; (1988), 1797-1801.
- Hirokawa K., O'Shaughnessy K.M., Ramrakha P., et Wilkins M.R., Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids, *Br J Pharmacol*, **113**: 4; (1994), 1448-1454.
- Hirsch E., Irikura V.M., Paul S.M., et Hirsh D., Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 20; (1996), 11008-11013.
- Ho L.J., Lin L.C., Hung L.F., Wang S.J., Lee C.H., Chang D.M., Lai J.H., et Tai T.Y., Retinoic acid blocks pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase production by down-regulating JNK-AP-1 signaling in human chondrocytes, *Biochem Pharmacol*, **70**: 2; (2005), 200-208.
- Hochberg M.C., Leibold M.G., Plevy S.E., Hobbs K.F., et Yocum D.E., The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel, *Semin Arthritis Rheum*, **34**: 6; (2005), 819-836.
- Hoffman L.M., Weston A.D., et Underhill T.M., Molecular mechanisms regulating chondroblast differentiation, *J Bone Joint Surg Am*, **85-A Suppl 2**; (2003), 124-132.
- Hoffmann S., Rockenstein A., Ramaswamy A., Celik I., Wunderlich A., Lingelbach S., Hofbauer L.C., et Zielke A., Retinoic acid inhibits angiogenesis and tumor growth of thyroid cancer cells, *Mol Cell Endocrinol*, **264**: 1-2; (2007), 74-81.
- Holback S., Adlerz L., Gatsinzi T., Jacobsen K.T., et Iverfeldt K., PI3-K- and PKC-dependent up-regulation of APP processing enzymes by retinoic acid, *Biochem Biophys Res Commun*, **365**: 2; (2008), 298-303.
- Hong S.H. et Privalsky M.L., The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export, *Mol Cell Biol*, **20**: 17; (2000), 6612-6625.
- Horai R., Saijo S., Tanioka H., Nakae S., Sudo K., Okahara A., Ikuse T., Asano M., et Iwakura Y., Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice, *J Exp Med*, **191**: 2; (2000), 313-320.
- Horton W.E., Yamada Y., et Hassell J.R., Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes, *Dev Biol*, **123**: 2; (1987), 508-516.
- Horwitz A.L. et Dorfman A., Subcellular sites for synthesis of chondromucoprotein of cartilage, *J Cell Biol*, **38**: 2; (1968), 58-68.
- Houle B., Rochette-Egly C., et Bradley W.E., Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 3; (1993), 985-989.
- Houssiau F.A., Devogelaer J.P., Van Damme J., de Deuxchaisnes C.N., et Van Snick J., Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides, *Arthritis Rheum*, **31**: 6; (1988), 784-788.
- Hsu C.A., Rishi A.K., Su-Li X., Gerald T.M., Dawson M.I., Schiffer C., Reichert U., Shroot B., Poirer G.C., et Fontana J.A., Retinoid induced apoptosis in leukemia cells through a retinoic acid nuclear receptor-independent pathway, *Blood*, **89**: 12; (1997), 4470-4479.
- Hsu W., Kerppola T.K., Chen P.L., Curran T., et Chen-Kiang S., Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region, *Mol Cell Biol*, **14**: 1; (1994), 268-276.

- Huang C., Ma W.Y., Dawson M.I., Rincon M., Flavell R.A., et Dong Z., Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 11; (1997), 5826-5830.
- Huber L.C., Brock M., Hemmatazad H., Giger O.T., Moritz F., Trenkmann M., Distler J.H., Gay R.E., Kolling C., Moch H., Michel B.A., Gay S., Distler O., et Jungel A., Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients, *Arthritis Rheum*, **56**: 4; (2007), 1087-1093.
- Huber M., Trattng S., et Lintner F., Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage, *Invest Radiol*, **35**: 10; (2000), 573-580.
- Huggenvik J.I., Collard M.W., Kim Y.W., et Sharma R.P., Modification of the retinoic acid signaling pathway by the catalytic subunit of protein kinase-A, *Mol Endocrinol*, **7**: 4; (1993), 543-550.
- Hui W., Rowan A.D., et Cawston T., Modulation of the expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases by TGF-beta1 and IGF-1 in primary human articular and bovine nasal chondrocytes stimulated with TNF-alpha, *Cytokine*, **16**: 1; (2001), 31-35.
- Hunziker E.B., *Articular cartilage and osteoarthritis*, ed. E. K.K.e. coll. 1992: Raven Press Ltd.: NY.
- Husmann M., Dragneva Y., Romahn E., et Jehnichen P., Nuclear receptors modulate the interaction of Sp1 and GC-rich DNA via ternary complex formation, *Biochem J*, **352 Pt 3**; (2000), 763-772.
- Idres N., Marill J., et Chabot G.G., Regulation of CYP26A1 expression by selective RAR and RXR agonists in human NB4 promyelocytic leukemia cells, *Biochem Pharmacol*, **69**: 11; (2005), 1595-1601.
- Imai T., Takakuwa R., Marchand S., Dentz E., Bornert J.M., Messaddeq N., Wendling O., Mark M., Desvergne B., Wahli W., Chambon P., et Metzger D., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 13; (2004), 4543-4547.
- Imam A., Hoyos B., Swenson C., Levi E., Chua R., Viriya E., et Hammerling U., Retinoids as ligands and coactivators of protein kinase C alpha, *Faseb J*, **15**: 1; (2001), 28-30.
- Islam A., Adamik B., Hawari F.I., Ma G., Rouhani F.N., Zhang J., et Levine S.J., Extracellular TNFR1 release requires the calcium-dependent formation of a nucleobindin 2-ARTS-1 complex, *J Biol Chem*, **281**: 10; (2006), 6860-6873.
- Isomaki P. et Punnonen J., Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis, *Ann Med*, **29**: 6; (1997), 499-507.
- Issemann I. et Green S., Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature*, **347**: 6294; (1990), 645-650.
- Janssen Y.M., Barchowsky A., Treadwell M., Driscoll K.E., et Mossman B.T., Asbestos induces nuclear factor kappa B (NF-kappa B) DNA-binding activity and NF-kappa B-dependent gene expression in tracheal epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 18; (1995), 8458-8462.
- Jiang Y., Relationship of Genant scoring method with Larsen scoring method in randomized, double-blind, placebo controlled trial of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis., *Arthritis and Rheumatism*, **41**: Suppl:S50; (1998),
- Johnston T.H. et Brotchie J.M., Drugs in development for Parkinson's disease, *Curr Opin Investig Drugs*, **5**: 7; (2004), 720-726.
- Jones B.B., Jurutka P.W., Haussler C.A., Haussler M.R., et Whitfield G.K., Vitamin D receptor phosphorylation in transfected ROS 17/2.8 cells is localized to the N-terminal region of the hormone-binding domain, *Mol Endocrinol*, **5**: 8; (1991), 1137-1146.
- Jones E.Y., Stuart D.I., et Walker N.P., Structure of tumour necrosis factor, *Nature*, **338**: 6212; (1989), 225-228.
- Joosten L.A., Helsen M.M., van de Loo F.A., et van den Berg W.B., Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra, *Arthritis Rheum*, **39**: 5; (1996), 797-809.
- Jouzeau J.Y., Cipolletta C., Presle N., Netter P., et Terlain B., Modulation of IL-1 effects on cartilage by NO synthase inhibitors: pharmacological studies in rats, *Osteoarthritis Cartilage*, **7**: 4; (1999), 382-385.
- Jouzeau J.Y., Pacquelet S., Boileau C., Nedelec E., Presle N., Netter P., et Terlain B., Nitric oxide (NO) and cartilage metabolism: NO effects are modulated by superoxide in response to IL-1, *Biorheology*, **39**: 1-2; (2002), 201-214.
- Kallen K.J., The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases, *Biochim Biophys Acta*, **1592**: 3; (2002), 323-343.
- Kamei Y., Xu L., Heinzl T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S.C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K., et Rosenfeld M.G., A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell*, **85**: 3; (1996), 403-414.
- Kaneko S., Satoh T., Chiba J., Ju C., Inoue K., et Kagawa J., Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis, *Cytokines Cell Mol Ther*, **6**: 2; (2000), 71-79.

- Kang M.K., Yoon Y.E., Yang J.Y., Kwon K.B., Park J.W., et Jhee E.C., Protective effect of retinoic acid on interleukin-1 beta-induced cytotoxicity of pancreatic beta-cells, *Mech Ageing Dev*, **125**: 7; (2004), 483-490.
- Karin M., The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation, *J Biol Chem*, **274**: 39; (1999), 27339-27342.
- Karin M. et Chang L., AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level, *J Endocrinol*, **169**: 3; (2001), 447-451.
- Karin M., Liu Z., et Zandi E., AP-1 function and regulation, *Curr Opin Cell Biol*, **9**: 2; (1997), 240-246.
- Kastner P., Mark M., Ghyselincx N., Krezel W., Dupe V., Grondona J.M., et Chambon P., Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development, *Development*, **124**: 2; (1997), 313-326.
- Kastner P., Krust A., Mendelsohn C., Garnier J.M., Zelent A., Leroy P., Staub A., et Chambon P., Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 7; (1990), 2700-2704.
- Katahira M., Knegtel R.M., Boelens R., Eib D., Schilthuis J.G., van der Saag P.T., et Kaptein R., Homo- and heteronuclear NMR studies of the human retinoic acid receptor beta DNA-binding domain: sequential assignments and identification of secondary structure elements, *Biochemistry*, **31**: 28; (1992), 6474-6480.
- Katsikis P.D., Chu C.Q., Brennan F.M., Maini R.N., et Feldmann M., Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis, *J Exp Med*, **179**: 5; (1994), 1517-1527.
- Katz S., Kowenz-Leutz E., Muller C., Meese K., Ness S.A., et Leutz A., The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells, *Embo J*, **12**: 4; (1993), 1321-1332.
- Kawakami A., Nakashima T., Sakai H., Hida A., Urayama S., Yamasaki S., Nakamura H., Ida H., Ichinose Y., Aoyagi T., Furuichi I., Nakashima M., Migita K., Kawabe Y., et Eguchi K., Regulation of synovial cell apoptosis by proteasome inhibitor, *Arthritis Rheum*, **42**: 11; (1999), 2440-2448.
- Kayashima K., Koga T., et Onoue K., Role of T lymphocytes in adjuvant arthritis. II. Different subpopulations of T lymphocytes functioning in the development of the disease, *J Immunol*, **120**: 4; (1978), 1127-1131.
- Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., Kaslaris E., Kioussis D., et Kollias G., Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis, *Embo J*, **10**: 13; (1991), 4025-4031.
- Keriel A., Stary A., Sarasin A., Rochette-Egly C., et Egly J.M., XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha, *Cell*, **109**: 1; (2002), 125-135.
- Kersten S., Seydoux J., Peters J.M., Gonzalez F.J., Desvergne B., et Wahli W., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting, *J Clin Invest*, **103**: 11; (1999), 1489-1498.
- Kersten S., Mandard S., Escher P., Gonzalez F.J., Tafuri S., Desvergne B., et Wahli W., The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism, *Faseb J*, **15**: 11; (2001), 1971-1978.
- Khuri F.R., Rigas J.R., Figlin R.A., Gralla R.J., Shin D.M., Munden R., Fox N., Huyghe M.R., Kean Y., Reich S.D., et Hong W.K., Multi-institutional phase I/II trial of oral bexarotene in combination with cisplatin and vinorelbine in previously untreated patients with advanced non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*, **19**: 10; (2001), 2626-2637.
- Kinoshita S., Akira S., et Kishimoto T., A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 4; (1992), 1473-1476.
- Kishimoto T., Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine, *Arthritis Res Ther*, **8 Suppl 2**; (2006), S2.
- Knegtel R.M., Boelens R., Ganadu M.L., George A.V., van der Saag P.T., et Kaptein R., Heteronuclear ¹¹³Cd-1H NMR study of metal coordination in the human retinoic acid receptor-beta DNA binding domain, *Biochem Biophys Res Commun*, **192**: 2; (1993), 492-498.
- Knight C.G., Willenbrock F., et Murphy G., A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases, *FEBS Lett*, **296**: 3; (1992), 263-266.
- Koch A.E., Harlow L.A., Haines G.K., Amento E.P., Unemori E.N., Wong W.L., Pope R.M., et Ferrara N., Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis, *J Immunol*, **152**: 8; (1994), 4149-4156.
- Kochhar D.M., Skeletal morphogenesis: comparative effects of a mutant gene and a teratogen, *Prog Clin Biol Res*, **171**; (1985), 267-281.
- Kopf E., Plassat J.L., Vivat V., de The H., Chambon P., et Rochette-Egly C., Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway, *J Biol Chem*, **275**: 43; (2000), 33280-33288.

- Kousteni S., Kockar F.T., Sweeney G.E., et Ramji D.P., Characterisation and developmental regulation of the *Xenopus laevis* CCAAT-enhancer binding protein beta gene, *Mech Dev*, **77**: 2; (1998), 143-148.
- Koutnikova H., Cock T.A., Watanabe M., Houten S.M., Champy M.F., Dierich A., et Auwerx J., Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 24; (2003), 14457-14462.
- Kraan M.C., Smith M.D., Weedon H., Ahern M.J., Breedveld F.C., et Tak P.P., Measurement of cytokine and adhesion molecule expression in synovial tissue by digital image analysis, *Ann Rheum Dis*, **60**: 3; (2001), 296-298.
- Kraemer K.H., DiGiovanna J.J., Moshell A.N., Tarone R.E., et Peck G.L., Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin, *N Engl J Med*, **318**: 25; (1988), 1633-1637.
- Kubota T., Kubota E., Matsumoto A., Kawai Y., Saito H., Mikuni-Takagaki Y., et Sato S., Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder, *Eur J Oral Sci*, **106**: 6; (1998), 992-998.
- Kuettner K.E., Aydelotte M.B., et Thonar E.J., Articular cartilage matrix and structure: a minireview, *J Rheumatol Suppl*, **27**; (1991), 46-48.
- Kurokawa R., Soderstrom M., Horlein A., Halachmi S., Brown M., Rosenfeld M.G., et Glass C.K., Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor, *Nature*, **377**: 6548; (1995), 451-454.
- Kurokawa R., Yu V.C., Naar A., Kyakumoto S., Han Z., Silverman S., Rosenfeld M.G., et Glass C.K., Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers, *Genes Dev*, **7**: 7B; (1993), 1423-1435.
- Kurokawa R., DiRenzo J., Boehm M., Sugarman J., Gloss B., Rosenfeld M.G., Heyman R.A., et Glass C.K., Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding, *Nature*, **371**: 6497; (1994), 528-531.
- Kuwabara K., Shudo K., et Hori Y., Novel synthetic retinoic acid inhibits rat collagen arthritis and differentially affects serum immunoglobulin subclass levels, *FEBS Lett*, **378**: 2; (1996), 153-156.
- Laasanen M.S., Toyras J., Korhonen R.K., Rieppo J., Saarakkala S., Nieminen M.T., Hirvonen J., et Jurvelin J.S., Biomechanical properties of knee articular cartilage, *Biorheology*, **40**: 1-3; (2003), 133-140.
- Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**: 5259; (1970), 680-685.
- Lafyatis R., Remmers E.F., Roberts A.B., Yocum D.E., Sporn M.B., et Wilder R.L., Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids, *J Clin Invest*, **83**: 4; (1989), 1267-1276.
- Lafyatis R., Kim S.J., Angel P., Roberts A.B., Sporn M.B., Karin M., et Wilder R.L., Interleukin-1 stimulates and all-trans-retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1-binding site, *Mol Endocrinol*, **4**: 7; (1990), 973-980.
- Lake B.G., Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **35**; (1995), 483-507.
- Lallena M.J., Diaz-Meco M.T., Bren G., Paya C.V., et Moscat J., Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms, *Mol Cell Biol*, **19**: 3; (1999), 2180-2188.
- Lampron C., Rochette-Egly C., Gorry P., Dolle P., Mark M., Lufkin T., LeMeur M., et Chambon P., Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal, *Development*, **121**: 2; (1995), 539-548.
- Landschulz W.H., Johnson P.F., Adashi E.Y., Graves B.J., et McKnight S.L., Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP, *Genes Dev*, **2**: 7; (1988), 786-800.
- Lansink M., Koolwijk P., van Hinsbergh V., et Kooistra T., Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression, *Blood*, **92**: 3; (1998), 927-938.
- Largman C., Detmer K., Corral J.C., Hack F.M., et Lawrence H.J., Expression of retinoic acid receptor alpha mRNA in human leukemia cells, *Blood*, **74**: 1; (1989), 99-102.
- Laudet V., Hanni C., Coll J., Catzeflis F., et Stehelin D., Evolution of the nuclear receptor gene superfamily, *Embo J*, **11**: 3; (1992), 1003-1013.
- Lawrence J.A., Adamson P.C., Caruso R., Chow C., Kleiner D., Murphy R.F., Venzon D.J., Shovlin M., Noone M., Merino M., Cowan K.H., Kaiser M., O'Shaughnessy J., et Zujewski J., Phase I clinical trial of alitretinoin and tamoxifen in breast cancer patients: toxicity, pharmacokinetic, and biomarker evaluations, *J Clin Oncol*, **19**: 10; (2001), 2754-2763.
- Lawson N.D. et Berliner N., Neutrophil maturation and the role of retinoic acid, *Exp Hematol*, **27**: 9; (1999), 1355-1367.

- Lebsack M.E., Paul C.C., Bloedow D.C., Burch F.X., Sack M.A., Chase W., et Catalano M.A., Subcutaneous IL-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, **34**: sppl; (1991), S67.
- LeClair K.P., Blonar M.A., et Sharp P.A., The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 17; (1992), 8145-8149.
- Lee F.S., Peters R.T., Dang L.C., et Maniatis T., MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 16; (1998), 9319-9324.
- Lee H.Y., Walsh G.L., Dawson M.I., Hong W.K., et Kurie J.M., All-trans-retinoic acid inhibits Jun N-terminal kinase-dependent signaling pathways, *J Biol Chem*, **273**: 12; (1998), 7066-7071.
- Lee H.Y., Sueoka N., Hong W.K., Mangelsdorf D.J., Claret F.X., et Kurie J.M., All-trans-retinoic acid inhibits Jun N-terminal kinase by increasing dual-specificity phosphatase activity, *Mol Cell Biol*, **19**: 3; (1999), 1973-1980.
- Lee H.Y., Dawson M.I., Walsh G.L., Nesbitt J.C., Eckert R.L., Fuchs E., Hong W.K., Lotan R., et Kurie J.M., Retinoic acid receptor- and retinoid X receptor-selective retinoids activate signaling pathways that converge on AP-1 and inhibit squamous differentiation in human bronchial epithelial cells, *Cell Growth Differ*, **7**: 8; (1996), 997-1004.
- Lee H.Y., Suh Y.A., Robinson M.J., Clifford J.L., Hong W.K., Woodgett J.R., Cobb M.H., Mangelsdorf D.J., et Kurie J.M., Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor, *J Biol Chem*, **275**: 41; (2000), 32193-32199.
- Lee M.S., Kliewer S.A., Provencal J., Wright P.E., et Evans R.M., Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding, *Science*, **260**: 5111; (1993), 1117-1121.
- Lefebvre B., Mouchon A., Formstecher P., et Lefebvre P., H11-H12 loop retinoic acid receptor mutants exhibit distinct trans-activating and trans-repressing activities in the presence of natural or synthetic retinoids, *Biochemistry*, **37**: 26; (1998), 9240-9249.
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J.C., et Staels B., Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis, *J Clin Invest*, **116**: 3; (2006), 571-580.
- Legendre F., Dudhia J., Pujol J.P., et Bogdanowicz P., JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression, *J Biol Chem*, **278**: 5; (2003), 2903-2912.
- Leid M., Kastner P., Lyons R., Nakshatri H., Saunders M., Zacharewski T., Chen J.Y., Staub A., Garnier J.M., Mader S., et al., Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently, *Cell*, **68**: 2; (1992), 377-395.
- Lekstrom-Himes J. et Xanthopoulos K.G., Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors, *J Biol Chem*, **273**: 44; (1998), 28545-28548.
- Leroy P., Krust A., Zelent A., Mendelsohn C., Garnier J.M., Kastner P., Dierich A., et Chambon P., Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid, *Embo J*, **10**: 1; (1991), 59-69.
- Letavernier E., Perez J., Joye E., Bellocq A., Fouqueray B., Haymann J.P., Heudes D., Wahli W., Desvergne B., et Baud L., Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta exerts a strong protection from ischemic acute renal failure, *J Am Soc Nephrol*, **16**: 8; (2005), 2395-2402.
- Levin A.A., Sturzenbecker L.J., Kazmer S., Bosakowski T., Huselton C., Allenby G., Speck J., Kratzisen C., Rosenberger M., Lovey A., et al., 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha, *Nature*, **355**: 6358; (1992), 359-361.
- Levine S.J., Mechanisms of soluble cytokine receptor generation, *J Immunol*, **173**: 9; (2004), 5343-5348.
- Li A., He M., Wang H., Qiao B., Chen P., Gu H., Zhang M., et He S., All-trans retinoic acid negatively regulates cytotoxic activities of nature killer cell line 92, *Biochem Biophys Res Commun*, **352**: 1; (2007), 42-47.
- Li J., Molkenin J.D., et Colbert M.C., Retinoic acid inhibits cardiac neural crest migration by blocking c-Jun N-terminal kinase activation, *Dev Biol*, **232**: 2; (2001), 351-361.
- Li M., Indra A.K., Warot X., Brocard J., Messaddeq N., Kato S., Metzger D., et Chambon P., Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis, *Nature*, **407**: 6804; (2000), 633-636.
- Li Y., Hashimoto Y., Agadir A., Kagechika H., et Zhang X., Identification of a novel class of retinoic acid receptor beta-selective retinoid antagonists and their inhibitory effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells, *J Biol Chem*, **274**: 22; (1999), 15360-15366.
- Li Y., Dawson M.I., Agadir A., Lee M.O., Jong L., Hobbs P.D., et Zhang X.K., Regulation of RAR beta expression by RAR- and RXR-selective retinoids in human lung cancer cell lines: effect on growth inhibition and apoptosis induction, *Int J Cancer*, **75**: 1; (1998), 88-95.

- Liacini A., Sylvester J., Li W.Q., et Zafarullah M., Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes, *Matrix Biol*, **21**: 3; (2002), 251-262.
- Liacini A., Sylvester J., Li W.Q., Huang W., Dehnade F., Ahmad M., et Zafarullah M., Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes, *Exp Cell Res*, **288**: 1; (2003), 208-217.
- Lianxu C., Hongti J., et Changlong Y., NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage*, **14**: 4; (2006), 367-376.
- Lin H., Ho A.S., Haley-Vicente D., Zhang J., Bernal-Fussell J., Pace A.M., Hansen D., Schweighofer K., Mize N.K., et Ford J.E., Cloning and characterization of IL-1HY2, a novel interleukin-1 family member, *J Biol Chem*, **276**: 23; (2001), 20597-20602.
- Lin J., Ziring D., Desai S., Kim S., Wong M., Korin Y., Braun J., Reed E., Gjertson D., et Singh R.R., TNFalpha blockade in human diseases: An overview of efficacy and safety, *Clin Immunol*; (2007),
- Ling L., Cao Z., et Goeddel D.V., NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 7; (1998), 3792-3797.
- Lipsky P.E., van der Heijde D.M., St Clair E.W., Furst D.E., Breedveld F.C., Kalden J.R., Smolen J.S., Weisman M., Emery P., Feldmann M., Harriman G.R., et Maini R.N., Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group, *N Engl J Med*, **343**: 22; (2000), 1594-1602.
- Liu Q. et Linney E., The mouse retinoid-X receptor-gamma gene: genomic organization and evidence for functional isoforms, *Mol Endocrinol*, **7**: 5; (1993), 651-658.
- Livak K.J. et Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, **25**: 4; (2001), 402-408.
- Llorente L., Richaud-Patin Y., Fior R., Alcocer-Varela J., Wijdenes J., Fourrier B.M., Galanaud P., et Emilie D., In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity, *Arthritis Rheum*, **37**: 11; (1994), 1647-1655.
- Lorenz H.M., Antoni C., Valerius T., Repp R., Grunke M., Schwerdtner N., Nusslein H., Woody J., Kalden J.R., et Manger B., In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects, *J Immunol*, **156**: 4; (1996), 1646-1653.
- Lotz M. et Guerne P.A., Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA), *J Biol Chem*, **266**: 4; (1991), 2017-2020.
- Lotz M., Blanco F.J., von Kempis J., Dudler J., Maier R., Villiger P.M., et Geng Y., Cytokine regulation of chondrocyte functions, *J Rheumatol Suppl*, **43**; (1995), 104-108.
- Loudig O., Babichuk C., White J., Abu-Abed S., Mueller C., et Petkovich M., Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism, *Mol Endocrinol*, **14**: 9; (2000), 1483-1497.
- Lu H.T., Liang Y.C., Sheu M.T., Ho H.O., Lin Y.T., Hsieh M.S., et Chen C.H., Disease-modifying effects of Glucosamine HCl involving regulation of metalloproteinases and chemokines activated by interleukin-1beta in human primary synovial fibroblasts, *J Cell Biochem*; (2007),
- Lubberts E., Joosten L.A., van Den Berselaar L., Helsen M.M., Bakker A.C., van Meurs J.B., Graham F.L., Richards C.D., et van Den Berg W.B., Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction, *J Immunol*, **163**: 8; (1999), 4546-4556.
- Ma Y., Thornton S., Boivin G.P., Hirsh D., Hirsch R., et Hirsch E., Altered susceptibility to collagen-induced arthritis in transgenic mice with aberrant expression of interleukin-1 receptor antagonist, *Arthritis Rheum*, **41**: 10; (1998), 1798-1805.
- Mader S., Kumar V., de Verneuil H., et Chambon P., Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element, *Nature*, **338**: 6212; (1989), 271-274.
- Mader S., Chen J.Y., Chen Z., White J., Chambon P., et Gronemeyer H., The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains, *Embo J*, **12**: 13; (1993), 5029-5041.
- Madhavan S., Anghelina M., Rath-Deschner B., Wypasek E., John A., Deschner J., Piesco N., et Agarwal S., Biomechanical signals exert sustained attenuation of proinflammatory gene induction in articular chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage*, **14**: 10; (2006), 1023-1032.

- Madhok R., Crilly A., Watson J., et Capell H.A., Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity, *Ann Rheum Dis*, **52**: 3; (1993), 232-234.
- Maheu E., Mazieres B., Valat J.P., Loyau G., Le Loet X., Bourgeois P., Grouin J.M., et Rozenberg S., Symptomatic efficacy of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis of the knee and hip: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial with a six-month treatment period and a two-month followup demonstrating a persistent effect, *Arthritis Rheum*, **41**: 1; (1998), 81-91.
- Maini R.N., Elliott M., Brennan F.M., Williams R.O., et Feldmann M., Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol*, **12 Suppl 11**; (1994), S63-66.
- Makarov S.S., NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction, *Arthritis Res*, **3**: 4; (2001), 200-206.
- Makarov S.S., Olsen J.C., Johnston W.N., Anderle S.K., Brown R.R., Baldwin A.S., Jr., Haskill J.S., et Schwab J.H., Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 1; (1996), 402-406.
- Malemud C.J., Small molecular weight inhibitors of stress-activated and mitogen-activated protein kinases, *Mini Rev Med Chem*, **6**: 6; (2006), 689-698.
- Malfait A.M., Liu R.Q., Ijiri K., Komiyama S., et Tortorella M.D., Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage, *J Biol Chem*, **277**: 25; (2002), 22201-22208.
- Malfait A.M., Verbruggen G., Veys E.M., Lambert J., De Ridder L., et Cornelissen M., Comparative and combined effects of interleukin 6, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha on proteoglycan metabolism of human articular chondrocytes cultured in agarose, *J Rheumatol*, **21**: 2; (1994), 314-320.
- Mallein-Gerin F. et Van der Rest M., *La culture de chondrocytes: outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage*. médecine/sciences. Vol. 12. 1996. 1087-1096.
- Mancini J.A., Blood K., Guay J., Gordon R., Claveau D., Chan C.C., et Riendeau D., Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis, *J Biol Chem*, **276**: 6; (2001), 4469-4475.
- Mangelsdorf D.J. et Evans R.M., The RXR heterodimers and orphan receptors, *Cell*, **83**: 6; (1995), 841-850.
- Mangelsdorf D.J., Ong E.S., Dyck J.A., et Evans R.M., Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway, *Nature*, **345**: 6272; (1990), 224-229.
- Mangelsdorf D.J., Umeshima K., Kliewer S.A., Borgmeyer U., Ong E.S., et Evans R.M., A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR, *Cell*, **66**: 3; (1991), 555-561.
- Mangelsdorf D.J., Borgmeyer U., Heyman R.A., Zhou J.Y., Ong E.S., Oro A.E., Kakizuka A., et Evans R.M., Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid, *Genes Dev*, **6**: 3; (1992), 329-344.
- Mankin H.J. et Treadwell B.V., Osteoarthritis: a 1987 update, *Bull Rheum Dis*, **36**: 5; (1986), 1-10.
- Mantadakis E., Samonis G., et Kalmanti M., A Comprehensive Review of Acute Promyelocytic Leukemia in Children, *Acta Haematol*, **119**: 2; (2008), 73-82.
- Mariette X., Emerging biological therapies in rheumatoid arthritis, *Joint Bone Spine*, **71**: 6; (2004), 470-474.
- Mark M., Ghyselinck N.B., Wendling O., Dupe V., Mascres B., Kastner P., et Chambon P., A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse, *Proc Nutr Soc*, **58**: 3; (1999), 609-613.
- Martel-Pelletier J., Pathophysiology of osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, **6**: 6; (1998), 374-376.
- Martel-Pelletier J., Alaaeddine N., et Pelletier J.P., Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis, *Front Biosci*, **4**; (1999), D694-703.
- Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., et Fahmi H., Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues, *Semin Arthritis Rheum*, **33**: 3; (2003), 155-167.
- Martel-Pelletier J., McCollum R., Fujimoto N., Obata K., Cloutier J.M., et Pelletier J.P., Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Lab Invest*, **70**: 6; (1994), 807-815.
- Martin J.H., Alalami O., et Yaqoob F., Differential effects of retinoids on nitric oxide production by promonocytic U937 cells and ZR-75-1 human breast cancer cells, *Oncol Rep*, **7**: 2; (2000), 219-223.
- Massaad C., Paradon M., Jacques C., Salvat C., Berezziat G., Berenbaum F., et Olivier J.L., Induction of secreted type IIA phospholipase A2 gene transcription by interleukin-1beta. Role of C/EBP factors, *J Biol Chem*, **275**: 30; (2000), 22686-22694.
- Matikainen S., Serkkola E., et Hurme M., Retinoic acid enhances IL-1 beta expression in myeloid leukemia cells and in human monocytes, *J Immunol*, **147**: 1; (1991), 162-167.
- Matrisian L.M., Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling, *Trends Genet*, **6**: 4; (1990), 121-125.

- Matsushima-Nishiwaki R., Okuno M., Adachi S., Sano T., Akita K., Moriwaki H., Friedman S.L., et Kojima S., Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res*, **61**: 20; (2001), 7675-7682.
- Mayerson A.B., Hundal R.S., Dufour S., Lebon V., Befroy D., Cline G.W., Enocksson S., Inzucchi S.E., Shulman G.I., et Petersen K.F., The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes, *Diabetes*, **51**: 3; (2002), 797-802.
- Mayne R. et Brewton R., *Extracellular matrix of cartilage: collagen*. Basic and clinical aspects, ed. J. Woessner et D. Howell. 1993: Dekker, M.: NY.
- Maytin E.V. et Habener J.F., Transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo, *J Invest Dermatol*, **110**: 3; (1998), 238-246.
- McMahan C.J., Slack J.L., Mosley B., Cosman D., Lupton S.D., Brunton L.L., Grubin C.E., Wignall J.M., Jenkins N.A., Brannan C.I., et al., A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types, *Embo J*, **10**: 10; (1991), 2821-2832.
- Medkova M. et Cho W., Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation, *J Biol Chem*, **274**: 28; (1999), 19852-19861.
- Mehta K., McQueen T., Tucker S., Pandita R., et Aggarwal B.B., Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages, *J Leukoc Biol*, **55**: 3; (1994), 336-342.
- Melchiorri C., Meliconi R., Frizziero L., Silvestri T., Pulsatelli L., Mazzetti I., Borzi R.M., Ugucioni M., et Facchini A., Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, **41**: 12; (1998), 2165-2174.
- Meyer L.H. et Pap T., MAPK signalling in rheumatoid joint destruction: can we unravel the puzzle? *Arthritis Res Ther*, **7**: 5; (2005), 177-178.
- Miano J.M., Topouzis S., Majesky M.W., et Olson E.N., Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells, *Circulation*, **93**: 10; (1996), 1886-1895.
- Michalik L. et Wahli W., Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair, *J Clin Invest*, **116**: 3; (2006), 598-606.
- Middleton J., Manthey A., et Tyler J., Insulin-like growth factor (IGF) receptor, IGF-I, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage, *J Histochem Cytochem*, **44**: 2; (1996), 133-141.
- Miller S.C. et Kearney S.L., Effect of in vivo administration of all trans-retinoic acid on the hemopoietic cell populations of the spleen and bone marrow: profound strain differences between A/J and C57BL/6J mice, *Lab Anim Sci*, **48**: 1; (1998), 74-80.
- Milner J.M. et Cawston T.E., Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **4**: 3; (2005), 363-375.
- Miyagawa N., Homma T., Kagechika H., Shudo K., et Nagai H., Effect of synthetic retinoid, TAC-101, on experimental autoimmune disease, *Pharmacology*, **67**: 1; (2003), 21-31.
- Miyazawa K., Mori A., Yamamoto K., et Okudaira H., Transcriptional roles of CCAAT/enhancer binding protein-beta, nuclear factor-kappaB, and C-promoter binding factor 1 in interleukin (IL)-1beta-induced IL-6 synthesis by human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes, *J Biol Chem*, **273**: 13; (1998), 7620-7627.
- Mohtai M., Smith R.L., Schurman D.J., Tsuji Y., Torti F.M., Hutchinson N.I., Stetler-Stevenson W.G., et Goldberg G.I., Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1, *J Clin Invest*, **92**: 1; (1993), 179-185.
- Mollenhauer J., Bee J.A., Lizarbe M.A., et von der Mark K., Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen, *J Cell Biol*, **98**: 4; (1984), 1572-1579.
- Montassier P., Inclusion de la tréтиноine dans les cyclodextrines, in *Paris XI*. 1996.
- Moos V., Fickert S., Muller B., Weber U., et Sieper J., Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage, *J Rheumatol*, **26**: 4; (1999), 870-879.
- Mor A., Abramson S.B., et Pilling M.H., The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction, *Clin Immunol*, **115**: 2; (2005), 118-128.
- Morand E.F., Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis, *Curr Opin Rheumatol*, **19**: 3; (2007), 302-307.
- Morand E.F. et Leech M., Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis, *Front Biosci*, **10**: (2005), 12-22.

- Morel J.C., Park C.C., Zhu K., Kumar P., Ruth J.H., et Koch A.E., Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression, *J Biol Chem*, **277**: 38; (2002), 34679-34691.
- Morita Y., Yamamura M., Kawashima M., Aita T., Harada S., Okamoto H., Inoue H., et Makino H., Differential in vitro effects of IL-4, IL-10, and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid synovium, *Rheumatol Int*, **20**: 2; (2001), 49-54.
- Motomura K., Sakai H., Isobe H., et Nawata H., Effects of retinoids on the production of tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells in vitro: evidence for participation of retinoid X receptor signalling pathway, *Cell Biochem Funct*, **15**: 2; (1997), 95-101.
- Motomura K., Ohata M., Satre M., et Tsukamoto H., Destabilization of TNF-alpha mRNA by retinoic acid in hepatic macrophages: implications for alcoholic liver disease, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**: 3; (2001), E420-429.
- Moulin D., Bianchi A., Boyault S., Sebillaud S., Koufany M., Francois M., Netter P., Jouzeau J.Y., et Terlain B., Rosiglitazone induces interleukin-1 receptor antagonist in interleukin-1beta-stimulated rat synovial fibroblasts via a peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-dependent mechanism, *Arthritis Rheum*, **52**: 3; (2005), 759-769.
- Muir H. et Hardingham T.E., *Cartilage matrix biochemistry, Textbook of Rheumatic Disease*, ed. S.J.T.c.s. eds. 1986: Churchill, Livingstone, Edinburgh. 177-198.
- Mukherjee R., Jow L., Croston G.E., et Paterniti J.R., Jr., Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists, *J Biol Chem*, **272**: 12; (1997), 8071-8076.
- Mukherjee R., Strasser J., Jow L., Hoener P., Paterniti J.R., Jr., et Heyman R.A., RXR agonists activate PPARalpha-inducible genes, lower triglycerides, and raise HDL levels in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**: 2; (1998), 272-276.
- Mulero J.J., Pace A.M., Nelken S.T., Loeb D.B., Correa T.R., Drmanac R., et Ford J.E., IL1HY1: A novel interleukin-1 receptor antagonist gene, *Biochem Biophys Res Commun*, **263**: 3; (1999), 702-706.
- Murrell G.A., Jang D., et Williams R.J., Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage, *Biochem Biophys Res Commun*, **206**: 1; (1995), 15-21.
- Myers S.L., Brandt K.D., Ehlich J.W., Braunstein E.M., Shelbourne K.D., Heck D.A., et Kalasinski L.A., Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee, *J Rheumatol*, **17**: 12; (1990), 1662-1669.
- Na S.Y., Kang B.Y., Chung S.W., Han S.J., Ma X., Trinchieri G., Im S.Y., Lee J.W., et Kim T.S., Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB, *J Biol Chem*, **274**: 12; (1999), 7674-7680.
- Naar A.M., Boutin J.M., Lipkin S.M., Yu V.C., Holloway J.M., Glass C.K., et Rosenfeld M.G., The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors, *Cell*, **65**: 7; (1991), 1267-1279.
- Nadra K., Anghel S.I., Joye E., Tan N.S., Basu-Modak S., Trono D., Wahli W., et Desvergne B., Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta, *Mol Cell Biol*, **26**: 8; (2006), 3266-3281.
- Nagai H., Matsuura S., Bouda K., Takaoka Y., Wang T., Niwa S., et Shudo K., Effect of Am-80, a synthetic derivative of retinoid, on experimental arthritis in mice, *Pharmacology*, **58**: 2; (1999), 101-112.
- Nagata T., Kanno Y., Ozato K., et Taketo M., The mouse Rxb gene encoding RXR beta: genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters, *Gene*, **142**: 2; (1994), 183-189.
- Nagpal S., Athanikar J., et Chandraratna R.A., Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor alpha, *J Biol Chem*, **270**: 2; (1995), 923-927.
- Nagpal S., Friant S., Nakshatri H., et Chambon P., RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo, *Embo J*, **12**: 6; (1993), 2349-2360.
- Nagpal S., Cai J., Zheng T., Patel S., Masood R., Lin G.Y., Friant S., Johnson A., Smith D.L., Chandraratna R.A., et Gill P.S., Retinoid antagonism of NF-IL6: insight into the mechanism of antiproliferative effects of retinoids in Kaposi's sarcoma, *Mol Cell Biol*, **17**: 7; (1997), 4159-4168.
- Nakagawa S., Fujii T., Yokoyama G., Kazanietz M.G., Yamana H., et Shirouzu K., Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase, *Mol Carcinog*, **38**: 3; (2003), 106-116.

- Nakajima T., Kinoshita S., Sasagawa T., Sasaki K., Naruto M., Kishimoto T., et Akira S., Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 6; (1993), 2207-2211.
- Nakano H., Shindo M., Sakon S., Nishinaka S., Mihara M., Yagita H., et Okumura K., Differential regulation of I kappa B kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappa B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 7; (1998), 3537-3542.
- Nasir A. et Greenberg J.D., TNF Antagonist Safety in Rheumatoid Arthritis: Updated Evidence from Observational Registries, *Bull NYU Hosp Jt Dis*, **65**: 3; (2007), 178-181.
- Naumann M. et Scheidereit C., Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations, *Embo J*, **13**: 19; (1994), 4597-4607.
- Nawroth P.P., Bank I., Handley D., Cassimeris J., Chess L., et Stern D., Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1, *J Exp Med*, **163**: 6; (1986), 1363-1375.
- Nesher G. et Zuckner J., Rheumatologic complications of vitamin A and retinoids, *Semin Arthritis Rheum*, **24**: 4; (1995), 291-296.
- Ness S.A., Kowenz-Leutz E., Casini T., Graf T., et Leutz A., Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types, *Genes Dev*, **7**: 5; (1993), 749-759.
- Nguyen Q., Mort J.S., et Roughley P.J., Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage, *J Clin Invest*, **89**: 4; (1992), 1189-1197.
- Nietfeld J.J., Wilbrink B., Helle M., van Roy J.L., den Otter W., Swaak A.J., et Huber-Bruning O., Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage, *Arthritis Rheum*, **33**: 11; (1990), 1695-1701.
- Nikawa T., Ikemoto M., Tokuoka K., Teshima S., Alpers D.H., Masui Y., Kishi K., et Rokutan K., Interleukin-1 beta enhances retinoic acid-mediated expression of bone-type alkaline phosphatase in rat IEC-6 cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **280**: 3; (2001), G510-517.
- Niles R.M., Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer, *Mutat Res*, **555**: 1-2; (2004), 81-96.
- Nishikawa M., Myoui A., Tomita T., Takahi K., Nampei A., et Yoshikawa H., [p38 MAP Kinase inhibitor], *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, **30**: 5; (2007), 390-397.
- Nishimoto N., Yoshizaki K., Miyasaka N., Yamamoto K., Kawai S., Takeuchi T., Hashimoto J., Azuma J., et Kishimoto T., Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum*, **50**: 6; (2004), 1761-1769.
- Nishio Y., Isshiki H., Kishimoto T., et Akira S., A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction, *Mol Cell Biol*, **13**: 3; (1993), 1854-1862.
- Nishioka K., Ohshima S., Umeshita-Sasai M., Yamaguchi N., Mima T., Nomura S., Murata N., Shimizu M., Miyake T., Yoshizaki K., Suemura M., Kishimoto T., et Saeki Y., Enhanced expression and DNA binding activity of two CCAAT/enhancer-binding protein isoforms, C/EBPbeta and C/EBPdelta, in rheumatoid synovium, *Arthritis Rheum*, **43**: 7; (2000), 1591-1596.
- Notoya K., Jovanovic D.V., Reboul P., Martel-Pelletier J., Mineau F., et Pelletier J.P., The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2, *J Immunol*, **165**: 6; (2000), 3402-3410.
- Nozaki Y., Yamagata T., Sugiyama M., Ikoma S., Kinoshita K., et Funachi M., Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis, *Clin Immunol*, **119**: 3; (2006), 272-279.
- O'Neill L.A. et Kaltschmidt C., NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function, *Trends Neurosci*, **20**: 6; (1997), 252-258.
- Ochoa W.F., Torrecillas A., Fita I., Verdaguer N., Corbalan-Garcia S., et Gomez-Fernandez J.C., Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C(alpha), *Biochemistry*, **42**: 29; (2003), 8774-8779.
- Oh G.S., Pae H.O., Seo W.G., Shin M.K., Kim I.K., Chai K.Y., Yun Y.G., Kwon T.O., Lim J.S., et Chung H.T., Inhibitory effect of retinoic acid on expression of inducible nitric oxide synthase gene in 1929 cells, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **23**: 3; (2001), 335-342.
- Ohata M., Lin M., Satre M., et Tsukamoto H., Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis, *Am J Physiol*, **272**: 3 Pt 1; (1997), G589-596.
- Ohori M., Takeuchi M., Maruki R., Nakajima H., et Miyake H., FR180204, a novel and selective inhibitor of extracellular signal-regulated kinase, ameliorates collagen-induced arthritis in mice, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **374**: 4; (2007), 311-316.
- Ohshima S., Saeki Y., Mima T., Sasai M., Nishioka K., Nomura S., Kopf M., Katada Y., Tanaka T., Suemura M., et Kishimoto T., Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 14; (1998), 8222-8226.

- Oikawa T., Okayasu I., Ashino H., Morita I., Murota S., et Shudo K., Three novel synthetic retinoids, Re 80, Am 580 and Am 80, all exhibit anti-angiogenic activity in vivo, *Eur J Pharmacol*, **249**: 1; (1993), 113-116.
- Okamoto H., Iwamoto T., Kotake S., Momohara S., Yamanaka H., et Kamatani N., Inhibition of NF-kappaB signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol*, **23**: 3; (2005), 323-330.
- Okamoto T., NF-kappaB and rheumatic diseases, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **6**: 4; (2006), 359-372.
- Okamoto T., Sakurada S., Yang J.P., et Merin J.P., Regulation of NF-kappa B and disease control: identification of a novel serine kinase and thioredoxin as effectors for signal transduction pathway for NF-kappa B activation, *Curr Top Cell Regul*, **35**; (1997), 149-161.
- Okimura A., Okada Y., Makihira S., Pan H., Yu L., Tanne K., Imai K., Yamada H., Kawamoto T., Noshiro M., Yan W., et Kato Y., Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage, *Arthritis Rheum*, **40**: 6; (1997), 1029-1036.
- Olivera D.L., Laydon J.T., Hilleagass L., Badger A.M., et Lee J.C., Effects of pyridinyl imidazole compounds on murine TNF-alpha production, *Agents Actions*, **39 Spec No**; (1993), C55-57.
- Olsen B.R., Collagen IX, *Int J Biochem Cell Biol*, **29**: 4; (1997), 555-558.
- Ongsakul M., Sirisinha S., et Lamb A.J., Impaired blood clearance of bacteria and phagocytic activity in vitamin A-deficient rats, *Proc Soc Exp Biol Med*, **178**: 2; (1985), 204-208.
- Ovchinnikov D.A., Deng J.M., Ogunrinu G., et Behringer R.R., Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice, *Genesis*, **26**: 2; (2000), 145-146.
- Pacquelet S., Presle N., Boileau C., Dumond H., Netter P., Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., Terlain B., et Jouzeau J.Y., Interleukin 17, a nitric oxide-producing cytokine with a peroxynitrite-independent inhibitory effect on proteoglycan synthesis, *J Rheumatol*, **29**: 12; (2002), 2602-2610.
- Pagnan G., Montaldo P.G., Pastorino F., Raffaghello L., Kirchmeier M., Allen T.M., et Ponzoni M., GD2-mediated melanoma cell targeting and cytotoxicity of liposome-entrapped fenretinide, *Int J Cancer*, **81**: 2; (1999), 268-274.
- Paleolog E.M., Angiogenesis in rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, **4 (suppl 3)**; (1996), S81-S90.
- Paleolog E.M., Young S., Stark A.C., McCloskey R.V., Feldmann M., et Maini R.N., Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, **41**: 7; (1998), 1258-1265.
- Park B.H., Qiang L., et Farmer S.R., Phosphorylation of C/EBPbeta at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes, *Mol Cell Biol*, **24**: 19; (2004), 8671-8680.
- Park H.Y., Davidson D., Raaka B.M., et Samuels H.H., The herpes simplex virus thymidine kinase gene promoter contains a novel thyroid hormone response element, *Mol Endocrinol*, **7**: 3; (1993), 319-330.
- Park S.W., Huq M.D., Loh H.H., et Wei L.N., Retinoic acid-induced chromatin remodeling of mouse kappa opioid receptor gene, *J Neurosci*, **25**: 13; (2005), 3350-3357.
- Pasceri V., Wu H.D., Willerson J.T., et Yeh E.T., Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators, *Circulation*, **101**: 3; (2000), 235-238.
- Pelletier J.P., McCollum R., Cloutier J.M., et Martel-Pelletier J., Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process, *J Rheumatol Suppl*, **43**; (1995), 109-114.
- Pelletier J.P., DiBattista J.A., Roughley P., McCollum R., et Martel-Pelletier J., Cytokines and inflammation in cartilage degradation, *Rheum Dis Clin North Am*, **19**: 3; (1993), 545-568.
- Pelletier J.P., Fernandes J.C., Brunet J., Moldovan F., Schrier D., Flory C., et Martel-Pelletier J., In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes, *Arthritis Rheum*, **48**: 6; (2003), 1582-1593.
- Pelletier J.P., Caron J.P., Evans C., Robbins P.D., Georgescu H.I., Jovanovic D., Fernandes J.C., et Martel-Pelletier J., In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy, *Arthritis Rheum*, **40**: 6; (1997), 1012-1019.
- Pelletier J.P., Jovanovic D., Fernandes J.C., Manning P., Connor J.R., Currie M.G., Di Battista J.A., et Martel-Pelletier J., Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase, *Arthritis Rheum*, **41**: 7; (1998), 1275-1286.
- Perez P., Schonthal A., et Aranda A., Repression of c-fos gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors, *J Biol Chem*, **268**: 31; (1993), 23538-23543.
- Perkins N.D., Schmid R.M., Duckett C.S., Leung K., Rice N.R., et Nabel G.J., Distinct combinations of NF-kappa B subunits determine the specificity of transcriptional activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 5; (1992), 1529-1533.

- Perlmann T., Rangarajan P.N., Umesono K., et Evans R.M., Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs, *Genes Dev*, **7**: 7B; (1993), 1411-1422.
- Peschon J.J., Torrance D.S., Stocking K.L., Glaccum M.B., Otten C., Willis C.R., Charrier K., Morrissey P.J., Ware C.B., et Mohler K.M., TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation, *J Immunol*, **160**: 2; (1998), 943-952.
- Peters J.M., Lee S.S., Li W., Ward J.M., Gavriloova O., Everett C., Reitman M.L., Hudson L.D., et Gonzalez F.J., Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta), *Mol Cell Biol*, **20**: 14; (2000), 5119-5128.
- Petkovich M., Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors, *Annu Rev Nutr*, **12**; (1992), 443-471.
- Petkovich M., Brand N.J., Krust A., et Chambon P., A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors, *Nature*, **330**: 6147; (1987), 444-450.
- Petkovich P.M., Heersche J.N., Tinker D.O., et Jones G., Retinoic acid stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D3 binding in rat osteosarcoma cells, *J Biol Chem*, **259**: 13; (1984), 8274-8280.
- Pettersson F., Dagleish A.G., Bissonnette R.P., et Colston K.W., Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of Bcl-2/Bax, *Br J Cancer*, **87**: 5; (2002), 555-561.
- Pettipher E.R., Henderson B., Moncada S., et Higgs G.A., Leucocyte infiltration and cartilage proteoglycan loss in immune arthritis in the rabbit, *Br J Pharmacol*, **95**: 1; (1988), 169-176.
- Peyron J. et Stanescu V., *Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie. Physiologie. Métabolisme. Vieillesse.* Appareil locomoteur, ed. E. E. Techniques. 1994, Paris-France.
- Pfaffl M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, **29**: 9; (2001), e45.
- Pfahl M., Nuclear receptor/AP-1 interaction, *Endocr Rev*, **14**: 5; (1993), 651-658.
- Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T.M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P.S., Kronke M., et Mak T.W., Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection, *Cell*, **73**: 3; (1993), 457-467.
- Phelps C.B., Sengchanthalangsy L.L., Huxford T., et Ghosh G., Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers, *J Biol Chem*, **275**: 38; (2000a), 29840-29846.
- Phelps C.B., Sengchanthalangsy L.L., Malek S., et Ghosh G., Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers, *J Biol Chem*, **275**: 32; (2000b), 24392-24399.
- Piwien-Pilipuk G., MacDougald O., et Schwartz J., Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBPbeta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone, *J Biol Chem*, **277**: 46; (2002), 44557-44565.
- Poli V., The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions, *J Biol Chem*, **273**: 45; (1998), 29279-29282.
- Poli V., Mancini F.P., et Cortese R., IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP, *Cell*, **63**: 3; (1990), 643-653.
- Poole A.R., Proteoglycans in health and disease: structures and functions, *Biochem J*, **236**: 1; (1986), 1-14.
- Pope R.M., Lovis R., Mungre S., Perlman H., Koch A.E., et Haines G.K., 3rd, C/EBP beta in rheumatoid arthritis: correlation with inflammation, not disease specificity, *Clin Immunol*, **91**: 3; (1999), 271-282.
- Pratt M.A., Niu M., et White D., Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids, *J Cell Biochem*, **90**: 4; (2003), 692-708.
- Privat S.J., Oo A., et Waterbury L.D., Production of interleukin-6, but not interleukin-8, induced by TNF-alpha or IL-1 beta in human fibroblast-like synoviocyte increases over cell passage, *Proc West Pharmacol Soc*, **44**; (2001), 9-13.
- Pufe T., Kurz B., Petersen W., Varoga D., Mentlein R., Kulow S., Lemke A., et Tillmann B., The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system, *Ann Anat*, **187**: 5-6; (2005), 461-472.
- Qian A., Cai Y., Magee T.R., et Wan Y.J., Identification of retinoic acid-responsive elements on the HNF1alpha and HNF4alpha genes, *Biochem Biophys Res Commun*, **276**: 3; (2000), 837-842.
- Radomska-Pandya A., Chen G., Czernik P.J., Little J.M., Samokyszyn V.M., Carter C.A., et Nowak G., Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy, *J Biol Chem*, **275**: 29; (2000), 22324-22330.
- Raffaghello L., Pagnan G., Pastorino F., Cosimo E., Brignole C., Marimpietri D., Montaldo P.G., Gambini C., Allen T.M., Bogenmann E., et Ponzoni M., In vitro and in vivo antitumor activity of liposomal Fenretinide targeted to human neuroblastoma, *Int J Cancer*, **104**: 5; (2003), 559-567.
- Ramji D.P., Cortese R., et Ciliberto G., *Regulation of C-reactive protein, haptoglobin and hemopexin gene expression.* Acute Phase Proteins: Molecular, Biology and Clinical Applications, ed. A. Mackiewicz, M.D. Kushner, et H. Baumann. 1993a, FL: CRC Press Boca Raton. 162-242.

- Ramji D.P., Vitelli A., Tronche F., Cortese R., et Ciliberto G., The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms, *Nucleic Acids Res*, **21**: 2; (1993b), 289-294.
- Rannou F., Francois M., Corvol M.T., et Berenbaum F., Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis, *Joint Bone Spine*, **73**: 1; (2006), 29-36.
- Rastinejad F., Wagner T., Zhao Q., et Khorasanizadeh S., Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1, *Embo J*, **19**: 5; (2000), 1045-1054.
- Raymond L., Eck S., Hays E., Tomek I., Kantor S., et Vincenti M., RelA is required for IL-1beta stimulation of Matrix Metalloproteinase-1 expression in chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage*, **15**: 4; (2007), 431-441.
- Raz Y. et Kelley M.W., Retinoic acid signaling is necessary for the development of the organ of Corti, *Dev Biol*, **213**: 1; (1999), 180-193.
- Reboul P., Pelletier J.P., Tardif G., Cloutier J.M., et Martel-Pelletier J., The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis, *J Clin Invest*, **97**: 9; (1996), 2011-2019.
- Reddy J.K. et Hashimoto T., Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system, *Annu Rev Nutr*, **21**; (2001), 193-230.
- Reddy P., Slack J.L., Davis R., Cerretti D.P., Kozlosky C.J., Blanton R.A., Shows D., Peschon J.J., et Black R.A., Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme, *J Biol Chem*, **275**: 19; (2000), 14608-14614.
- Redlich K., Schett G., Steiner G., Hayer S., Wagner E.F., et Smolen J.S., Rheumatoid arthritis therapy after tumor necrosis factor and interleukin-1 blockade, *Arthritis Rheum*, **48**: 12; (2003), 3308-3319.
- Regnier C.H., Song H.Y., Gao X., Goeddel D.V., Cao Z., et Rothe M., Identification and characterization of an IkappaB kinase, *Cell*, **90**: 2; (1997), 373-383.
- Renaud J.P., Rochel N., Ruff M., Vivat V., Chambon P., Gronemeyer H., et Moras D., Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid, *Nature*, **378**: 6558; (1995), 681-689.
- Renoux M., Hilliquin P., Galoppin L., Florentin I., et Menkes C.J., Release of mast cell mediators and nitrites into knee joint fluid in osteoarthritis--comparison with articular chondrocalcinosis and rheumatoid arthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, **4**: 3; (1996), 175-179.
- Revell J.P. et Baldwin J.A.S., *An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage*. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. 1963. 110-144.
- Ricote M., Li A.C., Willson T.M., Kelly C.J., et Glass C.K., The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature*, **391**: 6662; (1998), 79-82.
- Rieusset J., Touri F., Michalik L., Escher P., Desvergne B., Niesor E., et Wahli W., A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity, *Mol Endocrinol*, **16**: 11; (2002), 2628-2644.
- Ritchlin C., Dwyer E., Bucala R., et Winchester R., Sustained and distinctive patterns of gene activation in synovial fibroblasts and whole synovial tissue obtained from inflammatory synovitis, *Scand J Immunol*, **40**: 3; (1994), 292-298.
- Robins S.P., Functional properties of collagen and elastin, *Baillieres Clin Rheumatol*, **2**: 1; (1988), 1-36.
- Rochette-Egly C., Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation, *Cell Signal*, **15**: 4; (2003), 355-366.
- Rochette-Egly C., Adam S., Rossignol M., Egly J.M., et Chambon P., Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7, *Cell*, **90**: 1; (1997), 97-107.
- Rochette-Egly C., Lutz Y., Saunders M., Scheuer I., Gaub M.P., et Chambon P., Retinoic acid receptor gamma: specific immunodetection and phosphorylation, *J Cell Biol*, **115**: 2; (1991), 535-545.
- Rochette-Egly C., Oulad-Abdelghani M., Staub A., Pfister V., Scheuer I., Chambon P., et Gaub M.P., Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A, *Mol Endocrinol*, **9**: 7; (1995), 860-871.
- Roman-Blas J.A. et Jimenez S.A., NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, **14**: 9; (2006), 839-848.
- Roomi M.W., Ivanov V., Kalinovsky T., Niedzwiecki A., et Rath M., Modulation of human renal cell carcinoma 786-0 MMP-2 and MMP-9 activity by inhibitors and inducers in vitro, *Med Oncol*, **23**: 2; (2006), 245-250.
- Rordorf-Adam C., Geiger T., Henn R., Arnold J., Solf R., Wiesenberg I., Ferrini P.G., et Vosbeck K., CGP 47969A: a novel inhibitor of the synthesis of inflammatory cytokines, *Agents Actions*, **43**: 1-2; (1994), 53-59.

- Rose-John S., Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors, *Acta Biochim Pol*, **50**: 3; (2003), 603-611.
- Rosen E.D., Walkey C.J., Puigserver P., et Spiegelman B.M., Transcriptional regulation of adipogenesis, *Genes Dev*, **14**: 11; (2000), 1293-1307.
- Rosen E.D., Sarraf P., Troy A.E., Bradwin G., Moore K., Milstone D.S., Spiegelman B.M., et Mortensen R.M., PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro, *Mol Cell*, **4**: 4; (1999), 611-617.
- Rosengren S., Boyle D.L., et Firestein G.S., Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts, *Methods Mol Med*, **135**; (2007), 365-375.
- Ross S.A., McCaffery P.J., Drager U.C., et De Luca L.M., Retinoids in embryonal development, *Physiol Rev*, **80**: 3; (2000), 1021-1054.
- Rossant J., Zirngibl R., Cado D., Shago M., et Giguere V., Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis, *Genes Dev*, **5**: 8; (1991), 1333-1344.
- Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M., et Santoro M.G., Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase, *Nature*, **403**: 6765; (2000), 103-108.
- Roth V. et Mow V.C., The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age, *J Bone Joint Surg Am*, **62**: 7; (1980), 1102-1117.
- Rowe A., Eager N.S., et Brickell P.M., A member of the RXR nuclear receptor family is expressed in neural-crest-derived cells of the developing chick peripheral nervous system, *Development*, **111**: 3; (1991), 771-778.
- Ruberte E., Dolle P., Krust A., Zelent A., Morriss-Kay G., et Chambon P., Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis, *Development*, **108**: 2; (1990), 213-222.
- Sabatini M., Bardiot A., Lesur C., Moulharat N., Thomas M., Richard I., et Fradin A., Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**: 9; (2002), 673-679.
- Sack U., Kinne R.W., Marx T., Heppt P., Bender S., et Emmrich F., Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis, *Rheumatol Int*, **13**: 2; (1993), 45-51.
- Saklatvala J., Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage, *Nature*, **322**: 6079; (1986), 547-549.
- Sasai M., Saeki Y., Ohshima S., Nishioka K., Mima T., Tanaka T., Katada Y., Yoshizaki K., Suemura M., et Kishimoto T., Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice, *Arthritis Rheum*, **42**: 8; (1999), 1635-1643.
- Sato K., Tsuchiya M., Saldanha J., Koishihara Y., Ohsugi Y., Kishimoto T., et Bendig M.M., Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth, *Cancer Res*, **53**: 4; (1993), 851-856.
- Saunders M.A., Sansores-Garcia L., Gilroy D.W., et Wu K.K., Selective suppression of CCAAT/enhancer-binding protein beta binding and cyclooxygenase-2 promoter activity by sodium salicylate in quiescent human fibroblasts, *J Biol Chem*, **276**: 22; (2001), 18897-18904.
- Savage D.B., Tan G.D., Acerini C.L., Jebb S.A., Agostini M., Gurnell M., Williams R.L., Umpleby A.M., Thomas E.L., Bell J.D., Dixon A.K., Dunne F., Boiani R., Cinti S., Vidal-Puig A., Karpe F., Chatterjee V.K., et O'Rahilly S., Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Diabetes*, **52**: 4; (2003), 910-917.
- Schiff M.H., Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis*, **59 Suppl 1**; (2000), i103-108.
- Schindler J.F., Monahan J.B., et Smith W.G., p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets, *J Dent Res*, **86**: 9; (2007), 800-811.
- Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., et Dinarello C.A., Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, *Blood*, **75**: 1; (1990), 40-47.
- Schmid T.M., Popp R.G., et Linsenmayer T.F., Hypertrophic cartilage matrix. Type X collagen, supramolecular assembly, and calcification, *Ann N Y Acad Sci*, **580**; (1990), 64-73.
- Schmitz M.L. et Baeuerle P.A., The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B, *Embo J*, **10**: 12; (1991), 3805-3817.
- Schmutzler C. et Kohrle J., Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer, *Thyroid*, **10**: 5; (2000), 393-406.
- Schorpp M., Mattei M.G., Herr I., Gack S., Schaper J., et Angel P., Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene, *Biochem J*, **308 (Pt 1)**; (1995), 211-217.

- Schrader M., Wyss A., Sturzenbecker L.J., Grippo J.F., LeMotte P., et Carlberg C., RXR-dependent and RXR-independent transactivation by retinoic acid receptors, *Nucleic Acids Res*, **21**: 5; (1993), 1231-1237.
- Schroen D.J. et Brinckerhoff C.E., Inhibition of rabbit collagenase (matrix metalloproteinase-1; MMP-1) transcription by retinoid receptors: evidence for binding of RARs/RXRs to the -77 AP-1 site through interactions with c-Jun, *J Cell Physiol*, **169**: 2; (1996), 320-332.
- Schubert S.Y., Neeman I., et Resnick N., A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants, *Faseb J*, **16**: 14; (2002), 1931-1933.
- Schule R., Rangarajan P., Kliwer S., Ransone L.J., Bolado J., Yang N., Verma I.M., et Evans R.M., Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor, *Cell*, **62**: 6; (1990), 1217-1226.
- Schule R., Rangarajan P., Yang N., Kliwer S., Ransone L.J., Bolado J., Verma I.M., et Evans R.M., Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 14; (1991), 6092-6096.
- Schutt C., Cd14, *Int J Biochem Cell Biol*, **31**: 5; (1999), 545-549.
- Seckinger P., Lowenthal J.W., Williamson K., Dayer J.M., et MacDonald H.R., A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding, *J Immunol*, **139**: 5; (1987), 1546-1549.
- Seewaldt V.L., Johnson B.S., Parker M.B., Collins S.J., et Swisshelm K., Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells, *Cell Growth Differ*, **6**: 9; (1995), 1077-1088.
- Seguin C.A. et Bernier S.M., TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways, *J Cell Physiol*, **197**: 3; (2003), 356-369.
- Sen C.K. et Packer L., Antioxidant and redox regulation of gene transcription, *Faseb J*, **10**: 7; (1996), 709-720.
- Sen R. et Baltimore D., Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences, *Cell*, **46**: 5; (1986), 705-716.
- Sha W.C., Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor, *J Exp Med*, **187**: 2; (1998), 143-146.
- Shakibaei M., John T., Schulze-Tanzil G., Lehmann I., et Mobasheri A., Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis, *Biochem Pharmacol*, **73**: 9; (2007), 1434-1445.
- Sheikh M.S., Shao Z.M., Li X.S., Dawson M., Jetten A.M., Wu S., Conley B.A., Garcia M., Rochefort H., et Fontana J.A., Retinoid-resistant estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells transfected with retinoic acid receptor-alpha acquire sensitivity to growth inhibition by retinoids, *J Biol Chem*, **269**: 34; (1994), 21440-21447.
- Shen Y., Rattan V., Sultana C., et Kalra V.K., Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes, *Am J Physiol*, **270**: 5 Pt 2; (1996), H1624-1633.
- Shin D.M., Khuri F.R., Murphy B., Garden A.S., Clayman G., Francisco M., Liu D., Glisson B.S., Ginsberg L., Papadimitrakopoulou V., Myers J., Morrison W., Gillenwater A., Ang K.K., Lippman S.M., Goepfert H., et Hong W.K., Combined interferon-alfa, 13-cis-retinoic acid, and alpha-tocopherol in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: novel bioadjuvant phase II trial, *J Clin Oncol*, **19**: 12; (2001), 3010-3017.
- Shingleton W.D., Ellis A.J., Rowan A.D., et Cawston T.E., Retinoic acid combines with interleukin-1 to promote the degradation of collagen from bovine nasal cartilage: matrix metalloproteinases-1 and -13 are involved in cartilage collagen breakdown, *J Cell Biochem*, **79**: 4; (2000), 519-531.
- Shlopov B.V., Lie W.R., Mainardi C.L., Cole A.A., Chubinskaya S., et Hasty K.A., Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases, *Arthritis Rheum*, **40**: 11; (1997), 2065-2074.
- Silacci P., Dayer J.M., Desgeorges A., Peter R., Manueddu C., et Guerne P.A., Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity, *J Biol Chem*, **273**: 22; (1998), 13625-13629.
- Silman A.J., Petrie J., Hazleman B., et Evans S.J., Lymphoproliferative cancer and other malignancy in patients with rheumatoid arthritis treated with azathioprine: a 20 year follow up study, *Ann Rheum Dis*, **47**: 12; (1988), 988-992.
- Simonin M.A., Bordji K., Boyault S., Bianchi A., Gouze E., Becuwe P., Dauca M., Netter P., et Terlain B., PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts, *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**: 1; (2002), C125-133.
- Sims J.E., March C.J., Cosman D., Widmer M.B., MacDonald H.R., McMahan C.J., Grubin C.E., Wignall J.M., Jackson J.L., Call S.M., et al., cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily, *Science*, **241**: 4865; (1988), 585-589.

- Sims J.E., Gayle M.A., Slack J.L., Alderson M.R., Bird T.A., Giri J.G., Colotta F., Re F., Mantovani A., Shanebeck K., et al., Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 13; (1993), 6155-6159.
- Singh U.S., Pan J., Kao Y.L., Joshi S., Young K.L., et Baker K.M., Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells, *J Biol Chem*, **278**: 1; (2003), 391-399.
- Sirsjo A., Gidlof A.C., Olsson A., Torma H., Ares M., Kleinert H., Forstermann U., et Hansson G.K., Retinoic acid inhibits nitric oxide synthase-2 expression through the retinoic acid receptor-alpha, *Biochem Biophys Res Commun*, **270**: 3; (2000), 846-851.
- Sirum K.L. et Brinckerhoff C.E., Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts, *Biochemistry*, **28**: 22; (1989), 8691-8698.
- Smith D.E., Hanna R., Della F., Moore H., Chen H., Farese A.M., MacVittie T.J., Virca G.D., et Sims J.E., The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of soluble type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action, *Immunity*, **18**: 1; (2003), 87-96.
- Smith M.D., Triantafyllou S., Parker A., Youssef P.P., et Coleman M., Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis, *J Rheumatol*, **24**: 2; (1997), 365-371.
- Smith R.L., Degradative enzymes in osteoarthritis, *Front Biosci*, **4**; (1999), D704-712.
- Smith R.S., Smith T.J., Blieden T.M., et Phipps R.P., Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation, *Am J Pathol*, **151**: 2; (1997), 317-322.
- Smith W.C., Nakshatri H., Leroy P., Rees J., et Chambon P., A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter, *Embo J*, **10**: 8; (1991), 2223-2230.
- Solomon D.H., Karlson E.W., Rimm E.B., Cannuscio C.C., Mandl L.A., Manson J.E., Stampfer M.J., et Curhan G.C., Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis, *Circulation*, **107**: 9; (2003), 1303-1307.
- Soprano D.R. et Soprano K.J., Retinoids as teratogens, *Annu Rev Nutr*, **15**; (1995), 111-132.
- Srinivas H., Juroske D.M., Kalyankrishna S., Cody D.D., Price R.E., Xu X.C., Narayanan R., Weigel N.L., et Kurie J.M., c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha, *Mol Cell Biol*, **25**: 3; (2005), 1054-1069.
- Staels B., Vu-Dac N., Kosykh V.A., Saladin R., Fruchart J.C., Dallongeville J., et Auwerx J., Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates, *J Clin Invest*, **95**: 2; (1995), 705-712.
- Staels B., Koenig W., Habib A., Merval R., Lebret M., Torra I.P., Delerive P., Fadel A., Chinetti G., Fruchart J.C., Najib J., Maclouf J., et Tedgui A., Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators, *Nature*, **393**: 6687; (1998), 790-793.
- Stanton H., Rogerson F.M., East C.J., Golub S.B., Lawlor K.E., Meeker C.T., Little C.B., Last K., Farmer P.J., Campbell I.K., Fourie A.M., et Fosang A.J., ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro, *Nature*, **434**: 7033; (2005), 648-652.
- Starkman B.G., Cravero J.D., Delcarlo M., et Loeser R.F., IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK, *Biochem J*, **389**: Pt 3; (2005), 723-729.
- Stehlin-Gaon C., Willmann D., Zeyer D., Sanglier S., Van Dorsselaer A., Renaud J.P., Moras D., et Schule R., All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR beta, *Nat Struct Biol*, **10**: 10; (2003), 820-825.
- Stein B., Cogswell P.C., et Baldwin A.S., Jr., Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction, *Mol Cell Biol*, **13**: 7; (1993), 3964-3974.
- Stockwell R.A., The cell density of human articular and costal cartilage, *J Anat*, **101**: Pt 4; (1967), 753-763.
- Stockwell R.A. et Meachim G., *The chondrocytes*. Adult Articular Cartilage, ed. E. M.A.R. Freeman. 1973: Pitman Medical: London.
- Stoner C.M. et Gudas L.J., Mouse cellular retinoic acid binding protein: cloning, complementary DNA sequence, and messenger RNA expression during the retinoic acid-induced differentiation of F9 wild type and RA-3-10 mutant teratocarcinoma cells, *Cancer Res*, **49**: 6; (1989), 1497-1504.
- Sucov H.M., Murakami K.K., et Evans R.M., Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 14; (1990), 5392-5396.
- Sugiyama E., Kuroda A., Taki H., Ikemoto M., Hori T., Yamashita N., Maruyama M., et Kobayashi M., Interleukin 10 cooperates with interleukin 4 to suppress inflammatory cytokine production by freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells, *J Rheumatol*, **22**: 11; (1995), 2020-2026.
- Sun S.Y., Yue P., Chandraratna R.A., Tesfaigzi Y., Hong W.K., et Lotan R., Dual mechanisms of action of the retinoid CD437: nuclear retinoic acid receptor-mediated suppression of squamous differentiation and

- receptor-independent induction of apoptosis in UMSCC22B human head and neck squamous cell carcinoma cells, *Mol Pharmacol*, **58**: 3; (2000), 508-514.
- Sun X., Wie L., Davis C.M., et Chen Q., Anti-fas induction of apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes through activating transcription factor 2 and caspase-3: Dependence on p38 mitogen-activated protein kinase, *Trans Orthop Res Soc*, **27** (abstract 0195); (2002),
- Suryani S.et Sutton I., An interferon-gamma-producing Th1 subset is the major source of IL-17 in experimental autoimmune encephalitis, *J Neuroimmunol*, **183**: 1-2; (2007), 96-103.
- Szekanecz Z., Strieter R.M., Kunkel S.L., et Koch A.E., Chemokines in rheumatoid arthritis, *Springer Semin Immunopathol*, **20**: 1-2; (1998), 115-132.
- Taga T., Hibi M., Hirata Y., Yamasaki K., Yasukawa K., Matsuda T., Hirano T., et Kishimoto T., Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130, *Cell*, **58**: 3; (1989), 573-581.
- Tamura T., Udagawa N., Takahashi N., Miyaura C., Tanaka S., Yamada Y., Koishihara Y., Ohsugi Y., Kumaki K., Taga T., et et al., Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 24; (1993), 11924-11928.
- Tan N.S., Michalik L., Noy N., Yasmin R., Pacot C., Heim M., Fluhmann B., Desvergne B., et Wahli W., Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation, *Genes Dev*, **15**: 24; (2001), 3263-3277.
- Tanabe B.K., Abe L.M., Kimura L.H., Reinker K.A., et Yamaga K.M., Cytokine mRNA repertoire of articular chondrocytes from arthritic patients, infants, and neonatal mice, *Rheumatol Int*, **16**: 2; (1996), 67-76.
- Tang B.L.et Hong W., ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats, *FEBS Lett*, **445**: 2-3; (1999), 223-225.
- Tang G.W.et Russell R.M., 13-cis-retinoic acid is an endogenous compound in human serum, *J Lipid Res*, **31**: 2; (1990), 175-182.
- Tarrade A., Bastien J., Bruck N., Bauer A., Gianni M., et Rochette-Egly C., Retinoic acid and arsenic trioxide cooperate for apoptosis through phosphorylated RXR alpha, *Oncogene*, **24**: 14; (2005), 2277-2288.
- Tartaglia L.A., Goeddel D.V., Reynolds C., Figari I.S., Weber R.F., Fendly B.M., et Palladino M.A., Jr., Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor, *J Immunol*, **151**: 9; (1993), 4637-4641.
- Taskiran D., Stefanovic-Racic M., Georgescu H., et Evans C., Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1, *Biochem Biophys Res Commun*, **200**: 1; (1994), 142-148.
- Tate B.F., Allenby G., Perez J.R., Levin A.A., et Grippo J.F., A systematic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity, *Faseb J*, **10**: 13; (1996), 1524-1531.
- Taylor S.L., Renshaw B.R., Garka K.E., Smith D.E., et Sims J.E., Genomic organization of the interleukin-1 locus, *Genomics*, **79**: 5; (2002), 726-733.
- Tengku-Muhammad T.S., Hughes T.R., Ranki H., Cryer A., et Ramji D.P., Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines, *Cytokine*, **12**: 9; (2000), 1430-1436.
- Teranishi T., Hirano T., Arima N., et Onoue K., Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor- (TRF) like factor(s), *J Immunol*, **128**: 4; (1982), 1903-1908.
- Thacher S.M., Vasudevan J., et Chandraratna R.A., Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors, *Curr Pharm Des*, **6**: 1; (2000), 25-58.
- Thacher S.M., Standeven A.M., Athanikar J., Kopper S., Castilleja O., Escobar M., Beard R.L., et Chandraratna R.A., Receptor specificity of retinoid-induced epidermal hyperplasia: effect of RXR-selective agonists and correlation with topical irritation, *J Pharmacol Exp Ther*, **282**: 2; (1997), 528-534.
- Thiel M.J., Schaefer C.J., Lesch M.E., Mobley J.L., Dudley D.T., Teclé H., Barrett S.D., Schrier D.J., et Flory C.M., Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms, *Arthritis Rheum*, **56**: 10; (2007), 3347-3357.
- Thomas B., Berenbaum F., Humbert L., Bian H., Bereziat G., Crofford L., et Olivier J.L., Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclooxygenase-2 gene transcription by interleukin-1beta in articular chondrocytes, *Eur J Biochem*, **267**: 23; (2000), 6798-6809.
- Tilg H., Trehu E., Atkins M.B., Dinarello C.A., et Mier J.W., Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55, *Blood*, **83**: 1; (1994), 113-118.
- Tini M., Otulakowski G., Breitman M.L., Tsui L.C., et Giguere V., An everted repeat mediates retinoic acid induction of the gamma F-crystallin gene: evidence of a direct role for retinoids in lens development, *Genes Dev*, **7**: 2; (1993), 295-307.

- Tojima Y., Fujimoto A., Delhase M., Chen Y., Hatakeyama S., Nakayama K., Kaneko Y., Nimura Y., Motoyama N., Ikeda K., Karin M., et Nakanishi M., NAK is an IkappaB kinase-activating kinase, *Nature*, **404**: 6779; (2000), 778-782.
- Tomita T., Takeuchi E., Tomita N., Morishita R., Kaneko M., Yamamoto K., Nakase T., Seki H., Kato K., Kaneda Y., et Ochi T., Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy, *Arthritis Rheum*, **42**: 12; (1999), 2532-2542.
- Tong A., Reich A., Genin O., Pines M., et Monsonogo-Ornan E., Expression of chicken 75-kDa gelatinase B-like enzyme in perivascular chondrocytes suggests its role in vascularization of the growth plate, *J Bone Miner Res*, **18**: 8; (2003), 1443-1452.
- Tontonoz P., Kim J.B., Graves R.A., et Spiegelman B.M., ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation, *Mol Cell Biol*, **13**: 8; (1993), 4753-4759.
- Torrás H., Retinoids in aging, *Clin Dermatol*, **14**: 2; (1996), 207-215.
- Tortorella M.D., Burn T.C., Pratta M.A., Abbaszade I., Hollis J.M., Liu R., Rosenfeld S.A., Copeland R.A., Decicco C.P., Wynn R., Rockwell A., Yang F., Duke J.L., Solomon K., George H., Bruckner R., Nagase H., Itoh Y., Ellis D.M., Ross H., Wiswall B.H., Murphy K., Hillman M.C., Jr., Hollis G.F., Newton R.C., Magolda R.L., Trzaskos J.M., et Arner E.C., Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins, *Science*, **284**: 5420; (1999), 1664-1666.
- Towbin H., Staehelin T., et Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**: 9; (1979), 4350-4354.
- Towle C.A., Hung H.H., Bonassar L.J., Treadwell B.V., et Mangham D.C., Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis, *Osteoarthritis Cartilage*, **5**: 5; (1997), 293-300.
- Trechsel U., Evequoz V., et Fleisch H., Stimulation of interleukin 1 and 3 production by retinoic acid in vitro, *Biochem J*, **230**: 2; (1985), 339-344.
- Trentham D.E., Immunity to type II collagen in rheumatoid arthritis: a current appraisal, *Proc Soc Exp Biol Med*, **176**: 2; (1984), 95-104.
- Trentham D.E. et Brinckerhoff C.E., Augmentation of collagen arthritis by synthetic analogues of retinoic acid, *J Immunol*, **129**: 6; (1982), 2668-2672.
- Trippel S.B., Growth factor actions on articular cartilage, *J Rheumatol Suppl*, **43**; (1995), 129-132.
- Tsao P.W., Suzuki T., Totsuka R., Murata T., Takagi T., Ohmachi Y., Fujimura H., et Takata I., The effect of dexamethasone on the expression of activated NF-kappa B in adjuvant arthritis, *Clin Immunol Immunopathol*, **83**: 2; (1997), 173-178.
- Uchimura K., Nakamura M., Enjoji M., Irie T., Sugimoto R., Muta T., Iwamoto H., et Nawata H., Activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in rat Kupffer cells, *Hepatology*, **33**: 1; (2001), 91-99.
- Ulfgren A.K., Andersson U., Engstrom M., Klareskog L., Maini R.N., et Taylor P.C., Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis, *Arthritis Rheum*, **43**: 11; (2000), 2391-2396.
- Umesono K., Murakami K.K., Thompson C.C., et Evans R.M., Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors, *Cell*, **65**: 7; (1991), 1255-1266.
- Umesono K., Giguere V., Glass C.K., Rosenfeld M.G., et Evans R.M., Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element, *Nature*, **336**: 6196; (1988), 262-265.
- Underhill M., in *Conjonctions Bulletin du réseau canadien de l'arthrite*. 2004. p. 2.
- Unemori E.N., Hibbs M.S., et Amento E.P., Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines, *J Clin Invest*, **88**: 5; (1991), 1656-1662.
- Urban M.B. et Baeuerle P.A., The role of the p50 and p65 subunits of NF-kappa B in the recognition of cognate sequences, *New Biol*, **3**: 3; (1991), 279-288.
- Urban M.B., Schreck R., et Baeuerle P.A., NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit, *Embo J*, **10**: 7; (1991), 1817-1825.
- Vallejo M., Ron D., Miller C.P., et Habener J.F., C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 10; (1993), 4679-4683.
- van den Berg W.B. et Bresnihan B., Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-I, *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*, **13**: 4; (1999), 577-597.
- van den Berg W.B., Joosten L.A., Kollias G., et van De Loo F.A., Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction, *Ann Rheum Dis*, **58 Suppl 1**; (1999), I40-48.

- van der Kraan P.M., Buma P., van Kuppevelt T., et van den Berg W.B., Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**: 8; (2002), 631-637.
- Van der Rest M., Rosenberg L.C., Olsen B.R., et Poole A.R., Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen, *Biochem J*, **237**: 3; (1986), 923-925.
- van Roon J.A., van Roy J.L., Duits A., Lafeber F.P., et Bijlsma J.W., Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T helper-1 activation is inhibited by interleukin-4, *Ann Rheum Dis*, **54**: 10; (1995), 836-840.
- Van Snick J., Interleukin-6: an overview, *Annu Rev Immunol*, **8**; (1990), 253-278.
- Varnat F., Heggeler B.B., Grisel P., Boucard N., Corthesy-Theulaz I., Wahli W., et Desvergne B., PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway, *Gastroenterology*, **131**: 2; (2006), 538-553.
- Vilcek J. et Lee T.H., Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions, *J Biol Chem*, **266**: 12; (1991), 7313-7316.
- Vincenti M.P. et Brinckerhoff C.E., 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 Res*, **4**: 3; (2002), 157-164.
- Vivat V., Zechel C., Wurtz J.M., Bourguet W., Kagechika H., Umemiya H., Shudo K., Moras D., Gronemeyer H., et Chambon P., A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers, *Embo J*, **16**: 18; (1997), 5697-5709.
- Vogt P.K. et Bos T.J., jun: oncogene and transcription factor, *Adv Cancer Res*, **55**; (1990), 1-35.
- Vu-Dac N., Schoonjans K., Kosykh V., Dallongeville J., Fruchart J.C., Staels B., et Auwerx J., Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor, *J Clin Invest*, **96**: 2; (1995), 741-750.
- Vuolteenaho K., Moilanen T., Hamalainen M., et Moilanen E., Effects of TNFalpha-antagonists on nitric oxide production in human cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**: 4; (2002), 327-332.
- Wada M., Fukui T., Kubo Y., et Takahashi N., Formation of retinoyl-CoA in rat tissues, *J Biochem (Tokyo)*, **130**: 3; (2001), 457-463.
- Wahl S.M., Allen J.B., Wong H.L., Dougherty S.F., et Ellingsworth L.R., Antagonistic and agonistic effects of transforming growth factor-beta and IL-1 in rheumatoid synovium, *J Immunol*, **145**: 8; (1990), 2514-2519.
- Walker S.E. et Ranatunga S.K., Rheumatoid arthritis: A review, *Mo Med*, **103**: 5; (2006), 539-544.
- Wan H., Oridate N., Lotan D., Hong W.K., et Lotan R., Overexpression of retinoic acid receptor beta in head and neck squamous cell carcinoma cells increases their sensitivity to retinoid-induced suppression of squamous differentiation by retinoids, *Cancer Res*, **59**: 14; (1999), 3518-3526.
- Wang Y., Moser A.H., Shigenaga J.K., Grunfeld C., et Feingold K.R., Downregulation of liver X receptor-alpha in mouse kidney and HK-2 proximal tubular cells by LPS and cytokines, *J Lipid Res*, **46**: 11; (2005), 2377-2387.
- Wang Y.X., Lee C.H., Tiep S., Yu R.T., Ham J., Kang H., et Evans R.M., Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity, *Cell*, **113**: 2; (2003), 159-170.
- Watanabe H., Yamada Y., et Kimata K., Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function, *J Biochem (Tokyo)*, **124**: 4; (1998), 687-693.
- Wedel A. et Ziegler-Heitbrock H.W., The C/EBP family of transcription factors, *Immunobiology*, **193**: 2-4; (1995), 171-185.
- Weinblatt M.E., Kremer J.M., Bankhurst A.D., Bulpitt K.J., Fleischmann R.M., Fox R.I., Jackson C.G., Lange M., et Burge D.J., A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate, *N Engl J Med*, **340**: 4; (1999), 253-259.
- Weinblatt M.E., Keystone E.C., Furst D.E., Moreland L.W., Weisman M.H., Birbara C.A., Teoh L.A., Fischkoff S.A., et Chartash E.K., 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 Rheum*, **48**: 1; (2003), 35-45.
- Weninger W., Rendl M., Mildner M., et Tschachler E., Retinoids downregulate vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor production by normal human keratinocytes, *J Invest Dermatol*, **111**: 5; (1998), 907-911.
- Wesche H., Korherr C., Kracht M., Falk W., Resch K., et Martin M.U., The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases), *J Biol Chem*, **272**: 12; (1997), 7727-7731.
- West-Mays J.A., Cook J.R., Sadow P.M., Mullady D.K., Bargagna-Mohan P., Strissel K.J., et Fini M.E., Differential inhibition of collagenase and interleukin-1alpha gene expression in cultured corneal

- fibroblasts by TGF-beta, dexamethasone, and retinoic acid, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**: 5; (1999), 887-896.
- Westacott C.I. et Sharif M., Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum*, **25**: 4; (1996), 254-272.
- Whalen J.D., Lechman E.L., Carlos C.A., Weiss K., Kovessi I., Glorioso J.C., Robbins P.D., et Evans C.H., Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws, *J Immunol*, **162**: 6; (1999), 3625-3632.
- Whiteside S.T., Epinat J.C., Rice N.R., et Israel A., I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity, *Embo J*, **16**: 6; (1997), 1413-1426.
- Widschwendter M., Berger J., Daxenbichler G., Muller-Holzner E., Widschwendter A., Mayr A., Marth C., et Zeimet A.G., Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer, *Cancer Res*, **57**: 19; (1997), 4158-4161.
- Williams R.O., Pathogenesis and therapy of rheumatoid arthritis, *Ernst Schering Found Symp Proc*, **1**; (2006), 107-130.
- Williams R.O., Feldmann M., et Maini R.N., Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 20; (1992), 9784-9788.
- Williams S.C., Cantwell C.A., et Johnson P.F., A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro, *Genes Dev*, **5**: 9; (1991), 1553-1567.
- Willoughby D.A., Moore A.R., Colville-Nash P.R., et Gilroy D., Resolution of inflammation, *Int J Immunopharmacol*, **22**: 12; (2000), 1131-1135.
- Wolfe F. et Michaud K., Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients, *Arthritis Rheum*, **50**: 6; (2004), 1740-1751.
- Wolfe F., Freundlich B., et Straus W.L., Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis, *J Rheumatol*, **30**: 1; (2003), 36-40.
- Wooley P.H., Dutcher J., Widmer M.B., et Gillis S., Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice, *J Immunol*, **151**: 11; (1993), 6602-6607.
- Woronicz J.D., Gao X., Cao Z., Rothe M., et Goeddel D.V., IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK, *Science*, **278**: 5339; (1997), 866-869.
- Wu Z., Rosen E.D., Brun R., Hauser S., Adelmant G., Troy A.E., McKeon C., Darlington G.J., et Spiegelman B.M., Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity, *Mol Cell*, **3**: 2; (1999), 151-158.
- Wurtz J.M., Bourguet W., Renaud J.P., Vivat V., Chambon P., Moras D., et Gronemeyer H., A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors, *Nat Struct Biol*, **3**: 2; (1996), 206.
- Xu J. et Drew P.D., 9-Cis-retinoic acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes, *J Neuroimmunol*, **171**: 1-2; (2006), 135-144.
- Xu Q., Konta T., et Kitamura M., Retinoic acid regulation of mesangial cell apoptosis, *Exp Nephrol*, **10**: 3; (2002), 171-175.
- Xu X.C., Sozzi G., Lee J.S., Lee J.J., Pastorino U., Pilotti S., Kurie J.M., Hong W.K., et Lotan R., Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development, *J Natl Cancer Inst*, **89**: 9; (1997a), 624-629.
- Xu X.C., Sneige N., Liu X., Nandagiri R., Lee J.J., Lukmanji F., Hortobagyi G., Lippman S.M., Dhingra K., et Lotan R., Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis, *Cancer Res*, **57**: 22; (1997b), 4992-4996.
- Yamamoto Y. et Gaynor R.B., IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway, *Trends Biochem Sci*, **29**: 2; (2004), 72-79.
- Yamauchi P.S., Rizk D., et Lowe N.J., Retinoid therapy for psoriasis, *Dermatol Clin*, **22**: 4; (2004), 467-476, x.
- Yamazaki S., Muta T., et Takeshige K., A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei, *J Biol Chem*, **276**: 29; (2001), 27657-27662.
- Yang J.Y., Koo B.S., Kang M.K., Rho H.W., Sohn H.S., Jhee E.C., et Park J.W., Retinoic acid inhibits inducible nitric oxide synthase expression in 3T3-L1 adipocytes, *Exp Mol Med*, **34**: 5; (2002), 353-360.
- Yen A., Roberson M.S., Varvayanis S., et Lee A.T., Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest, *Cancer Res*, **58**: 14; (1998), 3163-3172.
- Ylikomi T., Bocquel M.T., Berry M., Gronemeyer H., et Chambon P., Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors, *Embo J*, **11**: 10; (1992), 3681-3694.
- Yoshimura A., Mori H., Ohishi M., Aki D., et Hanada T., Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation, *Curr Opin Immunol*, **15**: 6; (2003), 704-708.

- Yoshizaki K., Nishimoto N., Mihara M., et Kishimoto T., Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody, *Springer Semin Immunopathol*, **20**: 1-2; (1998), 247-259.
- Young M.R., Li J.J., Rincon M., Flavell R.A., Sathyanarayana B.K., Hunziker R., et Colburn N., Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 17; (1999), 9827-9832.
- Yu V.C., Delsert C., Andersen B., Holloway J.M., Devary O.V., Naar A.M., Kim S.Y., Boutin J.M., Glass C.K., et Rosenfeld M.G., RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements, *Cell*, **67**: 6; (1991), 1251-1266.
- Yu Z. et Xing Y., All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF-beta/Smad signaling, *Biochem Biophys Res Commun*, **340**: 3; (2006), 929-934.
- Zacheis D., Dhar A., Lu S., Madler M.M., Klucik J., Brown C.W., Liu S., Clement F., Subramanian S., Weerasekare G.M., Berlin K.D., Gold M.A., Houck J.R., Jr., Fountain K.R., et Benbrook D.M., Heteroarotinooids inhibit head and neck cancer cell lines in vitro and in vivo through both RAR and RXR retinoic acid receptors, *J Med Chem*, **42**: 21; (1999), 4434-4445.
- Zagariya A., Mungre S., Lovis R., Birrer M., Ness S., Thimmapaya B., et Pope R., Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta-induced activation by c-Jun, *Mol Cell Biol*, **18**: 5; (1998), 2815-2824.
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakawa M., et Karin M., The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation, *Cell*, **91**: 2; (1997), 243-252.
- Zechel C., Shen X.Q., Chen J.Y., Chen Z.P., Chambon P., et Gronemeyer H., The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats, *Embo J*, **13**: 6; (1994), 1425-1433.
- Zelent A., Krust A., Petkovich M., Kastner P., et Chambon P., Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin, *Nature*, **339**: 6227; (1989), 714-717.
- Zhang H. et Rosdahl I., Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells, *Int J Oncol*, **25**: 2; (2004), 303-308.
- Zhao Q. et Lee F.S., Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta, *J Biol Chem*, **274**: 13; (1999), 8355-8358.
- Zhou X.F., Shen X.Q., et Shemshedini L., Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization, *Mol Endocrinol*, **13**: 2; (1999), 276-285.
- Zhu X.J., Tu P., Zhen J., et Duan Y.Q., Adapalene gel 0.1%: effective and well tolerated in the topical treatment of acne vulgaris in Chinese patients, *Cutis*, **68**: 4 Suppl; (2001), 55-59.
- Zitnik R.J., Kotloff R.M., Latifpour J., Zheng T., Whiting N.L., Schwalb J., et Elias J.A., Retinoic acid inhibition of IL-1-induced IL-6 production by human lung fibroblasts, *J Immunol*, **152**: 3; (1994), 1419-1427.
- Zouboulis C.C., Retinoids--which dermatological indications will benefit in the near future? *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **14**: 5; (2001), 303-315.
- Zwerina J., Hayer S., Tohidast-Akrad M., Bergmeister H., Redlich K., Feige U., Dunstan C., Kollias G., Steiner G., Smolen J., et Schett G., Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction, *Arthritis Rheum*, **50**: 1; (2004), 277-290.
- Zwerina J., Redlich K., Polzer K., Joosten L., Kronke G., Distler J., Hess A., Pundt N., Pap T., Hoffmann O., Gasser J., Scheinecker C., Smolen J.S., van den Berg W., et Schett G., TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 28; (2007), 11742-11747.



Annexes

.....

All-trans retinoic acid (ATRA) suppresses IL-6 expression in IL-1-stimulated synovial fibroblasts by inhibition of ERK_{1/2} pathway independently of RAR activation

KIRCHMEYER M., KOUFANY M., SEBILLAUD S., NETTER P., JOUZEAU J-Y. and BIANCHI A.‡.

Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires (LPPA), UMR 7561 CNRS-Nancy Université, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

‡ Corresponding author: Arnaud BIANCHI.

E-mail: arnaud.bianchi@medecine.uhp-nancy.fr.

Phone: + 33(0)3 83 68 39 68

Fax: + 33(0)3 83 68 39 59

Authors:

Mélanie KIRCHMEYER, PhD, Meriem KOUFANY, Tc, Sylvie SEBILLAUD, Tc, Patrick NETTER, MD, PhD, Jean-Yves JOUZEAU, PharmD, PhD, Arnaud BIANCHI, PhD.



Abstract

Introduction. IL-6 is thought to play a pathogenic role in RA and synovium is a major source of IL-6 release. We investigated the ability of retinoids to suppress IL-6 expression in IL-1-stimulated synovial fibroblasts, with special care to the contribution of RAR (retinoic acid receptor) and RXR (retinoid X receptor) subtypes, and the implication of the MAPK pathway.

Methods. RAR- α , - β , - γ and RXR- α , - β , - γ levels were determined by RT-qPCR or western-blot in rat synovial fibroblasts stimulated with 10ng/ml of IL-1 β . Stimulated levels of IL-6 were assessed by RT-qPCR or immuno-assays in the presence or absence of 1 μ M of all-*trans* retinoic acid, ATRA [RAR agonist] or 0.3 μ M of BMS-649 [RXR agonist]. The contribution of RAR subtypes was checked with selective agonists or siRNAs. The effect of ATRA on upstream MAPK (p38 MAPK, JNK and ERK_{1/2}) was assessed by western blot, and the contribution of ERK_{1/2} pathway to the activation of pro-inflammatory transcription factors was studied by TransAm™ assays.


Results. Synovial fibroblasts expressed all RAR and RXR subtypes except RXR- γ . In IL-1-stimulated cells, ATRA, but not BMS-649, reduced IL-6 expression whereas selective RAR agonists were inactive. The inhibitory effect of ATRA on IL-6 was not affected by the silencing of RAR subtypes. ATRA also reduced the phosphorylation of ERK_{1/2}, but neither of p38 MAPK nor of JNK. The suppressive effect of ATRA on activation of AP-1 and NF-IL-6, was reproduced by the MEK1 inhibitor PD-98059, whereas ATRA and PD-98059 had no effect on NF- κ B activation.

Conclusions. Amongst RAR and RXR agonists, only ATRA inhibited IL-1-induced IL-6 expression in rat synovial fibroblasts by inhibiting ERK_{1/2} pathway and subsequent activation of AP-1 and NF-IL-6 independently RAR.

Introduction

Retinoids are natural or synthetic analogues of vitamin A, including all-*trans* retinoic acid (ATRA) and its 9-*cis* isomer (9-*cis* RA). ATRA and other retinoids play a major role in a wide range of physiological pathways such as cell proliferation, embryogenesis, differentiation, morphogenesis, and inflammation (for a review see [1]). Retinoids exert their functions through their binding to the retinoic acid receptor (RAR) and the retinoid X receptor (RXR), which belong to the sub-family B (respectively NR1B and NR2B) of the nuclear hormone receptors. Each receptor is divided into three subtypes referred as RAR- α , - β or - γ and RXR- α , - β or - γ , which are encoded by separate genes [6]. After binding of retinoids, RAR and RXR form a homo or a heterodimer and activate the cellular machinery for an increased transcription rate. But RAR and RXR can alternatively induce gene transrepression by sequestering transcription factors such as activator protein 1 (AP-1) or nuclear factor-interleukin (NF-IL)-6, without binding to DNA [6]. Based on the regulatory role of these transcription factors in the control of many inflammatory mediators, liganded RAR complexes can repress a broad spectrum of genes including inflammatory proteins, cytokines or matrix metalloproteases [7].


Rheumatoid arthritis (RA) is an immune-mediated inflammatory disease characterized by a chronic inflammation of the synovial membrane which organizes into an aggressive front of tissue able to invade and destroy local articular structures [8]. Although the cause of rheumatoid arthritis remains unknown, it has been established that cytokine networks play a pivotal role in the immuno-inflammatory and destructive response of RA [9]. Besides tumor necrosis factor (TNF)- α or interleukin (IL)-1, the pro-inflammatory and pleiotropic cytokine interleukin-6 (IL-6) could have important activities in the context of pathogenesis of RA [10]. Hence, huge amounts are found in the synovial fluid and tissue, and in the sera of arthritic patients [11], and IL-6 serum levels have been correlated with the activity of the disease [10]. IL-6 is synthesized, then secreted extensively by fibroblast-like synoviocytes from RA patients [12, 13]. The synthesis is mainly regulated by the transcription factors NF-IL-6, or CAAT-enhancer binding protein (C/EBP)- β , AP-1 and NF- κ B [12, 14, 15] which are constitutively activated in RA synovial tissue (for a review see [16]) and have binding sites in the promoter region of the IL-6 gene. Amongst possible pathogenic roles, IL-6 activates T cells and macrophages, induces osteoclasts differentiation, causes systemic inflammatory manifestations and could promote angiogenesis [10]. As a consequence, the blockade of IL-6



effects has emerged as a new therapeutic approach to RA and tocilizumab, a humanized antihuman IL-6 receptor monoclonal antibody, has successfully entered the clinics (for a review see [17]). These clinical data have confirmed the pathological role of IL-6 in RA (for a review [17]) and suggests that this second generation of anticytokine therapy may have therapeutical relevance in patients which have a limited response to disease modifying antirheumatic drugs or biological agents, such as inhibitors of TNF- α [9].

Beside their successful use in the treatment of skin diseases or cancer, retinoids were shown to be anti-inflammatory in several animal models of RA. Thus, a decrease of cartilage lesions, associated with a reduction of matrix metalloprotease (MMP)-1 expression was reported in the paws of adjuvant arthritic (AA) rats treated with 13-cis RA [18]. In the rodent collagen-induced arthritis (CIA) model, ATRA improves the course of the disease and reduces the production of inflammatory cytokines [19], and Am-80 (RAR agonist) decreases anti-collagen II antibody levels and improves joint swelling and bone destruction [32]. However, in contrast to its efficacy in the AA model, 13-cis RA remained poorly effective in the rat CIA model [32]. Apart from differences in the pathogenic mechanisms of animal models of RA [20] or in the binding activity of retinoids to RAR subtypes [1], these experimental data strongly suggest that the anti-arthritic effect of RAR agonists are supported mainly by their ability to reduce the immune response. The inflamed synovial tissue is a major source of IL-6 production [21] and the blockade of IL-6 [22] or its deficiency [23] reduced the severity of experimental arthritis by impairing the T-cell response. These data led us to postulate that the ability of retinoids to inhibit IL-6 production by activated synovial fibroblasts could have a major role in their anti-arthritic potency. Therefore, we compared the suppressive properties of the RAR agonist ATRA, and of the RXR agonist, BMS-649, on IL-1-induced expression of IL-6 in rat synovial fibroblasts and tried to elucidate the corresponding molecular events with respect to contribution of RAR/RXR subtypes and signalling pathways.

Firstly, we used compounds acting either on RAR or RXR, alone or in combination, to demonstrate that any suppressive effect on IL-6 expression was supported by RXR activation. Using mRNA silencing of RAR subtypes and selective agonists of RAR- α , - β or - γ , we showed that the inhibitory potency of ATRA on IL-6 was independent of RAR activation. Finally, we demonstrated that the MEK1 inhibitor PD-98059 reproduced the ability of ATRA to reduce the IL-1-induced phosphorylation of ERK_{1/2} and activation of AP-1 and of NF-IL-6, but not of NF- κ B. These data demonstrate that ATRA suppressed the IL-1-induced



production of IL-6 in a RAR independent manner, by inhibiting ERK_{1/2} pathway and subsequent activation of AP-1 and NF-IL-6 in synovial fibroblasts.

MATERIALS and METHODS

Synovial fibroblasts isolation and culture.

Rat synovial fibroblasts were obtained from synovium collected aseptically from healthy Wistar male rats (130-150 grams; Charles River, L'Arbresle, France), killed under dissociative anesthesia (ketamine [Rhône-Mérieux, Lyon, France] and acepromazine [Sanofi Santé Animale, Paris, France]) in accordance with national animal care guidelines, after approval by our internal ethics committee, as described before [24]. Cells were cultured as monolayers, in 75 cm² flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% of CO₂, until the 4th passage, in order to prevent any strong contamination by macrophage-like cells, and to obtain a homogenous population of synovial fibroblasts. The cell phenotype was controlled by measuring the mRNA level of the fibroblast-like markers synoviolin and cadherin-11 [25] and of the macrophage-like marker CD14 [26].

Study design.

The expression of IL-6 was studied in rat synovial fibroblasts cultured under low fetal calf serum conditions and stimulated with 10 ng/ml of rat recombinant IL-1 β (R&D Systems, Lille, France), in the presence or absence of a RAR agonist, ATRA (Sigma), used at 1 μ M, and/or a RXR agonist, BMS-649 (kindly provided by Bristol-Myers Squibb, Wallingford, Connecticut, USA) used at 0.3 μ M. Selective agonists (kindly provided by Bristol-Myers Squibb) of RAR- α (BMS-753), RAR- β (BMS-453) or RAR- γ (BMS-961) were used at 0.1 or 1 μ M. All drugs were maintained in the darkness before addition to the culture medium, at a final concentration of 0.1% of dimethylsulphoxide (DMSO), at the same time as IL-1 stimulation.

The contribution of RAR subtypes to the effect of ATRA was investigated using the ARN interference technology.

The effect of ATRA on activation of MAPK pathways was studied in IL-1-stimulated cells by measuring the phosphorylation of p38-MAPK, SAPK/JNK or ERK_{1/2} by western-blot after 5, 15 or 30 minutes respectively. The effect of ATRA and the possible contribution of ERK_{1/2} on IL-1 β -induced activation of NF- κ B, NF-IL-6 or AP-1 were studied by TransAmTM assays.

Assay for synovial fibroblasts viability

Cell viability was assessed by the mitochondrial-dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) as described before [27].


Gene silencing experiment

For experiments of RAR subtypes silencing, double stranded siRNA corresponding to a region of RAR- α (GCAGUUCGGAAGAGAUAGU), RAR- β (CUAGCUACUGGCUUCAA GA) or RAR- γ (GCCUUCUCCUUUACCUCC) mRNA were synthesized by Eurogentec (Liege, Belgium). Transfection of synovial fibroblasts with 50 nM of siRNA was performed during 24 hours using X-TremeGENE reagent[®] (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's recommendations. Cells were then stimulated with IL-1 β for 6 hours in the presence or absence (DMSO alone) of ATRA.

RNA extraction and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

After stimulation with IL-1 β , in the presence or absence (DMSO alone) of RAR or RXR agonists, total RNA was extracted from cell layers using RNeasy extraction kit, according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, Courtabœuf, France), as described before [24]. The mRNA levels for RAR- α , - β or - γ , RXR- α , - β or - γ , IL-6 and RP29 were quantified by real time qPCR in capillaries with the Lightcycler[™] technology (Roche Molecular Biochemicals). The reaction mixture was composed of cDNAs, SYBR green master mix system[®] (Qiagen), and primers pairs specific for the DNA fragments to be amplified. The sequences of the primers used were IL-6 (S: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', AS: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', NM 012589, 161bp, 59°C), RAR- α (S: 5'-ACCAGAT TACCTTCTCAAGG-3', AS: 5'-GGTACCGCGTGCAGATT-3', NM 031528, 65bp, 58°C), RAR- β (S: 5'-TCTTAATGAAAATCACAGATCTCCGC-3', AS: 5'-CCAGGAATTTCCATTTCAAGG-3', XM 223843, 62bp, 57°C), RAR- γ (S: 5'-AGTGCTATCTGCCTCATCT-3', AS: 5'-TTGTCCACCTTCACCTTCTCGGGTTC-3', NM 001062412, 66bp, 62°C), RXR- α (S: 5'-GAAGCGTACTGCAAACACAAG-3', AS: 5'-CAGCCGGAGCAGCAGCTTGG-3', NM 012805, 65bp, 66°C), RXR- β (S: 5'-CTTCATGTGCACAGAAACT-3', AS: 5'-TCTGTCAG CACCCGATCAAA-3', NM 206849, 68bp, 55°C), RXR- γ (S: 5'-CTGCACCGGGCAGGGT GGAAT-3', AS: 5'-CTGGACGGAAACCGAGCGGTG-3', NM 031765, 65bp, 66 °C) and RP-29 (S: AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG-3', AS: 5'-AGACGCGGCAAGAGC GAGAA-3', NM 012876, 70bp, 59°C).

The quantity of each cDNA was estimated by Ct, defined as the number of cycles corresponding to the moment where the fluorescence, secondary to SYBR green incorporation into double-stranded DNA, became detectable at the end of the PCR elongation phase. At completion of PCR cycling, a melting curve was performed in order to control the specificity of each amplified product. Each experiment included positive and negative reaction controls,



and Ct were converted into nanograms of DNA using calibration curves made of serial dilutions of known amounts of corresponding purified PCR products. The transcript level of the housekeeping gene ribosomal protein S29 (RP29) was determined in parallel for each sample and data were expressed as the normalized ratio of mRNA level of each gene of interest over the RP29 gene.

Measurement of IL-6 production.


IL-6 secreted in culture supernatant after 24 hours of incubation was measured in ng/ml with commercially available rat immuno-enzymatic assay (ELISA) (R&D SystemsTM, Abingdon, UK), with a limit of detection of 21 pg/ml. The assay was not sensitive to soluble receptors and no cross-reactivity was reported with other cytokines (manufacturer's data). Positive controls were used in each experiment.

Western blot analysis

For protein study, experiments were performed from 5 minutes to 24 hours after IL-1 β challenge. Cellular proteins were extracted with 1X Laemmli blue (Sigma), as described before [27] and electroblotted with RAR- α , RAR- β , RAR- γ , RXR- α , RXR- β or RXR- γ (1:2000, [Santa Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, France]), phospho-ERK_{1/2} (P-ERK_{1/2}), phospho-p38 MAPK (P-p38 MAPK) (1:1000 [Cell Signaling Beverly, MA, USA]), phospho-SAPK/JNK (P-JNK) (1:500, [Cell Signaling]) or β -actin (1:4000 [Sigma]). Detection of protein bands was done by chemiluminescence, with the Phototope Detection system according to the manufacturer's recommendations (Cell Signaling). Results were expressed as the ratio of each protein of interest over β -actin, used as internal control.

ELISA-based TransAmTM kit for NF-IL-6, NF- κ B (p65) and AP-1 (c-Jun)

Synovial fibroblasts were pre-incubated for 1 hour with 10 μ M of PD-98059 (inhibitor of ERK_{1/2}, Sigma) or incubated with 1 μ M of ATRA before stimulation for 30 min or 4 hours with IL-1 β . At corresponding times, nuclear extracts were prepared with a commercially available kit according to the manufacturer's recommendations (Active Motif, Rixensart, Belgium), as described before [27]. After protein quantification with a bicinchoninic acid assay kit (BCATM protein assay kit, Sigma), nuclear extracts were checked for NF-IL-6, NF- κ B (p65) and AP-1 (c-Jun) activation using ELISA-based kits (TransAMTM, Active Motif Europe, Rixensart, Belgium). Briefly, 2 μ g of nuclear proteins were added in a volume of 20 μ l to a well plate pre-coated either with oligonucleotides (5'-GGGACTTTCC-3') corresponding to NF- κ B responsive element (RE), or (5'-GCAAT-3') corresponding to NF-



IL-6 RE, or (5'-TGAGTCA-3') corresponding to AP-1 RE. Wells were then incubated with a primary antibody against phosphorylated NF- κ B (p65) (1:1000), phosphorylated NF-IL-6 (1:1500), or phosphorylated AP-1 (c-Jun) (1:500). The RE / NF- κ B, NF-IL-6 or AP-1 antibody complex was revealed by incubation with a secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody. The amounts of NF- κ B (p65), NF-IL-6 or AP-1 (c-Jun) proteins in nuclear extracts were quantified by measuring A₄₅₀ on a Multiskan™ microplate reader (Labsystems). The specificity of the assay was controlled by demonstrating that the addition of an excess of wild-type consensus RE (20 pmol/well) prevented transcription factor binding onto the well whereas an excess of mutated consensus RE remained ineffective.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.) of at least 3 independent assays. Comparisons were made by analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's protected least-squares difference (PLSD) *post-hoc* test, using Statview™ version 5.0 software (SAS Institute Inc., USA). A value of p less than 0.05 was considered significant (* p<0.05 vs control, # p<0.05 vs IL-1 β).

Results

1. Effect of IL-1 β on the expression of RAR and RXR subtypes.

Preliminary experiments using MTT assay showed no loss of cell viability in rat synovial fibroblasts stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of RAR or RXR agonists at the concentrations used (data not shown).

As shown in figure 1, the mRNAs and the proteins for all RAR subtypes (fig. 1a, 1b) and for RXR- α and - β (fig 1c, 1d) were detected in synovial fibroblasts under basal conditions. The mRNA of RXR- γ was not detected in our cell population, but a control experiment showed that it was highly expressed in rat adipose tissue, cortex and heart (data not shown), therefore confirming its restricted expression profile. In response to a stimulation of 6 to 24 hours with IL-1 β , the mRNA level of RAR decreased from 30 to 55% for the - α , from 15 to 60% for the - β , and from 10 to 25% for the - γ subtype (fig. 1a). Levels of mRNA of RXR- α or - β were not affected by IL-1 β stimulation (fig. 2c). Western blotting confirmed these expression profiles at the protein level (fig. 2b, 2d).

2. Effect of retinoids on IL-1 β -induced expression of IL-6.

As shown in figure 2, IL-6 mRNA level (fig. 2a) and corresponding mediator (fig. 2b) were not detected in basal conditions, but were strongly expressed in response to IL-1 β . In IL-1-stimulated synovial fibroblasts, ATRA (RAR agonist) decreased IL-6 gene expression from 70% (fig. 2a), and IL-6 level from 30% (fig. 2b) compared to IL-1 β controls. This inhibition was dose-dependent for ATRA between 1 nM and 10 μ M (data not shown). In contrast, BMS-649 (RXR agonist) was ineffective on IL-6 expression or production (fig. 2a and 2b). A co-stimulation with ATRA and BMS-649 inhibited pro-inflammatory cytokines expression to the same extent as ATRA alone.

3. Effect of RAR selective agonists on IL-1-induced expression of IL-6.

As the RXR agonist (BMS-649) was inactive on IL-1-induced expression of IL-6 whereas the RAR agonist (ATRA) was inhibitory, we next investigated the contribution of the different RAR subtypes. At the concentration used, the three selective RAR agonists (BMS-753 for RAR- α , BMS-453 for RAR- β and BMS-961 for RAR- γ) increased the mRNA level of RAR- β , chosen as a RAR-dependent target gene, from 2 to 20 fold (fig. 3a). This demonstrated that the RAR-selective agonists were active in our experimental system. A subsequent dose

.....

ranging study demonstrated that none of the three agonists reproduced the inhibitory effect of 1 μ M of ATRA on IL-6 (fig. 3b). These data were not in favour of a major contribution of RAR subtypes activation in the inhibitory effects of ATRA.

4. Effect of RAR silencing on the IL-6 suppressive effect of ATRA.


SiRNAs designed against RAR- α , RAR- β or RAR- γ were used to confirm whether the cytokines suppressive effect of ATRA on IL-6 was RAR independent. As shown in figure 4a, the transfection of synovial fibroblasts with each siRNA reduced significantly the mRNA level of the targeted RAR subtype, whereas the transfection of an oligomeric sequence (OS) has no effect (fig. 4a). After 24 hours of incubation, transfected synovial fibroblasts remained responsive to IL-1 β although the extent of IL-6 induction was slightly lower than in non transfected cells (fig. 4b). However, whatever the RAR siRNA used, ATRA still inhibited IL-1-induced expression of IL-6 with a similar efficacy as in non-transfected cells (around 70%) (fig. 4b). These data indicated that the suppressive effect of ATRA on IL-1-induced responses was likely RAR-independent.

5. Effect of ATRA on IL-1 β -induced activation of MAPK pathways

In our experimental system, p38 MAPK, JNK and ERK_{1/2} pathways were activated by IL-1 β , with the phosphorylation of JNK and p38 MAPK being obvious from 5 to 15 minutes and of ERK_{1/2} from 5 to 30 minutes after IL-1 β challenge (data not shown). In these experimental conditions, ATRA did neither affect the early phosphorylation of p38 MAPK (fig. 5a) nor of JNK (fig. 5b) induced by IL-1 β . In contrast, ATRA reduced the level of ERK_{1/2} phosphoproteins from 30 to 50% (fig. 5c). These data demonstrated that amongst IL-1-activated MAPK pathways, ATRA was inhibitory only on ERK_{1/2} in rat synovial fibroblasts.

6. Contribution of ERK_{1/2} to the activation of AP-1 and NF-IL-6 but not of NF- κ B

A control experiment showed that, at the concentration used, PD-98059 prevented efficiently the IL-1 β -induced phosphorylation of ERK_{1/2} in our experimental system (fig. 6a). In these conditions, the stimulating effect of IL-1 β on IL-6 release was reduced to the same extent (40 to 50%) by PD-98059 and ATRA (figure 6b). In preliminary experiments, activation of transcriptions factors by IL-1 β was shown to be significant after 30 min of stimulation for NF- κ B (1.6 fold) and after 4 hours of stimulation for NF-IL-6 (5 fold) or AP-1 (c-Jun) (7 fold) (data not shown). In IL-1 β stimulated cells, neither PD-98059 nor ATRA reduced the




activation of NF- κ B pathway (fig. 6c), whereas a comparable inhibition (40 to 55%) of NF-IL-6 (fig. 6d) or AP-1 (c-Jun) (fig. 6e) was observed with both molecules. These data suggested that inhibition of ERK_{1/2} pathway by ATRA contributed to its inhibitory effect on IL-1-induced activation of NF-IL-6 and AP-1 and subsequent production of IL-6.

Discussion

In the present work, we demonstrated for the first time that RAR and RXR subtypes were expressed in rat synovial fibroblasts either at the mRNA or the protein level. All receptor subtypes, except RXR- γ , were detected and this was consistent with the recent demonstration that their mRNAs, except of the RXR- γ mRNA, were expressed in human osteoarthritic chondrocytes [28]. In response to IL-1 stimulation, the expression of all RAR subtypes decreased in synovial fibroblasts, whereas those of RXR- α and RXR- β remained unaffected. However, such inhibitory effect of IL-1 may be counterbalanced in the presence of RAR agonist since all RAR subtypes contain a RARE in their promoter region [29], which renders them highly inducible by these agonists. In our experimental conditions, we observed that ATRA induced a three-fold increase in RAR mRNA levels in IL-1-stimulated cells (data not shown), therefore suggesting that our biological system was suitable to study the pharmacological properties of agonists of RAR or RXR subtypes.


In IL-1-stimulated synovial fibroblasts, we demonstrated that ATRA reduced the IL-1-induced expression and release of IL-6 whereas the RXR agonist, BMS-649, was ineffective. For the RAR agonist, this result was consistent with its ability to reduce cytokines production by fibroblastic cells [30] or macrophages [31] challenged with various inflammatory stimulus. In the case of RXR agonist, the lack of efficacy of BMS-649 was not unexpected even if RXR agonists are well known to act as co-stimulators and were rather shown to potentiate the effect of PPAR [32] or RAR [33] agonists than to display intrinsic anti-inflammatory properties. However, we also failed to demonstrate any potentiation of the suppressive effect of ATRA on IL-6 when it was used in combination with BMS-649, suggesting that activation of RXR played a minor role. As a consequence, ATRA could reduce IL-6 expression by activating RAR/RAR homodimers exist although being less abundant than RAR/RXR heterodimers [34], or by RAR-independent mechanisms. Complementary experiments with selective agonists of each RAR subtype (BMS-753 for RAR- α , BMS-453 for RAR- β and BMS-961 for RAR- γ), or with RAR designed against siRNA, demonstrated that the suppressive effect of ATRA on IL-6 was RAR-independent in our cell type.

To search for signalling events able to drive the suppressive effect of ATRA on IL-6, we investigated the possible contribution of upstream MAP kinases thought to be responsive to IL-1. As expected from the fibroblastic phenotype of our cell type, we demonstrated that p38 MAPK [35] and JNK [36] were activated in response to IL-1 challenge. However, we



showed further that activation of neither of these pathways was inhibited by ATRA. As a reduced phosphorylation of p38 was thought to contribute to the inhibitory effect of ATRA on IL-1-induced expression of cytokines in chondrocytes [37], these data highlight that ATRA may act in a cell-dependent manner. In contrast, we showed that phosphorylation of ERK_{1/2} was an early IL-1-mediated event in rat synovial fibroblasts, and demonstrated that it was reduced significantly by ATRA. Activation of ERK_{1/2} was also reported in mouse [38] and RA [39] synovial fibroblasts challenged with IL-1 and this was shown to contribute to the production of IL-6 in response to inflammatory stimuli. In our experimental system, the MEK1 inhibitor PD-98059 reproduced the suppressive effect of ATRA on IL-6, at a concentration preventing actively the phosphorylation of ERK_{1/2}. Taken together, these data suggested strongly that the inhibition of ERK_{1/2} pathway by ATRA supported its suppressive effect on IL-1-induced production of IL-6.

The transcription factors NF-IL-6, AP-1 and NF-κB possess binding sites in the promoter of IL-6 but their respective contribution to the stimulating effect of IL-1 on IL-6 expression seems to be variable in RA synovial fibroblasts [43, 44]. In our system, we demonstrated that IL-1 activated NF-IL-6, AP-1 and NF-κB pathways although with a different kinetics. Kinetics may explain some discrepancy between the published data with human cells since we confirmed a lack of activation of NF-IL-6 or c-Jun after 30 minutes of stimulation with IL-1 [43] but a strong activation of both pathways after 4 hours of stimulation [44]. At the time of their optimal activation, we demonstrated that ATRA suppressed NF-IL-6 and AP-1 pathways but not NF-κB pathway, and this effect was reproduced by the ERK_{1/2} inhibitor PD-98059. In contrast, the inhibitory effect of PD-98059 showed that AP-1 was activated by ERK_{1/2} in synovial fibroblasts [45, 46] and could contribute to the enhanced production of IL-6 in response to IL-1 [44]. This result was highly consistent with the regulation of MMP-1 by IL-1 in rabbit synovial fibroblasts, where ERK_{1/2}, but not p38 pathway accounted for the phosphorylation and activation of c-Jun [45]. The third transcription factor NF-IL-6 can be activated by a lot of biological signals but contains a highly conserved phosphorylation site for MAP kinases [47] which regulates its nuclear translocation in response to growth factors [48]. Our data demonstrated that activation of NF-IL-6 depended on activation of ERK_{1/2}, as was reported for the differentiating effect of adiponectin on pre-adipocytes fibroblasts [49]. Such blockade of NF-IL-6 by PD-98059 inducing the inhibition of IL-6 levels was shown in Kaposi's sarcoma cells [50]. Thus, we provide evidence that ERK_{1/2} contributed to the IL-1-induced activation of AP-1 and NF-IL-6



in synovial fibroblasts. In addition, our data suggest that the suppressive effect of ATRA on these transcription factors may be supported by inhibition of ERK_{1/2} phosphorylation. This mechanism is consistent with the ability of retinoids to mediate most of their anti-inflammatory effects by reducing activation of the AP-1 (for a review see [51]) or NF-IL-6 [50] pathways, although it remains to be confirmed in other cell types.

Conclusion

The present work demonstrated that ATRA, but several selective RAR agonists, displayed a powerful inhibitory potency on IL-1-induced expression and release of IL-6 by synovial fibroblasts. Despite the presence of all RAR and RXR subtypes, except RXR- γ , this suppressive effect was RAR-independent and not sensitive to RXR activation. Amongst MAP kinases, ATRA reduced the phosphorylation of ERK_{1/2} and the activation of AP-1 and NF-IL-6 pathways, but not of NF- κ B. These effects were reproduced by the MEK1 inhibitor PD-98059, suggesting that inhibition of ERK_{1/2} pathway supported the suppressive potency of ATRA on transcription factors and IL-6 release. The present data underline that a decreased synthesis of IL-6 by synovial fibroblasts can contribute to the anti-arthritic potency of ATRA in animal models, as was suggested for the inhibitory effect of Am-80 in human osteoblast-like cells [52]. Nonetheless, this cytokine suppressive potency was independent of RAR, indicating that alternative mechanisms, such as modulation of histone deacetylase activity [45], or retinoylation of kinases upstream ERK_{1/2} pathway [53, 54] could support the anti-inflammatory effect of other retinoids.



LIST OF ABBREVIATIONS

AA: Adjuvant arthritis, AP-1: Activator Protein-1, ATRA: All-*trans* retinoic acid, BCA: Bicinchoninic acid, CIA: Collagen-induced arthritis, DMSO: Dimethylsulfoxide, ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, ERK: Extracellularly regulated kinase, IL: Interleukin, LPS: Lipopolysaccharide, MAPK: Mitogen-activated protein kinase, MEK: MAP ERK kinase, MMP: Metalloprotease, NF-IL-6: Nuclear factor of IL-6, NF- κ B: Nuclear factor- κ B, PCR: Polymerase chain reaction, RA: Rheumatoid arthritis, RAR: Retinoic acid receptor, RE: Responsive element, RXR: Retinoid X receptor, SAPK/JNK: Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, TBST: Tween buffer saline, TNF- α : Tumor necrosis factor- α

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

MKi performed all experiments and drafted the manuscript,
MKo contributed to the study of RAR or RXR subtypes expression and statistical analysis,
SS performed the TransAm[™] assays and contributed to the experiments with PD-98059,
PN supervised the study design and the manuscript,
JYJ contributed to the study design, data analysis, and final presentation of the manuscript,
AB conceived the study, participated in its design and data analysis, and drafted the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Région Lorraine (PRST), the Association de la Recherche contre la Polyarthrite (ARP), and the Pôle Lorrain d'Ingénierie du Cartilage (PLIC). The authors thank Dr. C. Rochette-Egly (Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France) for her advised scientific help and for the generous gift of BMS-649, -753, -453 et -961 synthesized by Bristol-Myers-Squibb.



FIGURE LEGENDS

FIGURE 1.

Effect of IL-1 β on the expression of RAR or RXR subtypes in synovial fibroblasts. Rat cells were stimulated with 10 ng/ml of IL-1 β for 6, 12 or 24 hours for RAR or RXR gene expression and for 24 hours (C for control) for RAR or RXR protein expression. Level of mRNA of RAR (α , β , γ) (a) or RXR (α , β , γ) (c) quantified by real-time PCR and normalized to RP29. Data are expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments; Protein expression of RAR-(α , β , γ) (b) or RXR-(α , β) (d) normalized to β -actin. Statistically significant differences from the control are indicated as *: P<0.05.

FIGURE 2.

Effect of retinoids on IL-1 β -induced expression of IL-6 in synovial fibroblasts. Rat cells were stimulated with 10 ng/ml of IL-1 β for 6 hours (IL-6 expression) or 24 hours (IL-6 production) in the presence or absence of 1 μ M ATRA (RAR agonist) or 0.3 μ M BMS-649 (RXR agonist). (a) IL-6 mRNA levels quantified by real-time PCR and normalized to RP29; (b) IL-6 level (ng/ml) in culture supernatant by ELISA. Data are expressed as mean \pm S.D. of values from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as *: P<0.05, and from IL-1 β stimulated cells as #: P<0.05.

FIGURE 3.

Effect of selective RAR agonists on IL-1-induced expression of IL-6. (a) To control the ability of the selective agonists to trigger RAR-dependent responses, rat synovial fibroblasts were stimulated for 6 hours with 0.1 μ M of either RAR agonists (BMS-753 for RAR- α , BMS-453 for RAR- β , BMS-961 for RAR- γ), and the mRNA level of the target gene RAR- β normalized to RP29 was studied by real-time PCR. (b) Their suppressive effect on the IL-6 mRNA level normalized to RP29 was studied by real-time PCR in cells stimulated with 10 ng/ml of IL-1 β in the presence or absence of 0.1 or 1 μ M of either RAR agonists. Data are expressed as mean \pm S.D. of values from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as *: P<0.05, and from IL-1 β stimulated cells as #: P<0.05.

FIGURE 4.

Effect of RAR silencing on the suppressive effect of ATRA on IL-6 expression. (a) Normalized mRNA level of RAR- α , - β or - γ in rat synovial fibroblasts transfected for 24 hours with 50 nM of siRNA against the corresponding RAR subtype or with 50 nM of an oligonucleotidic sequence (OM), before stimulation with 1 μ M of ATRA for 6 hours; (b) Normalized mRNA level of IL-6 in synovial fibroblasts transfected for 24 hours with 50 nM of each RAR siRNA, then stimulated for 6 hours with 10 ng/ml of IL-1 β in the presence or absence of 1 μ M of ATRA. Data are expressed as mean \pm S.D. of

values from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as *: $P < 0.05$, and from IL-1 β stimulated cells as #: $P < 0.05$.

FIGURE 5.

Effect of ATRA on IL-1 β -induced activation of MAPK pathways in rat synovial fibroblasts. **(a)** phospho-p38 MAPK (P-p38 MAPK) level after 5 minutes of stimulation with 10 ng/ml of IL-1 β in the presence or absence of 1 μ M of ATRA. **(b)** phospho-JNK (P-JNK) level after 15 minutes of stimulation with 10 ng/ml of IL-1 β in the presence or absence of 1 μ M of ATRA. **(c)** phospho-ERK_{1/2} (P-ERK_{1/2}, or P-p42/44) levels after 30 minutes of stimulation with 10 ng/ml of IL-1 β in the presence or absence of 1 μ M of ATRA. Data are expressed in arbitrary units (AU) as mean \pm S.D. of protein levels normalized to β -actin collected from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as *: $P < 0.05$, and from IL-1 β stimulated cells as #: $P < 0.05$.

FIGURE 6.

Contribution of ERK_{1/2} pathway to the inhibitory effect of ATRA. Rat synovial fibroblasts were stimulated with 10 ng/ml of IL-1 β in the presence or absence of the ERK_{1/2} inhibitor PD-98059 or ATRA. **(a)** western blotting of phosphorylated ERK_{1/2} after 15 minutes of stimulation, in the presence or absence of 10 μ M of PD-98059; **(b)** production of IL-6 (ng/ml by ELISA) in culture supernatant after 24 hours of stimulation, in the presence or absence of 10 μ M of PD-98059 or 1 μ M of ATRA; **(c)** nuclear content of NF- κ B by ELISA-based TransAmTM kit after 30 minutes of stimulation, in the presence or absence of 10 μ M of PD-98059 or 1 μ M of ATRA; nuclear content of NF-IL-6 **(d)** or AP-1 (c-Jun) **(e)** by ELISA-based TransAmTM kit after 4 hours of stimulation, in the presence or absence of 10 μ M of PD-98059 or 1 μ M of ATRA. Data are expressed as mean \pm SD of IL-6 levels or A₄₅₀ values from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as *: $p < 0.05$, and from IL-1 β -stimulated cells as #: $P < 0.05$.

1. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P: **Retinoic acid signalling in the development of branchial arches.** *Curr Opin Genet Dev* 2004, **14**:591-598.
2. Chivot M: **Retinoid therapy for acne. A comparative review.** *Am J Clin Dermatol* 2005, **6**:13-19.
3. Yamauchi PS, Rizk D, Lowe NJ: **Retinoid therapy for psoriasis.** *Dermatol Clin* 2004, **22**:467-476, x.
4. Zhou GB, Chen SJ, Chen Z: **Acute promyelocytic leukemia: a model of molecular target based therapy.** *Hematology* 2005, **10 Suppl 1**:270-280.
5. Soprano DR, Qin P, Soprano KJ: **Retinoic acid receptors and cancers.** *Annu Rev Nutr* 2004, **24**:201-221.
6. Lefebvre P: **Molecular basis for designing selective modulators of retinoic acid receptor transcriptional activities.** *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2001, **1**:153-164.
7. DiSepio D, Malhotra M, Chandraratna RA, Nagpal S: **Retinoic acid receptor-nuclear factor-interleukin 6 antagonism. A novel mechanism of retinoid-dependent inhibition of a keratinocyte hyperproliferative differentiation marker.** *J Biol Chem* 1997, **272**:25555-25559.
8. Firestein GS: **Evolving concepts of rheumatoid arthritis.** *Nature* 2003, **423**:356-361.
9. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P: **New therapies for treatment of rheumatoid arthritis.** *Lancet* 2007, **370**:1861-1874.
10. Nishimoto N: **Interleukin-6 in rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2006, **18**:277-281.
11. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuchaisnes CN, Van Snick J: **Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**:784-788.
12. Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H: **Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1.** *Am J Pathol* 1998, **152**:793-803.
13. Tan PL, Farmiloe S, Yeoman S, Watson JD: **Expression of the interleukin 6 gene in rheumatoid synovial fibroblasts.** *J Rheumatol* 1990, **17**:1608-1612.
14. Miyazawa K, Mori A, Okudaira H: **IL-6 synthesis by rheumatoid synoviocytes is autonomously upregulated at the transcriptional level.** *J Allergy Clin Immunol* 1999, **103**:S437-444.
15. Wakisaka S, Suzuki N, Takeno M, Takeba Y, Nagafuchi H, Saito N, Hashimoto H, Tomita T, Ochi T, Sakane T: **Involvement of simultaneous multiple transcription factor expression, including cAMP responsive element binding protein and OCT-1, for synovial cell outgrowth in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1998, **57**:487-494.
16. Firestein GS, Manning AM: **Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:609-621.
17. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, Woodworth T, Alten R: **Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial.** *Lancet* 2008, **371**:987-997.
18. Brinckerhoff CE, Coffey JW, Sullivan AC: **Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid.** *Science* 1983, **221**:756-758.
19. Nozaki Y, Yamagata T, Sugiyama M, Ikoma S, Kinoshita K, Funachi M: **Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis.** *Clin Immunol* 2006, **119**:272-279.
20. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D: **Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease.** *Pathophysiology* 2005, **12**:167-181.
21. Sugita T, Furukawa O, Ueno M, Murakami T, Takata I, Tosa T: **Enhanced expression of interleukin 6 in rat and murine arthritis models.** *Int J Immunopharmacol* 1993, **15**:469-476.
22. Takagi N, Mihara M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Takeda Y, Ohsugi Y: **Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:2117-2121.
23. Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S: **T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis.** *J Exp Med* 2007, **204**:41-47.
24. Moulin D, Bianchi A, Boyault S, Sebillaud S, Koufany M, Francois M, Netter P, Jouzeau JY, Terlain B: **Rosiglitazone induces interleukin-1 receptor antagonist in interleukin-1beta-stimulated rat synovial fibroblasts via a peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-dependent mechanism.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:759-769.
25. Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS: **Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts.** *Methods Mol Med* 2007, **135**:365-375.
26. Schutt C: **Cd14.** *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**:545-549.
27. Bianchi A, Moulin D, Sebillaud S, Koufany M, Galteau MM, Netter P, Terlain B, Jouzeau JY: **Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14prostaglandin J2.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**:R1325-1337.
28. Chaturvedi P, Pratta M, Steplewski K, Connor J, Kumar S: **Functional characterization of an orphan nuclear receptor, Rev-ErbAalpha, in chondrocytes and its potential role in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:3513-3522.
29. Nagpal S, Chandraratna RA: **Vitamin A and regulation of gene expression.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998, **1**:341-346.

30. Zitnik RJ, Kotloff RM, Latifpour J, Zheng T, Whiting NL, Schwalb J, Elias JA: **Retinoic acid inhibition of IL-1-induced IL-6 production by human lung fibroblasts.** *J Immunol* 1994, **152**:1419-1427.
31. Motomura K, Ohata M, Satre M, Tsukamoto H: **Destabilization of TNF-alpha mRNA by retinoic acid in hepatic macrophages: implications for alcoholic liver disease.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, **281**:E420-429.
32. Uchimura K, Nakamuta M, Enjoji M, Irie T, Sugimoto R, Muta T, Iwamoto H, Nawata H: **Activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in rat Kupffer cells.** *Hepatology* 2001, **33**:91-99.
33. Kurokawa R, Soderstrom M, Horlein A, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld MG, Glass CK: **Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor.** *Nature* 1995, **377**:451-454.
34. Schrader M, Wyss A, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, LeMotte P, Carlberg C: **RXR-dependent and RXR-independent transactivation by retinoic acid receptors.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**:1231-1237.
35. Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, DeWitt DL, Saklatvala J: **Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels.** *J Immunol* 1997, **158**:3165-3173.
36. Han Z, Boyle DL, Auopperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS: **Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis.** *J Pharmacol Exp Ther* 1999, **291**:124-130.
37. Ho LJ, Lin LC, Hung LF, Wang SJ, Lee CH, Chang DM, Lai JH, Tai TY: **Retinoic acid blocks pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase production by down-regulating JNK-AP-1 signaling in human chondrocytes.** *Biochem Pharmacol* 2005, **70**:200-208.
38. Gao B, Calhoun K, Fang D: **The proinflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase, in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**:R172.
39. Hall JP, Kurdi Y, Hsu S, Cuzzo J, Liu J, Telliez JB, Seidl KJ, Winkler A, Hu Y, Green N *et al*: **Pharmacologic inhibition of tpl2 blocks inflammatory responses in primary human monocytes, synoviocytes, and blood.** *J Biol Chem* 2007, **282**:33295-33304.
40. Neff L, Zeisel M, Sibilia J, Scholler-Guinard M, Klein JP, Wachsmann D: **NF-kappaB and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci.** *Cell Microbiol* 2001, **3**:703-712.
41. Meyer LH, Pap T: **MAPK signalling in rheumatoid joint destruction: can we unravel the puzzle?** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**:177-178.
42. Thiel MJ, Schaefer CJ, Lesch ME, Mobley JL, Dudley DT, Teclle H, Barrett SD, Schrier DJ, Flory CM: **Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**:3347-3357.
43. Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM: **Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun.** *J Immunol* 2000, **165**:7199-7206.
44. Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H: **Transcriptional roles of CCAAT/enhancer binding protein-beta, nuclear factor-kappaB, and C-promoter binding factor 1 in interleukin (IL)-1beta-induced IL-6 synthesis by human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes.** *J Biol Chem* 1998, **273**:7620-7627.
45. Barchowsky A, Frleta D, Vincenti MP: **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* 2000, **12**:1469-1479.
46. Morel JC, Park CC, Zhu K, Kumar P, Ruth JH, Koch AE: **Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression.** *J Biol Chem* 2002, **277**:34679-34691.
47. Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S: **Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:2207-2211.
48. Piwien-Pilipuk G, MacDougald O, Schwartz J: **Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBPbeta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone.** *J Biol Chem* 2002, **277**:44557-44565.
49. Park BH, Qiang L, Farmer SR: **Phosphorylation of C/EBPbeta at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:8671-8680.
50. Nagpal S, Cai J, Zheng T, Patel S, Masood R, Lin GY, Friant S, Johnson A, Smith DL, Chandraratna RA *et al*: **Retinoid antagonism of NF-IL6: insight into the mechanism of antiproliferative effects of retinoids in Kaposi's sarcoma.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:4159-4168.
51. Pfahl M: **Nuclear receptor/AP-1 interaction.** *Endocr Rev* 1993, **14**:651-658.
52. Nagai H, Matsuura S, Bouda K, Takaoka Y, Wang T, Niwa S, Shudo K: **Effect of Am-80, a synthetic derivative of retinoid, on experimental arthritis in mice.** *Pharmacology* 1999, **58**:101-112.
53. Takahashi N, Liapi C, Anderson WB, Breitman TR: **Retinoylation of the cAMP-binding regulatory subunits of type I and type II cAMP-dependent protein kinases in HL60 cells.** *Arch Biochem Biophys* 1991, **290**:293-302.
54. Tournier S, Raynaud F, Gerbaud P, Lohmann SM, Anderson WB, Evain-Brion D: **Retinoylation of the type II cAMP-binding regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase is increased in psoriatic human fibroblasts.** *J Cell Physiol* 1996, **167**:196-203.

FIGURE 1

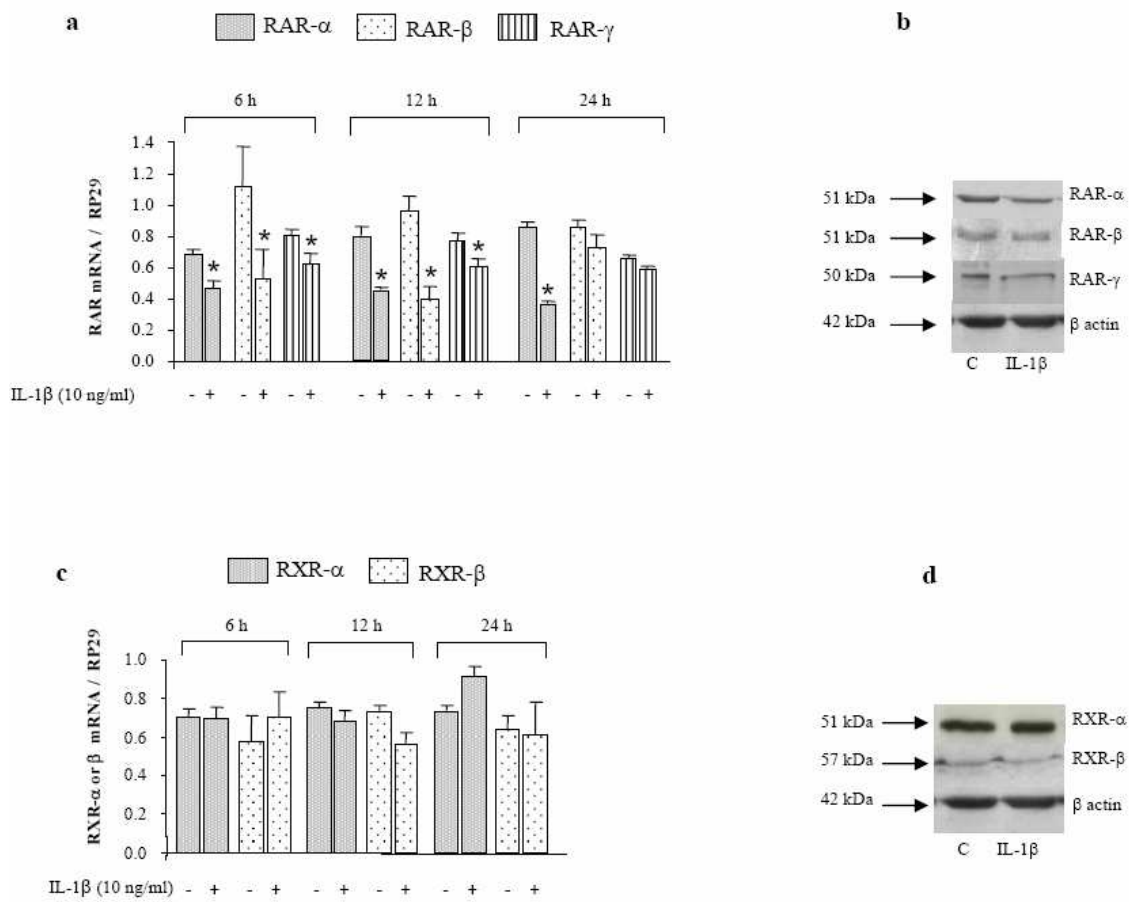
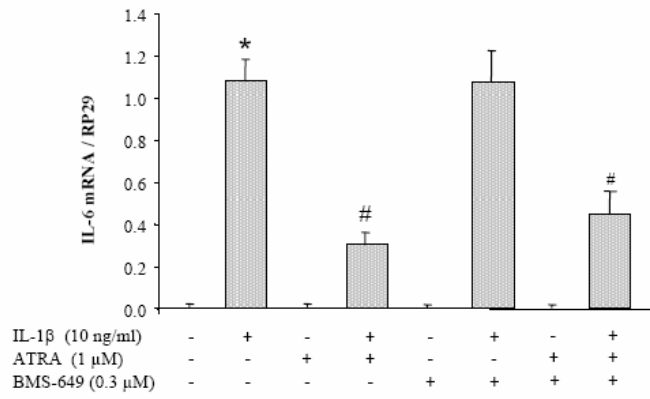
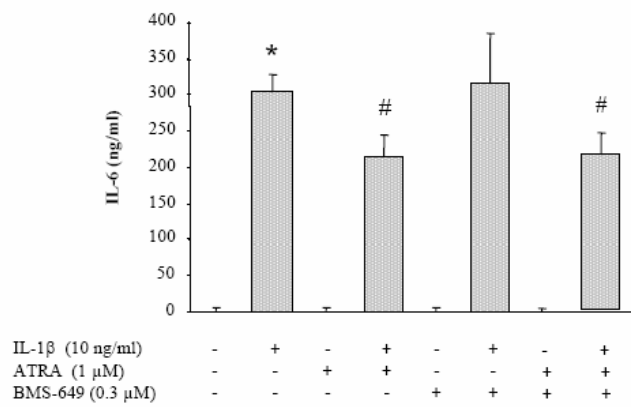


FIGURE 2

a

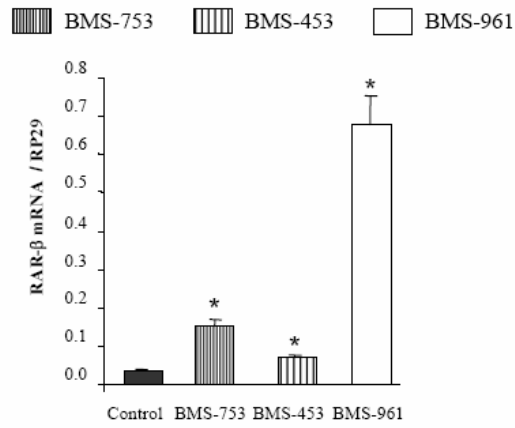


b



a

FIGURE 3



b

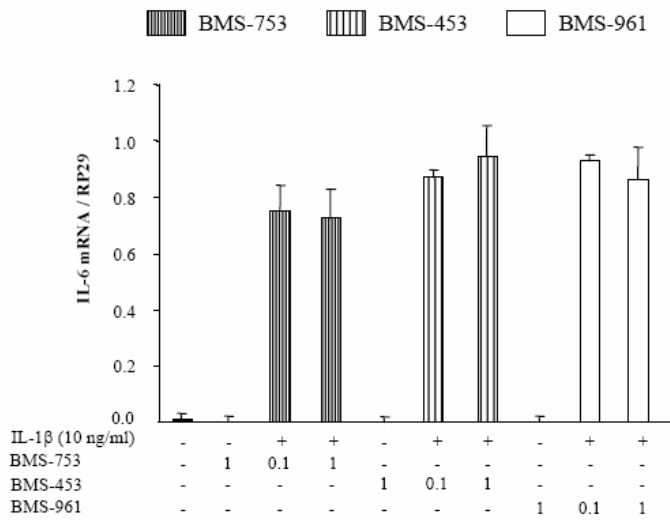
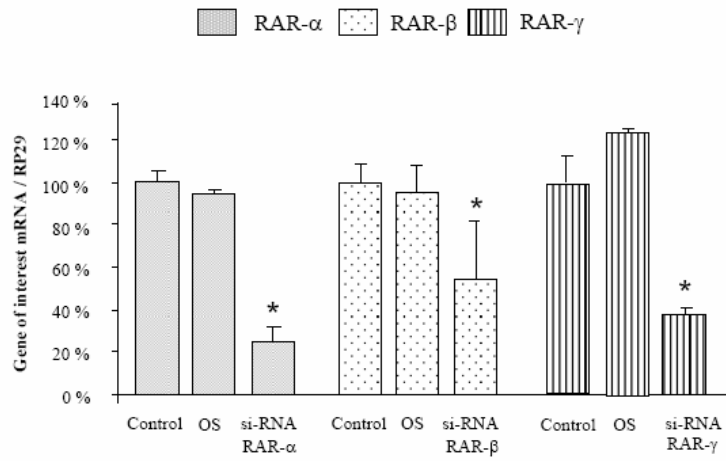


FIGURE 4

a



b

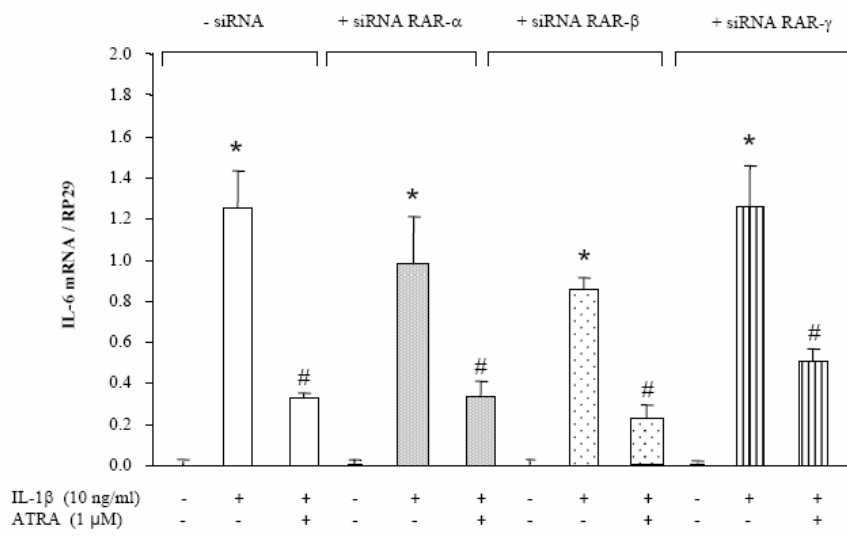


FIGURE 5

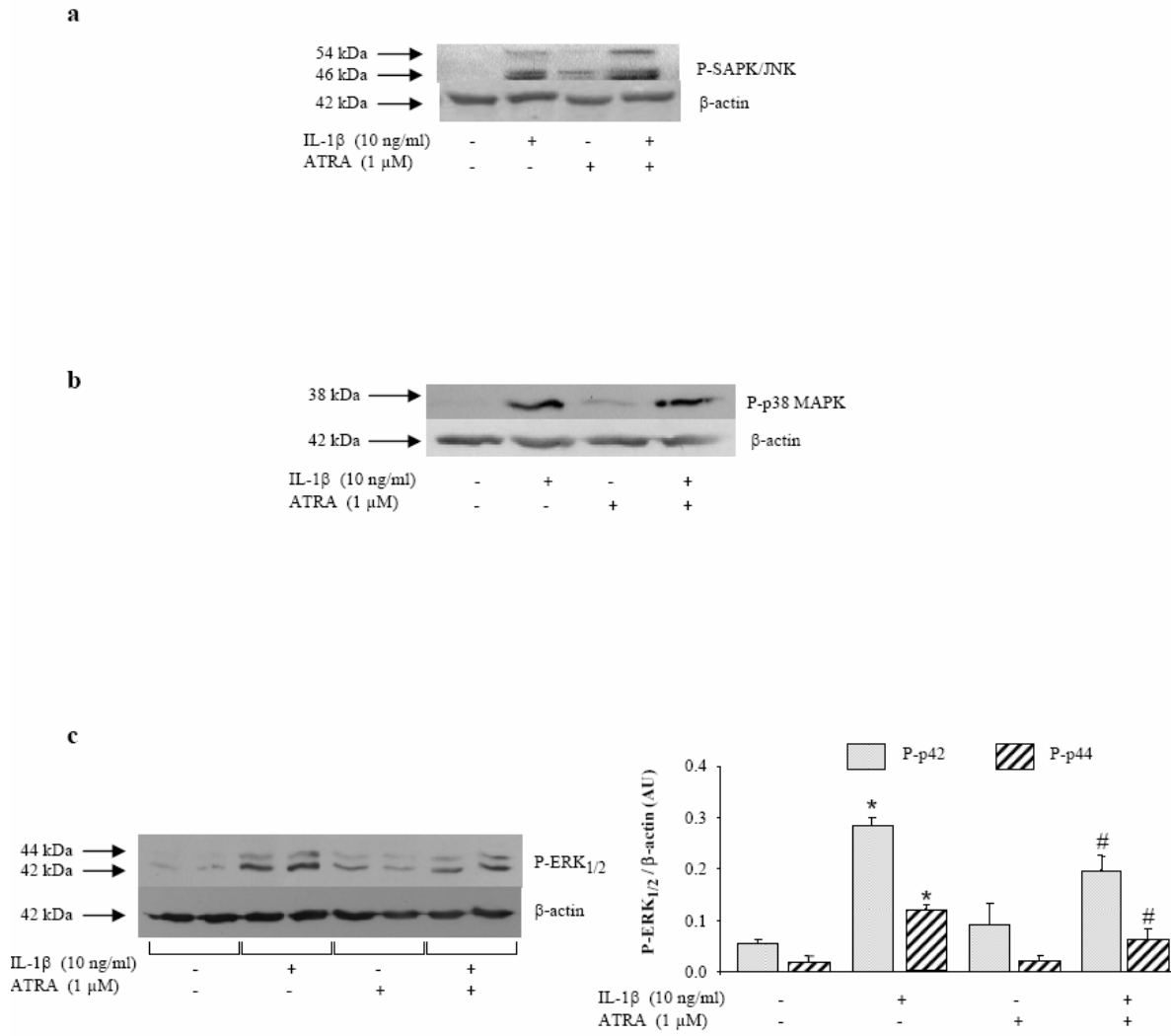
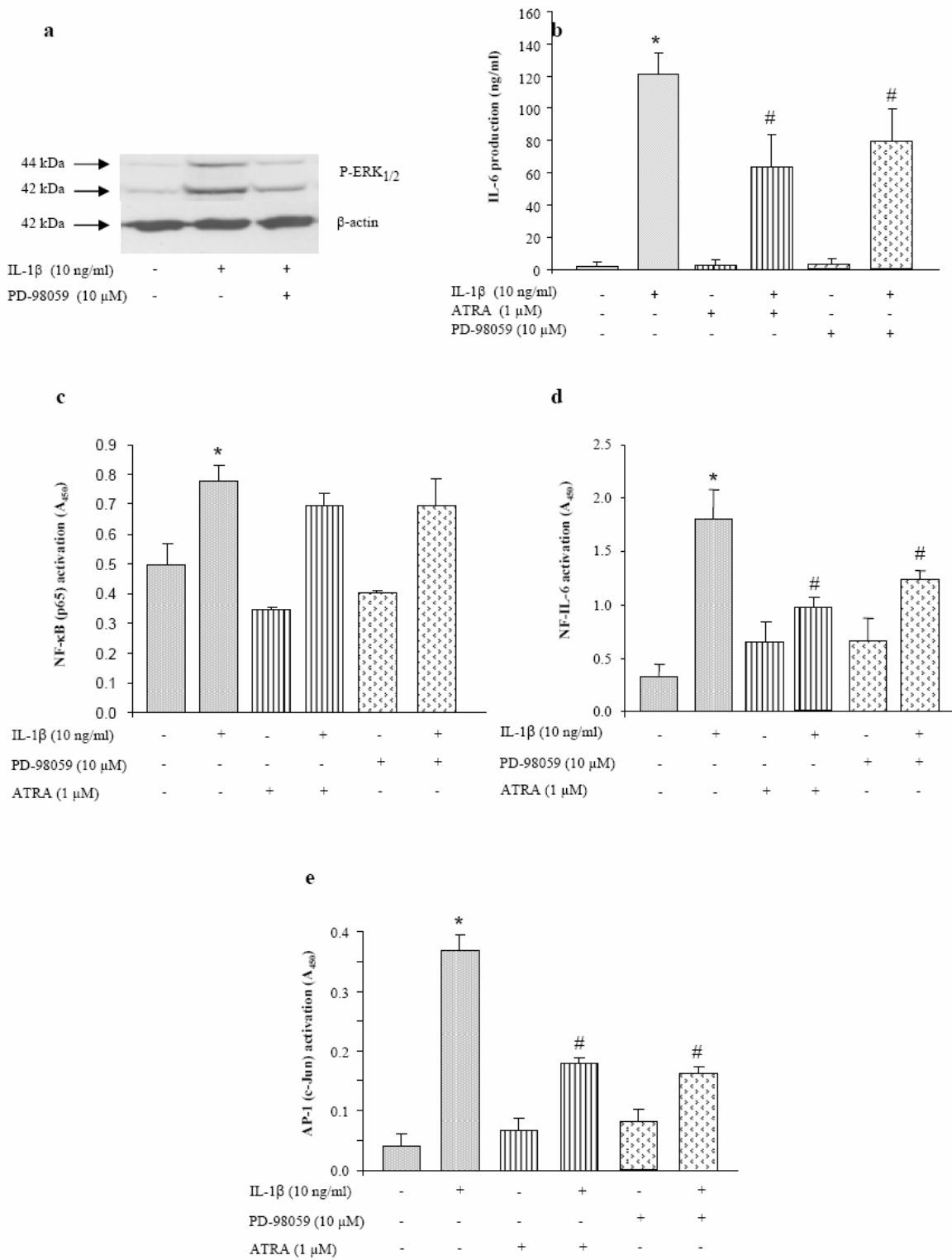


FIGURE 6





Evidence for species differences in the regulation of MMPs by all-*trans* retinoic acid in cytokine-stimulated chondrocytes

M. Kirchmeyer, J. Deffaud, S. Sebillaud, D. Moulin, M. Koufany, P. Netter, A. Bianchi*
and J.-Y. Jouzeau

*Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires (LPPA), UMR 7561 CNRS–Nancy
Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France*

Abstract. In inflammatory conditions, chondrocytes produce large amounts of matrix metalloproteinases (MMP) and nitric oxide (NO) thought to contribute to joint degradation. We tested the ability of all-*trans* retinoic acid (ATRA, a retinoic acid receptor (RAR) agonist) to modulate these inflammatory genes in chondrocytes from humans or rats, chosen as representative of animal models of arthritis. All RAR subtypes and RXR- α or - β were expressed at the mRNA level in both species, although IL-1 β (10 ng/ml) inhibited RAR subtypes more markedly in rat than in human cells. ATRA (300 or 1000 nM) inhibited IL-1-induced expression of iNOS and nitrites level in both species, although the NO pathway was induced maximally in rat cells. ATRA displayed controversial effects on MMPs between rat and human chondrocytes, especially for MMP-9 expression. The effects of ATRA were irrelevant to the nuclear translocation of AP-1. The present data underlines that retinoids have a species-dependent impact on IL-1-induced responses in chondrocytes, suggesting that extrapolation of their pharmacological properties from animal cells has a poor relevance to clinical situation.

Keywords: Rheumatoid arthritis, all-*trans* retinoic acid, metalloproteinases, AP-1

1. Introduction

Cartilage destruction is a common finding of several rheumatic diseases, which is generally thought to be a primary event in osteoarthritis (OA) or to be secondary to synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). RA is a chronic immune-mediated inflammatory disease affecting approximately 1% of the population worldwide [90]. It is characterized by a chronic inflammation of the synovial membrane which organizes into an invading pannus able to overlay cartilage surfaces and to destroy cartilage, bone and tendons. The pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1, play a key pathophysiological role in RA, and anti-TNF- α [38] or recombinant IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) [22] therapies have proven their ability to reduce acute flares and/or to slow the radiographic progression of the disease. Most of the cytokine-induced destruction of joint tissues is thought to be

*Address for correspondence: Arnaud Bianchi, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires (LPPA), UMR 7561 CNRS–Nancy Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 39 68; Fax: +33 3 83 68 39 59; E-mail: arnaud.bianchi@medecine.uhp-nancy.fr.

supported by members of the matrix metalloproteases (MMP) family displaying a catalytic and catabolic activity towards extra cellular matrix components [13,56,60].

MMPs can be classified into 6 main classes [10,13,87], including the collagenases (MMP-1, -8 and -13), the gelatinases (MMP-2 and -9), the stromelysins (MMP-3, -10 and -11), the matrilysins (MMP-7 and -26), the membrane-type MMPs (MMP-14, -15, -16, -17, -24 and -25) and a class of various MMPs. Each of them is synthesized and secreted as a latent form which can be activated by the removal of a 80 amino acids N-terminal domain. In physiological conditions, MMPs maintain connective tissue homeostasis in a wide range of biological functions [10], but their excessive production and activation in response to pro-inflammatory cytokines contribute to cartilage destruction in RA [58,74,89,91].

Thus, collagenases are prone to cleave fibrillar collagens and especially MMP-13 which is the most efficient against type II collagen [46,61]. MMP-13 is expressed more importantly in OA than in normal chondrocytes [61] and has been localised to both rheumatoid and OA cartilage [30,63,85]. As it is also able to cleave aggrecan, a proteoglycan important for the physiological resiliency of articular cartilage [13,56,60], MMP-13 is thought to play a pivotal role in accelerated cartilage turnover. Therefore, the targeting of MMP-13 and -1 has been proposed as attractive molecular therapeutics for joint diseases [13, 56]. Amongst stromelysins, MMP-3 can degrade a number of extracellular matrix components with an exquisite catalytic activity towards proteoglycans. It is highly induced by the pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α in rheumatoid synovium, and serum MMP-3 level is a clinically relevant marker for predicting joint destruction and evaluating disease activity in RA [16,53,75]. Gelatinases (MMP-2 and -9) also contribute to cartilage degradation as their serum levels correlate with the score of disease activity in RA patients [31], although their degrading activity is rather effective on triple helix breaks than on native collagen fibres. Moreover, MMP-2 is expressed constitutively whereas MMP-9 is inducible in chondrocytes [62].

Retinoids are natural or synthetic analogues of vitamin A whose effects are secondary to their binding to two nuclear receptors: retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR). Each of these receptors is divided into three subtypes referred as RAR- α , - β or - γ and RXR- α , - β or - γ , which are encoded by separate genes, although additional isoforms can be produced by differential splicing (RAR- α 1, - α 2, RAR- γ 1, - γ 2...) [49]. After retinoids binding, RAR and RXR form a homo or a heterodimer, and recruit co-activators allowing them to become in an active conformation. These RAR/RXR complexes can regulate expression of target genes by at least two mechanisms: a direct binding to DNA on a RAR responsive element (RARE) or a RXR responsive element (RXRE), or the sequestration of transcription factors like activator protein 1 (AP-1) or NF-IL-6 without binding to DNA. Amongst natural retinoids, all-*trans* retinoic acid (ATRA) and its 9-*cis* isomer (9-*cis* RA) are the most biologically active derivatives. ATRA and other retinoids play a major role in a wide range of physiological pathways such as cell proliferation, embryogenesis, differentiation, morphogenesis, inflammation... (for review see [55]). Some compounds have entered the clinics for the treatment of acne, psoriasis, acute promyelocytic leukaemia and some head or neck cancers, with a good efficacy [18,84,92,94]. Besides, ATRA has also been shown to decrease disease severity in mouse with collagen-induced arthritis together with collagenase activity in arthritic joints [71]. Furthermore, Brinckerhoff et al. reported that rat developing adjuvant arthritis had a less severe inflammatory reaction and a reduced MMP-1-like production in arthritic paws when they were treated with 13-*cis* RA (a pan-RAR agonist) [9]. These data in rodent models demonstrate that retinoids display an anti-arthritic potency which is linked likely to their ability to inhibit MMP synthesis and/or activation. However, retinoids were shown paradoxically to increase MMP-13 activity in bovine [82], human and porcine cartilage [32], MMP-3 activity in human and porcine cartilage [32], or MMP-2 activity in avian growth plate chondrocytes [69]. So, the ability of

retinoids to prevent possibly cartilage destruction by the modulation of MMPs remains doubtful and/or may be confused by species differences.

As preclinical pharmacodynamics in rodent models of arthritis is a pre-requisite for the development of antirheumatic drugs [67], we planed to search for possible species differences between rats and humans in the ability of ATRA, a RAR agonist, to modulate MMPs and the inflammatory gene iNOS in cytokine-stimulated chondrocytes cultures.

2. Materials and methods

2.1. Chondrocyte isolation and culture

Rat articular cartilage was obtained from femoral head caps of healthy Wistar male rats (130–150 grams, Charles River, L'Arbresle, France) killed under anesthesia (ketamine (Rhône-Mérieux, Lyon, France) and acepromazine (Sanofi Santé Animale, Paris, France)) in accordance with national animal care guidelines, after approval by our internal ethics committee. Human cartilage samples were obtained from OA patients undergoing hip or knee joint surgery. Chondrocytes were isolated by sequential enzymatic digestion with aqueous solutions of pronase (2% w/v) for 2 hours at 37°C, then collagenase B (1.5% w/v) overnight (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). The cells pellets were collected by centrifugation for 5 min at 240g and resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/NUT MIX F12, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) supplemented with 2 mM of L-glutamine (Invitrogen), 100 units/ml of penicillin (Invitrogen), 100 µg/ml of streptomycin (Invitrogen), 250 ng/ml of amphotericin B (Invitrogen) and heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Invitrogen) at a final concentration of either 10% (v/v) during subculturing or 1% FCS during experiments. Then, cells were cultured in 75 cm² flasks, at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% of CO₂. Cells were used at the first passage, in order to maintain the chondrocyte phenotype.

2.2. Study design

Human or rat chondrocytes cultured in monolayers under low FCS conditions were stimulated with 10 ng/ml of human (h) or rat (r) recombinant IL-1β respectively (Sigma), in the presence or absence (vehicle alone, 0.1% of dimethylsulfoxide (DMSO) final concentration) of 300 or 1000 nM of ATRA, a natural RAR agonist (Sigma). The messengers RNA (mRNA) levels for RAR-α, -β or -γ, RXR-α or -β, iNOS and MMP-3, -9 or -13, were determined 6 hours after IL-1β challenge in human or rat cells, whereas the production of NO_x and total MMP activity were assayed in culture supernatants at 24 hours.

2.3. Assay for chondrocytes viability

Cell viability was assessed by the mitochondrial-dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) into formazan [39]. Briefly, after stimulation with IL-1β for 24 hours at 37°C in the presence or absence of ATRA, chondrocytes were incubated with MTT (1 mg/ml final concentration) for 4 hours at 37°C before the addition of lysis buffer (20% w/v SDS in 50% aqueous solution of dimethylformamide, pH 4.7). After 24 hours of incubation at 37°C, solubilization of formazan crystals was quantified by measuring A₅₈₀ on a Multiskan™ microplate reader (Labsystems, Montigny-le-Bretonneux, France).

2.4. RNA extraction and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

After stimulation with IL-1 β for 6 h at 37°C, in the presence or absence of ATRA, total RNA was extracted from cell layers using RNeasy extraction kit, according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, Courtabœuf, France). RNAs were recovered in ultrapurified water and quantified by measuring A₂₆₀ with a Shimadzu™ UV-1601 spectrophotometer (Sciences Tec, Les Ulis, France). The quality of extracted RNAs was controlled by verifying that the ratio A₂₆₀/A₂₈₀ was over 1.8. Synthesis of cDNAs was performed from 2 μ g of total RNA with incubation buffer (Invitrogen) containing Tris/HCl buffer 250 mM at pH 8.3, KCl 375 mM and MgCl₂ 15 mM, hexamer random primers (0.2 μ g/ μ l), dithiothreitol 10 mM, and 200 units of Moloney Murine Leukæmia Virus reverse transcriptase (Invitrogen). The mix was incubated for 90 min at 37°C, then for 5 min at 95°C to inactivate the enzyme. The cDNAs were kept at -20°C until use for real-time PCR.

The mRNA levels for RAR- α , - β or - γ , RXR- α or - β , iNOS, MMP-3, -9 or -13, were quantified by real time qPCR in capillaries with the Lightcycler™ technology (Roche Molecular Biochemicals). The reaction mixture was composed of cDNAs, SYBR green master mix system® (Qiagen), and 0.5 μ M of primers pairs specific for the DNA fragments to be amplified. The sequences of the primers used, annealing temperatures and corresponding products length are listed in Table 1 for rat genes and in Table 2 for human genes. The quantity of each cDNA was estimated by *C_t*, defined as the number of cycles corresponding to the moment where the fluorescence, secondary to SYBR green incorporation into double-stranded DNA became detectable at the end of the PCR elongation phase. At completion of PCR cycling, a melting curve was performed by increasing the temperature from 65°C to 95°C at a rate of 0.1°C/s in order to control the specificity of each amplified product. The size of each amplicon was

Table 1
Characteristics of the molecular tools used to study the expression of rat genes in chondrocytes

Rat genes	Sequences (5'-3')	GenBank accession number	Amplicon length (Pb)	T _m (°C)
RP29	S: 5'-AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTC TAC TG-3' AS: 5'-AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA-3'	NM_012876	107	59
RAR- α	S: 5'-ACC AGA TTA CCC TTC TCA AGG-3' AS: 5'-GGT ACC GCG TGC AGA TT-3'	BC_099830	65	58
RAR- β	S: 5'-TCT TAA TGA AAA TCA CAG ATC TCC GC-3' AS: 5'-CCA GGA ATT TCC ATT TTC AAG G-3'	XM_223843	81	58
RAR- γ	S: 5'-AGT GCT ATC TGC CTC ATC T-3' AS: 5'-TTG TCC ACC TTC TCG GGT TC-3'	XM_001062412	62	57
RXR- α	S: 5'-GAA GCG TAC TGC AAA CAC AAG-3' AS: 5'-CAG CCG GAG CAG CAG CTT GG-3'	NM_012805	66	62
RXR- β	S: 5'-CTT CAT GTG CAC AGA AAC T-3' AS: 5'-TCT GTC AGC ACC CGA TCA AA-3'	NM_206849	68	55
iNOS	S: 5'-AAT GCG GAA GGT CAT GGC-3' AS: 5'-CGA CTT TCC TGT CTC AGT AGC AAA-3'	NM_012611	66	60
MMP-3	S: 5'-GCT CAT CCT ACC CAT TGC AT-3' AS: 5'-GCT TGT GCA TCA GCT CCA TA-3'	NM_133523	219	58
MMP-9	S: 5'-CCA CCG AGC TAT CCA CTC AT-3' AS: 5'-GTC CGG TTT CAG CAT GTT TT-3'	NM_031055	159	58
MMP-13	S: 5'-AGG CCT TCA GAA AAG CCT TC-3' AS: 5'-GAG CTG CTT GTC CAG GTT TC-3'	XM_343345	226	58

Table 2
Characteristics of the molecular tools used to study the expression of human genes in chondrocytes

Human genes	Sequences (5'-3')	GenBank accession number	Amplicon length (Pb)	T _m (°C)
RP29	S: 5'-AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTC TAC TG-3' AS: 5'-AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA-3'	NM_001013	107	59
RAR- α	S: 5'-ACC AGA TTA CCC TTC TCA AGG-3' AS: 5'-GGT ACC GCG TGC AGA TT-3'	NM_000964	64	58
RAR- β	S: 5'-TCT TAA TGA AAA TCA CAG ATC TCC GC-3' AS: 5'-CCA GGA ATT TCC ATT TTC AAG G-3'	NM_000965	81	58
RAR- γ	S: 5'-TGG CTA CCA AGT GCA TCA TC-3' AS: 5'-AAT GCT GAG CCC TGT AAA GC-3'	NM_000966	70	60
RXR- α	S: 5'-TAG TCG CAG ACA TGG ACA CC-3' AS: 5'-TTC ACC TGG GTG GAG AAA TC-3'	BD_391691	57	61
RXR- β	S: 5'-TCC CAC ACT TTT CCT CCT TG-3' AS: 5'-TCA ATG GAT CGG TGT GAA AA-3'	NM_021976	99	58
iNOS	S: 5'-ACA AGC CTA CCC CTC CAG AT-3' AS: 5'-TCC CGT CAG TTG GTA GGT TC-3'	NM_000625	157	59
MMP-3	S: 5'-GCA GTT TGC TCA GCC TAT CC-3' AS: 5'-GAG TGT CGG AGT CCA GCT TC-3'	NM_002422	213	59
MMP-9	S: 5'-CAT CGT CAT CCA GTT TGG TG-3' AS: 5'-AGG GAC CAC AAC TCG TCA TC-3'	NM_004994	140	58
MMP-13	S: 5'-TGG TGG TGA TGA AGA TGA TTT G-3' AS: 5'-TCT AAG CCG AAG AAA GAC TGC-3'	NM_002427	161	57

controlled on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml). Each experiment included positive and negative reaction controls, and *C_t* were converted into nanograms of DNA using calibration curves made of serial dilutions of known amounts of corresponding purified PCR products. The transcript level of the housekeeping gene ribosomal protein S29 (RP29) was determined in parallel for each sample and data were expressed as the normalized ratio of mRNA level of each gene of interest over the RP29 gene.

2.5. MMP fluorimetric assay

After stimulation with IL-1 β for 24 hours at 37°C, in the presence or absence of ATRA, total MMP activity was quantified in culture supernatants using a fluorogenic substrate [47]. Briefly, latent MMPs were activated by adding 50 μ l of 4-aminophenylmercuric acetate (APMA (Sigma), 1.5 mM in Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) reaction buffer containing 15 mM NaCl and 5 mM CaCl₂) to 50 μ l of culture supernatant. Then, 50 μ l of the fluorogenic MMP substrate DNP-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-NH₂ (Calbiochem, Nottingham, UK) was added to a final concentration of 30 μ M. After 4 hours of incubation in darkness at 37°C, MMP-induced cleavage of substrate was measured with a Fluostar Optima™ spectrofluorimeter (BMG Labtechnologies, Champigny-sur-Marne, France) at excitation and emission wavelengths of 280 nm and 360 nm, respectively. Data were expressed in arbitrary units of fluorescence.

2.6. Nitrites assay

NO production was determined spectrophotometrically by measuring the accumulation of nitrites in culture supernatants by the Griess reaction [37]. Briefly, 100 μ l of culture supernatant were mixed with

100 μl of Griess reagent (sulfanilamide (1%) in 2.5% of H_3PO_4 and N-naphtylethylenediamine dihydrochloride (0.1%) in H_2O) for 5 min at room temperature. The formation of the pink diazoic complex was quantified by measuring A_{550} on a Multiskan™ microplate reader (Labsystems). Nitrite concentrations were calculated with a standard curve of sodium nitrite ranging from 0 to 50 μM . The limit of quantification of the method was determined to be 1 μM in our experimental conditions.

2.7. Preparation of nuclear extracts

Chondrocytes stimulated with IL-1 β for 30 min at 37°C, in the presence or absence of ATRA, were used for the preparation of nuclear extracts according to the manufacturer's recommendations (Active Motif, Rixensart, Belgium). Briefly, $(2-3) \times 10^6$ cells were washed with ice-cold PBS containing phosphatase inhibitors, then scraped off the culture flasks and transferred into pre-chilled tubes. Cells were pelleted by centrifugation at 250g for 5 min, then resuspended in hypotonic buffer and kept on ice for 15 min. After addition of detergents, nuclear fractions were collected by centrifugation at 14,000g for 30 s. The nuclear pellets were resuspended in complete lysis buffer, then incubated on ice for 30 min and centrifuged at 14,000g for 10 min. Supernatants containing the nuclear fractions were collected and stored at -80°C until protein or transactivation assays.

2.8. Quantification of nuclear proteins

The protein concentration of each nuclear extract was determined with a bicinchoninic acid assay kit (BCA™ protein assay kit, Sigma). Briefly, samples were diluted 10 times in distilled water, then added to a 96-wells plate in a final volume of 10 μl per well. Then, 200 μl of a mixture of 50 volumes of Reagent A (sodium carbonate-sodium bicarbonate-BCA-sodium tartrate-NaOH 0.1 M, Sigma) and one volume of Reagent B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -4%, Sigma) were added in each well, and the plate was shaken for 5 s then incubated for 30 min at 37°C. The formation of the purple-colored BCA-copper complex was quantified by measuring A_{550} on a Multiskan™ microplate reader (Labsystems), using a calibration curve with bovine serum albumin (Sigma) as a standard.

2.9. ELISA-based TransAM™ kit for AP-1 c-jun

Nuclear extracts were checked for activation of AP-1 pathway using an enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA)-based kit against c-jun (TransAM™, Active Motif Europe, Rixensart, Belgium). Briefly, 10 μg of nuclear proteins containing AP-1 transcription factors were added in a volume of 20 μl to a well plate pre-coated with the oligonucleotide (5'-TGAGTCA-3') corresponding to TPA-response element (TRE). After 1 hour of incubation at room temperature with mild agitation, wells were washed three times with washing buffer (100 mM PBS, pH 7.5, 500 mM NaCl and 1% Tween 20) then incubated for 1 hour at room temperature with a primary antibody against phosphorylated c-jun (1:500). After three additional washings with buffer, the TRE/AP-1/c-jun antibody complex was revealed by incubation with a secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody for one hour at room temperature. After 4 final washings with buffer, 100 μl of developing solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution diluted in 1% DMSO) were added to each well and the reaction was stopped by the addition of 100 μl of 0.5 M H_2SO_4 after 5 min of incubation in the dark. The amount of c-jun protein in nuclear extracts was quantified by measuring A_{450} on a Multiskan™ microplate reader (Labsystems). The specificity of the assay was controlled by demonstrating that the addition of an excess of wild-type consensus TRE (20 pmol/well) prevented AP-1 binding onto the well whereas an excess of mutated consensus TRE remained ineffective.

2.10. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of at least 3 independent assays. Comparisons were made by analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's protected least-squares difference (PLSD) *post-hoc* test, using StatView™ version 5.0 software (SAS Institute Inc., USA). A value of p less than 0.05 was considered as significant ($*p < 0.05$ vs. control or $^{\#}p < 0.05$ vs. IL-1 β).

3. Results

3.1. Effect of IL-1 β on the expression of RAR or RXR subtypes

Preliminary experiments using the MTT assay showed no loss of cell viability in rat or human chondrocytes stimulated with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β , in the presence or absence of ATRA at the concentrations used (data not shown). As shown in Fig. 1, the mRNAs for all RAR subtypes (Fig. 1(a)) and for RXR- α or - β (Fig. 1(b)) were detected in chondrocytes from both species under basal

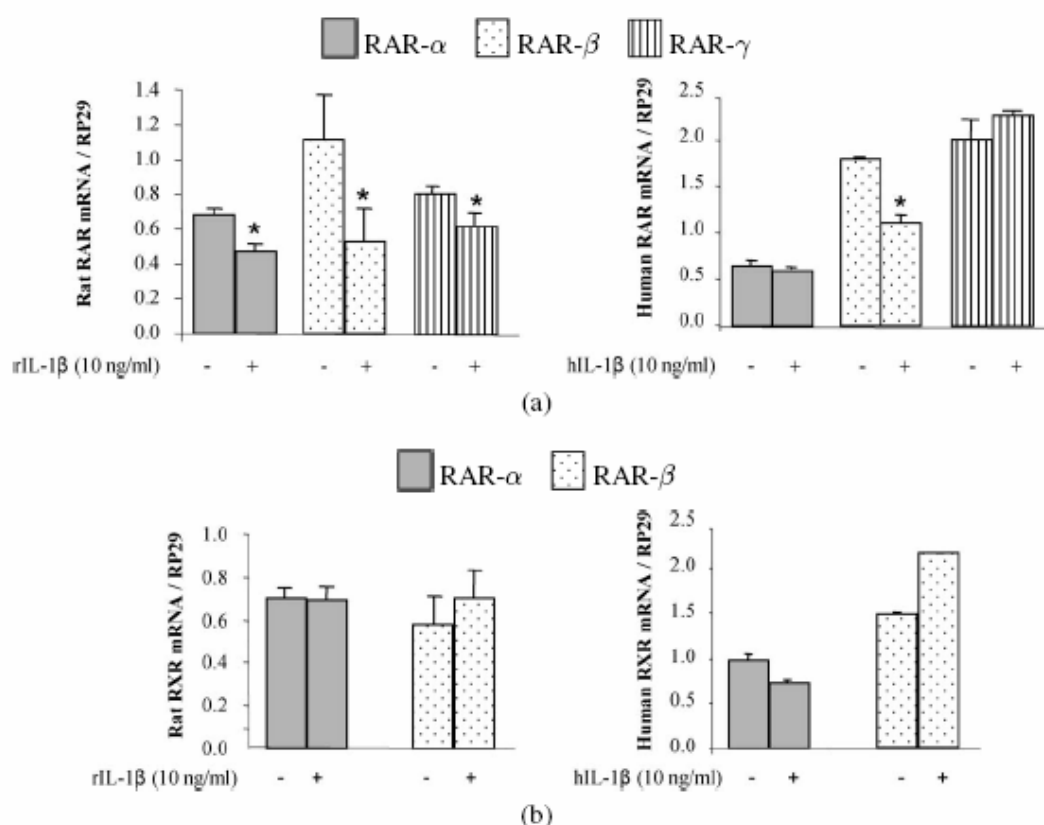


Fig. 1. Effect of IL-1 β on the expression of RAR and RXR isotypes in chondrocytes. Rat or human cell monolayers were stimulated with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β for 6 hours. Data are expressed as mean \pm SD of normalized mRNA level quantified by real-time PCR from at least three independent experiments. (a) RAR(- α , - β , - γ) expression; (b) RXR(- α , - β) expression. Statistically significant differences from the control are indicated as $*p < 0.05$.

conditions, whereas RXR- γ was lacking. In response to a stimulation of 6 hours with IL-1 β , the mRNA level of RAR decreased from 25% for the α or γ subtypes to 55% for the β subtype (Fig. 1(a)) in rat chondrocytes. In human cells, RAR- α and RAR- γ mRNA levels were not affected by IL-1 β challenge, but the expression of RAR- β decreased by 30% (Fig. 1(a)). In both species, the mRNA level of RXR- α or - β was not affected by IL-1 β stimulation (Fig. 1(b)).

3.2. Effect of ATRA on inducible NO pathway in IL-1 β -stimulated chondrocytes

As shown in Fig. 2, iNOS mRNA level was not detected in basal conditions but was induced by IL-1 β in both species (Fig. 2(a)). Consistently, the release of nitrites in culture supernatants was low ($2.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ in rat cells) or undetectable (human cells) in basal conditions but was strongly enhanced by IL-1 β in rat chondrocytes ($23.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$) while becoming detectable ($2.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$) in human chondrocytes (Fig. 2(b)). These data highlighted that IL-1 β stimulated inducible NO pathway more actively in rat than in human cells. In IL-1 β -stimulated chondrocytes, ATRA decreased iNOS mRNA

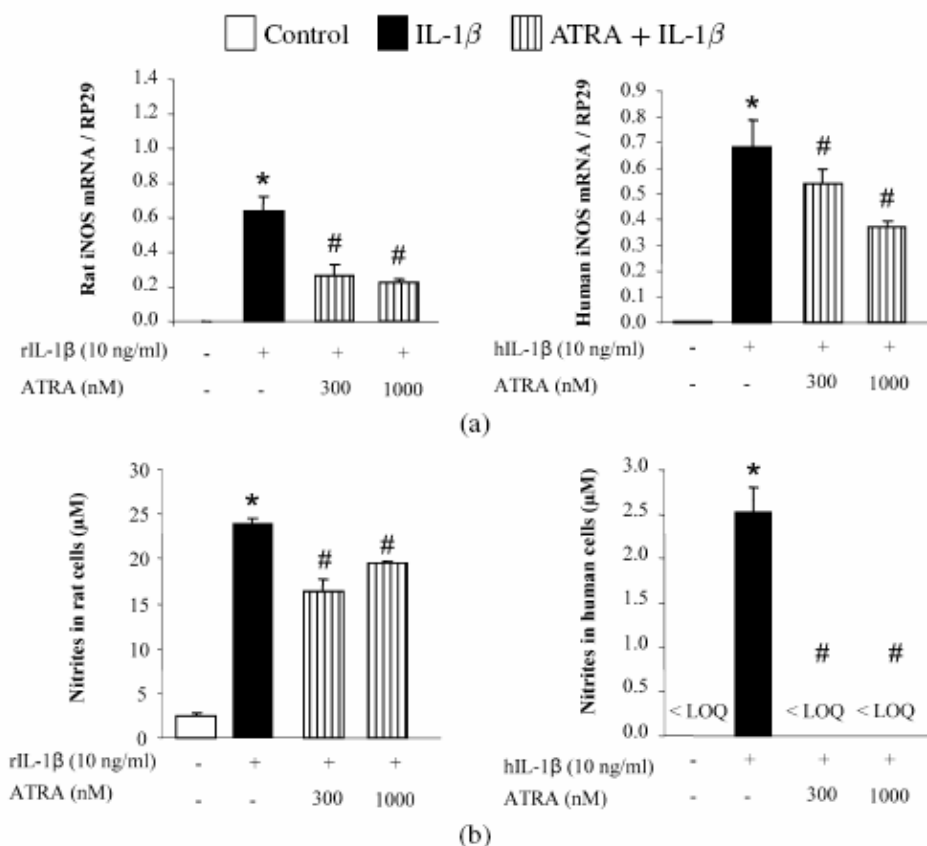


Fig. 2. Effect of ATRA on inducible NO pathway in IL-1-stimulated chondrocytes. Rat or human chondrocytes were stimulated with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β , in the presence or absence of 300 or 1000 nM of ATRA. (a) iNOS mRNA level determined 6 hours after IL-1 challenge by real-time PCR and normalized to RP29; (b) Nitrites level in culture supernatants determined 24 hours after IL-1 challenge by the Griess reaction. Data are expressed as mean \pm SD of values from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as * $p < 0.05$, and from IL-1 β stimulated cells as # $p < 0.05$. LOQ: limit of quantification of the method.

level from 60 to 65% in rat cells and from 20 to 45% in human cells (Fig. 2(a)), whereas stimulated nitrite levels decreased from 20 to 30% and below control level respectively (Fig. 2(b)). These inhibitory effects were in the same range for the two concentrations of ATRA tested.

3.3. Effect of ATRA on IL-1 β -induced expression of MMPs

As shown in Fig. 3, the mRNA levels for MMP-3 (Fig. 3(a)), MMP-9 (Fig. 3(b)), or MMP-13 (Fig. 3(c)), were not detected in resting chondrocytes from both species, but were induced by 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β . In rat IL-1 β -stimulated chondrocytes, ATRA increased the mRNA level for MMPs around 1.4-fold for MMP-3 (Fig. 3(a)), 2.2-fold for MMP-13 (Fig. 3(c)) or 5.5-fold for MMP-9 (Fig. 3(b)). In contrast, ATRA did neither change the mRNA level for MMP-3 (Fig. 3(a)) nor for MMP-13 (Fig. 3(c)), and even reduced the mRNA level for MMP-9 (Fig. 3(b)) in human IL-1 β -stimulated cells. In both species, the effect of ATRA was in the same range for the two concentrations used. These data demonstrated that the effect of ATRA on IL-1 β -induced responses was different or opposite between rat and human chondrocytes for the three MMPs studied.

3.4. Effect of ATRA on IL-1 β -induced MMP activity

As indicated in the material and methods section, MMP activity was measured after activation of pro-enzymes by chemicals, therefore accounting for both latent and active matrix degrading enzymes in culture supernatants. As shown in Fig. 4, the stimulation of rat (Fig. 4(a)) or human (Fig. 4(b)) chondrocytes with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β increased total MMP activity by 3-fold. In IL-1 β -stimulated cells, ATRA was inactive on MMP activity in rat chondrocytes (Fig. 4(a)) but was inhibitory in human chondrocytes in an apparently dose-related manner (Fig. 4(b)).

3.5. Effect of ATRA on IL-1 β -induced activation of AP-1

As shown in Fig. 5, stimulation of rat or human chondrocytes with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β increased the amount of activated c-jun in nuclear extracts by 2-fold. These data indicated that IL-1 activated efficiently AP-1 pathway in our experimental system. In both species, the highest concentration of ATRA failed to prevent IL-1 β -induced activation of c-jun in chondrocytes, while leaving its basal level unaffected in unstimulated controls.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that RAR and RXR subtypes were expressed in rat and in human chondrocytes at the transcriptional level. The expression of RAR- α was not unexpected due to its ubiquitous expression [34]. Other RAR subtypes were demonstrated previously to have a more restricted panel of expression in heart, brain or liver for RAR- β and epidermis for RAR- γ [34]. Nonetheless, our data confirm the recent demonstration that all RAR subtypes were expressed in human OA chondrocytes, with a maximal mRNA level for RAR- γ [15]. This finding is complementary to a previous report in mouse embryos [79] where RAR- γ was localized in precartilaginous mesenchyme and chondrified structures (at the day 12.5 post coitum), and after 13.5 days in cartilage cell lineage of mice [79]. Taken together, these data are in favour of a major role of RAR- γ as a signal transducer of ATRA in mature

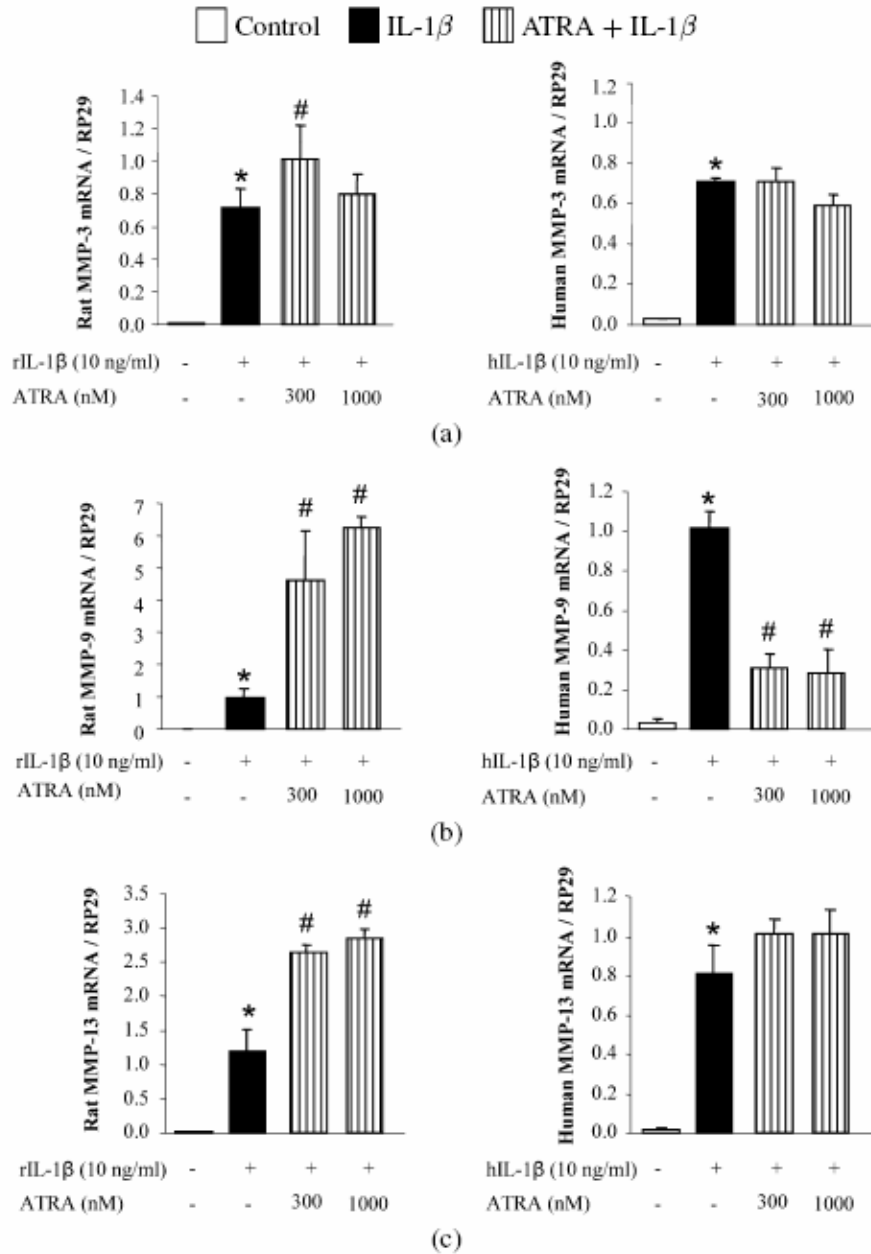


Fig. 3. Effect of ATRA on IL-1-induced expression of MMPs in chondrocytes. Rat or human chondrocytes were stimulated for 6 hours with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β , in the presence or absence of 300 or 1000 nM of ATRA. Data are expressed as mean \pm SD of normalized mRNA level quantified by real-time PCR from at least three independent experiments. (a) MMP-3 expression; (b) MMP-9 expression; (c) MMP-13 expression. Statistically significant differences from the control are indicated as * p < 0.05, and from IL-1 β stimulated cells as # p < 0.05.

chondrocytes and may support its well-known differentiating effects during chondrogenesis and cartilage differentiation. Concerning RXR subtypes, RXR- α was predominantly expressed in liver, kidney,

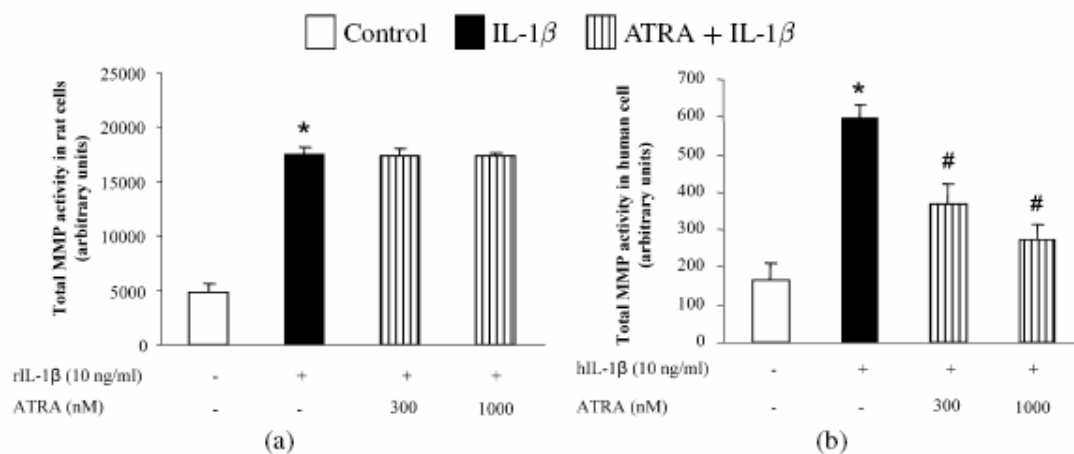


Fig. 4. Effect of ATRA on IL-1-induced MMP activity in chondrocytes. Rat (a) or human (b) chondrocytes were stimulated for 24 h with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β , in the presence or absence of 300 or 1000 nM of ATRA. Total MMP activity was analyzed by a fluorometric assay with DNP-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-NH₂ as a substrate (λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 360 nm). Data are expressed as mean \pm SD of MMP activity (fluorescence arbitrary units) from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as * p < 0.05, and from IL-1 β stimulated cells as # p < 0.05.

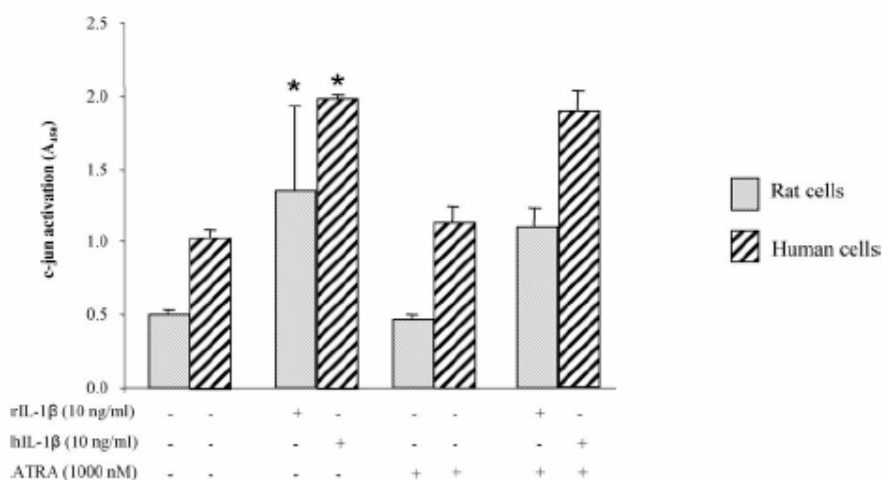


Fig. 5. Effect of ATRA on IL-1-induced activation of AP-1 in chondrocytes. Rat or human chondrocytes were stimulated for 30 min with 10 ng/ml of homolog recombinant IL-1 β , in the presence or absence of 1000 nM of ATRA. Activation of c-jun was measured in nuclear extracts by the ELISA-based TransAm™ kit. Data are expressed as mean \pm SD of A₄₅₀ from at least three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as * p < 0.05.

epidermis, and intestine, whereas RXR- β was widely distributed throughout the body (for a review see [34]). RXR- γ , which was not detected in chondrocytes, is known to be strongly expressed in skin. The lack of expression of RXR- γ mRNA in mature chondrocytes from both species confirmed the recent finding in human OA chondrocytes [15] and was in line with previous reports in rat Kupffer cells [73] or human bronchial smooth muscle cells [21]. This suggests that RXR- γ may have a restrictive expression compared to the other retinoid binding receptors.

In our experimental system, we demonstrated that IL-1 β decreased expression of all RAR subtypes in rat chondrocytes, but only of RAR- β in human cells, whereas RXR- α and - β mRNA levels remained unaffected in both species. These data were not unexpected since IL-1 β was reported to have a variable effect on RAR or RXR expression depending on the experimental model. Thus, transgenic mice overexpressing IL-1 β exhibited a reduced expression of RAR- γ , but a normal expression of other RAR subtypes compared to wild type animals [11]. In contrast, IL-1 β enhanced the ATRA-induced expression of RAR- β and RXR- β in rat intestinal cells [70], suggesting that the effect of IL-1 β may depend on the tissue and/or the species used. The IL-1-induced changes that were observed in our experimental system can lead to at least two proposals: (i) a RAR-dependent transcriptional event would be more altered than a RXR dependent one in IL-1-stimulated chondrocytes, (ii) the efficiency of RAR agonists would be more altered by IL-1 in rat than in human chondrocytes. The ability of an inflammatory stimulus to reduce RAR expression is shared by other nuclear receptors as peroxisome proliferators activated receptor gamma (PPAR- γ) in rat chondrocytes [7], or liver X receptor alpha in mouse kidney cells [88], and may result in a reduced efficiency of corresponding agonists. On the basis of the difference in RAR expression that we observed in IL-1-stimulated cells, RAR agonists were expected to be more active in human than in rat cells, all the more than RAR- β (solely repressed by IL-1 β in humans) contains a RARE in the promoter region of its gene which renders it highly inducible by RAR agonists (more than 3 times in IL-1-stimulated chondrocytes treated with ATRA vs. IL-1 β stimulation, data not shown). The fact that all RAR subtypes and RXR- α and - β were detected in rat and human chondrocytes makes sense to search for anti-inflammatory properties of a RAR agonist in our system and to compare its effects between the two species. In addition, this finding is in line with the demonstration that, amongst the 48 known nuclear receptors, chondrocytes expressed PPAR subtypes [7,8,66,83], retinoid-Z-receptor-gamma [7], or glucocorticoid receptor [14,25], in a functionally active form. Of particular interest, agonists of PPAR subtypes [7,8,66,83] or glucocorticoids [14,25] displayed anti-inflammatory effects in chondrocytes, opening insight to possible anti-inflammatory effects of retinoids.

In the present study, the inducible nitric oxide pathway was chosen as representative of an inflammatory response in chondrocytes. Indeed, chondrocytes were shown to produce more nitric oxide than macrophages in response to an inflammatory stimulus and to be responsive to single cytokine stimulation [27]. NO overproduction was shown to contribute to inhibition of the synthesis of extracellular matrix components and NO synthase inhibitors prevented cartilage lesions in experimental OA or RA [44]. In our experimental system, IL-1 stimulated iNOS expression powerfully in both species although the corresponding nitrites production was much higher in rat chondrocytes, confirming that this inflammatory pathway was particularly responsive in this cell type. In these experimental conditions, we tested the effect of ATRA at 300 and 1000 nM, although its Kd was shown to be in the 1–10 nM range towards RAR [1]. These concentrations were selected by considering both that the binding properties of whole cells may differ from that of nucleosol preparations and that higher doses of ATRA were needed to activate the whole cell machinery than to transactivate chimeric constructs. In addition, these concentrations are consistent with those reported to support biological effects in articular [73] or non articular [43] cell types, whereas lower doses remained inactive in our experimental system (data not shown).

In the literature, there are conflicting data on the ability of retinoids to modulate NO pathway. Indeed, ATRA was shown to inhibit iNOS expression and/or NO production in many cell types exposed to an inflammatory stimulus [4,19,24,41,45,59,65,72,93]. In addition, ATRA reduced inducible NO pathway in mice developing collagen-induced arthritis [71] or rat with immune-mediated glomerulonephritis [20]. In contrast, ATRA was demonstrated to stimulate NO synthesis in various monocytic [2,26] or cancer [35,57] cell lines, a finding associated with its anti-tumoral and differentiating effect. Finally, ATRA

stimulated inducible NO pathway in rat developing a septic choc [23] and this was thought to trigger lethality. In our experimental conditions, ATRA decreased IL-1 β -induced expression of iNOS in rat or human chondrocytes. This suggests that ATRA may prevent, at least in part, the deleterious effect of inducible NO pathway on cartilage in inflammatory conditions.

In our experimental conditions, human and rat chondrocytes expressed mRNAs for MMP-3, MMP-9 and MMP-13 in response to a stimulation with homolog IL-1 β , thereby confirming the well known inducing effect of this cytokine on MMPs [6,32,36,48,54,68,77]. In rat cells, ATRA potentiated the stimulating effect of IL-1 on MMP-3 and -13 while being ineffective in human cells. These results are consistent with its ability to stimulate the basal expression of AP-1 responsive metalloprotease genes in rat epiphyseal chondrocytes [3]. The data are much more disputable in human cells since ATRA was shown to increase MMP-3 mRNA level in resting chondrocytes [32], but to attenuate the cytokine-induced MMP-3 production and activation in a lung fibroblast cell line [96]. On the other hand, ATRA suppressed the cytokine-induced expression and activity of MMP-13 in human chondrocytes [42] or bovine cartilage [82]. However, the inhibitory effect of ATRA on IL-1-induced MMP-13 expression was reported to switch into a stimulatory effect depending on the time of incubation [82], therefore suggesting that its regulatory role on MMPs was greatly influenced by the experimental conditions. The most striking effect of ATRA was observed on IL-1-induced expression of MMP-9 which was strongly enhanced in rat cells while being drastically repressed in human chondrocytes. An inducing effect of ATRA on MMP-9 mRNA level was already reported in resting avian chondrocytes [86], but ATRA was shown to be ineffective on MMP-9 expression in rat hepatic macrophages [64]. Once again, these data suggest that the regulation of MMP-9 expression by ATRA was greatly influenced by the species and/or the cell type, all the more than an inducing effect was reported paradoxically in human SK-N-BE 9N neuroblastoma cells [29]. Finally, we confirmed that ATRA decreased IL-1-induced expression of MMP-1 by 50% in human cells (data not shown). No comparison was possible with rat chondrocytes which express one interstitial collagenase sharing 86% of homology with MMP-13 [33,40,80] but not MMP-1 [80]. Taken together, our data underlined that ATRA potency on human cells cannot be extrapolated from its effect on rat cells. This is best exemplified by MMP-9 whose induction by ATRA in rat was misleading to its therapeutically relevant inhibition in human cells.

In both cell types, IL-1 increased total MMP activity in culture supernatants, thus confirming that its inducing effect on MMPs mRNA levels translated into functional enzymes. In our experimental conditions, ATRA exhibited a clear species difference with a dose-related inhibitory potency restricted to human chondrocytes. Of particular note, the fluorogenic substrate used was exquisitely sensitive to the cleaving activity of MMP-2 over MMP-1, -3 or -13, and was, therefore, mainly representative for the gelatinases [47]. This result is consistent with the strong inhibitory effect of ATRA on IL-1-induced MMP-9 mRNAs in human chondrocytes and with its ability to decrease PMA-induced expression of MMP-2 and -9 in a human renal carcinoma cell line [78]. As ATRA was also reported to suppress IL-1-induced MMP-1 or -13 activities in human chondrocytes [42], our data suggest that ATRA may have relevance to reduce cartilage degradation in joint diseases by controlling metalloproteases.

The anti-inflammatory effects of retinoids have frequently been linked to a negative interaction on AP-1 pathway *via* a direct binding of retinoids-RAR/RXR complexes to c-jun or c-fos, or an interference with the DNA binding capacity of AP-1 (for a review see [50]). However, the effect of ATRA on AP-1 complex was shown to depend on the cell type since the disruption of c-jun/c-fos dimerization was found in HeLa but not in COS cells [95]. In addition, some RAR antagonists were also demonstrated to have anti-AP-1 activity [17] and to display anti-inflammatory effect in experimental arthritis

[5]. In human chondrocytes, the anti-AP-1 effect of ATRA was accompanied by the inhibition of IL-1-induced p38 and JNK activities, suggesting that the suppressive mechanisms might also involve more upstream molecules [42]. In our experimental conditions, we confirmed that IL-1 increased the translocation of AP-1 to the nucleus in both species but failed to detect any inhibitory potency of ATRA, even after a longer time of incubation (data not shown). These data were confirmed by western blot with an anti-phospho-c-jun antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA) (data not shown), supporting that ATRA regulated iNOS and MMPs expression by alternate mechanisms. A plausible explanation is that ATRA could interfere with AP-1 binding to the DNA rather than with AP-1 translocation. Indeed, an increase in histone deacetylase (HDAC) activity by retinoids (RXR agonists) was shown to suppress MMP-1 and -13 expression in human SW-1353 chondrosarcoma by preventing the binding of AP-1 to their promoters [12]. Alternatively, ATRA may have suppressed signalling pathways other than AP-1 downstream to IL-1. Thus, activation of NF- κ B was implicated in the inducing effect of IL-1 on MMP-1 [76,28], MMP-3 [52], MMP-9 [81] or MMP-13 [28,52] gene expression in human chondrocytes, whereas ATRA was demonstrated to inhibit NF- κ B pathway in other cell types [51]. Finally, further studies are required to investigate whether the effects of ATRA depended or not on RAR activation and could be mediated by RAR-RXR heterodimers (potentialisation of ATRA by a RXR agonist) rather than by RAR homodimers (lack of potentialisation by RXR agonist).

To summarize, the present work highlights that effects of the pan RAR agonist, ATRA, differed greatly between rat and human cells, especially for its modulating effect on MMP-9 expression or total MMP activity. These data demonstrate that ATRA was acting in a species-dependent manner and that the extrapolation of its pharmacological properties from experiments with rodent cells has a poor relevance to clinical situation.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Région Lorraine (PRST), the Association de la Recherche contre la Polyarthrite (ARP), and the Pôle Lorrain d'Ingénierie du Cartilage (PLIC).

References

- [1] G. Allenby, M.T. Bocquel, M. Saunders, S. Kazmer, J. Speck, M. Rosenberger, A. Lovey, P. Kastner, J.F. Grippo, P. Chambon et al., Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993), 30–34.
- [2] L.M. Austenaa and A.C. Ross, Potentiation of interferon-gamma-stimulated nitric oxide production by retinoic acid in RAW 264.7 cells, *J. Leukoc. Biol.* **70** (2001), 121–129.
- [3] R.T. Ballock, A. Heydemann, L.M. Wakefield, K.C. Flanders, A.B. Roberts and M.B. Sporn, Inhibition of the chondrocyte phenotype by retinoic acid involves upregulation of metalloprotease genes independent of TGF-beta, *J. Cell. Physiol.* **159** (1994), 340–346.
- [4] P.A. Bechere1, L. Le Goff, S. Ktorza, O. Chosidow, C. Frances, F. Issaly, J.M. Mencia-Huerta, P. Debre, M.D. Mossalayi and M. Arock, CD23-mediated nitric oxide synthase pathway induction in human keratinocytes is inhibited by retinoic acid derivatives, *J. Invest. Dermatol.* **106** (1996), 1182–1186.
- [5] B.C. Beehler, Y.J. Hei, S. Chen, J.A. Lupisella, J. Ostrowski, J.E. Starrett, D. Tortolani, K.M. Trampusch and P.R. Reczek, Inhibition of disease progression by a novel retinoid antagonist in animal models of arthritis, *J. Rheumatol.* **30** (2003), 355–363.
- [6] P. Borden, D. Solymar, A. Sucharczuk, B. Lindman, P. Cannon and R.A. Heller, Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes, *J. Biol. Chem.* **271** (1996), 23577–23581.

- [7] K. Bordji, J.P. Grillasca, J.N. Gouze, J. Magdalou, H. Schohn, J.M. Keller, A. Bianchi, M. Dauca, P. Netter and B. Terlain, Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes, *J. Biol. Chem.* **275** (2000), 12243–12250.
- [8] S. Boyault, M.A. Simonin, A. Bianchi, E. Compe, B. Liagre, D. Mainard, P. Becuwe, M. Dauca, P. Netter, B. Terlain and K. Bordji, 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human chondrocytes by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation pathways, *FEBS Lett.* **501** (2001), 24–30.
- [9] C.E. Brinckerhoff, J.W. Coffey and A.C. Sullivan, Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid, *Science* **221** (1983), 756–758.
- [10] C.E. Brinckerhoff and L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3** (2002), 207–214.
- [11] K. Bry and U. Lappalainen, Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: the role of interleukin 1beta in the regulation of inflammation-mediated pulmonary retinoic acid pathways in transgenic mice, *Semin. Perinatol.* **30** (2006), 121–128.
- [12] P.S. Burrage, J.T. Huntington, M.B. Sporn and C.E. Brinckerhoff, Regulation of matrix metalloproteinase gene expression by a retinoid X receptor-specific ligand, *Arthritis Rheum.* **56** (2007), 892–904.
- [13] P.S. Burrage, K.S. Mix and C.E. Brinckerhoff, Matrix metalloproteinases: role in arthritis, *Front. Biosci.* **11** (2006), 529–543.
- [14] J.P. Carbone, R.C. Baldrige, T.R. Koszalka, A.M. Bongiovanni and R.L. Brent, Characterization of cytosolic glucocorticoid receptor of fetal rat epiphyseal chondrocytes, *J. Steroid Biochem.* **35** (1990), 495–505.
- [15] P. Chaturvedi, M. Pratta, K. Stepleski, J. Connor and S. Kumar, Functional characterization of an orphan nuclear receptor, Rev-ErbAalpha, in chondrocytes and its potential role in osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* **54** (2006), 3513–3522.
- [16] C.H. Chen, K.C. Lin, D.T. Yu, C. Yang, F. Huang, H.A. Chen, T.H. Liang, H.T. Liao, C.Y. Tsai, J.C. Wei and C.T. Chou, Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity, *Rheumatology (Oxford)* **45** (2006), 414–420.
- [17] J.Y. Chen, S. Penco, J. Ostrowski, P. Balaguer, M. Pons, J.E. Starrett, P. Reczek, P. Chambon and H. Gronemeyer, RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation, *EMBO J.* **14** (1995), 1187–1197.
- [18] M. Chivot, Retinoid therapy for acne. A comparative review, *Am. J. Clin. Dermatol.* **6** (2005), 13–19.
- [19] P.K. Datta and E.A. Lianos, Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells, *Kidney Int.* **56** (1999), 486–493.
- [20] P.K. Datta, R.S. Reddy and E.A. Lianos, Effects of all-trans-retinoic acid (atRA) on inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity and transforming growth factor beta-1 production in experimental anti-GBM antibody-mediated glomerulonephritis, *Inflammation* **25** (2001), 351–359.
- [21] R.M. Day, Y.H. Lee, A.M. Park and Y.J. Suzuki, Retinoic acid inhibits airway smooth muscle cell migration, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34** (2006), 695–703.
- [22] J.M. Dayer and B. Bresnihan, Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* **46** (2002), 574–578.
- [23] Y. Devaux, S. Grosjean, C. Seguin, C. David, B. Dousset, F. Zannad, C. Meistelman, N. De Talance, P.M. Mertes and D. Ungureanu-Longrois, Retinoic acid and host-pathogen interactions: effects on inducible nitric oxide synthase *in vivo*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279** (2000), E1045–E1053.
- [24] S.T. Dheen, Y. Jun, Z. Yan, S.S. Tay and E.A. Ling, Retinoic acid inhibits expression of TNF-alpha and iNOS in activated rat microglia, *Glia* **50** (2005), 21–31.
- [25] J.A. DiBattista, J. Martel-Pelletier, L.O. Wosu, T. Sandor, T. Antakly and J.P. Pelletier, Glucocorticoid receptor mediated inhibition of interleukin-1 stimulated neutral metalloprotease synthesis in normal human chondrocytes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72** (1991), 316–326.
- [26] N. Dugas, M.D. Mossalayi, A. Calenda, A. Leotard, P. Becherel, F. Mentz, F. Ouaz, M. Arock, P. Debre, J. Dornand and B. Dugas, Role of nitric oxide in the anti-tumoral effect of retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human promonocytic leukemic cells, *Blood* **88** (1996), 3528–3534.
- [27] C.H. Evans, S.C. Watkins and M. Stefanovic-Racic, Nitric oxide and cartilage metabolism, *Methods Enzymol.* **269** (1996), 75–88.
- [28] Z. Fan, H. Yang, B. Bau, S. Soder and T. Aigner, Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes, *Rheumatol. Int.* **26** (2006), 900–903.
- [29] A.R. Farina, M.P. Masciulli, A. Tacconelli, L. Cappabianca, G. De Santis, A. Gulino and A.R. Mackay, All-trans-retinoic acid induces nuclear factor kappaB activation and matrix metalloproteinase-9 expression and enhances basement membrane invasivity of differentiation-resistant human SK-N-BE 9N neuroblastoma cells, *Cell Growth Differ.* **13** (2002), 343–354.

- [30] J.C. Fernandes, J. Martel-Pelletier, V. Lascau-Coman, F. Moldovan, D. Jovanovic, J.P. Raynauld and J.P. Pelletier, Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study, *J. Rheumatol.* **25** (1998), 1585–1594.
- [31] M. Fiedorczyk, P.A. Klimiuk, S. Sierakowski, E. Gindzienska-Sieskiewicz and J. Chwiecko, Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* **33** (2006), 1523–1529.
- [32] C.R. Flannery, C.B. Little, B. Caterson and C.E. Hughes, Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes, *Matrix Biol.* **18** (1999), 225–237.
- [33] J.M. Freije, I. Diez-Itza, M. Balbin, L.M. Sanchez, R. Blasco, J. Tolivia and C. Lopez-Otin, Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas, *J. Biol. Chem.* **269** (1994), 16766–16773.
- [34] P. Germain, P. Chambon, G. Eichele, R.M. Evans, M.A. Lazar, M. Leid, A.R. De Lera, R. Lotan, D.J. Mangelsdorf and H. Gronemeyer, International union of pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors, *Pharmacol. Rev.* **58** (2006), 760–772.
- [35] D. Ghigo, C. Priotto, D. Migliorino, D. Geromin, C. Franchino, R. Todde, C. Costamagna, G. Pescarmona and A. Bosia, Retinoic acid-induced differentiation in a human neuroblastoma cell line is associated with an increase in nitric oxide synthesis, *J. Cell. Physiol.* **174** (1998), 99–106.
- [36] J.N. Gouze, E. Gouze, M.P. Popp, M.L. Bush, E.A. Dacanay, J.D. Kay, P.P. Levings, K.R. Patel, J.P. Saran, R.S. Watson and S.C. Ghivizzani, Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta, *Arthritis Res. Ther.* **8** (2006), R173.
- [37] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok and S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* **126** (1982), 131–138.
- [38] K. Hamilton and E.W. Clair, Tumour necrosis factor-alpha blockade: a new era for effective management of rheumatoid arthritis, *Exp. Opin. Pharmacother.* **1** (2000), 1041–1052.
- [39] M.B. Hansen, S.E. Nielsen and K. Berg, Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J. Immunol. Methods* **119** (1989), 203–210.
- [40] P. Henriet, G.G. Rousseau and Y. Eeckhout, Cloning and sequencing of mouse collagenase cDNA. Divergence of mouse and rat collagenases from the other mammalian collagenases, *FEBS Lett.* **310** (1992), 175–178.
- [41] K. Hirokawa, K.M. O'Shaughnessy, P. Ramrakha and M.R. Wilkins, Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids, *Br. J. Pharmacol.* **113** (1994), 1448–1454.
- [42] L.J. Ho, L.C. Lin, L.F. Hung, S.J. Wang, C.H. Lee, D.M. Chang, J.H. Lai and T.Y. Tai, Retinoic acid blocks pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase production by down-regulating JNK-AP-1 signaling in human chondrocytes, *Biochem. Pharmacol.* **70** (2005), 200–208.
- [43] N. Idres, J. Marill and G.G. Chabot, Regulation of CYP26A1 expression by selective RAR and RXR agonists in human NB4 promyelocytic leukemia cells, *Biochem. Pharmacol.* **69** (2005), 1595–15601.
- [44] J.Y. Jouzeau, S. Pacquelet, C. Boileau, E. Nedelec, N. Presle, P. Netter and B. Terlain, Nitric oxide (NO) and cartilage metabolism: NO effects are modulated by superoxide in response to IL-1, *Biorheology* **39** (2002), 201–214.
- [45] M.K. Kang, Y.E. Yoon, J.Y. Yang, K.B. Kwon, J.W. Park and E.C. Jhee, Protective effect of retinoic acid on interleukin-1 beta-induced cytotoxicity of pancreatic beta-cells, *Mech. Ageing Dev.* **125** (2004), 483–490.
- [46] V. Knauper, C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight and G. Murphy, Biochemical characterization of human collagenase-3, *J. Biol. Chem.* **271** (1996), 1544–1550.
- [47] C.G. Knight, F. Willenbrock and G. Murphy, A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases, *FEBS Lett.* **296** (1992), 263–266.
- [48] T. Kubota, E. Kubota, A. Matsumoto, Y. Kawai, H. Saito, Y. Mikuni-Takagaki and S. Sato, Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder, *Eur. J. Oral. Sci.* **106** (1998), 992–998.
- [49] P. Lefebvre, Molecular basis for designing selective modulators of retinoic acid receptor transcriptional activities, *Curr. Drug Targets Immun. Endocr. Metabol. Disord.* **1** (2001), 153–164.
- [50] P. Lefebvre, P.J. Martin, S. Flajollet, S. Dedieu, X. Billaut and B. Lefebvre, Transcriptional activities of retinoic acid receptors, *Vitam. Horm.* **70** (2005), 199–264.
- [51] A. Li, M. He, H. Wang, B. Qiao, P. Chen, H. Gu, M. Zhang and S. He, All-trans retinoic acid negatively regulates cytotoxic activities of nature killer cell line 92, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352** (2007), 42–47.
- [52] A. Liacini, J. Sylvester, W.Q. Li and M. Zafarullah, Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappaB) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes, *Matrix Biol.* **21** (2002), 251–262.
- [53] L.S. Lohmander, K.D. Brandt, S.A. Mazuca, B.P. Katz, S. Larsson, A. Struglics and K.A. Lane, Use of the plasma stromelysin (matrix metalloproteinase 3) concentration to predict joint space narrowing in knee osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* **52** (2005), 3160–3167.

- [54] S. Madhavan, M. Anghelina, B. Rath-Deschner, E. Wypasek, A. John, J. Deschner, N. Piesco and S. Agarwal, Biomechanical signals exert sustained attenuation of proinflammatory gene induction in articular chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage* **14** (2006), 1023–1032.
- [55] M. Mark, N.B. Ghyselinck and P. Chambon, Retinoic acid signalling in the development of branchial arches, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14** (2004), 591–518.
- [56] J. Martel-Pelletier, D.J. Welsch and J.P. Pelletier, Metalloproteinases and inhibitors in arthritic diseases, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **15** (2001), 805–829.
- [57] J.H. Martin, O. Alalami and F. Yaqoob, Differential effects of retinoids on nitric oxide production by promonocytic U937 cells and ZR-75-1 human breast cancer cells, *Oncol. Rep.* **7** (2000), 219–223.
- [58] S.S. McCachren, Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium, *Arthritis Rheum.* **34** (1991), 1085–1093.
- [59] K. Mehta, T. McQueen, S. Tucker, R. Pandita and B.B. Aggarwal, Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages, *J. Leukoc. Biol.* **55** (1994), 336–342.
- [60] J.M. Milner and T.E. Cawston, Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4** (2005), 363–375.
- [61] P.G. Mitchell, H.A. Magna, L.M. Reeves, L.L. Lopresti-Morrow, S.A. Yocum, P.J. Rosner, K.F. Geoghegan and J.E. Hambor, Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage, *J. Clin. Invest.* **97** (1996), 761–718.
- [62] M. Mohtai, R.L. Smith, D.J. Schurman, Y. Tsuji, F.M. Torti, N.J. Hutchinson, W.G. Stetler-Stevenson and G.I. Goldberg, Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1, *J. Clin. Invest.* **92** (1993), 179–185.
- [63] F. Moldovan, J.P. Pelletier, J. Hambor, J.M. Cloutier and J. Martel-Pelletier, Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: *in vitro* mimicking effect by transforming growth factor beta, *Arthritis Rheum.* **40** (1997), 1653–1661.
- [64] K. Motomura, M. Ohata, M. Satre and H. Tsukamoto, Destabilization of TNF-alpha mRNA by retinoic acid in hepatic macrophages: implications for alcoholic liver disease, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281** (2001), E420–E429.
- [65] K. Motomura, H. Sakai, H. Isobe and H. Nawata, Effects of retinoids on the production of tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells in vitro: evidence for participation of retinoid X receptor signalling pathway, *Cell Biochem. Funct.* **15** (1997), 95–101.
- [66] D. Moulin, A. Bianchi, S. Boyault, S. Sebillaud, M. Koufany, M. Francois, P. Netter, J.Y. Jouzeau and B. Terlain, Rosiglitazone induces interleukin-1 receptor antagonist in interleukin-1beta-stimulated rat synovial fibroblasts via a peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-dependent mechanism, *Arthritis Rheum.* **52** (2005), 759–769.
- [67] A. Mukherjee, V.G. Hale, O. Borga and R. Stein, Predictability of the clinical potency of NSAIDs from the preclinical pharmacodynamics in rats, *Inflamm. Res.* **45** (1996), 531–540.
- [68] Q. Nguyen, J.S. Mort and P.J. Roughley, Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage, *J. Clin. Invest.* **89** (1992), 1189–1197.
- [69] D. Nie, Y. Ishikawa, T. Yoshimori, R.E. Wuthier and L.N. Wu, Retinoic acid treatment elevates matrix metalloproteinase-2 protein and mRNA levels in avian growth plate chondrocyte cultures, *J. Cell. Biochem.* **68** (1998), 90–99.
- [70] T. Nikawa, M. Ikemoto, K. Tokuoka, S. Teshima, D.H. Alpers, Y. Masui, K. Kishi and K. Rokutan, Interleukin-1beta enhances retinoic acid-mediated expression of bone-type alkaline phosphatase in rat IEC-6 cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280** (2001), G510–G517.
- [71] Y. Nozaki, T. Yamagata, M. Sugiyama, S. Ikoma, K. Kinoshita and M. Funachi, Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis, *Clin. Immunol.* **119** (2006), 272–279.
- [72] G.S. Oh, H.O. Pae, W.G. Seo, M.K. Shin, I.K. Kim, K.Y. Chai, Y.G. Yun, T.O. Kwon, J.S. Lim and H.T. Chung, Inhibitory effect of retinoic acid on expression of inducible nitric oxide synthase gene in 1929 cells, *Immunopharm. Immunotoxicol.* **23** (2001), 335–342.
- [73] M. Ohata, M. Lin, M. Satre and H. Tsukamoto, Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis, *Am. J. Physiol.* **272** (1997), G589–G596.
- [74] Y. Okada, H. Nagase and E.D. Harris Jr., A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.* **261** (1986), 14245–14255.
- [75] N.J. Peake, K. Khawaja, A. Myers, D. Jones, T.E. Cawston, A.D. Rowan and H.E. Foster, Levels of matrix metalloproteinase (MMP)-1 in paired sera and synovial fluids of juvenile idiopathic arthritis patients: relationship to inflammatory activity, MMP-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in a longitudinal study, *Rheumatology (Oxford)* **44** (2005), 1383–1389.
- [76] L. Raymond, S. Eck, E. Hays, I. Tomek, S. Kantor and M. Vincenti, RelA is required for IL-1beta stimulation of matrix metalloproteinase-1 expression in chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage* **15** (2007), 431–441.

- [77] P. Reboul, J.P. Pelletier, G. Tardif, J.M. Cloutier and J. Martel-Pelletier, The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis, *J. Clin. Invest.* **97** (1996), 2011–2019.
- [78] M.W. Roomi, V. Ivanov, T. Kalinovsky, A. Niedzwiecki and M. Rath, Modulation of human renal cell carcinoma 786-0 MMP-2 and MMP-9 activity by inhibitors and inducers *in vitro*, *Med. Oncol.* **23** (2006), 245–250.
- [79] E. Ruberte, P. Dolle, A. Krust, A. Zelent, G. Morriss-Kay and P. Chambon, Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis, *Development* **108** (1990), 213–222.
- [80] M. Schorpp, M.G. Mattei, I. Herr, S. Gack, J. Schaper and P. Angel, Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene, *Biochem. J.* **308**(Pt 1) (1995), 211–217.
- [81] M. Shakibaei, T. John, G. Schulze-Tanzil, I. Lehmann and A. Mobasher, Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis, *Biochem. Pharmacol.* **73** (2007), 1434–1445.
- [82] W.D. Shingleton, A.J. Ellis, A.D. Rowan and T.E. Cawston, Retinoic acid combines with interleukin-1 to promote the degradation of collagen from bovine nasal cartilage: matrix metalloproteinases-1 and -13 are involved in cartilage collagen breakdown, *J. Cell. Biochem.* **79** (2000), 519–531.
- [83] M.A. Simonin, K. Bordji, S. Boyault, A. Bianchi, E. Gouze, P. Becuwe, M. Dauca, P. Netter and B. Terlain, PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282** (2002), C125–C133.
- [84] D.R. Soprano, P. Qin and K.J. Soprano, Retinoic acid receptors and cancers, *Annu. Rev. Nutr.* **24** (2004), 201–221.
- [85] L.C. Tetlow and D.E. Woolley, Comparative immunolocalization studies of collagenase 1 and collagenase 3 production in the rheumatoid lesion, and by human chondrocytes and synoviocytes *in vitro*, *Br. J. Rheumatol.* **37** (1998), 64–70.
- [86] A. Tong, A. Reich, O. Genin, M. Pines and E. Monsonego-Ornan, Expression of chicken 75-kDa gelatinase B-like enzyme in perivascular chondrocytes suggests its role in vascularization of the growth plate, *J. Bone Miner. Res.* **18** (2003), 1443–1452.
- [87] R. Visse and H. Nagase, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circ. Res.* **92** (2003), 827–839.
- [88] Y. Wang, A.H. Moser, J.K. Shigenaga, C. Grunfeld and K.R. Feingold, Downregulation of liver X receptor-alpha in mouse kidney and HK-2 proximal tubular cells by LPS and cytokines, *J. Lipid. Res.* **46** (2005), 2377–2387.
- [89] S.M. Wilhelm, Z.H. Shao, T.J. Housley, P.K. Seperack, A.P. Baumann, Z. Gunja-Smith and J.F. Woessner Jr., Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1). Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity, *J. Biol. Chem.* **268** (1993), 21906–21913.
- [90] A.M. Wolfe, The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys, *Bull. Rheum. Dis.* **19** (1968), 518–523.
- [91] D.E. Woolley and L.C. Tetlow, Observations on the microenvironmental nature of cartilage degradation in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* **56** (1997), 151–161.
- [92] P.S. Yamauchi, D. Rizk and N.J. Lowe, Retinoid therapy for psoriasis, *Dermatol. Clin.* **22** (2004), 467–476, x.
- [93] J.Y. Yang, B.S. Koo, M.K. Kang, H.W. Rho, H.S. Sohn, E.C. Jhee and J.W. Park, Retinoic acid inhibits inducible nitric oxide synthase expression in 3T3-L1 adipocytes, *Exp. Mol. Med.* **34** (2002), 353–360.
- [94] G.B. Zhou, S.J. Chen and Z. Chen, Acute promyelocytic leukemia: a model of molecular target based therapy, *Hematology* **10**(Suppl. 1) (2005), 270–280.
- [95] X.F. Zhou, X.Q. Shen and L. Shemshedini, Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization, *Mol. Endocrinol.* **13** (1999), 276–285.
- [96] Y.K. Zhu, X. Liu, R.F. Ertl, T. Kohyama, F.Q. Wen, H. Wang, J.R. Spurzem, D.J. Romberger and S.I. Rennard, Retinoic acid attenuates cytokine-driven fibroblast degradation of extracellular matrix in three-dimensional culture, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25** (2001), 620–627.

VI

Pathophysiological Relevance of PPAR to Osteoarthritis: From the Control of Inflammation to Cartilage Protection?

Arnaud BIANCHI, Mélanie KIRCHMEYER, Marie-Madeleine GALTEAU
 and Jean-Yves JOUZEAU*

*Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires (LPPA),
 UMR 7561 CNRS-UHP Nancy 1, Avenue de la forêt de Haye, BP 184,
 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

Abstract. Peroxisome proliferators activated receptors (PPAR) are ligand-inducible nuclear transacting factors comprising 3 subtypes, PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ , which play a key role in lipids and glucose homeostasis. All PPAR subtypes have been identified in joint cells and their activation resulted in a transcriptional repression of pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF α), early inflammatory genes (NOS₂, COX-2, mPGES-1) or matrix metalloproteases (MMP-1, MMP-13), at least for the γ subtype. These anti-inflammatory and anti-catabolic properties were confirmed in animal models of joint diseases although much less data are available for experimental osteoarthritis (OA) than for polyarthritis. PPAR agonists were also shown to stimulate IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) production by cytokines-stimulated cells in a subtype-dependent manner. So, PPAR agonists are able to reduce joint inflammation and to prevent cartilage destruction, although many effects were obtained at a higher concentration than required to restore insulin sensitivity or to lower circulating lipids levels. Besides, PPAR agonists were able to modulate the differentiation and/or activity of bone cells, but data are lacking for their effect on OA-associated sclerosis of subchondral bone. Although promising, the therapeutic insight of PPAR agonists in OA warrants additional proofs that could be obtained indirectly from the follow-up of diabetic and/or hyperlipidemic patients with OA treated daily with glitazones or fibrates.

Keywords. PPAR subtypes, gene transcription, cytokines, eicosanoids, metalloproteases, animal models, osteoarthritis

1. Peroxisome Proliferators Activated Receptors (PPAR)

1.1. Structure – Overall Expression and Functions

Peroxisome proliferators activated receptors, subtypes PPAR α (N1RC1), PPAR β/δ (FAAR, NUC1 or NR1C2) and PPAR γ (NR1C3), are ligand-inducible nuclear transact-

* Corresponding Author: Pr. Jean-Yves Jouzeau, LPPA, Phone: +33(3)83683950, Fax: +33(3)83683959, E-mail: Jean-Yves.Jouzeau@pharma.uhp-nancy.fr.

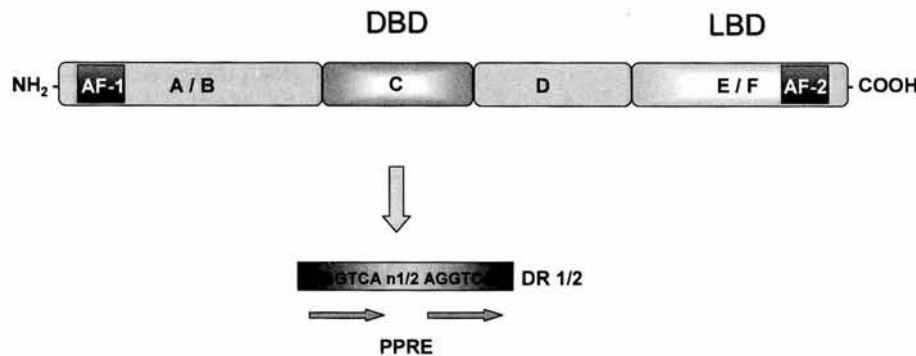


Figure 1. Schematic representation of the functional domains of PPAR. PPAR are composed of four distinct functional regions: 1) the A/B domain located at the N-terminus, containing a ligand-independent activation function (AF-1) responsible for PPAR phosphorylation; 2) the C domain or DNA binding domain (DBD) promoting the binding of PPAR to the peroxisome proliferator response element (PPRE, a classical direct repeat [DR] separated by one or two nucleotides) in the promoter region of target genes; 3) the D domain is a hinge region responsible for the docking of cofactors, 4) the E/F domain or ligand-binding domain (LBD) located at the C-terminus, responsible for ligand specificity and containing a ligand-dependent activation function (AF-2) which promotes the recruitment of cofactors to assist the gene transcription process and is necessary for the heterodimerization with RXR.

ing factors. They belong to the steroid receptors family including receptors for retinoids, thyroid hormones or corticosteroids [1]. Their overall protein structure is composed by six domains, termed generally from A to F, having key specific functions such as ligand binding (LBD), interaction with DNA (DBD) or control of transactivation (AF domains) (Fig. 1).

PPAR α is expressed exquisitely in tissues contributing actively to fatty acids catabolism (mainly in liver, and less markedly in brown fat, kidney, heart or skeletal muscle), where it regulates the expression of genes involved in fatty acid uptake and ω - or β -oxidation [2]. PPAR α is also expressed in endothelial and vascular smooth muscle cells, as well as macrophages/foam cells, and contributes to the control of inflammation, thereby opening insight to the treatment of atherosclerosis [3,4].

PPAR β/δ is the less well-characterized PPAR subtype despite its ubiquitous expression. It takes place in lipids metabolism by favouring the reverse transport of cholesterol and oxidation of fatty acids [5], plays a major metabolic role in muscle and adipose tissue [6] and has been linked to profound anti-obesity and anti-diabetic actions in animal models [7]. Activation of PPAR β/δ has also been linked to cell proliferation or apoptosis depending on the cell type and seems to play a key role in wound healing [8].

PPAR γ is highly expressed in white and brown adipose tissue and less intensively in cardiac and skeletal muscle [2]. It plays a pivotal role in adipocytes differentiation and lipids storage [9] and its activation provides insulin sensitizing properties that have entered the clinics [4,10]. PPAR γ is also thought to be a negative regulator of inflammation [11] since its activation is able to suppress pro-inflammatory cytokines production [12,13] while being anti-inflammatory in several animal models [14,15]. Of particular note, many metabolic effects of PPAR γ and β/δ agonists were supported by their ability to correct the circulating imbalance between leptin and adiponectin [4,10], two adipokines also found at abnormal levels in the synovial fluid of OA patients [16].

1.2. Mechanism of Action

Activation of PPARs leads to the formation of heterodimers with retinoid-X receptors [17] (RXRs). These PPAR-RXR dimers bind to DNA-specific sequences, called peroxisome proliferators response elements (PPRE), to stimulate or dampen the transcription of target genes. The classical PPRE consensus sequence is a direct repeat (AGGTCA) separated by one or two nucleotides (DR1/2) (Fig. 1), which is unfortunately not sufficient to predict the responsiveness to PPAR agonists since a perfect consensus was reported to be possibly non functional [18] whereas a highly degenerated sequence was, on the contrary, demonstrated to be fully responsive [19]. In addition to their differential tissue distribution, PPAR subtypes vary in their selectivity and sensitivity towards agonists and recruit distinct co-activator proteins follow-on in the regulation of different sets of genes [1]. There are several mechanisms by which PPAR activation can regulate the transcriptional machinery (summarized in Fig. 2).

Briefly, besides the classical PPRE-mediated effects and possible interference with histone acetylation [20] (Fig. 3), PPAR can develop protein-protein interaction with several transcription factors as NF- κ B [21–23], AP-1 [24], NF-AT [25], STAT [26] or *egr-1* [27], thereby reducing the response to inflammatory cytokines or growth factors. PPAR can also modulate the response to transcription factors by competing for the recruitment of several co-activators [20] or by interfering directly with their DNA binding site, as demonstrated recently for AP-1 in the promoter region of MMP-1 gene [28]. Of particular note, additional PPAR-independent mechanisms have been reported for PPAR agonists, especially the inhibition of NF- κ B pathway by the natural PPAR γ ligand 15- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) [29,30], most of which being attributable to the high chemical reactivity of its cyclopentenone ring with substances containing nucleophilic groups, such as cysteinyl thiol group of proteins [31].

1.3. PPAR Agonists

PPAR are considered as lipid sensors that can be activated either by endogenous compounds, generally natural fatty acids and their metabolites (low-binding affinity ligands), or by synthetic agonists (high-binding affinity ligands), including the anti-lipidemic fibrates [32] and the anti-diabetic thiazolidinediones [33] (see Table 1).

1.3.1. Endogenous Compounds

Most endogenous PPAR agonists are eicosanoids derived from arachidonic acid biotransformation by the lipoxygenases or cyclooxygenases pathways. Thus, the 5-lipoxygenase metabolite leukotriene B₄ (LTB₄) [34] is a potent agonist of PPAR α although 8S-HETE (8S-hydroxyeicosatetraenoic acid) has the highest affinity for this subtype [32]. Furthermore, the cyclooxygenases metabolites PGA₁ [35] and PGI₂ [36] are preferential ligands of PPAR β/δ . Finally, by-products from the 15-lipoxygenase pathway, 9-HODE (9-hydroxy-octadecadienoic acid) and 13-HODE, and the cyclooxygenase-derived dehydration product of prostaglandin D₂, 15d-PGJ₂, are selective agonists of PPAR γ [37,38]. Interestingly, 15d-PGJ₂ was demonstrated to be produced in the late resolution phase of experimental acute inflammation and is postulated to be a negative regulator of inflammation [39]. Plenty of fatty acids metabolites,

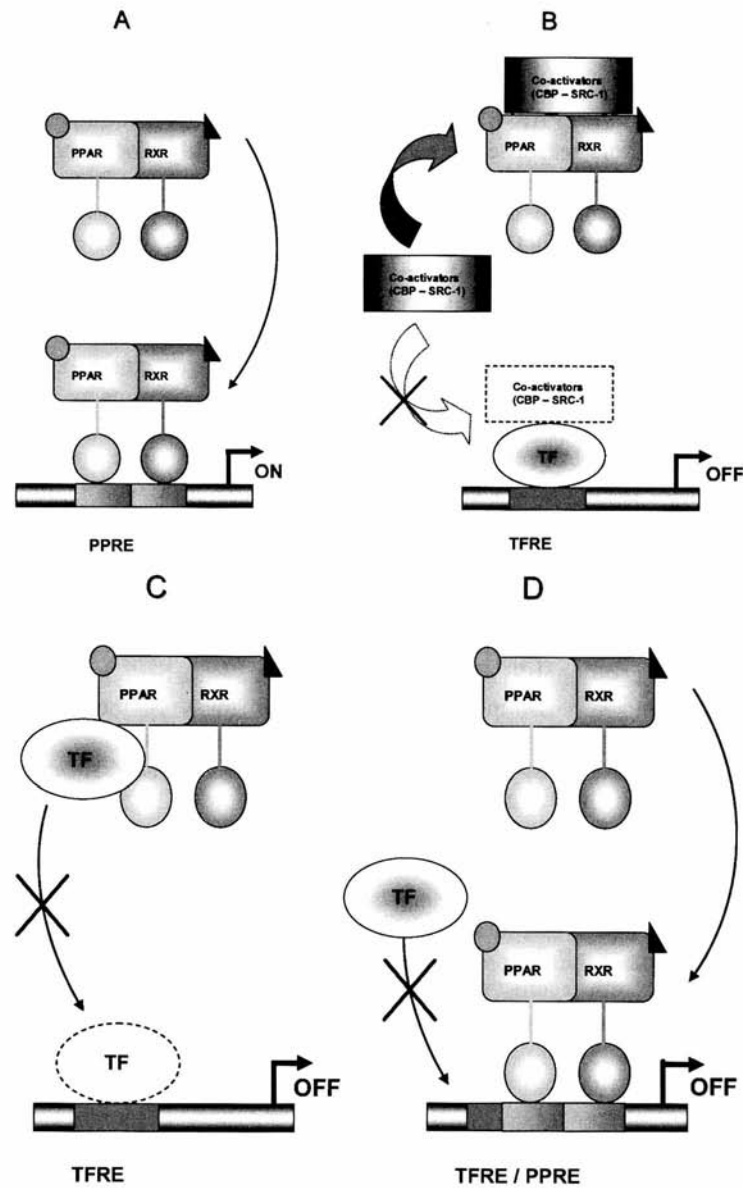


Figure 2. Schematic representation of the transcriptional machinery control by activation of PPAR. A) After ligand binding (variable translocation depending on the subtype), the PPAR-RXR heterodimer binds to a peroxisome proliferator response element (PPRE) located in the promoter region to control (generally activate) the transcription of a target gene; B) After ligand binding, the PPAR-RXR heterodimer competes with a transcription factor (TF) for the recruitment of common co-activators, therefore resulting in the suppression of TF-dependent transcriptional activity; C) After ligand binding, the PPAR-RXR heterodimer squelches a transcription factor (TF) by direct protein-protein interaction, therefore resulting in the suppression of TF-dependent transcriptional activity by reduction of its translocation; D) After ligand binding, the PPAR-RXR heterodimer binds to a peroxisome proliferator response element overlapping (PPRE composite) the binding site of a transcription factor (TF) in the promoter region of a target gene, therefore suppressing TF-dependent transcriptional activity by competitive DNA binding.

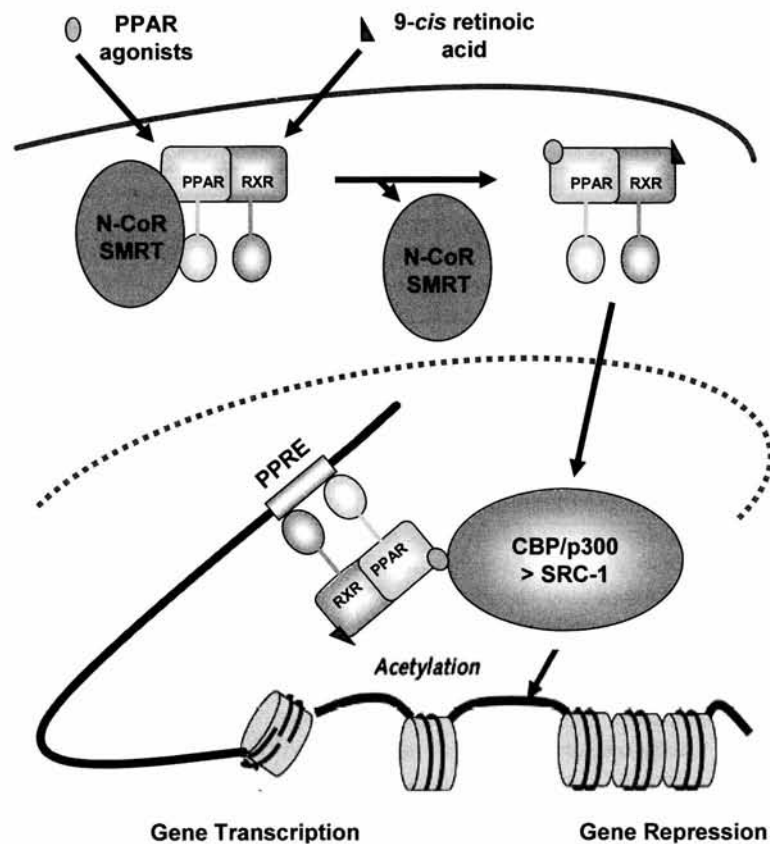


Figure 3. General model for transcriptional activation by PPAR. Binding of PPAR agonists and 9-*cis* retinoic acid to a PPAR-RXR/corepressor complex, which is not bound to DNA, results in the dissociation of the corepressors (Nuclear receptor CoRepressor [N-CoR], Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor [SMRT]) and activation of the PPAR-RXR heterodimer. The activated PPAR-RXR heterodimer binds to a peroxisome proliferator response element (PPRE) located in the promoter region of a target gene and recruits co-activators (preferentially CAMP response element Binding Protein [CBP] and the related protein p300 [CBP/p300], or Steroid Receptor Coactivator 1 [SRC-1]) which have intrinsic histone acetyltransferase (HAT) activity. Finally, acetylation of core histones removes the electrostatic attraction between negatively charged DNA and positively charged lysine, allowing the loosening of the nucleosomal structure with a subsequent chromatin remodelling. The subsequent recruitment of large protein complexes, including RNA polymerase II, leads to initiation of gene transcription. In some cases, as the control of COX-2 gene expression in IL-1-stimulated synovial fibroblasts, the recruitment of CBP/p300 can be competitive with other transcription factors, resulting in a decrease in HAT activity and secondary reduction of gene transcription.

including those originating from transcellular metabolism, can activate PPAR with a variable subtype selectivity [40]. However, the theory of an endogenous control of inflammation by PPAR activation suffers from actual limitations. Firstly, most endogenous compounds have a low binding affinity to PPAR (K_d generally over the micromolar range) and, as a consequence, high concentrations of ligands will be necessary to activate the system. Secondly, data are lacking to demonstrate that these metabolites can be produced endogenously in sufficient amounts to activate PPAR, especially for 15d-PGJ₂ [41], even if intracellular concentration could overcome plasma levels for

Table 1. PPAR agonists used in *in vitro* studies with joint cells

Compounds	PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ	Cell type [References]
Synthetic high-binding affinity ligands				
Clofibrate (clofibric acid)	+ [#]	–	±	C [47,52]
Fenofibrate (fenofibric acid)	+ [#]	–	±	C [52]
GW9578	++ [#]	–	–	Ocl (differentiation/activity) [59]
Pyrixinic acid (Wy14643)	++ [#]	–	±	C [47,48,52] SF [27,60] Obl (maturation) [61]
L165041	–	++ [#]	±	Ocl (differentiation/activity) [59]
GW501516	–	++ [#]	–	SF [50]
Ciglitazone	–	–	+ [#]	C [62,63] SF [60] Ocl (differentiation/activity) [59,64] Obl (maturation) [61]
GI262570	–	–	++ [#]	C [65]
Pioglitazone	–	–	+ [#]	C [63]
Rosiglitazone	–	–	++ [#]	C [28,48,52,66–68] SF [20,50,55,57] Obl (differentiation) [69]
Troglitazone	–	–	+ [#]	C [47,66,68] SF [20,27,57,70] Obl (maturation) [61]
Natural low-binding affinity ligands				
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂	–	–	+ [#]	C [47, 48, 55, 62, 63, 65–67] SF [27, 50, 55, 60, 70] Ocl (differentiation) [64] Obl (differentiation) [69,71]
Prostacyclin	–	+ [#]	–	Obl [71]

++: very easy binding and/or strong activation in transactivation assays; +: easy binding and/or activation in transactivation assays; ±: weak binding and or low activation in transactivation assays; –: no binding detected and/or no activation in transactivation assays; [#]: this compound has been determined to have selectivity for this PPAR isoform; C: chondrocytes; SF: synovial fibroblasts; Obl: osteoblasts; Ocl: osteoclasts

some metabolites. Thirdly, most fatty acids metabolites lack any marked selectivity for a given PPAR subtype and the endogenous control of inflammation will depend on whether they are produced concomitantly or sequentially and/or can compete for PPAR binding. Besides these endogenous compounds, dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) could have some therapeutical relevance since they are natural ligands for PPAR α and PPAR γ [32], but can also modify the endogenous metabolites produced from membrane phospholipids [42].

1.3.2. Synthetic Ligands

Fibrates, as clofibrate, fenofibrate or Wy14643, are agonists of PPAR α which were developed as hypolipidemic agents through optimization of their lipid-lowering activity in rodents before the discovery of PPAR [32]. Whereas the active metabolites of clofibrate and fenofibrate are dual activators of PPAR α and γ , with an approximately 10-fold selectivity for PPAR α , Wy14643 and GW9578 are 50 to 500-fold selective for PPAR α [43]. GW501516 is a newly synthesized agonist [44] which is > 1000-fold selective for PPAR β/δ over the other subtypes [45], whereas L165041 is only 10-fold

more selective for PPAR α over PPAR γ [43,45]. Agonists of PPAR γ include antidiabetic molecules of the thiazolidinediones or “glitazones” family which have been developed initially through empirical screening in rodent models of insulin resistance. Glitazones have an increased selectivity for PPAR γ from troglitazone and pioglitazone to rosiglitazone [43,45,46], although non thiazolidinediones derivatives, such as GI262570, have a > 1000-fold selectivity for PPAR γ over the PPAR α and β/δ subtypes [43].

As for any compound with pharmacological activity, the *in vitro* concentrations used must be viewed critically to interpret the efficacy of PPAR agonists on joint cells. In several studies, the PPAR α agonist Wy14643 was tested above 50 μ M [27,47,48] and the PPAR γ agonists troglitazone [27,47] or rosiglitazone [47,49,50] above 10 μ M, whereas the PPAR β/δ agonist GW501516 was active from 0.1 nM [50] to 100 nM. Most of these concentrations are high compared to the respective binding affinity or activity of PPAR agonists (generally < 1 μ M for Wy14643 on PPAR α < 10 nM for GW501516 on PPAR β/δ and < 100 nM for rosiglitazone on PPAR γ) in cell-based transactivation assays [51] or reporter cell lines expressing human PPAR subtypes [45]. In contrast, PPAR-dependent activities were reported at lower concentrations, namely 1 μ M of rosiglitazone [28] or Wy14643 [52] in rabbit chondrocytes monolayers although the selectivity of high concentrations of PPAR agonists was confirmed with a panel of subtype-selective target genes in rat chondrocytes embedded in alginate beads [53]. This discrepancy could be explained, at least in part, by species differences in the response of PPAR to a given agonist [32] and by differences in the methodology (gene reporter technology) or experimental conditions (pericellular environment [54]) used. However, one can also underline that most anti-inflammatory effects were observed only with a high concentrations of PPAR agonists whereas the stimulation of IL-1Ra production occurred from a low agonist's concentration. This suggests that the sensitivity of genes to a given PPAR agonist could depend on the location of any PPRE in the transcriptional machinery of their promoter or, alternatively, that the anti-inflammatory effects may be rather supported by the titration of transcription factors which requires a higher agonist concentration and/or additional mechanisms.

Whatever the PPAR agonist, the time at which it is added relatively to the inflammatory stimulus is critical to interpret its potency in cell culture systems. As PPAR agonists are expected to act as transcriptional regulators, it is not surprising that numerous reports on joint cells were obtained with a pre-treatment time ranging from several minutes [27,55,56] to few hours [57]. However, co-stimulation was also reported to be efficient against cytokines [28,48,50,52,55], whereas the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on IL-1-induced MMP-1 expression decreased gradually with time after addition of the stimulus [55]. In some experiments, PPAR γ agonists provided an identical inhibition of IL-1-induced responses in pre-treatment or co-incubation [48], but 15d-PGJ₂ was reported to be less inhibitory on TGF- β -induced activation of COL1A2 promoter in co-stimulatory conditions [58]. Taken together, these data confirm that the transcriptional activity of PPAR agonists takes advantage from any pre-incubation but suggest that their potency remains obvious when they are added at the same time as cytokine challenge.

1.4. Expression in Joint Tissues

In the last ten years, PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ were shown to be expressed constitutively in synovial fibroblasts [50,57] as well as chondrocytes from several species [28,47,55,68]. In most cases, activation of PPAR resulted in inhibition of cytokine-induced expression of pro-inflammatory genes or matrix metalloproteases (see below). Nonetheless, contradictory data were reported on the ability of PPAR γ agonists to induce chondrocytes apoptosis [62,63,72]. PPAR subtypes were also reported in bone cells where activation of the γ subtype was linked to inhibition of both osteoclastogenesis [64] and differentiation of progenitors into osteoblasts [73], although subtype-specific PPAR agonists had a variable effect on bone resorption [59]. Besides, messenger RNAs for PPAR γ were detected in rat articular fat-pad [74] which is a potent source of cytokines [75] and adipokines [16] production within the joints. In acute or chronic inflammatory conditions, activation of PPAR took also advantage from the expression of its three subtypes in monocytes and macrophages [12,23,76] as well as B and T lymphocytes [77,78]. Taken together, these data demonstrate that PPAR subtypes are expressed both in resident and infiltrating joint cells, suggesting that they may have a pleiotropic anti-inflammatory effect although in a cell-specific manner.

It is worth noting that the expression pattern of PPAR subtypes could be modified in inflammatory conditions since PPAR γ was reported to decrease in joint cells in response to bacterial endotoxins [57] or IL-1 [50]. Such inflammation-induced pattern is thought to contribute, at least in part, to the PPAR β/δ -dependent effect of rosiglitazone in IL-1-stimulated chondrocytes [50]. Recently, it was also reported that the mRNA levels of all PPAR subtypes decreased in chondrocytes stimulated with TGF- β [53], further underlining that changes in PPAR levels could be key regulators of the pharmacological responses to their agonists [79].

2. Modulation of Key Inflammatory Genes by PPAR Agonists

2.1. Cytokines

In many cell types, the PPAR γ agonists 15d-PGJ₂ and thiazolidinediones were shown to inhibit the transcriptional induction of genes playing a pivotal role in joint pathophysiology as TNF α [12] or IL-1 [13]. Thus, PPAR γ agonists were able to repress LPS-induced TNF α expression [57] and IL-1-induced IL-1 β production [50] in synovial fibroblasts. These data were consistent with the ability of 15d-PGJ₂ to suppress pro-inflammatory cytokines production in THP-1 cells stimulated with PMA [80] and synovial fibroblasts from OA or RA patients [81]. A reduction of circulating levels of TNF α , IL-1 β and IL-6 was also reported in arthritic mice treated systemically with rosiglitazone [82]. This suppressive effect of PPAR γ agonists on cytokines was accompanied by an inhibition of NF- κ B pathway in synovial fibroblasts [57,81] and chondrocytes [68] or by a reduced expression of phosphorylated I- κ B (pI- κ B) in inflamed joint tissues [15]. More recently, the PPAR α agonist fenofibrate was also demonstrated to reduce the degradation of I- κ B in IL-1-stimulated synovial fibroblasts [83], further suggesting that the modulation of pro-inflammatory cytokines by PPAR agonists may occur, at least in part, by inhibition of the NF- κ B pathway.

Besides, PPAR agonists were reported recently to stimulate IL-1 Ra production in synovial fibroblasts [50], chondrocytes [52] and THP-1 cells [80]. Although there was some discrepancy, due to differences in cell types or experimental conditions [50,80], these data demonstrated that PPAR γ agonists were able to correct the imbalance between IL-1 β and IL-1Ra towards a less pathological state. Furthermore, the stimulating effect of PPAR agonists on IL-1Ra production was supported by activation of either the β/δ [50] or the α [52] subtype. Finally, the stimulation of IL-1Ra was thought to contribute to the inhibitory effect of several PPAR α agonists on IL-1-induced MMPs expression in chondrocytes, although the exact mechanism remains to be elucidated [52].

2.2. Inducible Arachidonic Acid Cascade

Prostaglandins (PG), mainly PGE₂, are well known arachidonic acid-derived lipid mediators that are produced in excessive amounts within inflammatory joints [84]. The effects of PGE₂ on joint tissues vary with the differentiation status of chondrocytes, but it is generally accepted that PGE₂ can contribute to the formation of an altered cartilage matrix [85–88], the maintenance of synovitis [84,89,90] and to an accelerated bone turnover [91,92]. Synthesis of PGE₂ is a multi-step process involving a preferential enzymatic coupling between constitutive and inducible isoforms of phospholipases A₂ (PLA₂), cyclooxygenases (COX) and terminal PG synthases [93]. Besides COX-2, membrane Prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) was shown to play a key limiting role in the stimulated synthesis of PGE₂ in synovial fibroblasts [94] and chondrocytes [95]. PPAR γ agonists were reported to stimulate the basal expression of COX-2, which has a PPRE consensus site in its promoter [96], but this did not result necessarily in an enhanced production of PGE₂ [67]. In contrast, PPAR γ agonists were able to suppress cytokine-induced PGE₂ production in human [68] and rat [67] chondrocytes, as well as in human synovial fibroblasts [27], with a greater inhibitory potency on mPGES-1 than on COX-2. Although there was some species differences in the contribution of PPAR γ to the effect of 15d-PGJ₂ [67], this agonist was therefore considered to act as a “dual agent” on arachidonic acid cascade in OA chondrocytes [55]. The transcriptional regulation of human COX-2 and mPGES-1 by pro-inflammatory cytokines involves overlapping, but distinct, signalling pathways [27,97] which were inhibited by interference of PPAR γ agonists with histone acetylase p300 activity [20] or the transcription factor early growth response factor-1 (Egr-1) [27], respectively. A major role of NF- κ B was suggested in the control of mPGES-1 transcriptional activity in rat chondrocytes [67], but an indirect regulation cannot be ruled out since NF- κ B was also shown to regulate the early expression of Egr-1 [98]. These data underline that PPAR γ agonists have a multi-step regulatory role on inducible arachidonic acid cascade and provide a rationale for possible negative feedback regulatory loops in joint cells [70] and during the resolution phase of acute inflammation [39].

It is important to recall that, beside their inhibitory property on prostaglandins synthesis, some non selective COX inhibitors were able to activate PPAR α and γ in transactivation assays [99], whereas inhibition of PPAR β/δ by sulindac sulfide might contribute to its antiproliferative potency on colon cancer cells [100]. Although providing an additional mechanism to some genomic effects of NSAIDs, as their COX-independent chemopreventive properties [101], the therapeutic relevance of these data remains uncertain in OA for at least three reasons: i) PPAR modulation by NSAIDs was observed at doses which were consistent with adipocytes differentiation

but far above those required for inhibition of COX isoenzymes in chondrocytes [102] and synovial fibroblasts [103]; ii) loss of PPAR stimulation by COX-derived metabolites [40] could be insufficiently compensated by the weak agonist potency of NSAIDs; iii) increased levels of lipoxygenase-derived metabolites (see § 1.3.1), secondary to COX-inhibition, could compete with NSAIDs for activating PPARs [104].

3. Modulation of Extracellular Matrix Remodelling by PPAR Agonists

3.1. Matrix Metalloproteases (MMPs)

Matrix metalloproteases (MMPs) are thought to play a major role in cartilage degradation in OA [105] even if the promising efficacy of their inhibitors in animal models [106,107] has not been confirmed in OA patients [108] or raised safety concern [109]. Amongst MMPs, stromelysin-1 (MMP-3) and aggrecanases (ADAMTS-4 and -5) were implicated in the degradation of proteoglycans, though at different cleavage sites in the interglobular domain of aggrecan [110], whereas collagenase-1 (MMP-1) and -3 (MMP-13) contributed actively to the cleavage of specific collagens [111]. Gelatinases (MMP-2 and -9) may play a secondary role in cartilage breakdown since they have less specificity for a given extracellular matrix component while contributing to the removal of matrix fragments [112]. PPAR γ agonists were shown to reduce IL-1-induced MMP-1 expression or activity in synovial fibroblasts [55] and chondrocytes [28] and, in the later case, this was accompanied by a reduced degradation of proteoglycans. The transcriptional down-regulation of MMP-1 gene involved the reduction of activator protein (AP)-1 binding [55] which was ascribed to DNA binding competition on a composite PPRE/AP-1 site in the MMP-1 promoter [28]. More recently, the PPAR α agonist clofibrate was also shown to suppress the inducing effect of IL-1 β on MMP-1, -3 and -13 expression in rabbit chondrocytes, but this effect was supported by an increase in soluble IL-1Ra production [52]. In human chondrocytes, PPAR γ agonists were also reported to inhibit IL-1 β -induced MMP-13 production at the transcriptional level, by interfering with the activation of AP-1 and NF- κ B [48], a finding consistent with the dual decrease of IL-1 β and MMP-13 levels and the reduced severity of cartilage lesions in OA animals treated with pioglitazone [113]. Finally, agonists of PPAR γ prevented the expression of the aggrecanase-generated epitope NITEGE in cytokine-treated rat chondrocytes while reducing the expression of MMP-3 and -9 and subsequent occurrence of the MMP-generated epitope VDIPEN [65]. Although there is no firm demonstration that PPAR are playing a role, these data can be brought together with the ability of n-3 PUFAs to prevent glycosaminoglycans release as well as ADAMTS-4, MMP-3 and -13 expression in human OA cartilage exposed to IL-1 [42]. Taken together, these data support that PPAR agonists, mainly of the γ subtype, have an anticatabolic potency towards MMPs and may prevent cartilage degradation in OA.

3.2. Growth Factors

Transforming growth factor (TGF- β) is a multifunctional cytokine that plays an important role in tissue repair [114] but has a complex pathophysiological role in OA. On one hand, TGF- β stimulates the synthesis of cartilage-specific components [115] and counteracts the suppressive effect of inflammatory cytokines on them [116], while it

controls MMPs activity by the synthesis of their natural tissue inhibitors [117]. On the other hand, its intra-articular administration [118] or joint overexpression [119] is inflammatory with the synovial-layer-dependent formation of osteophytes [120], whereas it induces the expression of aggrecanase-1 in joint cells [121,122] with the subsequent occurrence of matrix-derived neo-epitopes. In many other tissues, TGF- β contributes to organ fibrosis by favouring matrix overload but its stimulatory effect on collagens [58,123,124] and fibronectin [125] synthesis is reduced by PPAR γ agonists. Such inhibitory potency may contribute to the preventive effect of some PPAR agonists on skin [58], lung [124], kidney [126] or liver [127] fibrosis. It was demonstrated, very recently, that selective agonists of either PPAR subtypes were able to suppress the stimulatory effect of TGF- β on PGs synthesis and deposition by interfering with aggrecan gene expression in chondrocytes maintained in tridimensional culture [53]. Although it remains unclear to what extent such anti-anabolic effect may balance with the respective cytokine suppressive potency of TGF- β and of PPAR agonists in cartilage, these data suggest that PPAR agonists could be deleterious in situation of cartilage repair while being protective in situation of cartilage degradation.

Insulin-like growth factor (IGF)-1 is another cytokine sharing in common with TGF- β the ability to stimulate the production of extracellular matrix components [128] and to counteract their degradation [129], although it remains less mitogenic, at least on mature chondrocytes [130]. In OA cartilage, the increased expression of IGF-1 combined with the normal level and functionality of IGF-1 receptors has led to the proposal that chondrocytes become hyporesponsive to IGF-1, because the bioavailability of this growth factor is reduced secondary to an increased production of IGF binding proteins (IGFBP) [131]. In non articular cell types, PPAR γ agonists were shown to inhibit several biological responses to IGF-1 [132] while stimulating the production of IGFBP-1 [133,134]. More recently, selective agonists of either PPAR subtypes were demonstrated to stimulate the expression of IGFBP-1, -2 or -5 and to decrease those of IGFBP-6 whereas IGFBP-3 and -4 remained unresponsive in liver and kidney cell lines [135]. Unfortunately, IGFBP-1 and -6 are not secreted by articular cartilage or chondrocytes [131] and IGFBP-3 is expressed predominantly in OA conditions [136] with a maximal content in the more severe lesions [137]. So, PPAR agonists may have a poor theoretical potency to relieve the IGF-1 hyporesponsiveness of OA cartilage although one cannot exclude that they could interfere with the cell-specific proteases that compromise locally the functional activity of growth factor binding proteins [138].

4. Effect of PPAR Agonists in Animal Models of Rheumatic Diseases

4.1. Arthritis Model

Agonists of PPAR γ were shown to reduce the severity of experimental polyarthritis in rat [83,139] and mice [15,82,140]. A concomitant reduction of synovitis was reported with the natural agonist 15d-PGJ₂ [139,140] or several glitazones given preventively or therapeutically [15,82,139], and more recently with the PPAR α agonist fenofibrate [83]. Efficacy was associated with an overall reduction of inflammatory genes [15,82,140] and oxidant stress [82,140], although contradictory data were reported for the effect of PPAR γ agonists on apoptosis of synovial fibroblasts [15,139]. However, one must consider that the anti-arthritic effect of PPAR agonists was obtained by parenteral route

[139,140] or with high oral doses [83,139], supporting that their anti-inflammatory effect necessitated much higher doses than required to lower circulating lipids or increase insulin sensitivity. Indeed, the dose ratio between anti-inflammatory and insulin sensitizing properties was estimated to be over 100-fold for troglitazone in rat, although without obvious liver toxicity [139].

4.2. Experimental Osteoarthritis (OA)

There is only one report evaluating the effect of the PPAR γ agonist pioglitazone in the meniscectomy model of OA in guinea pig [113]. When given at 20 mg/kg/day from 1 day after surgery until necropsy, pioglitazone reduced the severity and extent of cartilage lesions in the knee joint but was ineffective on osteophytes formation. Prevention of macroscopic and morphologic changes was accompanied by a reduction of the percentage of chondrocytes staining positively for MMP-13 or IL-1 β in OA cartilage, suggesting that interference with IL-1 signalling in articular chondrocytes may contribute to the protective effect of pioglitazone. As for polyarthritis, cartilage sparing was obtained for a higher dose than used in antidiabetic studies although the circulating levels remained in the range of those reported in humans treated with the highest recommended dose of pioglitazone [113]. As non-insulin dependent diabetes mellitus is also a systemic risk factor for the development of OA [141], there is possibility that glitazones could reduce cartilage destruction by their dual cytokines suppressive and insulin sensitizing properties in diabetic patients with OA.

5. Conclusion and Future Trends

Several *in vitro* and animal studies have demonstrated that PPAR subtypes are expressed and functional in joint cells and that their activation down regulates the transcriptional machinery to reduce pro-inflammatory cytokines and metalloproteases production. From that point of view, PPAR agonists can prevent joint inflammation and cartilage destruction to various degrees. However, one must also consider that most anti-inflammatory effects were reported at concentrations of agonists far above their binding affinity for PPAR subtypes. In addition, PPAR γ agonists were able to prevent fibrosis of soft tissues by reducing the synthesis of extracellular matrix components and to cause bone mass loss in some mouse models [142]. This suggests that joint inflammation is less sensitive to PPAR activation than lipids and glucose homeostasis and that PPAR agonists could have a complex interplay with the turn-over of cartilage and bone matrices. So, it seems logical to speculate that the modulation of OA by PPAR activation will come to fruition if we can demonstrate firstly that diabetic patients treated with PPAR agonists are at lower risk of developing OA and/or develop less severe cartilage lesions without significant bone changes.

Note Added to Proof

During the processing of this manuscript, an additional work demonstrated that pioglitazone (30 mg/kg/day) reduced the development of cartilage lesions in the anterior cruciate ligament transection model of OA in dog (Boileau C. et al., *Arthritis Rheum* 56

(2007), 2288-98). This protective effect was accompanied by a reduced expression of matrix degrading enzymes (MMP-1, ADAMTS-5) and less activation of inflammatory signaling pathways as ERK1/2, p38MAPK or NF- κ B in OA cartilage.

References

- [1] S. Kersten, B. Desvergne, and W. Wahli, Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405** (2000), 421-424.
- [2] O. Braissant, F. Fufelle, C. Scotto, M. Dauca, and W. Wahli, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137** (1996), 354-366.
- [3] F. Blaschke, Y. Takata, E. Caglayan, R.E. Law, and W.A. Hsueh, Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** (2006), 28-40.
- [4] P.T. Cheng and R. Mukherjee, PPARs as targets for metabolic and cardiovascular diseases. *Mini Rev Med Chem* **5** (2005), 741-753.
- [5] A.J. Gilde, K.A. van der Lee, P.H. Willemsen, G. Chinetti, F.R. van der Leij, G.J. van der Vusse, B. Staels, and M. van Bilsen, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPAR-beta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* **92** (2003), 518-524.
- [6] Y.X. Wang, C.L. Zhang, R.T. Yu, H.K. Cho, M.C. Nelson, C.R. Bayuga-Ocampo, J. Ham, H. Kang, and R.M. Evans, Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* **2** (2004), e294.
- [7] T. Tanaka, J. Yamamoto, S. Iwasaki, H. Asaba, H. Hamura, Y. Ikeda, M. Watanabe, K. Magoori, R.X. Ioka, K. Tachibana, Y. Watanabe, Y. Uchiyama, K. Sumi, H. Iguchi, S. Ito, T. Doi, T. Hamakubo, M. Naito, J. Auwerx, M. Yanagisawa, T. Kodama, and J. Sakai, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (2003), 15924-15929.
- [8] W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* **132** (2002), 83-91.
- [9] K. Schoonjans, B. Staels, and J. Auwerx, The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1302** (1996), 93-109.
- [10] A. Tsuchida, T. Yamauchi, and T. Kadowaki, Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin. *J Pharmacol Sci* **97** (2005), 164-170.
- [11] B. Desvergne, I.J. A, P.R. Devchand, and W. Wahli, The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol* **65** (1998), 65-74.
- [12] M. Ricote, A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, and C.K. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391** (1998), 79-82.
- [13] C. Jiang, A.T. Ting, and B. Seed, PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391** (1998), 82-86.
- [14] S. Cuzzocrea, B. Pisano, L. Dugo, A. Ianaro, P. Maffia, N.S. Patel, R. Di Paola, A. Ialenti, T. Genovese, P.K. Chatterjee, M. Di Rosa, A.P. Caputi, and C. Thiemermann, Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* **483** (2004), 79-93.
- [15] T. Shiojiri, K. Wada, A. Nakajima, K. Katayama, A. Shibuya, C. Kudo, T. Kadowaki, T. Mayumi, Y. Yura, and Y. Kamisaki, PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol* **448** (2002), 231-238.
- [16] N. Presle, P. Pottier, H. Dumond, C. Guillaume, F. Lapique, S. Pallu, D. Mainard, P. Netter, and B. Terlain, Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage* **14** (2006), 690-695.
- [17] S.A. Kliewer, K. Umehono, D.J. Mangelsdorf, and R.M. Evans, Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355** (1992), 446-449.

- [18] P. Gervois, S. Chopin-Delannoy, A. Fadel, G. Dubois, V. Kosykh, J.C. Fruchart, J. Najib, V. Laudet, and B. Staels, Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* **13** (1999), 400-409.
- [19] S. Fourcade, S. Savary, S. Albet, D. Gauthé, C. Gondcaille, T. Pineau, J. Bellenger, M. Bentejac, A. Holzinger, J. Berger, and M. Bugaut, Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR α . *Eur J Biochem* **268** (2001), 3490-3500.
- [20] K. Farrajota, S. Cheng, J. Martel-Pelletier, H. Afif, J.P. Pelletier, X. Li, P. Ranger, and H. Fahmi, Inhibition of interleukin-1 β -induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum* **52** (2005), 94-104.
- [21] M.E. Poynter and R.A. Daynes, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* **273** (1998), 32833-32841.
- [22] B. Staels, W. Koenig, A. Habib, R. Merval, M. Lebre, I.P. Torra, P. Delerive, A. Fadel, G. Chinetti, J.C. Fruchart, J. Najib, J. Maclouf, and A. Tedgui, Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* **393** (1998), 790-793.
- [23] N. Marx, U. Schonbeck, M.A. Lazar, P. Libby, and J. Plutzky, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **83** (1998), 1097-1103.
- [24] P. Delerive, J.C. Fruchart, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* **169** (2001), 453-459.
- [25] S.W. Chung, B.Y. Kang, and T.S. Kim, Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. *Mol Pharmacol* **64** (2003), 1169-1179.
- [26] J.M. Shipley and D.J. Waxman, Down-regulation of STAT5b transcriptional activity by ligand-activated peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARgamma. *Mol Pharmacol* **64** (2003), 355-364.
- [27] S. Cheng, H. Afif, J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, X. Li, K. Farrajota, M. Lavigne, and H. Fahmi, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1 β -induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem* **279** (2004), 22057-22065.
- [28] M. Francois, P. Richette, L. Tsagris, M. Raymondjean, M.C. Fulchignoni-Lataud, C. Forest, J.F. Savouret, and M.T. Corvol, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element. *J Biol Chem* **279** (2004), 28411-28418.
- [29] A. Rossi, P. Kapahi, G. Natoli, T. Takahashi, Y. Chen, M. Karin, and M.G. Santoro, Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* **403** (2000), 103-108.
- [30] D.S. Straus, G. Pascual, M. Li, J.S. Welch, M. Ricote, C.H. Hsiang, L.L. Sengchanthalangsy, G. Ghosh, and C.K. Glass, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000), 4844-4849.
- [31] M. Fukushima, Biological activities and mechanisms of action of PGJ2 and related compounds: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **47** (1992), 1-12.
- [32] G. Krey, O. Braissant, F. L'Horsset, E. Kalkhoven, M. Perroud, M.G. Parker, and W. Wahli, Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* **11** (1997), 779-791.
- [33] T.M. Willson, J.M. Lehmann, and S.A. Kliewer, Discovery of ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptors. *Ann N Y Acad Sci* **804** (1996), 276-283.
- [34] P.R. Devchand, H. Keller, J.M. Peters, M. Vazquez, F.J. Gonzalez, and W. Wahli, The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* **384** (1996), 39-43.
- [35] B.M. Forman, J. Chen, and R.M. Evans, The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann N Y Acad Sci* **804** (1996), 266-275.
- [36] R.A. Gupta, J. Tan, W.F. Krause, M.W. Geraci, T.M. Willson, S.K. Dey, and R.N. DuBois, Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000), 13275-13280.
- [37] S.A. Kliewer, J.M. Lenhard, T.M. Willson, I. Patel, D.C. Morris, and J.M. Lehmann, A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83** (1995), 813-819.
- [38] L. Nagy, P. Tontonoz, J.G. Alvarez, H. Chen, and R.M. Evans, Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* **93** (1998), 229-240.

- [39] D.W. Gilroy, P.R. Colville-Nash, D. Willis, J. Chivers, M.J. Paul-Clark, and D.A. Willoughby, Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5** (1999), 698-701.
- [40] D. Bishop-Bailey and J. Wray, Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **71** (2003), 1-22.
- [41] L.C. Bell-Parikh, T. Ide, J.A. Lawson, P. McNamara, M. Reilly, and G.A. FitzGerald, Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest* **112** (2003), 945-955.
- [42] C.L. Curtis, C.E. Hughes, C.R. Flannery, C.B. Little, J.L. Harwood, and B. Caterson, n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J Biol Chem* **275** (2000), 721-724.
- [43] T.M. Willson, P.J. Brown, D.D. Sternbach, and B.R. Henke, The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43** (2000), 527-550.
- [44] W.R. Oliver, Jr., J.L. Shenk, M.R. Snaith, C.S. Russell, K.D. Plunket, N.L. Bodkin, M.C. Lewis, D.A. Winegar, M.L. Sznajdman, M.H. Lambert, H.E. Xu, D.D. Sternbach, S.A. Kliewer, B.C. Hansen, and T.M. Willson, A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (2001), 5306-5311.
- [45] M. Seimandi, G. Lemaire, A. Pillon, A. Perrin, I. Carlavan, J.J. Voegel, F. Vignon, J.C. Nicolas, and P. Balaguer, Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem* **344** (2005), 8-15.
- [46] I. Wiesenberg, M. Chiesi, M. Missbach, C. Spanka, W. Pignat, and C. Carlberg, Specific activation of the nuclear receptors PPARgamma and RORA by the antidiabetic thiazolidinedione BRL 49653 and the antiarthritic thiazolidinedione derivative CGP 52608. *Mol Pharmacol* **53** (1998), 1131-1138.
- [47] K. Bordji, J.P. Grillasca, J.N. Gouze, J. Magdalou, H. Schohn, J.M. Keller, A. Bianchi, M. Dauca, P. Netter, and B. Terlain, Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* **275** (2000), 12243-12250.
- [48] H. Fahmi, J.A. Di Battista, J.P. Pelletier, F. Mineau, P. Ranger, and J. Martel-Pelletier, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* **44** (2001), 595-607.
- [49] H. Fahmi, J.P. Pelletier, J.A. Di Battista, H.S. Cheung, J.C. Fernandes, and J. Martel-Pelletier, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage* **10** (2002), 100-108.
- [50] D. Moulin, A. Bianchi, S. Boyault, S. Sebillaud, M. Koufany, M. Francois, P. Netter, J.Y. Jouzeau, and B. Terlain, Rosiglitazone induces interleukin-1 receptor antagonist in interleukin-1beta-stimulated rat synovial fibroblasts via a peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* **52** (2005), 759-769.
- [51] B.R. Henke, S.G. Blanchard, M.F. Brackeen, K.K. Brown, J.E. Cobb, J.L. Collins, W.W. Harrington, Jr., M.A. Hashim, E.A. Hull-Ryde, I. Kaldor, S.A. Kliewer, D.H. Lake, L.M. Leesnitzer, J.M. Lehmann, J.M. Lenhard, L.A. Orband-Miller, J.F. Miller, R.A. Mook, Jr., S.A. Noble, W. Oliver, Jr., D.J. Parks, K.D. Plunket, J.R. Szewczyk, and T.M. Willson, N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J Med Chem* **41** (1998), 5020-5036.
- [52] M. Francois, P. Richette, L. Tsagris, C. Fitting, C. Lemay, M. Benallaoua, K. Tahiri, and M.T. Corvol, Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway potentiates interleukin-1 receptor antagonist production in cytokine-treated chondrocytes. *Arthritis Rheum* **54** (2006), 1233-1245.
- [53] P.E. Poleni, A. Bianchi, S. Etienne, M. Koufany, S. Sebillaud, P. Netter, B. Terlain, and J.Y. Jouzeau, Agonists of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) alpha, beta/delta or gamma reduce transforming growth factor (TGF)-beta-induced proteoglycans' production in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* (2006), doi:10.1016/j.joca.2006.10.009.
- [54] G.J. van Osch, W.B. van den Berg, E.B. Hunziker, and H.J. Hauselmann, Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **6** (1998), 187-195.
- [55] H. Fahmi, J.P. Pelletier, F. Mineau, and J. Martel-Pelletier, 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **10** (2002), 845-848.
- [56] X. Li, H. Afif, S. Cheng, J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, P. Ranger, and H. Fahmi, Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol* **32** (2005), 887-895.

- [57] M.A. Simonin, K. Bordji, S. Boyault, A. Bianchi, E. Gouze, P. Becuwe, M. Dauca, P. Netter, and B. Terlain, PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **282** (2002), C125-133.
- [58] A.K. Ghosh, S. Bhattacharyya, G. Lakos, S.J. Chen, Y. Mori, and J. Varga, Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum* **50** (2004), 1305-1318.
- [59] B.Y. Chan, A. Gartland, P.J. Wilson, K.A. Buckley, J.P. Dillon, W.D. Fraser, and J.A. Gallagher, PPAR agonists modulate human osteoclast formation and activity in vitro. *Bone* **40** (2007), 149-159.
- [60] T. Kalajdzic, W.H. Faour, Q.W. He, H. Fahmi, J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, and J.A. Di Battista, Nimesulide, a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor, suppresses peroxisome proliferator-activated receptor induction of cyclooxygenase 2 gene expression in human synovial fibroblasts: evidence for receptor antagonism. *Arthritis Rheum* **46** (2002), 494-506.
- [61] S.M. Jackson and L.L. Demer, Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 preosteoblasts. *FEBS Lett* **471** (2000), 119-124.
- [62] B. Relic, V. Benoit, N. Franchimont, C. Ribbens, M.J. Kaiser, P. Gillet, M.P. Merville, V. Bours, and M.G. Malaise, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits Bay 11-7085-induced sustained extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and apoptosis in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *J Biol Chem* **279** (2004), 22399-22403.
- [63] Z.Z. Shan, K. Masuko-Hongo, S.M. Dai, H. Nakamura, T. Kato, and K. Nishioka, A potential role of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J Biol Chem* **279** (2004), 37939-37950.
- [64] G. Mbalaviele, Y. Abu-Amer, A. Meng, R. Jaiswal, S. Beck, M.F. Pittenger, M.A. Thiede, and D.R. Marshak, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem* **275** (2000), 14388-14393.
- [65] M. Sabatini, A. Bardiot, C. Lesur, N. Moulharat, M. Thomas, I. Richard, and A. Fradin, Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **10** (2002), 673-679.
- [66] S. Boyault, A. Bianchi, D. Moulin, S. Morin, M. Francois, P. Netter, B. Terlain, and K. Bordji, 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-1beta-induced IKK enzymatic activity and I-kappaBalpha degradation in rat chondrocytes through a PPARgamma-independent pathway. *FEBS Lett* **572** (2004), 33-40.
- [67] A. Bianchi, D. Moulin, S. Sebillaud, M. Koufany, M.M. Galteau, P. Netter, B. Terlain, and J.Y. Jouzeau, Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14prostaglandin J2. *Arthritis Res Ther* **7** (2005), R1325-1337.
- [68] S. Boyault, M.A. Simonin, A. Bianchi, E. Compe, B. Liagre, D. Mainard, P. Becuwe, M. Dauca, P. Netter, B. Terlain, and K. Bordji, 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human chondrocytes by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett* **501** (2001), 24-30.
- [69] B. Lecka-Czernik, E.J. Moerman, D.F. Grant, J.M. Lehmann, S.C. Manolagas, and R.L. Jilka, Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* **143** (2002), 2376-2384.
- [70] Y. Tsubouchi, Y. Kawahito, M. Kohno, K. Inoue, T. Hla, and H. Sano, Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun* **283** (2001), 750-755.
- [71] A.C. Maurin, P.M. Chavassieux, and P.J. Meunier, Expression of PPARgamma and beta/delta in human primary osteoblastic cells: influence of polyunsaturated fatty acids. *Calcif Tissue Int* **76** (2005), 385-392.
- [72] Y.Y. Shao, L. Wang, D.G. Hicks, S. Tarr, and R.T. Ballock, Expression and activation of peroxisome proliferator-activated receptors in growth plate chondrocytes. *J Orthop Res* **23** (2005), 1139-1145.
- [73] A.A. Ali, R.S. Weinstein, S.A. Stewart, A.M. Parfitt, S.C. Manolagas, and R.L. Jilka, Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* **146** (2005), 1226-1235.
- [74] H. Dumond, N. Presle, P. Pottie, S. Pacquelet, B. Terlain, P. Netter, A. Gepstein, E. Livne, and J.Y. Jouzeau, Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 284-295.
- [75] T. Ushiyama, T. Chano, K. Inoue, and Y. Matsusue, Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann Rheum Dis* **62** (2003), 108-112.

- [76] G. Chinetti, S. Griglio, M. Antonucci, I.P. Torra, P. Delerive, Z. Majd, J.C. Fruchart, J. Chapman, J. Najib, and B. Staels, Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* **273** (1998), 25573-25580.
- [77] R. Cunard, M. Ricote, D. DiCampli, D.C. Archer, D.A. Kahn, C.K. Glass, and C.J. Kelly, Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J Immunol* **168** (2002), 2795-2802.
- [78] N. Marx, B. Kehrle, K. Kohlhammer, M. Grub, W. Koenig, V. Hombach, P. Libby, and J. Plutzky, PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* **90** (2002), 703-710.
- [79] C. Blanquart, R. Mansouri, J.C. Fruchart, B. Staels, and C. Glineur, Different ways to regulate the PPARalpha stability. *Biochem Biophys Res Commun* **319** (2004), 663-670.
- [80] C.A. Meier, R. Chicheportiche, C.E. Juge-Aubry, M.G. Dreyer, and J.M. Dayer, Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cytokine* **18** (2002), 320-328.
- [81] J.D. Ji, H. Cheon, J.B. Jun, S.J. Choi, Y.R. Kim, Y.H. Lee, T.H. Kim, I.J. Chae, G.G. Song, D.H. Yoo, S.Y. Kim, and J. Sohn, Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun* **17** (2001), 215-221.
- [82] S. Cuzzocrea, E. Mazzon, L. Dugo, N.S. Patel, I. Serraino, R. Di Paola, T. Genovese, D. Britti, M. De Maio, A.P. Caputi, and C. Thiemermann, Reduction in the evolution of murine type II collagen-induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum* **48** (2003), 3544-3556.
- [83] H. Okamoto, T. Iwamoto, S. Kotake, S. Momohara, H. Yamanaka, and N. Kamatani, Inhibition of NF-kappaB signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **23** (2005), 323-330.
- [84] J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, and H. Fahmi, Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* **33** (2003), 155-167.
- [85] J.P. Pelletier, J.C. Fernandes, D.V. Jovanovic, P. Reboul, and J. Martel-Pelletier, Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol* **28** (2001), 2509-2519.
- [86] C.A. Clark, E.M. Schwarz, X. Zhang, N.M. Ziran, H. Drissi, R.J. O'Keefe, and M.J. Zuscik, Differential regulation of EP receptor isoforms during chondrogenesis and chondrocyte maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **328** (2005), 764-776.
- [87] T. Sadowski and J. Steinmeyer, Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **9** (2001), 407-415.
- [88] G.N. Lowe, Y.H. Fu, S. McDougall, R. Polendo, A. Williams, P.D. Benya, and T.J. Hahn, Effects of prostaglandins on deoxyribonucleic acid and aggrecan synthesis in the RCJ 3.1C5.18 chondrocyte cell line: role of second messengers. *Endocrinology* **137** (1996), 2208-2216.
- [89] H. Inoue, M. Takamori, Y. Shimoyama, H. Ishibashi, S. Yamamoto, and Y. Koshihara, Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol* **136** (2002), 287-295.
- [90] W.H. Faour, Y. He, Q.W. He, M. de Ladurantaye, M. Quintero, A. Mancini, and J.A. Di Battista, Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* **276** (2001), 31720-31731.
- [91] Y. Kobayashi, T. Mizoguchi, I. Take, S. Kurihara, N. Udagawa, and N. Takahashi, Prostaglandin E2 enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A-dependent phosphorylation of TAK1. *J Biol Chem* **280** (2005), 11395-11403.
- [92] K. Yoshida, H. Oida, T. Kobayashi, T. Maruyama, M. Tanaka, T. Katayama, K. Yamaguchi, E. Segi, T. Tsuboyama, M. Matsushita, K. Ito, Y. Ito, Y. Sugimoto, F. Ushikubi, S. Ohuchida, K. Kondo, T. Nakamura, and S. Narumiya, Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002), 4580-4585.
- [93] T. Tanioka, Y. Nakatani, N. Semmyo, M. Murakami, and I. Kudo, Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* **275** (2000), 32775-32782.
- [94] D.O. Stichtenoth, S. Thoren, H. Bian, M. Peters-Golden, P.J. Jakobsson, and L.J. Crofford, Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* **167** (2001), 469-474.

- [95] F. Kojima, H. Naraba, S. Miyamoto, M. Beppu, H. Aoki, and S. Kawai, Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **6** (2004), R355-365.
- [96] E.A. Meade, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, and S.M. Prescott, Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* **274** (1999), 8328-8334.
- [97] K. Masuko-Hongo, F. Berenbaum, L. Humbert, C. Salvat, M.B. Goldring, and S. Thirion, Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis Rheum* **50** (2004), 2829-2838.
- [98] R. Thyss, V. Virolle, V. Imbert, J.F. Peyron, D. Aberdam, and T. Virolle, NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *Embo J* **24** (2005), 128-137.
- [99] J.M. Lehmann, J.M. Lenhard, B.B. Oliver, G.M. Ringold, and S.A. Kliewer, Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **272** (1997), 3406-3410.
- [100] T.C. He, T.A. Chan, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, PPARdelta is an APC-regulated target of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99** (1999), 335-345.
- [101] G.N. Levy, Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *Faseb J* **11** (1997), 234-247.
- [102] F.J. Blanco, R. Guitian, J. Moreno, F.J. de Toro, and F. Galdo, Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* **26** (1999), 1366-1373.
- [103] R. Yamazaki, N. Kusunoki, T. Matsuzaki, S. Hashimoto, and S. Kawai, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **302** (2002), 18-25.
- [104] J.T. Huang, J.S. Welch, M. Ricote, C.J. Binder, T.M. Willson, C. Kelly, J.L. Witztum, C.D. Funk, D. Conrad, and C.K. Glass, Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400** (1999), 378-382.
- [105] M.B. Goldring, The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **43** (2000), 1916-1926.
- [106] M. Brewster, E.J. Lewis, K.L. Wilson, A.K. Greenham, and K.M. Bottomley, Ro 32-3555, an orally active collagenase selective inhibitor, prevents structural damage in the STR/ORT mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **41** (1998), 1639-1644.
- [107] M.J. Janusz, E.B. Hookfin, S.A. Heitmeyer, J.F. Woessner, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, K.K. Brown, L.C. Hsieh, N.G. Almstead, B. De, M.G. Natchus, S. Pikul, and Y.O. Taiwo, Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* **9** (2001), 751-760.
- [108] D.R. Close, Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* **60 Suppl 3** (2001), iii62-67.
- [109] T. Shaw, J.S. Nixon, and K.M. Bottomley, Metalloproteinase inhibitors: new opportunities for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Expert Opin Investig Drugs* **9** (2000), 1469-1478.
- [110] B. Caterson, C.R. Flannery, C.E. Hughes, and C.B. Little, Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* **19** (2000), 333-344.
- [111] P. Reboul, J.P. Pelletier, G. Tardif, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier, The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* **97** (1996), 2011-2019.
- [112] K. Imai, S. Ohta, T. Matsumoto, N. Fujimoto, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada, Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* **151** (1997), 245-256.
- [113] T. Kobayashi, K. Notoya, T. Naito, S. Unno, A. Nakamura, J. Martel-Pelletier, and J.P. Pelletier, Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum* **52** (2005), 479-487.
- [114] M.B. Sporn and A.B. Roberts, Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications. *Jama* **262** (1989), 938-941.
- [115] H.J. Hauselmann, M.B. Aydelotte, B.L. Schumacher, K.E. Kuettner, S.H. Gitelis, and E.J. Thonar, Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix* **12** (1992), 116-129.
- [116] H.M. van Beuningen, P.M. van der Kraan, O.J. Arntz, and W.B. van den Berg, Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* **71** (1994), 279-290.
- [117] M. Gunther, H.D. Haubeck, E. van de Leur, J. Blaser, S. Bender, I. Gutgemann, D.C. Fischer, H. Tschesche, H. Greiling, P.C. Heinrich, and et al., Transforming growth factor beta 1 regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression in differentiated human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **37** (1994), 395-405.

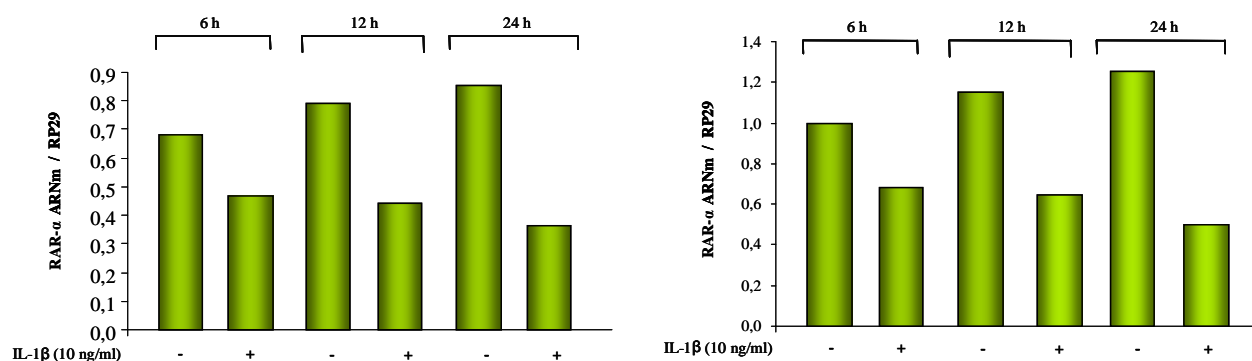
- [118] J.B. Allen, C.L. Manthey, A.R. Hand, K. Ohura, L. Ellingsworth, and S.M. Wahl, Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* **171** (1990), 231-247.
- [119] A.C. Bakker, F.A. van de Loo, H.M. van Beuningen, P. Sime, P.L. van Lent, P.M. van der Kraan, C.D. Richards, and W.B. van den Berg, Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* **9** (2001), 128-136.
- [120] H.M. van Beuningen, H.L. Glansbeek, P.M. van der Kraan, and W.B. van den Berg, Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* **6** (1998), 306-317.
- [121] Y. Yamanishi, D.L. Boyle, M. Clark, R.A. Maki, M.D. Tortorella, E.C. Arner, and G.S. Firestein, Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol* **168** (2002), 1405-1412.
- [122] N. Moulharat, C. Lesur, M. Thomas, G. Rolland-Valognes, P. Pastoureau, P. Anract, F. De Ceuninck, and M. Sabatini, Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 296-305.
- [123] F. Zheng, A. Fornoni, S.J. Elliot, Y. Guan, M.D. Breyer, L.J. Striker, and G.E. Striker, Upregulation of type I collagen by TGF-beta in mesangial cells is blocked by PPARgamma activation. *Am J Physiol Renal Physiol* **282** (2002), F639-648.
- [124] H.A. Burgess, L.E. Daugherty, T.H. Thatcher, H.F. Lakatos, D.M. Ray, M. Redonnet, R.P. Phipps, and P.J. Sime, PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288** (2005), L1146-1153.
- [125] B. Guo, D. Koya, M. Isono, T. Sugimoto, A. Kashiwagi, and M. Haneda, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit TGF-beta 1-induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells. *Diabetes* **53** (2004), 200-208.
- [126] Y. Guan, Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* **15** (2004), 2801-2815.
- [127] T. Miyahara, L. Schrum, R. Rippe, S. Xiong, H.F. Yee, Jr., K. Motomura, F.A. Anania, T.M. Willson, and H. Tsukamoto, Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* **275** (2000), 35715-35722.
- [128] D.J. McQuillan, C.J. Handley, M.A. Campbell, S. Bolis, V.E. Milway, and A.C. Herington, Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem J* **240** (1986), 423-430.
- [129] W. Hui, A.D. Rowan, and T. Cawston, Modulation of the expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases by TGF-beta1 and IGF-1 in primary human articular and bovine nasal chondrocytes stimulated with TNF-alpha. *Cytokine* **16** (2001), 31-35.
- [130] P.A. Guerne, A. Sublet, and M. Lotz, Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol* **158** (1994), 476-484.
- [131] G. Tardif, P. Reboul, J.P. Pelletier, C. Geng, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier, Normal expression of type 1 insulin-like growth factor receptor by human osteoarthritic chondrocytes with increased expression and synthesis of insulin-like growth factor binding proteins. *Arthritis Rheum* **39** (1996), 968-978.
- [132] A. Aiello, G. Pandini, F. Frasca, E. Conte, A. Murabito, A. Sacco, M. Genua, R. Vigneri, and A. Belfiore, Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology* **147** (2006), 4463-4475.
- [133] A. Hilding, K. Hall, J. Skogsberg, E. Ehrenborg, and M.S. Lewitt, Troglitazone stimulates IGF-binding protein-1 by a PPAR gamma-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **303** (2003), 693-699.
- [134] D. Seto-Young, M. Paliou, J. Schlosser, D. Avtanski, A. Park, P. Patel, K. Holcomb, P. Chang, and L. Poretsky, Direct thiazolidinedione action in the human ovary: insulin-independent and insulin-sensitizing effects on steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* **90** (2005), 6099-6105.
- [135] T. Degenhardt, M. Matilainen, K.H. Herzig, T.W. Dunlop, and C. Carlberg, The Insulin-like Growth Factor-binding Protein 1 Gene Is a Primary Target of Peroxisome Proliferator-activated Receptors. *J Biol Chem* **281** (2006), 39607-39619.
- [136] T. Eviatar, H. Kauffman, and A. Maroudas, Synthesis of insulin-like growth factor binding protein 3 in vitro in human articular cartilage cultures. *Arthritis Rheum* **48** (2003), 410-417.

- [137] T.I. Morales, The insulin-like growth factor binding proteins in uncultured human cartilage: increases in insulin-like growth factor binding protein 3 during osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **46** (2002), 2358-2367.
- [138] R.C. Bunn and J.L. Fowlkes, Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab* **14** (2003), 176-181.
- [139] Y. Kawahito, M. Kondo, Y. Tsubouchi, A. Hashiramoto, D. Bishop-Bailey, K. Inoue, M. Kohno, R. Yamada, T. Hla, and H. Sano, 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* **106** (2000), 189-197.
- [140] S. Cuzzocrea, N.S. Wayman, E. Mazzon, L. Dugo, R. Di Paola, I. Serraino, D. Britti, P.K. Chatterjee, A.P. Caputi, and C. Thiemermann, The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol Pharmacol* **61** (2002), 997-1007.
- [141] T. Sturmer, H. Brenner, R.E. Brenner, and K.P. Gunther, Non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) and patterns of osteoarthritis. The Ulm osteoarthritis study. *Scand J Rheumatol* **30** (2001), 169-171.
- [142] S.O. Rzonca, L.J. Suva, D. Gaddy, D.C. Montague, and B. Lecka-Czernik, Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology* **145** (2004), 401-406.



Addendum concernant les calculs de PCR

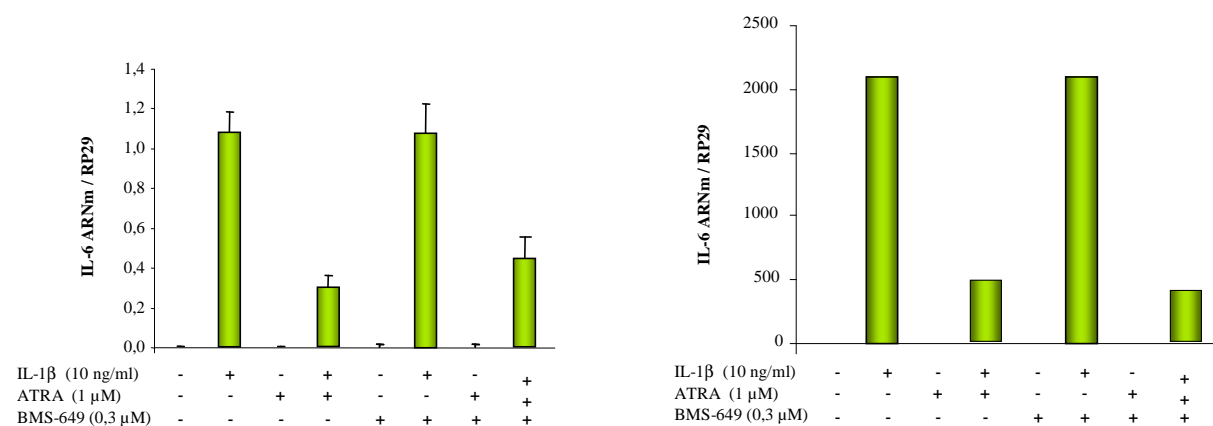
Figure correspondant à la **Figure 48** du manuscrit (p.173).



Méthode de calcul : comparaison à une gamme de produits de PCR purifiés et de concentration connue

Méthode de calcul : méthode de Pfaffl

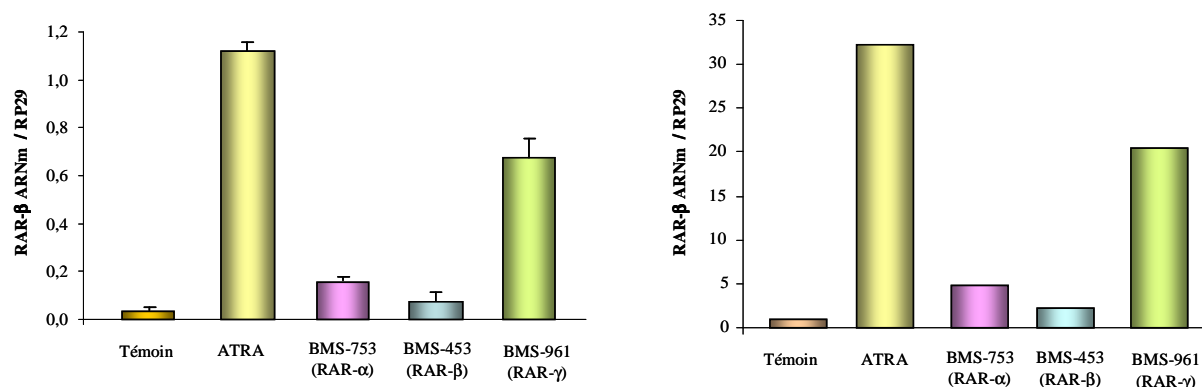
Figure correspondant à la **Figure 52** du manuscrit (p.178).



Méthode de calcul : comparaison à une gamme de produits de PCR purifiés et de concentration connue


Méthode de calcul : méthode de Pfaffl

Figure correspondant à la **Figure 55** du manuscrit (p.184), avec ajout de l'effet de l'ATRA sur l'expression génique de RAR-β.



Méthode de calcul : comparaison à une gamme de produits de PCR purifiés et de concentration connue

Méthode de calcul : méthode de Pfaffl



Les résultats obtenus à partir des deux méthodes utilisées sont donc comparables, les profils obtenus sont similaires, seule l'échelle varie, puisque les résultats obtenus d'après la méthode de Pfaffl sont rapportés au témoin, qui vaut donc arbitrairement 1. Ces calculs ont également été refaits pour les autres résultats du manuscrit, mais ne sont pas détaillés.

RÉSUMÉ

Les rétinoïdes (dérivés de la vitamine A) ont montré des propriétés anti-arthritiques intéressantes dans des modèles expérimentaux d'arthropathie. Nous avons étudié leur effet sur l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéases matricielles (MMP) induites par l'IL-1 β dans les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes humains et de rat. En conditions inflammatoires, les fibroblastes synoviaux produisent de fortes quantités de cytokines inflammatoires dans l'articulation (TNF- α , IL-1 β , IL-6). L'acide all-*trans* rétinoïque (ATRA, agoniste RAR), et l'acide 9-*cis* rétinoïque (co-agoniste RAR/RXR) inhibent l'expression de ces cytokines dans les fibroblastes synoviaux de rat stimulés par l'IL-1. L'ATRA inhibe également la phosphorylation d'ERK_{1/2} induite par l'IL-1, sans affecter celles de p38 ou de JNK, et diminue l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-IL-6 induits par l'IL-1. L'effet de l'ATRA sur les cytokines inflammatoires n'est pas potentialisé par un agoniste RXR, ni reproduit par des agonistes sélectifs des isotypes RAR, et n'est pas antagonisé par la répression des isotypes RAR, démontrant ainsi des effets indépendants de RAR ou RXR. En revanche, l'effet inhibiteur de l'ATRA sur AP-1, sur NF-IL-6 et sur la production d'IL-6 est reproduit par un antagoniste d'ERK_{1/2}.

En conditions inflammatoires, les chondrocytes produisent de grandes quantités de MMP et de nitrites. L'ATRA inhibe l'expression d'iNOS et la production de nitrites induites par l'IL-1 dans les chondrocytes de rat et humains. Cependant, l'activité MMP totale est réduite uniquement dans les chondrocytes humains, et cette différence n'est pas due à une modulation variable de l'activation d'AP-1.

Ceci démontre que les rétinoïdes ont un impact important sur les paramètres inflammatoires des cellules articulaires, mais qu'il varie suivant l'espèce, suggérant que l'extrapolation des résultats obtenus à partir des cellules de rat est délicate.

ABSTRACT

Retinoids (molecules derived from vitamin A) used in experimental models of arthropathies, have shown interesting anti-arthritic properties. We have studied retinoid effects on the inhibition of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteases (MMP) induced by IL-1 β in rat and human synovial fibroblasts and chondrocytes. In pro-inflammatory conditions, synovial fibroblasts produce large quantities of inflammatory cytokines in the joint (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Both all-*trans* retinoic acid (ATRA, agonist of RAR) and 9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA, co-agonist of RAR and RXR) inhibit the expression of these cytokines in rat synovial fibroblasts stimulated by IL-1. ATRA also inhibit the phosphorylation of ERK1/2 induced by IL-1, without affecting that of p38 or JNK, and decrease activation of transcription factors AP-1, NF- κ B and NF-IL-6 induced by IL-1. The effect of ATRA on inflammatory cytokines expression is not potentiated by RXR agonist, nor reproduces by selective RAR agonists, and is not antagonized by RAR isotypes silencing, showing that the effects of ATRA are independent of RAR or RXR. However, the inhibitory effect of ATRA on AP-1 and on NF-IL-6 is reproduced by a ERK1/2 antagonist.

In pro-inflammatory conditions, chondrocytes produce large amounts of MMP and nitrites. ATRA inhibits iNOS expression and nitrites production induced by IL-1 in rat and human chondrocytes. However, total MMP activity is only inhibited in human chondrocytes, and this difference is not the consequence of a variable modulation of AP-1 activation.

These results showed that retinoids have an important impact on inflammatory parameters on articular cells, but they varied regarding to the species, suggesting that extrapolation of results obtained from rat cells to human is difficult.

MOTS CLÉS

Rétinoïdes – Chondrocytes et Fibroblastes synoviaux – Inflammation – Cytokines – Métalloprotéases matricielles.

KEY WORDS

Retinoids – Chondrocytes and synovial fibroblasts– Inflammation – Cytokines – Matrix Metalloproteases.