

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science-Technologie-Santé

FACULTE de PHARMACIE

Année : 2005

Thèse N°

## Thèse

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie Cellulaire et Biochimie

Présentée et soutenue par

**Pascale VERGNE-SALLE**

le 20 décembre 2005

**Etude de l'effet de différents effecteurs (diosgénine, léflunomide)  
sur la synthèse de cytokines et l'expression de COX-2  
dans les synoviocytes humains de type B de polyarthrite rhumatoïde.  
Identification des voies de transduction du signal.**

Thèse dirigée par M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOU

JURY :

M. le Professeur F. BERENBAUM

Rapporteur

M. le Professeur P. GILLET

Rapporteur

M. le Professeur J.L. BENEYTOU

Examineur

M. le Professeur R. TREVES

Examineur

M. le Professeur P. BERTIN

Examineur

M. le Docteur B. LIAGRE

Examineur

**UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTÉ DE PHARMACIE**

<b><u>DOYEN DE LA FACULTE :</u></b>	Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
<b><u>ASSESEURS :</u></b>	Madame le Professeur CHULIA Dominique Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences
<b><u>PROFESSEURS :</u></b>	
<b>BENEYTOU</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE - CRYPTOGRAMIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACIE GALENIQUE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE – CHIMIE MINERALE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	PARASITOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
<b>GHESTEM</b> Axel	BOTANIQUE - CRYPTOGRAMIE
<b>HABRIOUX</b> Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE – HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
<b>ODART</b> Nicole	PHARMACODYNAMIE
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE
<b><u>MAITRES DE CONFERENCES</u></b>	
<b>ALLAIS</b> Daovy	PHARMACOGNOSIE
<b>BASLY</b> Jean Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE – BROMATOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE
<b>CARDI</b> Patrice	PHYSIOLOGIE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Marie Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE – BROMATOLOGIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE – CRYPTOGRAMIE

<b>JAMBUT</b> Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>LAGORCE</b> Jean François	CHIMIE ORGANIQUE
<b>LARTIGUE</b> Martine	PHARMACODYNAMIE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
<b>LOTFI Hayat</b>	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	IMMUNOLOGIE
<b>PARTOUCHE</b> Christian	PHYSIOLOGIE
<b>POUGET</b> Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOMATHEMATIQUE
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE PHYSIQUE – CHIMIE MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOMATHEMATIQUES – INFORMATIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	INFORMATIQUE
<b><u>PROFESSEUR CERTIFIE</u></b>	
<b>MARBOUTY</b> Jean-Michel	ANGLAIS
<b><u>ATER</u></b>	
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	Scé M. le Prof. DREYFUSS
<b>DUMETRE</b> Aurélien	Scé M. le Prof. DREYFUSS et MOESCH
<b>FAURE</b> Sébastien	Scé Mme le Prof. OUDART
<b>YAHIAOUI</b> Samir	Scé M. le Prof. BUXERAUD

# Résumé

Bien que les mécanismes exacts conduisant à l'inflammation et à la destruction ostéo-articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) ne soient pas connus, cette maladie auto-immune se caractérise par l'activation de multiples cellules immunitaires aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de différents effecteurs de la destruction ostéo-articulaire comme les métalloprotéases et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). D'autre part, l'hyperplasie synoviale agressive est probablement liée à un défaut d'apoptose des cellules synoviales. Notre travail a été réalisé dans un modèle de culture de synoviocytes fibroblastiques humains de PR. La première partie du travail est consacrée à l'étude de l'apoptose et de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les cellules synoviales traitées par la diosgénine, un stéroïde végétal. La deuxième partie concerne les mécanismes d'action du léflunomide, utilisé dans le traitement de la PR et notamment ses effets sur les cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Nos résultats montrent pour la première fois que la diosgénine entraîne une inhibition de la croissance, une apoptose des cellules synoviales, associées à une induction de l'expression de COX-2. Le processus apoptotique déclenché par la diosgénine entraîne une chute du potentiel membranaire mitochondrial, l'activation de la caspase-3 et une fragmentation de l'ADN. Les effets pro-apoptotiques de la diosgénine sont associés à une surexpression de COX-2 corrélée à une augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> endogène.

L'A77 1726, métabolite actif du léflunomide, est responsable à forte dose (100 µM) d'une augmentation de la sécrétion d'interleukine (IL)-10, d'une diminution de la production d'IL-11 et n'a pas d'effet sur celles du récepteur soluble du *tumor necrosis factor-α* (sTNFR1) et de l'IL-8. Nos résultats confirment que l'A77 1726 est responsable d'une diminution de la production d'IL-6 et de PGE<sub>2</sub> et d'une augmentation de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra). Les effets de l'A77 1726 semblent associés à une activation de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38. Enfin, l'A77 1726 est un puissant inhibiteur de l'activation du *nuclear factor-κB* (NF-κB) induite par l'IL-1β.

## **MOTS CLES :**

Polyarthrite rhumatoïde, synoviocytes humains, diosgénine, léflunomide, cytokines, interleukine-10, interleukine-11, apoptose, MAPK, NF-κB, cyclooxygénase-2

# Abstract

Although the exact physiopathology of rheumatoid arthritis (RA) is unknown, this chronic inflammatory joint disease is characterized by the activation of multiple immune cells, production of pro-inflammatory cytokines and synthesis of different destructive factors such as metalloproteases and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). In addition, alterations in the apoptosis of synovial cells is probably responsible for synovial hyperplasia. We studied the effects of diosgenin, a plant steroid, and the effects of leflunomide, a disease-modifying antirheumatic drug in a model of cultured human RA fibroblast synovial cells (RA FLS).

First, diosgenin inhibits RA FLS growth with apoptosis induction associated with cyclooxygenase-2 (COX-2) upregulation. We observed a loss of mitochondrial membrane potential, caspase-3 activation and DNA fragmentation after diosgenin treatment. These results suggest that the proapoptotic effect of diosgenin is associated with COX-2 overexpression correlated with overproduction of endogenous PGE<sub>2</sub>. In the second part of the study, we showed that high dose of A77 1726 (100 μM), the active metabolite of leflunomide, increased interleukin(IL)-10 secretion, decreased IL-11 release and had no effect on tumor necrosis factor-α soluble receptor I (sTNFRI) and IL-8 secretion in IL-1β-stimulated RA FLS. Furthermore, our results confirmed that A77 1726 decreases IL-6 and PGE<sub>2</sub> synthesis while it increases IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) secretion. The effect of A77 1726 on IL-10 and IL-11 secretion seemed to be associated with the status of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. Furthermore, A77 1726 was a potent inhibitor of nuclear factor-κB (NF-κB) activation induced by IL-1β in human RA FLS.

## **KEY WORDS:**

Rheumatoid arthritis, human synoviocytes, diosgenin, leflunomide, cytokines, interleukin-10, interleukin-11, apoptosis, MAPK, NF-κB, cyclooxygenase-2.

# Sommaire

<b>RÉSUMÉ</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>SOMMAIRE</b> .....	5
<b>PUBLICATIONS</b> .....	8
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	9
<b>INTRODUCTION</b> .....	15
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	18
<b>I / PHYSIOPATHOLOGIE DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE (PR)</b> .....	19
A / LA SYNOVITE RHUMATOÏDE.....	19
B / ROLE DES CELLULES T.....	21
C / ROLE DES CELLULES B .....	26
D / ROLE DES CELLULES SYNOVIALES.....	27
E / ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES .....	29
F / CYTOKINES ET POLYARTHRITE RHUMATOÏDE.....	30
G / LA DESTRUCTION OSTEO-CARTILAGINEUSE .....	42
H / L' ANGIOGENESE.....	44
<b>II / LE METABOLISME DES CYCLO-OXYGENASES</b> .....	45
A / METABOLISME DE L' ACIDE ARACHIDONIQUE .....	45
B / LES TROIS TYPES DE CYCLO-OXYGENASES (COX) .....	46
C / LES PROSTAGLANDINES.....	48
D / CYCLOOXYGENASES ET PR.....	49
<b>III / VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE ET POLYARTHRITE RHUMATOÏDE</b> .....	50
A / LA VOIE TRAF/NIK/I $\kappa$ BK/NF- $\kappa$ B .....	51
B / LA VOIE DES MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN (MAP) KINASES.....	54
C / LA VOIE PHOSPHATIDYL INOSITOL-3 KINASE (PI3K) .....	57
D / LA VOIE JAK/STAT.....	57
<b>IV / L' APOPTOSE</b> .....	58
A / APPROCHES GENERALES DE L' APOPTOSE .....	58
B / POLYARTHRITE RHUMATOÏDE ET APOPTOSE.....	78
<b>V / LE LEFLUNOMIDE</b> .....	80
<b>VI / LA DIOSGENINE</b> .....	82

<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	86
I / CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES SYNOVIALES .....	87
A / PREPARATION ET CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES SYNOVIALES HUMAINES.....	87
B / CULTURE DES SYNOVIOCYTES HUMAINS DE TYPE B.....	88
II / ETUDE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES.....	88
A / TEST AU MTT APRES TRAITEMENT PAR LA DIOSGENINE.....	88
B / MICROSCOPIE OPTIQUE A CONTRASTE DE PHASE.....	89
III / ANALYSE DE L' APOPTOSE.....	89
A / ETUDE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ET MARQUAGE AU DAPI.....	89
B / DOSAGE DE L' ACTIVITE CASPASE-3 .....	90
C / ANALYSE QUANTITATIVE DE L' APOPTOSE .....	91
IV / ANALYSE DE L' EXPRESSION DE COX-2 .....	92
A / EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES .....	92
B / ANALYSE DE L' EXPRESSION DE LA PROTEINE COX-2 .....	92
V / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE PGE <sub>2</sub> .....	94
VI / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES .....	95
VII / PREPARATION DES EXTRAITS NUCLEAIRES ET ETUDE DE L' ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B .....	97
VIII / ANALYSE QUANTITATIVE DES MAP KINASES : PHOSPHO-ERK1/ERK2, PHOSPHO-JNK ET PHOSPHO-p38 $\alpha$ HUMAINES .....	98
IX / ANALYSES STATISTIQUES.....	98
 <b>RÉSULTATS</b> .....	 100
I / RESULTATS DES EXPERIENCES REALISEES AVEC LA DIOSGENINE.....	101
A / CULTURE DE CELLULES SYNOVIALES .....	101
B / LES EFFETS DE LA DIOSGENINE SUR LA PROLIFERATION ET LA MORPHOLOGIE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES HUMAINES DE PR.....	102
C / ANALYSE DE LA CHUTE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ).....	105
D / ETUDE DE L' ACTIVITE CASPASE-3 .....	106
E / ANALYSE DE LA FRAGMENTATION DE L' ADN.....	107
F / ETUDE DE L' EXPRESSION ET DE L' ACTIVITE DE LA COX-2 DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR LA DIOSGENINE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR .....	109
G / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE PGE <sub>2</sub> ENDOGENE DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR LA DIOSGENINE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES.....	111
H / ETUDE DE L' EFFET DE LA DIOSGENINE SUR LA FRAGMENTATION DE L' ADN APRES SUREXPRESSON DE COX-2 INDUITE PAR L' IL-1 $\beta$ .....	113
I / LES EFFETS DE LA DIOSGENINE SUR LA PRODUCTION D' IL-6 ET D' IL-8 PAR LES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR .....	114
II / RESULTATS DES EXPERIENCES REALISEES AVEC L' A77 1726.....	116
A / EFFETS DE L' A77 1726 SUR LA FRAGMENTATION DE L' ADN DANS LES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR .....	116
B / EFFETS DE L' A77 1726 SUR LA PRODUCTION DE CYTOKINES ET ANTAGONISTES DES CYTOKINES : IL-6 , IL-8, IL-10, IL-11, IL-15, IL-18, sTNFRI, IL-1Ra .....	116

C / ANALYSE DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE COX-2 APRES TRAITEMENT DES CELLULES SYNOVIALES PAR L'A77 1726 .....	123
D / EFFETS DE L'A77 1726 SUR L'ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B ET DES MAP KINASES (ERK1/ERK2, p38 $\alpha$ , JNK).....	125
<b>DISCUSSION</b> .....	130
I / PREMIERE PARTIE.....	133
II / DEUXIEME PARTIE .....	138
<b>CONCLUSION</b> .....	144
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	148
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	173
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	177
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	178
<b>ANNEXES</b> : publications élaborées au cours de la thèse.....	180
ANNEXE 1 .....	181
ANNEXE 2 .....	182

# Publications

B Liagre, P. Vergne, M Rigaud, JL Beneytout. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. FEBS letters, 1997; 414, p.159-64.

P Vergne, B Liagre, P Bertin, J Cook-Moreau, R Trèves, JL Beneytout, M Rigaud. Methotrexate and cyclooxygenase metabolism in cultured human rheumatoid synoviocytes. J. Rheumatol., 1998, 25, p.433-40.

B Liagre, P Vergne, M Rigaud, JL Beneytout. Arachidonate 15-lipoxygenase of reticulocyte-type in human arthritis type B synoviocytes and modulation of its activity by proinflammatory cytokines. J. Rheumatol., 1999, 26, p.1044-51.

B Liagre, JL Charissoux, P Vergne, D Bernache-Assoulant, JL Beneytout. Effects of biomaterials on osteoarthritis and rheumatoid synovial cells. Modulation of eicosanoid and proinflammatory cytokine production. Bioceramics, vol. 11, Edited by R.Z. Le Geros and J.P. Le Geros, Elsevier Science Ltd 1998, p.297-300.

F Lapique, P Vergne, JY Jouzeau, D Loeuille, P Gillet, E Vignon, P Thomas, P Velicitat, D Türk, C Guillaume, A Gaucher, P Bertin, P Netter. Articular diffusion of meloxicam after a single oral dose. Relationship to cyclo-oxygenase inhibition in synovial cells. Clin Pharmacokinet., 2000, 39(5), p.369-82.

JC Le Bail, B Liagre, P Vergne, P Bertin, JL Beneytout, G Habrioux. Aromatase in synovial cells from postmenopausal women. Steroids, 2001, 66, p.749-57.

B Liagre, S Moalic, P Vergne, JL Charissoux, D Bernache-Assollant, JL Beneytout. Effects of alumina and zirconium dioxide particles on arachidonic acid metabolism and proinflammatory interleukin production in osteoarthritis and rheumatoid synovial cells. J. Bone Joint Surg. [Br], 2002, 84-B, p.920-30.

## **Publications élaborées au cours de la thèse:**

B Liagre, P Vergne-Salle, C Corbière, JL Charissoux, JL Beneytout. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synoviocytes with cyclooxygenase-2 overexpression. Arthritis Res. Ther., 2004, 6, p.R373-83 (Annexe 1).

P Vergne-Salle, DY Léger, P Bertin, R Trèves, JL Beneytout, B Liagre. Effects of the active metabolite of leflunomide, A77 1726, on cytokine release and the MAPK signalling pathway in human rheumatoid arthritis synoviocytes. Cytokine 2005, 31, p.335-48 (Annexe 2).

# Liste des abréviations

## A

AA : acide arachidonique  
 ABTS : 2,2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate]  
 Ac : anticorps  
 ADCC : cytotoxicité liée au fragment Fc des immunoglobulines  
 ADN : acide désoxyribonucléique  
 ADNc : ADN complémentaire  
 ADP : adénosine diphosphate  
 AIF : "apoptosis-inducing factor"  
 AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens  
 AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
 ANT : transporteur de nucléotide adénylique  
 AP-1 : « activator protein », facteur de transcription  
 Apaf-1 : "Apoptotic protease-activating factor"  
 AURE : "adenosine-uridine rich element"  
 ARN : acide ribonucléique  
 ATF6 ou 4 : "Activating Transcription Factor"  
 ATP : adénosine triphosphate

## B

BAR : "bifunctional apoptosis regulator"  
 Bcl-2 : "B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins"  
 bFGF : "b fibroblast growth factor"  
 BH : "Bcl-2 homology"  
 BSA : albumine sérique bovine

## C

CARD : "caspase recrutement domain"  
 CBP : "CREB-binding protein"  
 CD : cellule dendritique  
 C/EBP : "CCAAT/enhancer-binding protein"  
 CHOP : « C/EBP homologus protein »  
 CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
 COX : cyclooxygénases  
 CPA : cellule présentatrice de l'antigène  
 CREB : "Cyclic-AMP regulatory binding protein"

**D**

DAG : diacylglycérol  
 DAPI : 4',6-diamino-2-phenylindole  
 DAP-kinase : "Death-associated protein kinase"  
 DAS : "disease activity score"  
 DD : "Death Domain"  
 DED : "death effector domain"  
 DEDAF : "DED-associated factor"  
 DEDD : "DED-containing DNA-binding protein"  
 DFF : facteur de fragmentation de l'ADN  
 DHODH : dihydroorotate déshydrogénase  
 DIABLO : "Direct IAP Binding protein with Low pI"  
 DISC : "Death-inducing Signaling Complex"  
 DMEM : "Dulbecco's Modified Eagle Medium"  
 DMSO : diméthylsulfoxyde  
 DNase : désoxyribonucléase  
 DO : densité optique  
 DR3, DR4, DR5 : "Death Receptor"  
 DS : déviation standard  
 DTT : dithiothréitol  
 $\Delta\Psi_m$  : potentiel membranaire mitochondrial

**E**

EC : extrait cytosolique  
 EGF : "epidermal growth factor"  
 EMSA : "Electromobility Shift Assay"  
 ENA : "epithelial neutrophil activating peptide"  
 endo G : endonucléase G  
 EP : récepteur de prostaglandine  
 EPO : érythropoïétine  
 ERK : "extracellular signal-regulated: « ER stress response element"

**F**

FACS : "Fluorescent analysis of cells stained"  
 FAD: "Flavin Adenin Dinucleotide"  
 FADD : "Fas-associated death domain"  
 FLAP : "five-lipoxygenase-activating-protein"  
 Flice : procaspase-8 ("FADD-like ICE")  
 FLIP : "Flice inhibitory protein"

**G**

GM-CSF : “granulocyte macrophage-colony stimulating factor”

**H**

12-HHT : 12-S-hydroxy-5, 8, 10-hepta décatriènoïque

HEL : lignée de cellules érythroleucémiques

HEPES : N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N’-[2-éthanesulfonique]

5, 12 ou 15-HETE : acide (5, 12 ou 15)-hydroxyeicosatétraènoïque

5, 12 ou 15-HPETE : acide (5, 12 ou 15)-hydroxyperoxyeicosatétraènoïque

HLA : « human leucocyte antigen »

Hsp : « Heat shock protein »

**I**

IAPs : protéines inhibitrices de l’apoptose

ICAD : “inhibitor of CAD”

ICAM : “intercellular adhesion molecule”

ICE : “interleukin-1 $\beta$  converting enzyme”

Ig : immunoglobuline

IGF : “insulin growth factor”

I- $\kappa$ B : “inhibitor of  $\kappa$ B”

IKK : I- $\kappa$ B kinase

IL : interleukine

IL-1AcP : protéine accessoire du récepteur de l’IL-1

IL-1Ra : antagoniste du récepteur à l’interleukine-1

INF: interféron

IP3 : inositol tri-phosphate

IRAK : protéine kinase activatrice du récepteur de l’IL-1

IRE : endonucléase de type I (« high inositol-requiring »)

**J**

JAK/STAT : “janus kinase/signal transducer and activator of transcription”

JNK : “c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase”

**K**

kDa : kilo dalton

kpb : kilo paire de bases

**L**

LAF : “lymphocyte function associated antigen”

LEF : léflunomide

LIF : “leucocyte inhibitory factor”

LOX : lipoxygénase

LT : lymphotoxine

## M

M : mitose

MAPK : “mitogen-activated protein kinase”

MCP : “monocyte chemoattractant protein”

MEK : “MAP Kinase Kinase”

MEKK : “MAP Kinase Kinase Kinase”

MIP : “macrophage inflammatory protein”

MMP : “matrix metalloprotéinase”

MPTP : pore de transition de perméabilité membranaire

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide

## N

NAD<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide

NF-κB : « nuclear factor-Kappa B »

NIK : “NF-κB-inducing Kinase”

NO : oxyde nitrique

NOXA : membre de la famille Bcl-2 (« BH3-only »)

## O

Omi/HtrA2 : “ high temperature requirement protein A2”

OPG : ostéoprotégérine

## P

PAF : facteur d’activation plaquettaire

PARP : poly (ADP-ribose) polymérase

PBP : « PPARγ-binding protein »

PBS : tampon de phosphate de sodium

PCOX-1 : « partial COX-1 »

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PDGF : “platelet derived growth factor”

PG : prostaglandine

PGES : “PGE<sub>2</sub> synthase”

PI3K : phosphatidyl inositol-3 kinase

PKA : protéine kinase A

PLA<sub>2</sub> : phospholipase 2

PMA : “phorbol 12-myristate 13-acetate”

PPAR : “peroxisome proliferator-activated receptors”

PPRE : « peroxisome proliferator response element »

PR : polyarthrite rhumatoïde

## R

RANK : récepteur activateur de NF- $\kappa$ B

RANTES : “regulated upon activation T cell expressed & secreted”

RE : réticulum endoplasmique

RIP : « receptor-interacting protein »

RLO : radicaux libres oxygénés

RNase : ribonucléase

RT : transcription réverse

## S

SAM : “sterile alpha motif”

SdFFF : “sedimentation field flow fractionation”

SDS : sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de poly-acrylamide en présence de SDS

Smac : “Second Mitochondria-derived Activator of Caspase”

SOCS : “suppressor of cytokine signalling”

STAT : “signal transducers and activation of transcription”

sTNF-R : récepteur soluble du TNF

SVF : sérum de veau fœtal

## T

TBS : tampon tris salin

TCR : récepteur à l'antigène du lymphocyte T

TGF- $\beta$  : “tumor growth factor  $\beta$ ”

TIMP : inhibiteur de métalloprotéase

TNF : “tumor necrosis factor”

TNF-R : “TNF receptor ”

TRADD : “TNF receptor-associated death domain”

TRAF : “TNF receptor-associated factor”

TRAIL : “tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand”

Treg : cellule T régulatrice

TX : thromboxane

## U

UDPGD : uridine diphosphoglucose dihydrogénase

URF : unité relative de florescence

URL : unité relative de luminescence

## V

VCAM-1 : « vascular cell adhesion molecule »

VDAC : canal anionique voltage-dépendant

VEGF : « vascular endothelial growth factor »

**X**

XAF-1 : “XIAP associated factor”

XIAP : “X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein”

# **Introduction**

Décrite par le Français Auguste Landré-Beauvais en 1800, la polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Sa prévalence en France varie de 0,3 à 0,8% de la population adulte. Elle atteint trois fois plus la femme que l'homme, surtout entre 30 et 50 ans. Elle est classiquement intégrée dans le groupe des maladies auto-immunes et des connectivites. Maladie ou syndrome ? C'est une affection très hétérogène ce qui explique les difficultés de sa prise en charge. Certaines PR s'avèrent très bénignes, d'autres au contraire sont d'une agressivité redoutable. Après une phase variable d'installation de la maladie, la période d'état se caractérise par une polyarthrite bilatérale, symétrique et destructrice, d'évolution chronique entrecoupée de phases aiguës et parfois compliquée de manifestations systémiques : manifestations hématologiques, pleuro-pulmonaires, cardiaques, hépatiques, atteinte rénale et oculaire, vascularite, etc...

L'étiologie et la pathogénie de la PR restent mal connues. Un grand nombre d'avancées ont cependant permis de mieux définir les nombreuses interactions entre différents types cellulaires présents au sein de l'articulation enflammée et en particulier d'affiner nos connaissances sur les cytokines, acteurs majeurs de ces interactions. Sur le versant immunitaire, les principales cellules en cause sont les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Au sein de l'articulation, les cellules endothéliales permettent la migration des cellules et concourent à la néoangiogenèse observée. Les synoviocytes et macrophages synthétisent des facteurs pro-inflammatoires et des molécules effectrices responsables de la destruction ostéocartilagineuse. Parmi ces facteurs, les cytokines jouent un rôle majeur avec en tête le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine (IL)-1. Il s'établit un déséquilibre entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires au profit des premières. Par activation ou en synergie avec les cytokines pro-inflammatoires, les prostaglandines amplifient la réponse inflammatoire et participent à la destruction articulaire. L'activité de ces différents médiateurs nécessite la transmission d'un signal intra-cellulaire. Les principales voies de signalisation impliquées dans l'inflammation sont les voies des *mitogen-activated protein* (MAP) kinases et du *nuclear factor-kappaB* (NF- $\kappa$ B). Elles sont désormais considérées comme des cibles thérapeutiques d'avenir. Enfin, la formation du pannus synovial, constitué d'une hyperplasie des cellules synoviales envahissant les structures voisines, est probablement liée à un défaut d'apoptose. Cependant, les mécanismes de contrôle de l'apoptose des cellules synoviales dans la PR sont encore mal connus.

Des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques ont permis le développement des nouveaux traitements anti-TNF ayant une efficacité clinique spectaculaire et le pouvoir de diminuer la progression des destructions articulaires. Cependant, leurs effets sont le plus souvent suspensifs, avec reprise de l'évolution à l'arrêt. Ainsi, il reste de nombreuses inconnues concernant la physiopathologie.

Dans l'axe des différents thèmes d'intérêt du laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire de la Faculté de Pharmacie de Limoges, notre travail a été centré sur les thérapeutiques de la PR : notamment le léflunomide et ses mécanismes d'action et la diosgénine, un stéroïde végétal, dans un modèle de culture de cellules synoviales fibroblastiques de PR que nous utilisons depuis plusieurs années.

Après une étude bibliographique sur la physiopathologie de la PR, le métabolisme des cyclo-oxygénases, les voies de signalisation intra-cellulaires, l'apoptose, le léflunomide et la diosgénine, nous avons séparé les résultats des expériences réalisées en deux parties.

Dans le laboratoire, différents travaux ont porté sur les effets de la diosgénine et ont montré qu'elle pouvait induire l'apoptose de différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, associée à une augmentation de l'expression de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2). Compte tenu de la résistance des cellules synoviales à l'apoptose dans la PR, il nous est apparu intéressant d'étudier les effets de la diosgénine sur la prolifération, la survie des cellules synoviales, ainsi que l'expression et l'activité de COX-2 et ses relations avec l'apoptose dans les cellules synoviales de PR en culture. Les résultats de ces expériences représentent la première partie du travail exposé.

La deuxième partie concerne les mécanismes d'action du léflunomide, un traitement de la PR ayant fait la preuve de son efficacité clinique. Les mécanismes d'action du léflunomide sont probablement multiples et le plus connu est la diminution de la prolifération des lymphocytes T activés par inhibition de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), une enzyme clé de la voie de biosynthèse *de novo* de pyrimidine. Les autres cibles du léflunomide pourraient être les médiateurs de l'inflammation et notamment les cytokines. A côté de ses propriétés inhibitrices sur la production de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), d'IL-6 et au contraire activatrices de la production d'un inhibiteur naturel, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra), nous nous sommes intéressés à ses effets sur différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires : l'IL-8, l'IL-10, l'IL-11, l'IL-15, l'IL-18 et le récepteur soluble du TNF. Puis, nous avons plus particulièrement étudié les voies de signalisation impliquées dans les effets du léflunomide sur l'IL-10 et l'IL-11.

## **Partie Bibliographique**

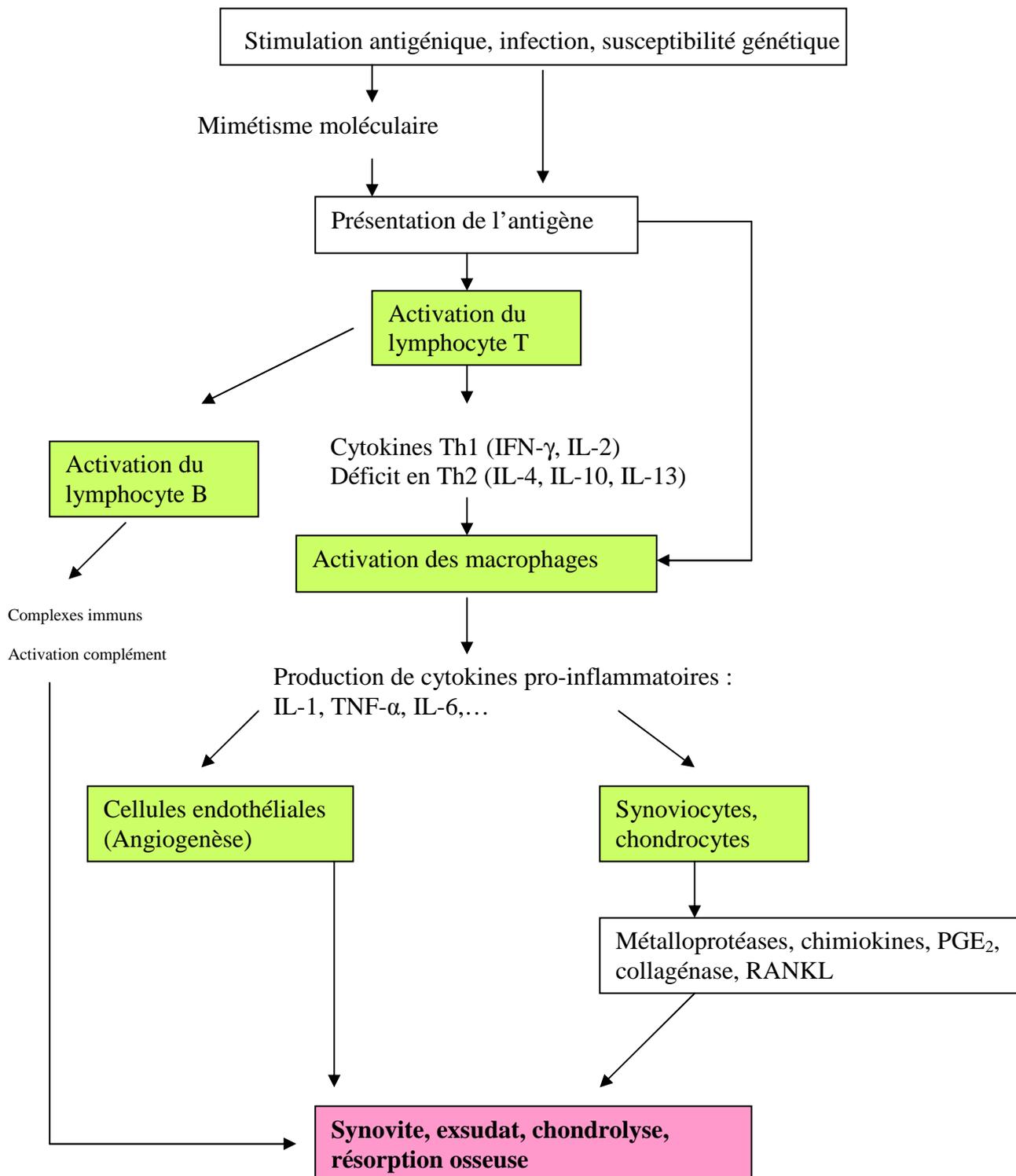
## **I / PHYSIOPATHOLOGIE DE LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE (PR)**

La pathogénie de la PR reste obscure, même si l'on pense qu'il s'agit d'une affection auto-immune, impliquant les lymphocytes T et B, en réponse à une stimulation antigénique de nature variable (antigènes ou super-antigènes, endogène ou exogène), dans un contexte de susceptibilité génétique. Les synoviocytes jouent également un rôle important, en particulier dans la phase de destruction ostéo-articulaire et dans la perpétuation de la maladie. Naturellement, l'immunité innée, dans laquelle se rangent l'inflammation et la production de cytokines, occupe une place fondamentale, siège des actuels progrès thérapeutiques. L'angiogenèse, enfin, est un phénomène transversal, intervenant tout au long de la maladie. L'ensemble de ces acteurs va transformer une articulation normale, en une articulation inflammatoire siège d'une hypertrophie synoviale richement vascularisée, infiltrée par des cellules de l'inflammation et des lymphocytes, précédant parfois de peu une destruction cartilagineuse et osseuse (Boissier, 2002) (figure 1).

### **A / LA SYNOVITE RHUMATOIDE**

La membrane synoviale normale est constituée de 2 à 3 couches cellulaires composées de synoviocytes et appelée intima, reposant sur un tissu fibro-adipeux vascularisé appelé sous-intima. L'absence de membrane basale entre tissu synovial et tissu sous-synovial facilite les échanges. Sur le plan histologique, il existe 2 types de synoviocytes (Fitzgerald et al., 1995). Les synoviocytes de type A ou « macrophage-like » représentent 20 à 30% des cellules synoviales et ont un aspect macrophagique: appareil lysosomal très riche, reticulum endoplasmique réduit, noyau riche en hétérochromatine et extensions digitiformes. Elles expriment des marqueurs macrophagiques, notamment CD14 et CD68. Ce sont des cellules d'origine hématopoïétique.

Les synoviocytes de type B ou « fibroblaste-like » représentent 70 à 80% des cellules synoviales. Leur aspect suggère une nature fibroblastique: forme allongée, reticulum endoplasmique et appareil de Golgi très développé, peu de vacuoles, extensions digitiformes et noyau pâle. Leur origine serait locale, dérivant des fibroblastes du tissu sous-synovial, dont elles se distinguent par l'expression d'UDPGD (uridine diphosphoglucose dihydrogénase) et de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule).



**Figure 1:** Séquence pathogénique de la polyarthrite rhumatoïde d'après Boissier (2002).

Dans la PR, la membrane synoviale prolifère pour aboutir au pannus synovial responsable de la destruction cartilagineuse et osseuse. La synovite rhumatoïde est caractérisée par une hyperplasie de la membrane synoviale, avec un épaississement de la couche cellulaire bordante (intima), un infiltrat de cellules inflammatoires périvasculaires, un œdème interstitiel et une néo-angiogenèse (Palmer et al., 1995). L'épaississement de l'intima est probablement le résultat d'une prolifération des synoviocytes de type B et d'un recrutement important de macrophages (Fitzgerald et al., 1995 ; Ritchlin et al., 2004). Dans la sous-intima, l'infiltrat inflammatoire périvasculaire est composé essentiellement de macrophages, de lymphocytes T avec une prédominance des CD4 par rapport aux CD8. Le nombre de lymphocytes B est faible. Les lymphocytes T CD4+ prédominent en effet dans les zones denses périvasculaires autour des macrophages. Cependant, les lymphocytes T CD8+ sont bien représentés dans les zones dites « transitionnelles » à la périphérie des agrégats cellulaires (Fitzgerald et al., 1995).

Les premiers événements restent obscurs. Plusieurs arguments plaident pour une accumulation initiale de cellules macrophagiques avec un phénotype activé, suivie d'une prolifération des synoviocytes de type B, caractérisés également par des modifications phénotypiques (Palmer et al., 1995). La prolifération des synoviocytes de type B, probablement liée en partie à une perturbation des phénomènes d'apoptose, contribue de façon importante à l'inflammation articulaire et à la dégradation de la matrice : libération de molécules effectrices amplifiant l'attraction des leucocytes, synthèse de nombreuses cytokines et augmentation de la production des métalloprotéases (MMPs) (Ritchlin et al., 2000).

## **B / ROLE DES CELLULES T**

### **1 / Le paradigme de la cellule T**

Première étape de la réponse immunitaire spécifique, la cellule T a été mise au centre de la physiopathologie de la PR, support d'un raisonnement appelé « le paradigme de la cellule T dans la PR » et d'une théorie presque exclusivement auto-immune de la PR. Le lymphocyte T CD4 jouerait un rôle dans la phase d'initiation de la maladie. En effet, il y aurait présentation par la cellule présentatrice d'antigène (CPA) d'un antigène arthritogène inconnu par des molécules HLA de classe II aux lymphocytes T CD4, ce qui enclencherait le processus inflammatoire et l'activation cellulaire conduisant à la synovite. Le dogme de la prévalence des cellules T dans le développement de la PR a cependant été remis en question il y a une quinzaine d'années en attribuant un rôle prépondérant à l'activation de cellules non T, en particulier les synoviocytes et aux médiateurs pro-inflammatoires qu'ils sécrètent. La polémique demeure encore à ce jour quant à la question de

savoir si le déclenchement de la maladie est orchestré par les lymphocytes T qui sont activés par un (des) autoantigène(s) ou si l'intervention des lymphocytes T n'est que la conséquence d'une réaction inflammatoire à début articulaire impliquant les synoviocytes.

De nombreux arguments viennent à l'appui d'un rôle important des lymphocytes T (Fox, 1997). Ceux-ci sont souvent trouvés en abondance dans le tissu synovial et le liquide articulaire de patients atteints de PR, notamment les lymphocytes T exprimant le phénotype mémoire CD4+ CD45RO et les lymphocytes porteurs de marqueurs d'activation. La liaison de la PR avec des allèles du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II est un argument important de l'intervention de ceux-ci dans la pathogénie. Les modèles expérimentaux viennent à l'appui de cette théorie, notamment celui de l'arthrite au collagène qui ne peut se produire en l'absence de lymphocytes T actifs. Le rôle pivot du lymphocyte T, dans la pathogénie de la PR, est renforcé par l'hypothèse du peptide arthritogène. Le peptide arthritogène pourrait être d'origine exogène (agents infectieux ou super-antigènes) ou endogène (collagène de type II, protéoglycanes, glycoprotéine gp39 chondrocytaire, super-antigènes, etc...). Il serait reconnu de façon anormale par les lymphocytes T CD4, avec comme conséquences la prolifération et l'activation des lymphocytes T, des lymphocytes B, la sécrétion de cytokines et de médiateurs inflammatoires.

Cependant, plusieurs arguments plaident contre leur rôle déclenchant et exclusif (Cantagrel et al., 1995): la faible quantité de cytokines T-dépendantes (interleukine(IL)-2, IL-3, IL-4 et interféron(IFN)- $\gamma$ ) dans l'articulation par rapport à des cytokines produites par d'autres types cellulaires ; les lymphocytes synoviaux sont des cellules peu actives (petits et quiescents, faible nombre de cellules T en phase de multiplication, présence surtout des marqueurs tardifs d'activation [HLA-DR ou VLA-1] et non du marqueur d'activation précoce [CD25]) ; l'absence d'oligoclonalité des lymphocytes T dans la synoviale rhumatoïde ; la destruction paraît souvent peu dépendante de la présence des cellules T ; enfin la déplétion par des anticorps monoclonaux anti-CD4 n'est pas toujours efficace en pratique clinique.

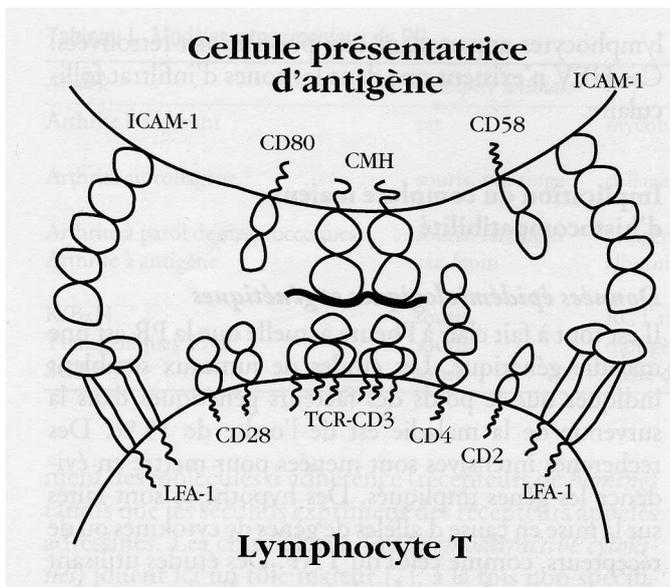
## **2 / Migration des cellules T dans l'articulation rhumatoïde et apparition d'un organe lymphoïde secondaire intrasynovial**

Les lymphocytes T synoviaux sont pour la plupart des cellules CD4+ de type Th1 produisant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 (Boissier, 2002). Les lymphocytes CD8, également présents mais en proportion plus modeste, ont aussi un rôle pathogénique. Ils peuvent intervenir par la production de cytokines, leur fonction cytotoxique ou en participant à une inhibition spécifique de la réponse à certains antigènes. La présence des cellules T dans la membrane synoviale est la résultante de phénomènes décrits sous le terme de « homing ». Les lymphocytes concernés entrent en interaction

avec la cellule endothéliale, car les premiers expriment des molécules d'adhérence (récepteurs de « homing ») tandis que les seconds expriment des récepteurs appelés adressines. Les chimiokines ou « chemoattractive cytokines » jouent ici un rôle majeur, à la fois non spécifique (attraction des leucocytes) et spécifique (chémoattraction de certaines populations lymphocytaires spécifiques) (Gerard et al., 2001). Enfin, les cellules T retenues au sein du tissu synovial sont sélectionnées. La perturbation des phénomènes d'apoptose pourrait rendre compte de leur persistance à long terme dans la membrane synoviale, longtemps après une première stimulation. Le micro-environnement synovial interviendrait dans la persistance délétère de ces lymphocytes : l'IFN- $\beta$ , produit par les synoviocytes, est un agent essentiel de la survie des lymphocytes T (Pilling et al., 1999). Les lymphocytes s'organisent comme dans un ganglion lymphatique, formant un véritable organe lymphoïde secondaire avec des zones à prédominance de lymphocytes T voisinant étroitement des zones de lymphocytes B (Berek et al., 1997). La chronologie et le mécanisme de formation de cette néo-organogenèse lymphoïde sont encore mal connus.

### **3 / Implication du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)**

La PR est une maladie génétique, comme en témoignent les études de jumeaux. Le poids des facteurs génétiques dans la survenue de la maladie serait de l'ordre de 15%. De nombreuses recherches ont été menées et la seule association formellement identifiée est celle avec le système HLA. L'haplotype HLA DR4 est associé à la PR, notamment les génotypes DRB1\*0401 et 0404 sont fortement associés avec les formes destructrices de PR dans les populations caucasoïdes (Eliaou, 1995). Dans les groupes où les allèles DRB1\*0401 et 0404 sont rares, d'autres allèles paraissent impliqués dans la susceptibilité à la maladie, tels DRB1\*0101, DRB1\*1001, DRB1\*1402, et peut être l'association d'allèles de DQB1 à des spécificités DQ3 et DQ5 (Nepom, 2001). La fonction initiale des molécules de classe II du CMH est de présenter l'antigène, l'ensemble antigène-molécule de classe II à la surface de la CPA étant spécifiquement reconnu par le récepteur à l'antigène de la cellule T, en formant un complexe trimoléculaire (CMH-antigène-récepteur à l'antigène) (figure 2).



**Figure 2:** Présentation de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité au récepteur à l'antigène de la cellule T (TCR) d'après Boissier (2002).

Les différents allèles HLA de classe II à risque partagent une séquence d'acides aminés identiques (QKRAA ou QRRAA ou RRRAA) entre les positions 70-74 de la 3<sup>ème</sup> région hypervariable du domaine NH-2 terminal appelé « épitope partagé » (poche moléculaire dans laquelle se loge l'antigène présenté). Plusieurs hypothèses ont été proposées. Cette séquence d'acides aminés serait impliquée dans la présentation des peptides antigéniques aux récepteurs des cellules T. Il y aurait ainsi sélection et présentation de peptide(s) auto-réactif(s) qui serai(en)t responsable(s) de l'initiation du processus pathologique (Eliaou, 1995). Certains antigènes microbiens contiennent cette séquence comme les protéines bactériennes de choc thermique, hsp. L'hypothèse serait que les molécules HLA DR4 contenant QKRAA, comme HLA DRB1\*0401, pourraient elles-mêmes être présentées comme des antigènes, faire sélectionner dans le thymus des lymphocytes T spécifiques de QKRAA, capables ensuite de reconnaître des antigènes microbiens porteurs de cette séquence par réaction croisée dans l'articulation (Albali et al., 1995).

#### 4 / Réponse des lymphocytes T dans la synoviale

La recherche directe d'un auto-antigène responsable du déclenchement de la PR s'avérant infructueuse, de nombreuses études ont été réalisées pour analyser les caractères et la spécificité de la réponse T dans la membrane synoviale. La très grande majorité des lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur (TCR) hétérodimérique formé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . Le répertoire potentiel des lymphocytes T est de  $10^{15}$  à  $10^{22}$  spécificités, correspondant au nombre théorique de combinaisons possibles des gènes variables (V) $\alpha$  et  $\beta$  du TCR. Il est en réalité

beaucoup plus restreint. Dans la PR, les lymphocytes T synoviaux et du sang périphérique expriment l'ensemble des gènes V $\beta$ . Néanmoins, une surexpression de certaines familles de gènes V $\beta$  par les lymphocytes T de la synoviale par rapport à ceux du sang circulant a pu être mise en évidence: V $\beta$ 3, V $\beta$ 17, V $\beta$ 14 (Alam, 1995). Sur les nombreuses études consacrées à ce sujet, des différences notables existent et ces prédominances semblent varier selon que l'on étudie la membrane synoviale ou le liquide articulaire. Cette question de l'oligoclonalité de la réponse T n'est pas résolue. Quoi qu'il en soit, des anomalies du répertoire paraissent exister concernant à la fois les lymphocytes CD4+ et CD8+.

Enfin, les différents modèles expérimentaux de polyarthrite chez l'animal montrent que la phase effectrice de la maladie peut être la conséquence de réponses immunitaires diverses (Fournier, 2005). Il peut s'agir de lymphocytes T spécifiques d'un autoantigène à localisation strictement articulaire (le collagène de type II par exemple) ou dirigés contre une protéine ubiquitaire (la glucose-6-phosphate isomérase) qui s'accumulerait dans l'articulation. Au contraire, remettant en cause le concept de l'antigène arthritogénique unique, une mutation d'une protéine (ZAP-70) intervenant dans la signalisation induite par le TCR pourrait altérer la sélection positive et négative dans le thymus et aboutir à des lymphocytes hyperréactifs à de multiples antigènes.

## **5 / Les cellules T régulatrices**

A côté des lymphocytes T de type Th1 et Th2, il existe des cellules T régulatrices (Treg) caractérisées par les molécules CD4 CD25, mais aussi le facteur de transcription Foxp3 et le récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes (GITR) (Fournier, 2005). Le mécanisme d'action de ces cellules Treg requiert un contact cellulaire avec la cible. Dans le modèle d'arthrite au collagène, la suppression de ces cellules avant l'immunisation accélère et augmente la sévérité de la maladie. Dans la PR, il pourrait exister une altération des cellules Treg CD4+ exprimant fortement CD25 (Cao et al., 2003).

## **C / ROLE DES CELLULES B**

Depuis les études effectuées sur des modèles expérimentaux, il semble vraisemblable que les lymphocytes B et les anticorps qu'ils sécrètent occupent une place importante dans la survenue de la maladie. Le fait que la membrane synoviale puisse s'organiser comme un organe lymphoïde secondaire est un lien pathogénique important. Ceci peut expliquer la transmission locale, intrasynoviale, de messages entre les lymphocytes T et B, venant s'ajouter à la présentation locale d'antigènes par les CPA.

### **1 / Les auto-anticorps dans la PR**

Le facteur rhumatoïde, qui est un anticorps dirigé contre la portion Fc des Immunoglobulines (Ig) G synthétisé par les lymphocytes B est présent dans 70 % des PR et est associé aux formes plus sévères. Il s'agit probablement d'un co-facteur important de la PR, mais pas d'un élément déclenchant. Cependant, un modèle animal de PR entièrement transmissible par les anticorps a été décrit. Il s'agit de la souris KRN/NOD : croisement d'une souris NOD et d'une souris transgénique pour un récepteur T reconnaissant une molécule HLA de classe II occupée par un peptide de la glucose-6-phospho-isomérase (GPI) (Kouskoff, 1996). Le sérum de ces souris développant spontanément une polyarthrite destructrice reproduit la maladie quand il est transféré à d'autres souris, la transmission étant liée à des auto-anticorps anti-GPI. D'autres anticorps, les anticorps anti-citrulline, se sont révélés être intéressants dans le diagnostic de la PR car très spécifiques (95%). Leur sensibilité dans la PR n'est que d'environ 50%, mais ils sont présents dès le début des signes cliniques et même possiblement plusieurs mois ou années avant le début de la maladie (Zeng et al., 2003). Il n'a pas été encore décrit de rôle pathogène à ces anticorps. Bien que ceci reste controversé, il semble que les protéines de la synoviale rhumatoïde soient anormalement citrullinées par rapport à des protéines synoviales normales. La citrullinisation anormale pourrait entraîner l'immunogénicité des protéines sur un terrain génétiquement prédéterminé et plus précisément chez les patients présentant l'épitope HLA DR partagé. L'origine de cette citrullinisation anormale des protéines synoviales pourrait être génétique, un polymorphisme particulier du gène d'une D-iminase citrullinante PADI 4 (Mariette, 2004).

Des autoanticorps dirigés contre des antigènes du cartilage seraient des agents pathogéniques possibles. Trois autoantigènes ont été l'objet de plusieurs travaux : le collagène de type II, l'aggrécane et la glycoprotéine gp39. Ils sont la cible d'anticorps retrouvés dans le liquide synovial de PR et sont arthritogènes chez la souris (Boissier, 2002).

## **2 / Le rôle du lymphocyte B dans l'auto-immunité**

Non seulement le lymphocyte B est le précurseur du plasmocyte responsable de la sécrétion des anticorps, mais il s'agit aussi d'une remarquable cellule présentatrice d'antigènes. Son rôle dans l'auto-immunité pourrait également passer par la présentation anormale d'auto-antigènes. L'immunoglobuline de membrane des lymphocytes B permet la fixation de l'antigène qui peut ensuite être « traité », puis présenté au lymphocyte T (Mariette, 2004). Les effets du rituximab dans la PR illustrent l'importance des lymphocytes B dans la pathogénie de cette maladie immunologique. Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 et le CD-20 est une molécule spécifique du lymphocyte B mature. La fixation du rituximab sur la CD-20 entraîne la lyse du lymphocyte B par un mécanisme de cytotoxicité liée au fragment Fc des immunoglobulines (ADCC) et par activation du complément (CDC). Récemment, une étude randomisée contre placebo a montré l'efficacité spectaculaire du rituximab dans la PR maintenue pendant 6 mois après seulement deux perfusions à J1 et J15. L'effet clinique était associé à une déplétion B majeure et à une diminution importante du taux de facteurs rhumatoïdes (Panayi, 2005).

## **D / ROLE DES CELLULES SYNOVIALES**

Firestein et al. (1990) ont remis en question le rôle principal et initiateur du lymphocyte T dans la physiopathogénie de la PR. En effet, dans la synoviale rhumatoïde, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> paraissent quiescents, n'expriment pas leurs marqueurs d'activation (IL-2R, VLA-1, transferrine) et surtout les cytokines produites par les lymphocytes T activés sont en très faible quantité (IL-2, IL-3, IL-4 et IFN- $\gamma$ ). Au contraire, les synoviocytes macrophage-like (type A) et fibroblaste-like (type B) expriment des marqueurs d'activation. Les cytokines majoritaires dans le liquide articulaire ou la synoviale de PR (IL-1, TNF- $\alpha$  et IL-6) sont produites par ces cellules. Dans l'arthrite à l'adjuvant complet de Freund, les synoviocytes sont activés et expriment des molécules HLA de classe II avant le début de l'arthrite et surtout avant l'afflux de cellules mononucléées dans la membrane synoviale (Lopez-Bote et al., 1988).

### **1 / Fibroblastes synoviaux**

La synovite rhumatoïde se caractérise par une hypertrophie de la membrane synoviale et l'invasion des tissus voisins. Cette membrane synoviale devenue agressive est parfois comparée à une tumeur de malignité locale. Des modifications morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes synoviaux ont été observées. Cependant, il n'est pas totalement clair de départager le caractère primitif de ces transformations (« PR en tant que maladie du fibroblaste synovial ») de la

possibilité de modifications secondaires aux événements survenant dans le microenvironnement articulaire (« PR en tant que maladie impliquant le fibroblaste synovial »). Les arguments montrant cette transformation sont nombreux : morphologie, perte d'inhibition de contact, activation de plusieurs oncogènes *egr-1*, *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *c-ras*, *c-sis*, détection d'une activité télomérase comme dans les tumeurs (Kinne et al., 1995 ; Boissier, 2002). L'hypothèse d'une expansion monoclonale ou oligoclonale de fibroblastes a été émise (Imamura et al., 1998). Dans ce contexte, le groupe de Firestein a développé la possibilité d'attribuer les transformations synoviales et les taux anormalement bas d'apoptose synoviale à des mutations des gènes contrôlant l'apoptose, comme *p53* (Firestein et al., 1997).

D'autre part, ces cellules produisent *in vitro*, après stimulation par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ , de nombreuses enzymes protéolytiques de type métalloprotéinases, aggrecanases, cystéine et sérine protéases, impliquées dans la dégradation du cartilage articulaire (Mohammed et al., 2003).

## **2 / Les macrophages synoviaux**

Le système phagocytaire mononucléé de la membrane synoviale est représenté par les synoviocytes macrophagiques de type A de la région intime et les macrophages de la région sous-intime et du liquide synovial.

Les études d'immunophénotype ont montré que la prolifération synoviale, dans la PR, était largement liée au recrutement des macrophages (Athanasou et al., 1995).

D'autre part, les macrophages de l'intima et de la sous-intima n'ont pas exactement le même phénotype. Il existe notamment une absence ou une diminution d'expression de CD25 (IL-2R), CD35 (récepteur de C3b) et CD34 à la surface des macrophages de l'intima par rapport à ceux de la sous-intima qui pourrait correspondre à une différenciation des macrophages de la région sous-intime en macrophages de la région intime (Athanasou et al., 1991).

L'ensemble des macrophages synoviaux est également caractérisé par une augmentation de l'expression de diverses molécules d'adhésion : l'intégrine  $\beta 2$ , CD11a, CD11b, CD11c, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), E-sélectine, LAF-3 (lymphocyte function associated antigen-3) et ICAM-3 (Athanasou et al., 1995).

Pour Firestein et al. (1990), il existerait entre macrophages et fibroblastes synoviaux un système paracrine/autocrine complexe. En effet, les macrophages sont capables de libérer de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  qui stimulent la prolifération des fibroblastes et augmentent la production d'IL-6 et de granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). Le GM-CSF peut stimuler la synthèse d'IL-1 et augmenter l'expression des molécules HLA de classe II sur les macrophages. Le TNF- $\alpha$  peut agir en synergie avec le GM-CSF. La production locale de cytokines pourrait avoir un

impact sur les cellules T et contribuer à leur faible degré d'activation. L'activation des cellules B et la production de facteurs rhumatoïdes pourraient être le résultat de mécanismes indépendants des cellules T.

La destruction articulaire est probablement liée à la libération de cytokines par les macrophages et les fibroblastes activés. Ces cellules, beaucoup plus que les lymphocytes T, prédominent à la jonction synoviale/cartilage où débutent les érosions. La libération d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  par les macrophages synoviaux stimule la synthèse par les synoviocytes de collagénase, élastase, activateur du plasminogène et prostaglandines, qui sont les principaux effecteurs de la destruction articulaire.

Les cytokines et en particulier l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  augmentent l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, LFA-3, VCAM-1 et E-sélectine) à la surface des cellules endothéliales et permettent ainsi la migration des cellules T à travers l'endothélium vasculaire vers la synoviale. Les lymphocytes T seraient ainsi de simple « spectateurs », attirés par le processus inflammatoire, et n'auraient aucun rôle initiateur dans la synovite rhumatoïde. La PR pourrait ainsi résulter d'un dérèglement local des fonctions des macrophages et fibroblastes synoviaux, entraînant une hyperproduction de cytokines et une stimulation aspécifique des lymphocytes T et B.

## **E / ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES**

Les cellules dendritiques (CD) sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques et résident dans le sang et les tissus périphériques. Elles ont été mises en évidence dans le liquide, mais surtout dans le tissu synovial. Elles se regroupent avec les lymphocytes T en agrégats périvasculaires (Falgarone et al., 2005). Dans le tissu synovial, les CD ont un phénotype activé en comparaison des cellules sanguines et du liquide synovial. Leur migration dans le pannus synovial est probablement liée à la présence locale de chémokines spécifiques (par exemple CCL19 et CCL21). La différenciation des CD est induite par le GM-CSF, l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et surtout l'interaction de CD40 et CD40 ligand exprimé par les cellules T (Sarkar et al., 2005). Les CD différenciées expriment de nombreuses molécules HLA de classe II, de nombreuses molécules de costimulation (CD40, CD54, CD58, CD80 et CD86) et molécules d'adhésion (Falgarone et al., 2005).

Les CD jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la PR car elles représentent de puissantes cellules présentatrices de l'antigène. En fonction de l'environnement cytokinique, elles interviennent aussi dans la transformation phénotypique des lymphocytes T naïfs en type Th1 ou Th2. Les interactions entre CD et cellules T se font par contact cellulaire à travers de multiples interactions récepteur/ligand, mais aussi par l'intermédiaire de cytokines et chémokines. Les CD

produisent de l'IL-12 et de l'IL-23 qui font basculer la réponse immunitaire vers le type Th1. L'IL-23 augmente la production lymphocytaire T d'IL-17, qui à son tour va activer les fibroblastes synoviaux et augmenter leur réponse à d'autres signaux provenant des cellules T (Sarkar et al., 2005). L'interaction entre RANK (récepteur activateur de NF- $\kappa$ B) situé sur les CD et RANK ligand exprimé par les cellules T conduit à l'augmentation de la survie des CD (Sarkar et al., 2005).

Au total, les CD pourraient jouer un rôle primordial dans la présentation de l'antigène arthritogène aux lymphocytes T, dans l'activation des cellules B. Tout ceci aboutirait à la formation de lymphocytes T mémoires et pourrait influencer les réponses des macrophages et synoviocytes. L'environnement cytokinique pourrait aboutir à un allongement de la durée de vie des CD, contribuant au caractère chronique de la maladie.

## **F / CYTOKINES ET POLYARTHRITE RHUMATOÏDE**

### **1 / Généralités**

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montrent que les cytokines sont parmi les principaux médiateurs des maladies immuno-inflammatoires. L'importance de ces cytokines, et notamment de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$ , dans l'inflammation et la destruction articulaire a été bien établie dans la PR (Dayer, 1994). Ce sont des glycoprotéines solubles de faible poids moléculaire assurant les communications intercellulaires. Certaines sont présentes dans le cytoplasme et sur les membranes, la plupart sont sécrétées. Les cytokines fonctionnent rarement isolément mais le plus souvent en réseau mêlant des effets synergiques, complémentaires, ou antagonistes et inhibiteurs. Leur effet global dépend du tissu où ces multiples cytokines sont présentes. Elles agissent soit directement sur la cellule dont elles proviennent (effet autocrine), plus fréquemment sur les cellules adjacentes au sein d'un même tissu (effet paracrine), et moins fréquemment à distance sur les cellules d'un autre organe (effet endocrine). Enfin, elles peuvent dans les cellules qui les ont produites, y exercer leur effet biologique sans être sécrétées (effet intracrine) (Meyer, 2002). Les cytokines sont classées selon leur type de récepteur membranaire, mais il est plus pratique de les classer selon leur fonction principale sachant qu'une même cytokine a souvent de multiples fonctions, parfois antagonistes (fonction pléiomorphe), et que plusieurs cytokines ont parfois la même fonction (fonction pléiotrope). Ainsi on distinguera les cytokines pro-inflammatoires, anti-inflammatoires, immunorégulatrices, chimiotactiques (chimiokines), hématopoïétiques, les cytokines de différenciation et de croissance (facteurs de croissance) (tableau n°1) (Arend, 2001a).

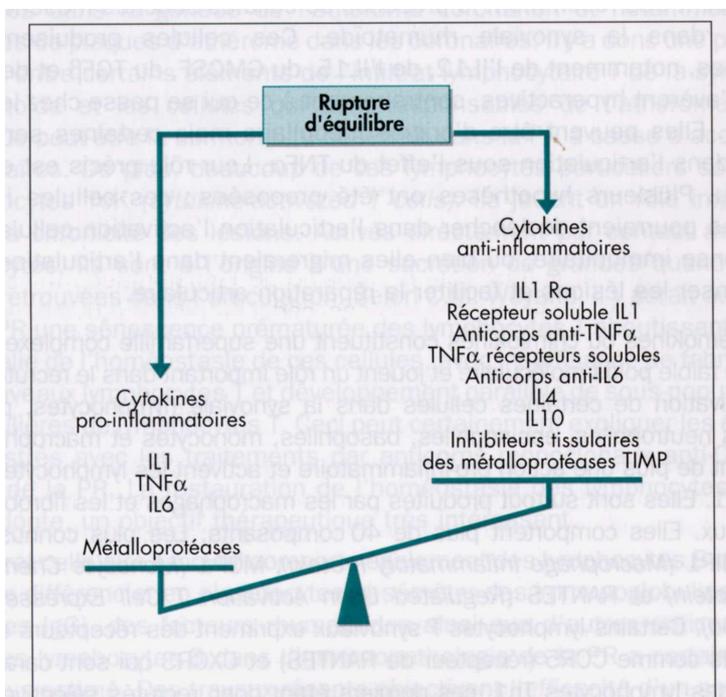
On rapproche des cytokines proprement dites les facteurs solubles capables de se fixer sur les cytokines. Il s'agit le plus souvent de récepteurs solubles détachés de la membrane des cellules.

Ils sont présents souvent à des concentrations très élevées dans le milieu synovial inflammatoire. Certains de ces récepteurs solubles vont inhiber l'activité de la cytokine, comme les récepteurs solubles du TNF (sTNF-RI et sTNF-RII). D'autres molécules sont produites physiologiquement et vont s'opposer à l'activité des cytokines, tel l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra). La plupart des cytokines sont présentes dans le tissu synovial de PR (Tableau n°2) (Meyer, 2002).

Les cytokines peuvent être produites par des cellules de différentes origines. Ainsi, dans le milieu synovial, les sources principales de cytokines sont les monocytes/macrophages, les polynucléaires et les mastocytes.

Dans la synovite rhumatoïde, les cytokines lymphocytaires, comme l'IL-2, l'IL-4, et l'IFN- $\gamma$ , sont en très faible quantité. Ceci contraste avec la présence de quantités abondantes de cytokines monocytaires, macrophagiques et fibroblastiques telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 (Arend, 2001a).

Dans la PR, il existe un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 et les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) qui sont en quantité insuffisante (figure 3). Les récepteurs solubles du TNF- $\alpha$  qui normalement régulent cette cytokine sont dépassés par la sécrétion exagérée de TNF- $\alpha$ . L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  jouent un rôle particulièrement important en aboutissant de façon synergique à la libération de métalloprotéases et de prostaglandines par les cellules activées (fibroblastes, macrophages). Il s'en suit une destruction du cartilage, une résorption osseuse et la prolifération chronique des cellules synoviocytaires.



**Figure 3** : Déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires dans la synoviale rhumatoïde d'après Sany (2003).

**Tableau n°1.** Classification fonctionnelle des cytokines selon Meyer (2002).

<i>Famille</i>	<i>Membres</i>
Pro-inflammatoires	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, lymphotoxine (LT), leucocyte inhibitory factor (LIF), IL-17, IL-18
Anti-inflammatoires	IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13
Chimiokines	IL-8, macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , monocyte chemoattractant protein (MCP-1), regulated upon activation T cell expressed & secreted (RANTES), epithelial neutrophil activating peptide 78 (ENA-78), melanoma growth stimulating activity (Gro $\alpha$ )
Hématopoïétiques	IL-3, érythropoïétine (EPO), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), G-CSF, M-CSF
Immunorégulatrices	Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), interféron- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-16, IL-18
Facteurs de croissance et différenciation	Platelet-derived growth factor (PDGF), endothelial growth factor (EGF), b fibroblast growth factor (bFGF), insulin growth factor (IGF), TGF- $\beta$ , vascular endothelial growth factor (VEGF)

**Tableau n°2:** Expression des cytokines dans la synoviale rhumatoïde selon Meyer (2002).

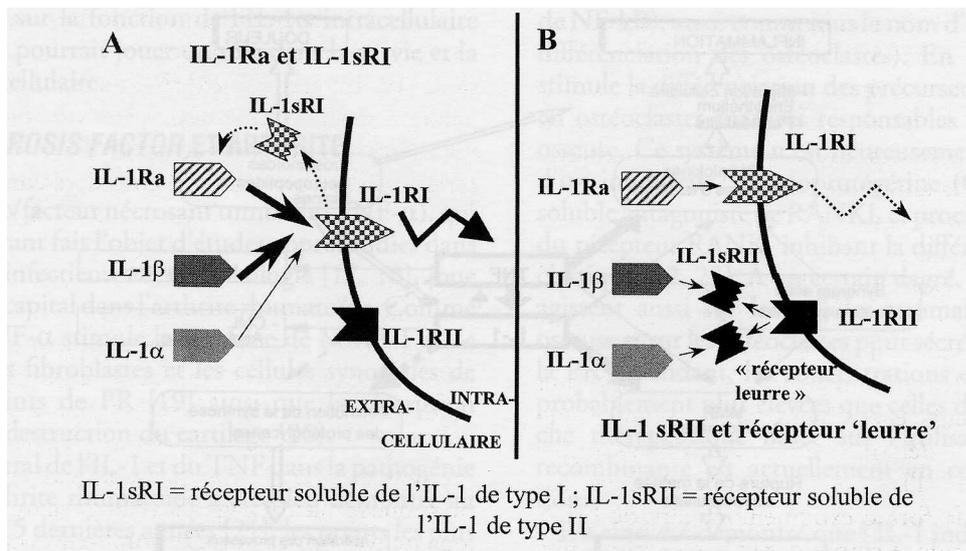
<i>Cytokine</i>	<i>ARNm</i>	<i>Protéine</i>
<b>Pro-inflammatoires :</b>		
IL-1 $\alpha$ et $\beta$	+	+
TNF- $\alpha$	+	+
LT	+	$\pm$
IL-6	+	+
GM-CSF	+	+
M-CSF	+	+
LIF	+	+
Oncostatin M	+	+
IL-2	+	+
IL-3	+	$\pm$
IL-7	+	+
IL-9	?	?
IL-12	?	?
IL-15	+	+
IFN- $\alpha$ , - $\beta$	+	+
IFN- $\gamma$	+	+
IL-17	+	$\pm$
IL-18	+	+
<b>Immunorégulatrices :</b>		
IL-4	$\pm$	-
IL-10	+	+
IL-11	+	+
IL-13	$\pm$	+
TGF- $\beta$	+	+
<b>Chimiokines :</b>		
IL-8	+	+
Gro- $\alpha$	+	+
MIP-1	+	+
MCP-1	+	+
ENA-78	+	+
RANTES	+	+
<b>Facteurs de croissance :</b>		
FGF	+	+
PDGF	+	+
VEGF	+	+

## 2 / Les principales cytokines intervenant dans la physiopathologie de la PR

### 2.1 / L'interleukine-1 (IL-1)

L'IL-1 existe sous 2 formes : l'IL-1 $\alpha$ , protéine essentiellement associée à la cellule, constituée de 159 acides aminés, d'un poids moléculaire de 17,5 kDa et l'IL-1 $\beta$  (153 acides aminés et 17,3 kDa) libérée en grande partie dans le milieu extra-cellulaire. Ces 2 cytokines sont synthétisées dans un premier temps sous forme de peptides précurseurs de 31 kDa. Le précurseur de l'IL-1 $\alpha$  a une activité biologique. Ce n'est pas le cas du précurseur de l'IL-1 $\beta$ , qui nécessite d'être scindé par une enzyme, appelée « IL-1 converting enzyme » (ICE), mais aussi de nombreuses protéases telles que la protéase 3 (PR3) (Dayer, 1994 et 2002). De façon générale, l'IL-1 $\alpha$  reste généralement dans l'espace intracellulaire ou bien est exprimée à la surface des cellules. On ne sait encore que très peu sur la fonction de l'IL-1 $\alpha$  intracellulaire sinon qu'elle pourrait jouer un rôle dans la survie et la maturation cellulaire (Dayer, 2002). L'IL-1 est produite principalement par les monocytes activés, mais aussi les synoviocytes, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés (Dayer, 2002).

Deux récepteurs distincts de l'IL-1 ont été caractérisés : le récepteur de type I (IL-1RI) et le récepteur de type II (IL-1RII) (Dayer, 2002) (figure 4). Les IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  se lient aux deux récepteurs avec des affinités différentes. Le récepteur de type I possède un long domaine intracytoplasmique et est responsable de l'induction de la réponse intracellulaire après avoir lié l'IL-1. La liaison du récepteur par l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  induit la formation d'un hétérodimère avec la protéine accessoire du récepteur de l'IL-1 (IL1AcP). Les deux molécules possèdent des domaines « Toll » dont le rôle est important dans la transduction du signal. Le complexe hétérodimérique recrute la protéine kinase activatrice du récepteur de l'IL-1 (IRAK) et le signal est alors transduit au noyau par différentes voies, dont TRAF6, la phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K), le nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mais aussi la mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 (Janssens et al., 2003). Le récepteur de type II n'induit aucun signal intracellulaire, mais fonctionne uniquement comme « récepteur piège » (decoy receptor) permettant de diminuer les taux d'IL-1 disponible pour la liaison à son autre récepteur, IL-1RI.



**Figure 4 :** Les familles IL-1 et récepteurs de l'IL-1 d'après Dayer (2002). A : récepteur de type I de l'IL-1 ; B : récepteur de type II de l'IL-1.

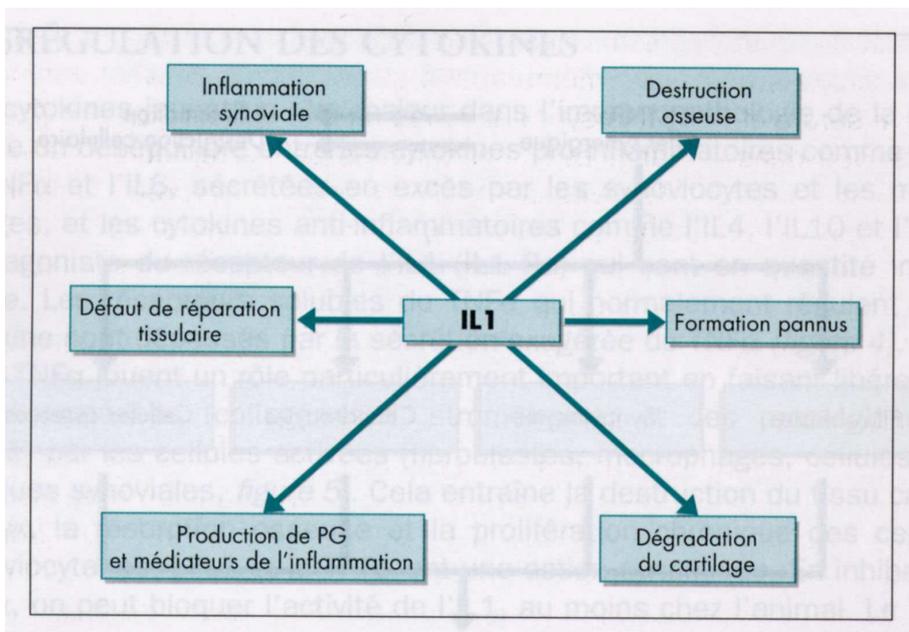
Les domaines extra-cellulaires des récepteurs peuvent être clivés et agir comme des inhibiteurs solubles de l'IL-1 (Dinarello et al., 1994). L'inhibiteur spécifique de l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  est l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) (Eisenberg et al., 1990). Il se lie au récepteur de l'IL-1, mais n'est pas capable de déclencher la transduction d'un signal intracellulaire. Il existe actuellement trois isoformes d'IL-1Ra, dont l'une est sécrétée, les deux autres étant intracellulaires. Si le rôle de l'IL-1Ra sécrété est bien clair, celui des isoformes intracellulaires reste encore à comprendre. Ces dernières pourraient servir à équilibrer la relative grande quantité d'IL-1 $\alpha$  et pro-IL-1 $\alpha$  à l'intérieur des cellules. L'IL-1Ra est essentiellement produit par les monocytes/macrophages.

Dans la PR, le rôle central de l'IL-1 a été bien démontré au cours de ces dernières années. Des taux élevés d'IL-1 ont été détectés dans le liquide synovial. Le tissu synovial *in vitro* produit spontanément de l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , associées à une expression importante des ARNm des deux cytokines (Arend, 2001a). L'IL-1 $\beta$  est présente dans le sang périphérique avec parfois des taux corrélés à l'activité de la maladie (Dayer, 1994).

Les injections intra-articulaires d'IL-1 chez le rat provoquent une arthrite destructrice (Van den Berg, 2001). Le TNF- $\alpha$  induit des lésions d'ampleur moins importante dans le cartilage articulaire. Les arthrites au collagène ou l'arthrite de la souris MRL-lpr sont aggravées par l'administration locale ou systémique d'IL-1 (Arend et al., 1995). Dans la synovite rhumatoïde, l'IL-1 contribue au chimiotactisme des neutrophiles, lymphocytes et monocytes, stimule les fonctions des lymphocytes T et B, et augmente l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales (Arend, 1990). D'autre part, elle stimule la production de nombreux médiateurs intervenant dans la destruction articulaire et ce de façon beaucoup plus puissante que le

TNF- $\alpha$  : métalloprotéinases, aggrécanases, PGE<sub>2</sub> et activateur du plasminogène (Arend, 1990). L'IL-1 empêche les processus de réparation en inhibant la synthèse de protéoglycanes et du collagène de type II constituant le cartilage. Elle induit également la synthèse d'IL-6, d'IL-8 par les fibroblastes et d'IL-2 par les lymphocytes T (Koch et al., 1995). D'autre part, les démonstrations du rôle de l'IL-1 dans l'activation des ostéoblastes menant indirectement à la résorption osseuse sont multiples. L'IL-1 agit sur les ostéoblastes (responsables de la formation osseuse) en induisant l'expression de RANKL (ligand du récepteur activateur de NF- $\kappa$ B), aussi connu sous le nom de facteur de différenciation des ostéoclastes (ODF). En retour, RANKL stimule la différenciation des précurseurs des ostéoclastes en ostéoclastes matures responsables de la résorption osseuse (Goldring, 2003).

Le déséquilibre entre IL-1 et IL-1Ra joue probablement un rôle important dans la physiopathologie de la PR. Il semble que, chez les patients atteints de PR, la concentration d'IL-1Ra endogène ne suffise pas à réguler les effets induits par des taux élevés d'IL-1 (Dayer, 1992). De nombreuses cytokines anti-inflammatoires peuvent augmenter la production d'IL-1Ra, surtout l'IFN $\beta$ , mais aussi l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Arend, 2001b). Tout ceci est bien illustré par les données cliniques thérapeutiques obtenues avec l'Anakinra (forme recombinante de l'IL-1Ra humain) qui entraîne une réduction significative des symptômes de PR et une amélioration de la qualité de vie (Jiang et al., 2002).



**Figure 5 :** Rôle pivot de l'IL-1 dans les principaux mécanismes du processus pathogénique de la PR (d'après Meyer, 2002).

## 2.2 / Le facteur de nécrose tumorale ou tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Le TNF- $\alpha$  est produit dans la cellule sous la forme d'un pro-peptide de 26 kDa. La molécule biologiquement active du TNF- $\alpha$  existe en solution sous la forme d'un trimère possédant des sous-unités d'environ 17 kDa. Il existe également une forme membranaire du TNF- $\alpha$  (environ 1 à 2%) qui est biologiquement active.

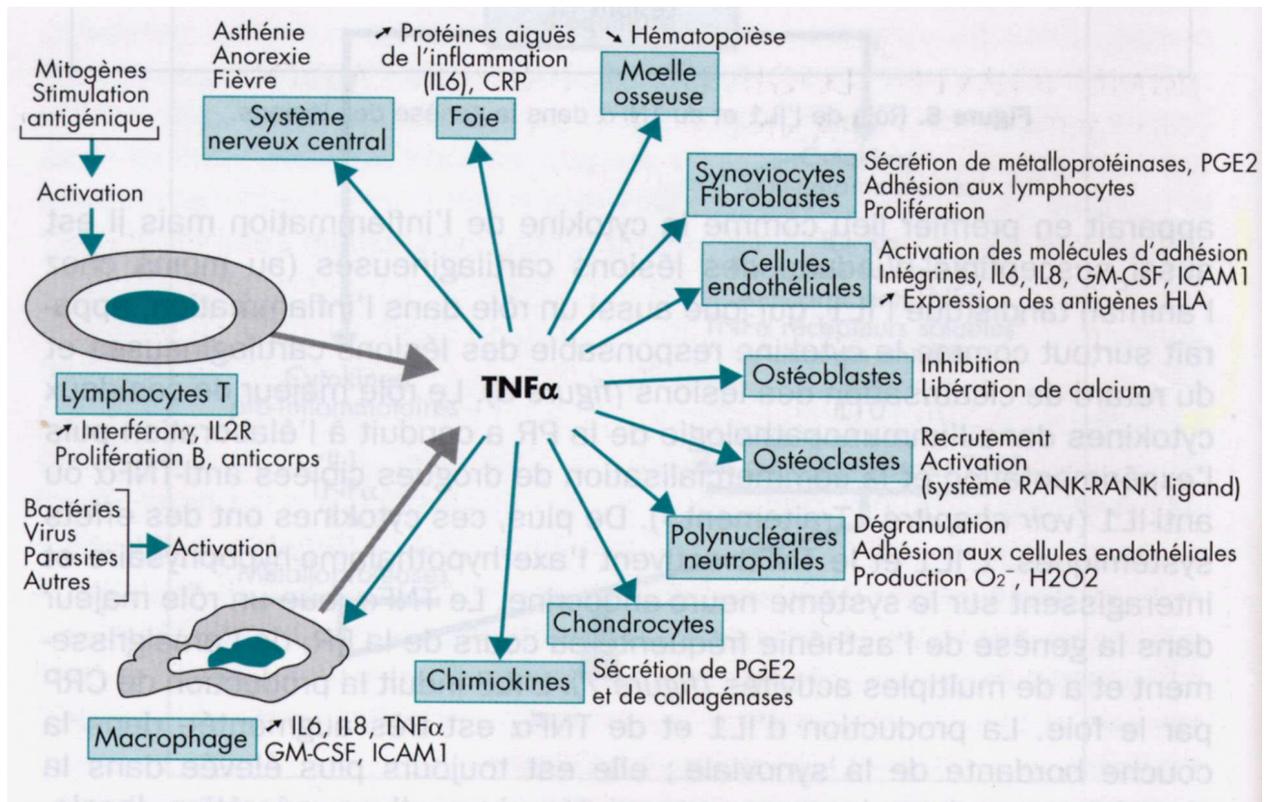
Le TNF- $\alpha$  exerce ses activités en se liant à des récepteurs spécifiques, qui sont de deux types : un récepteur de 55 kDa (TNF-RI p55) et un autre de 75 kDa (TNF-RII p75). La portion extracellulaire des deux récepteurs peut être clivée et cette forme soluble (sTNFR) de récepteur peut se lier au TNF- $\alpha$  et inhiber ses activités biologiques (Dayer, 1994). Les taux sériques de sTNFR sont corrélés à l'activité de la PR (Meyer, 2002). L'observation de ces taux élevés de récepteurs solubles, capables de neutraliser les effets du TNF- $\alpha$ , jointe à celle rapportée à partir de cultures d'explants de synoviale rhumatoïde *in vitro*, suggère une tentative de régulation spontanée insuffisante pour maîtriser les phénomènes inflammatoires synoviaux.

Le TNF- $\alpha$  est essentiellement produit par les monocytes/macrophages. Comme l'IL-1, il stimule la production de médiateurs de l'inflammation (Meyer, 2002): PGE<sub>2</sub>, leucotriènes, facteur d'activation plaquettaire (PAF), oxyde nitrique (NO) et les produits réactifs de l'oxygène. Il induit la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, L'IL-6, le GM-CSF, ainsi que des chimiokines (IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1), et des métalloprotéases médiateurs de la destruction ostéo-cartilagineuse (Meyer, 2002). Il augmente l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, il active l'angiogenèse. Il s'agit d'un facteur de croissance des fibroblastes. Pour illustrer la complexité du réseau des cytokines, la production de TNF- $\alpha$  est stimulée par l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1. La production d'IL-1 par les cellules synoviales en culture est réduite après incubation avec des anticorps anti-TNF- $\alpha$  (Koch et al., 1995).

De nombreux arguments plaident pour une participation importante du TNF- $\alpha$  dans la PR. En effet, des concentrations élevées de TNF- $\alpha$  ont été détectées dans le sérum et le liquide synovial de PR. Les études immunohistochimiques ont mis en évidence la présence de TNF- $\alpha$  dans les cellules du pannus, les macrophages, les cellules bordantes, les cellules profondes avec une distribution périvasculaire et plus particulièrement les jonctions synoviale/cartilage, à proximité même des destructions cartilagineuses (Chu et al., 1991). Les taux sériques et synoviaux de TNF- $\alpha$  sont corrélés aux critères cliniques et biologiques d'activité de la PR (Emilie et al., 1995).

L'arthrite au collagène chez la souris est aggravée par l'injection de TNF- $\alpha$  et améliorée par les anticorps anti-TNF- $\alpha$  administrés avant le début de la maladie. Les souris transgéniques surexprimant le TNF- $\alpha$  développent une arthrite avec destruction articulaire (Koch et al., 1995).

La preuve du rôle majeur du TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie de la PR a été apportée par les effets spectaculaires obtenus récemment avec l'utilisation thérapeutique chez l'homme des anti-TNF- $\alpha$  qu'il s'agisse des anticorps monoclonaux humanisés (infliximab), humains (adalimumab) ou des récepteurs solubles du TNF-RII p75 (etanercept) (Maini et al., 1998).



**Figure 6 :** Les différentes activités du TNF- $\alpha$  (d'après Sany, 2003).

### 2.3 / L'interleukine -4 (IL-4)

L'IL-4 est une cytokine de type Th2 anti-inflammatoire car elle inhibe avant tout la production des cytokines de type Th1, c'est-à-dire l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (Van Roon et al., 2001). Elle inhibe la synthèse des métalloprotéases et augmente la production d'IL-1Ra. L'IL-4 diminue la résorption osseuse en réduisant la survie et l'activation des ostéoclastes dans un modèle de résorption osseuse *ex vivo* et dans l'arthrite au collagène chez l'animal (Miossec et al., 1994 ; Joosten et al. 1999).

#### **2.4 / L'interleukine-6 (IL-6)**

L'IL-6 est une cytokine de 26 kDa produite par les monocytes, les lymphocytes T et les synoviocytes fibroblastiques. Son action principale est la stimulation de la synthèse des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes. Elle induit également la différenciation des lymphocytes B et des cellules myélomonocytaires, et l'activation des cellules T (Wong et al., 2003). Elle augmente la production de protéases induites par l'IL-1 (Koch et al., 1995). La production d'IL-6 par les synoviocytes en culture est augmentée après stimulation par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  (Emilie et al., 1995).

Les concentrations d'IL-6 sont plus élevées dans le liquide synovial de PR que dans celui d'arthrose. Dans la PR, les taux sériques d'IL-6 sont corrélés aux critères cliniques et biologiques d'activité de la maladie et aux lésions articulaires radiologiques (Koch et al., 1995 ; Wong et al., 2003). Chez les souris déficientes en IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>), il n'y a pas d'inflammation ni de destruction articulaire après induction d'une arthrite au collagène (Wong et al., 2003). D'autre part, la résorption osseuse péri-articulaire est probablement en partie liée au développement des ostéoclastes stimulés par l'IL-6 (Kotake et al., 1996).

#### **2.5 / L'interleukine-8 (IL-8)**

L'IL-8 est une protéine de 8 kDa, produite par les macrophages et fibroblastes synoviaux. Il s'agit d'un facteur chimiotactique et activateur des neutrophiles, produit par les synoviocytes en réponse à l'IL-1 et au TNF- $\alpha$  (Koch et al., 1995). L'IL-8 aurait également des propriétés d'induction de l'angiogenèse. L'injection intra-articulaire d'IL-8 chez le lapin est responsable d'une inflammation articulaire intense (Koch et al., 1995).

#### **2.6 / L'interleukine 10 (IL-10)**

L'IL-10 est une cytokine immunorégulatrice importante intervenant dans le contrôle de la réponse inflammatoire et la régulation de la différenciation et prolifération de plusieurs cellules immunitaires (cellules T, B et NK). L'IL-10 est un homodimère de 37 kDa. Elle est produite essentiellement par les monocytes/macrophages, les lymphocytes T de type Th2, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales (Meyer, 2002). L'IL-10 est produite spontanément par la membrane synoviale (Morita et al., 1998). Elle joue un rôle important dans la balance cytokinique puisqu'elle favorise le développement d'une réponse Th2. En effet, elle inhibe la prolifération des lymphocytes T et leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Katsikis et al., 1994 ; Morita et al., 2001). Elle inhibe la synthèse des cytokines proinflammatoires comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-8 (De Waal Malefyt et al., 1991a). Inversement, le TNF- $\alpha$  induit la production d'IL-10 via l'activation de NF-

$\kappa$ B (Asadullah et al., 2003). L'IL-10 induit la synthèse d'un suppresseur de synthèse des cytokines appelé SOCS-3 (Donnelly et al., 1999). D'autre part, l'IL-10 inhibe certaines fonctions macrophagiques comme la présentation de l'antigène, stimule la production d'inhibiteurs des cytokines (IL-1Ra, sTNFR). Par contre, elle augmente la prolifération des cellules B et leur différenciation en cellules sécrétant des immunoglobulines (Rousset et al., 1992 ; Katsikis et al., 1994). L'IL-10 inhibe la synthèse de COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub> (Niuro et al., 1997).

Le récepteur de l'IL-10 est composé de deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ . L'interaction entre récepteur et ligand active les tyrosine kinases Jak 1 et Tyk 2, mais également les facteurs de transcription STAT 1, 3 et 5 (Moore et al., 2001). L'IL-10 bloque aussi la translocation de NF- $\kappa$ B en inhibant l'activité d'IKK (Asadullah et al., 2003).

L'IL-10 réduit l'inflammation, l'infiltration cellulaire et la destruction articulaire dans différents modèles animaux d'arthrite (Persson et al., 1996). L'IL-10 est détectée dans le sérum, le liquide synovial et le tissu synovial des patients souffrant de PR (Cush et al., 1995). Chez l'homme, dans la PR, l'efficacité de l'IL-10 reste limitée, même en association avec le méthotrexate (Keystone et al., 1998).

### **2.7 / L'interleukine-11**

L'IL-11 a initialement été identifiée comme une lymphokine dérivée des cellules stromales et un facteur hématopoïétique (Paul et al., 1987). Les effets de l'IL-11 sont divers et incluent des activités à la fois pro- et anti-inflammatoires. L'IL-11 stimule la prolifération des cellules B dépendant des cellules T, la différenciation de ces cellules et leur production d'immunoglobulines (Yin et al., 1992). En augmentant le nombre de cellules de l'inflammation dans l'organe cible, l'IL-11 a ainsi été suspectée d'avoir une action pro-inflammatoire. Dans le même sens, l'IL-11 est classée dans la famille des cytokines de type IL-6 sur les bases d'un spectre d'activités communes et d'un récepteur commun, à savoir la glycoprotéine 130 (gp130) (Heinrich et al., 2003 ; Wong et al., 2003). L'IL-11 stimule la production de protéines plasmatiques de la phase aiguë. Elle induit également une résorption osseuse dans les cultures de cellules osseuses et sa neutralisation supprime le développement des ostéoclastes après stimulation par la 1,25-dihydroxy vitamine D3 et la parathormone (Girasole et al., 1994). Dans les synoviocytes rhumatoïdes en culture, l'IL-1 $\alpha$  et le TNF- $\alpha$  stimulent la production d'ARNm et de protéine de l'IL-11. Cet effet synergique est complètement aboli par l'indométacine et restauré par l'addition de PGE<sub>2</sub> (Mino et al., 1998). Compte tenu des effets de l'IL-11 sur les ostéoclastes, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  pourraient contribuer à la résorption osseuse observée dans la PR par l'intermédiaire de leur action sur l'IL-11. De la même manière, l'IL-4 qui est une cytokine anti-inflammatoire inhibe la production d'IL-11 dans les

synoviocytes rhumatoïdes (Taki et al., 2000). Ainsi, l'IL-4 pourrait également exercer ses effets protecteurs sur la résorption osseuse au moins en partie via l'inhibition de l'IL-11.

Inversement, un certain nombre de faits plaident pour une action anti-inflammatoire de l'IL-11. Dans les synoviocytes d'arthrose, l'IL-11 diminue la sécrétion de PGE<sub>2</sub> induite par le TNF- $\alpha$ , la synthèse des protéines COX-2 et cPLA<sub>2</sub> et celle des récepteurs du TNF (TNF-sR55 et TNF-sR75). Enfin, l'IL-11 diminue également la translocation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF- $\alpha$  (Alaaedine et al., 1999). Hermann et al. (1998) ont pu mettre en évidence la présence d'IL-11 dans la membrane et le liquide synovial de PR, ainsi que dans le sérum. La neutralisation de l'IL-11 endogène entraîne un doublement du taux de TNF- $\alpha$ , taux qui est multiplié par 22 si l'IL-10 endogène est également bloquée. Par contre, l'IL-11 exogène n'a pas d'effet sur la production spontanée de TNF- $\alpha$ , celle-ci étant inhibée uniquement en présence de récepteur soluble à l'IL-11 (Hermann et al., 1998). Dans les synoviocytes de PR, l'IL-11 exogène diminue la production des métalloprotéases de type 1 et 3, et augmente celle de l'inhibiteur de métalloprotéase de type 1 (TIMP-1) (Maier et al., 1993 ; Hermann et al., 1998). Walmsley et al. (1998) ont étudié les effets de l'IL-11 recombinante humaine dans l'arthrite à collagène chez la souris : une diminution significative des scores cliniques apparaît avec de fortes doses d'IL-11, mais n'est pas maintenue tout au long de la période des 10 jours d'observation. Cependant, les scores de lésions histologiques de la membrane synoviale sont améliorés.

Le rôle exacte de l'IL-11 reste donc controversé et pourrait varier en fonction des cellules cibles ou des phases de l'inflammation.

### **2.8 / L'interleukin-15 (IL-15)**

L'IL-15 est une cytokine de 114 acides aminés produite par les monocytes activés, les cellules dendritiques, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Bessis et al., 2001). Ses activités *in vitro* correspondent à une induction de la migration transendothéliale, de la prolifération et de la production de cytokines par les lymphocytes T, une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK et une maturation des lymphocytes B (McInnes et al., 1998). Enfin, l'IL-15 a un rôle dans la destruction osseuse en stimulant la différenciation des progéniteurs ostéoclastiques par un effet indépendant du TNF- $\alpha$  (Ogata et al., 1999). Dans le modèle de la souris SCID, l'IL-15 induit la migration intrasynoviale des lymphocytes T (Bessis et al., 2001). Les lymphocytes T activés par l'IL-15 produisent du TNF- $\alpha$  et stimulent la synthèse de cette cytokine par les macrophages. Il s'agit donc d'une cytokine pro-inflammatoire ayant une action lymphocytaire T et intervenant dans la destruction osseuse.

### 2.9 / L'interleukine-17 (IL-17)

Les activités de l'IL-17 sont principalement pro-inflammatoires. Elle est produite par les lymphocytes T CD4+. Elle induit la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages et les fibroblastes (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, LIF, PGE<sub>2</sub>) (Meyer, 2002). L'activité de l'IL-17 sur l'induction d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  est inhibée par l'IL-4 et l'IL-10. Elle favorise la maturation des ostéoclastes via l'induction de RANK-L sur les lymphocytes T et les ostéoblastes (Chaubaud et al., 2001).

### 2.10 / L'interleukine-18 (IL-18)

L'IL-18 est une cytokine connue sous le nom d'*IFN- $\gamma$  inducing factor*. Elle a des homologies de structure avec l'IL-1 et sa forme mature est obtenue après clivage par l'enzyme de conversion de l'IL-1 (ICE) (Bessis et al., 2001). Elle est produite par plusieurs types cellulaires (macrophages, lymphocytes, ostéoblastes, chondrocytes, cellules dendritiques). L'IL-18 induit la synthèse d'IFN- $\gamma$  et agit en synergie avec l'IL-12 dans l'induction de la différenciation des lymphocytes T CD4 vers un profil Th1. Elle induit la synthèse d'IL-1, d'IL-8, de TNF- $\alpha$ , de PGE<sub>2</sub> (Meyer, 2002 ; Dai et al., 2004). Elle stimule l'angiogenèse et l'activation des polynucléaires neutrophiles. Elle agit sur les chondrocytes en réduisant leur prolifération, en stimulant la synthèse de COX-2, de stromélysine et de NO synthase inductible. L'IL-18 binding protein (IL-18BP), qui est inhibiteur naturel de l'IL-18, peut inhiber l'arthrite au collagène chez la souris (Plater-Zyberk et al., 2001).

## **G / LA DESTRUCTION OSTEO-CARTILAGINEUSE**

La destruction articulaire est la conséquence majeure de la PR. Elle est liée à la formation du pannus synovial, conséquence d'un infiltrat de cellules de l'inflammation, d'une néoangiogenèse et d'une hyperplasie des cellules synoviales. Les cytokines libérées par ces différents acteurs cellulaires, et plus particulièrement l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  stimulent la production de facteurs responsables de la dégradation du cartilage (Ritchlin, 2004).

Le cartilage est composé de protéoglycanes riche en chondroïtine, de collagène et de chondrocytes responsables de la synthèse mais aussi de la digestion enzymatique de la matrice cartilagineuse. Dans la PR, il existe un déséquilibre avec une augmentation de la destruction enzymatique liée aux métalloprotéases (MMPs) et une diminution de l'activité de synthèse (Ritchlin, 2004). Les MMPs sont synthétisées par les synoviocytes, chondrocytes et macrophages. La famille des MMPs est composée de plus d'une vingtaine de protéines classées en 5 catégories

qui sont : les collagénases, les stromélysines, les gélatinases, les métalloprotéinases membranaires (MT-MMPs) et les agrécanases. Toutes ces enzymes ont une activité sélective : les collagénases interstitielles (MMP-1, -8, -13) sont capables de dégrader les collagènes de type I, II, III, IV et VII. Le collagène ainsi dénaturé par ces enzymes devient un substrat pour les gélatinases (MMP-2 et -9). Les stromélysines (MMP-3, -10 et -11) ont des substrats plus divers : protéoglycanes, gélatine, fibronectine et collagène de type IX (Rannou et al., 2005). Les MT-MMPs peuvent se lier à la membrane cellulaire et se caractérisent par leur capacité à activer d'autres MMPs. Les cellules responsables de la synthèse des MMPs produisent également des inhibiteurs spécifiques des MMPs, appelés TIMPs (TIMP-1, -2, -3 et -4). Ainsi, le « turnover » du cartilage est dépendant de la balance MMPs/TIMPs. Dans la PR, il existe un déséquilibre entre l'activité des TIMPs et l'activité des MMPs au profit de cette dernière. Les deux cytokines majeures qui interviennent dans la destruction du cartilage sont l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . Elles stimulent la synthèse de MMPs dans les synoviocytes et chondrocytes et le TNF- $\alpha$  inhibe la production des TIMPs. D'autre part, ces deux cytokines diminuent la synthèse de collagène et de protéoglycanes (Goldring, 2003).

Le remodelage osseux est permanent et dépend de l'activité coordonnée des cellules résorbant l'os (ostéoclastes) et des cellules formant l'os (ostéoblastes). Dans la PR, les études histologiques ont montré que les résorptions osseuses locales périarticulaires (géodes) étaient liées à l'activité des ostéoclastes (Goldring, 2003 ; Ritchlin, 2004). Les ostéoclastes sont des cellules dérivées de la lignée monocytes/macrophages et la différenciation des précurseurs des ostéoclastes en ostéoclastes matures dépend du réseau de cytokines environnantes, notamment l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-11, l'IL-15 et le *macrophage-colony-stimulating factor* (M-CSF) (Goldring, 2003). Récemment, un nouveau membre de la famille du TNF a été découvert et nommé *osteoclast differentiation factor* ou *osteoprotegerin ligand* ou enfin *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand* (RANKL). RANKL est synthétisé par les ostéoblastes et les cellules stromales osseuses, mais aussi les synoviocytes fibroblastiques et les lymphocytes T dans le tissu synovial (Romas et al., 2002a). Il s'agit d'un facteur essentiel de différenciation des ostéoclastes (Lacey et al., 1998). RANKL se lie à son récepteur (RANK) localisé sur les précurseurs des ostéoclastes, les ostéoclastes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Il existe également une forme soluble de ce récepteur nommée ostéoprotégérine (OPG), qui agit comme un récepteur leurre ou « *decoy receptor* » et bloque la liaison de RANKL prévenant ainsi l'activation de RANK et donc l'ostéoclastogénèse. RANKL pourrait jouer un rôle prépondérant dans les lésions osseuses de la PR. La production de RANKL est fortement augmentée par l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-17 (Romas et al., 2002a). L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  contribuent encore aux lésions osseuses en diminuant la formation osseuse par induction de l'apoptose des ostéoblastes (Goldring, 2003).

Dans l'arthrite au collagène chez le rat, le traitement par protéine de fusion Fc-OPG réduit le nombre d'ostéoclastes dans l'os juxta-articulaire et empêche l'apparition d'érosions osseuses (Romas et al., 2002b).

Les prostaglandines et notamment la prostaglandine E<sub>2</sub> interviennent également dans les phénomènes de destruction cartilagineuse et osseuse. Ces effets sont décrits dans le chapitre sur le métabolisme des cyclo-oxygénases.

## H / L'ANGIOGENESE

L'angiogenèse est un élément important dans le développement et la persistance de la synovite rhumatoïde. L'hyperplasie de la membrane synoviale augmente la distance entre les synoviocytes et les vaisseaux sanguins, réalisant une hypoperfusion et hypoxie relatives. Tout ceci déclenche une néoangiogenèse qui permet d'augmenter les apports en facteurs de croissance et cytokines, entretenant l'inflammation et l'hyperplasie synoviale. L'angiogenèse est un processus complexe dépendant de l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ces facteurs sont nombreux, listés dans le tableau n°3. Ils sont pour beaucoup produits par les cellules endothéliales, les macrophages et les synoviocytes.

**Tableau n°3:** Les principaux facteurs pro- et anti-angiogéniques.

<b>Facteurs pro-angiogéniques</b>	<b>Facteurs anti-angiogéniques</b>
FGF	Angiostatine
PDGF	Endostatine
TGFβ	Prolactine
VEGF	TIMPs
Angiogénine	Thrombospondine-1
Angiopoïétine-1	Interféron inducible protein 10
G-CSF	Platelet factor-4
GM-CSF	IL-12
IL-1	IL-1
IL-2	IL-2
TNF-α	TNF-α
IL-6	IL-6
IL-8	
IL-15	
IL-18	
Pléiotropine	

Le VEGF, un des médiateurs majeurs de l'angiogenèse, a été détecté dans le liquide synovial et le sérum des patients atteints de PR. Son niveau d'expression est corrélé avec la sévérité de la maladie (Clavel et al., 2003). Il a une action chémoattractive sur les cellules endothéliales, monocytes et polynucléaires. Il augmente la perméabilité vasculaire, induit une vasodilatation, a un effet mitogénique sur les cellules endothéliales. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 augmentent sa production. L'angiopoïétine-1 est un facteur de croissance qui stimule spécifiquement la néovascularisation. Sa production est stimulée par le TNF- $\alpha$  dans les synoviocytes rhumatoïdes en culture. Inversement, l'endostatine et l'angiostatine sont des facteurs angiostatiques qui diminuent la croissance et la migration des cellules endothéliales (Clavel et al., 2003). Les intégrines ( $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  dans la synoviale rhumatoïde) et les molécules d'adhésion permettent les interactions entre cellules endothéliales et matrice extra-cellulaire et stimulent l'angiogenèse (Szekanecz et al., 2005). Parmi les cytokines impliquées dans la PR, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 ont des effets pro- et anti-angiogéniques (Tableau n°3). L'IL-8, l'IL-15 et l'IL-18 interviennent également dans l'angiogenèse (Szekanecz et al., 2005).

## **II / LE METABOLISME DES CYCLO-OXYGENASES**

### **A / METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE**

Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques dérivés de l'oxydation enzymatique de l'acide arachidonique (AA) présent dans les phospholipides membranaires. L'AA est libéré sous l'action d'une enzyme, la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et est transformé principalement en prostanoïdes sous l'action des cyclo-oxygénases (COX) de type 1 et 2 et en leucotriènes sous l'action de la 5-lipoxygénase (5-LOX) (Smith, 1989). La prostaglandine (PG) H<sub>2</sub> est un produit intermédiaire converti en prostaglandines (PGs) ou thromboxane (Tx) par différentes enzymes, dont la PGE<sub>2</sub> synthase (PGES) responsable de la synthèse de PGE<sub>2</sub> (figure 7). Les enzymes intervenant dans le métabolisme de l'AA existent sous plusieurs formes : les formes constitutives comme la PLA<sub>2</sub> cytosolique, la COX-1 et la PGES cytosolique ; et les formes inductibles après diverses stimulations (cytokines, état inflammatoire) comme la COX-2, la PGES microsomale et différents types de PLA<sub>2</sub> sécrétées.

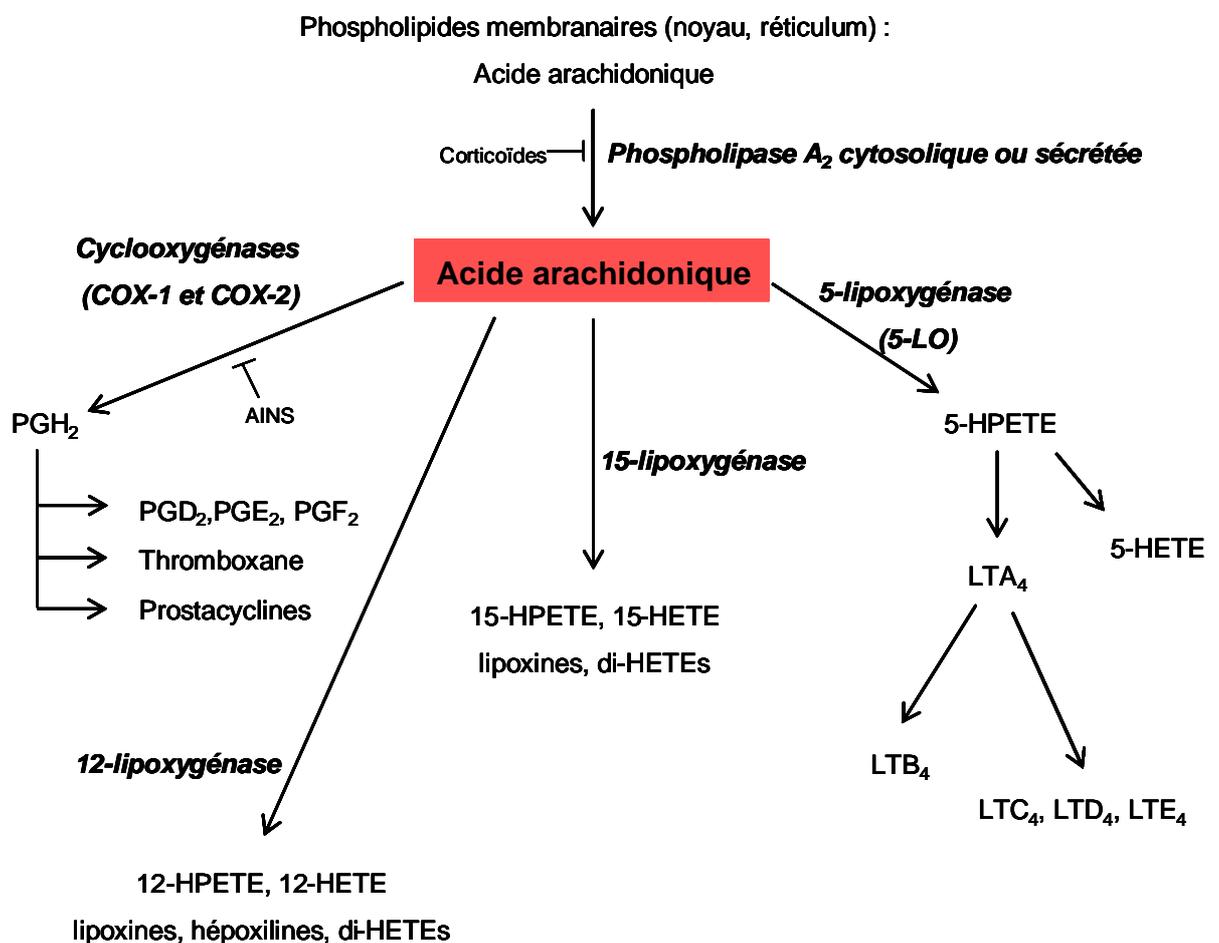
## B / LES TROIS TYPES DE CYCLO-OXYGENASES (COX)

La COX est une hémoprotéine constituée de deux sous-unités identiques possédant chacune un atome de fer héminique. Il s'agit d'une protéine transmembranaire localisée au niveau des membranes nucléaire et du réticulum endoplasmique (Sigal, 1991). La COX forme un complexe avec les molécules d'AA à la suite de leur libération de la membrane plasmique et catalyse deux réactions distinctes :

- l'oxydation et la cyclisation de l'AA en hydroxy-15-endoperoxyde-9,11 PGG<sub>2</sub> instable
- la conversion de la PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub>.

L'endoperoxyde PGH<sub>2</sub> est une molécule « carrefour » dont la transformation varie d'un type cellulaire à l'autre selon l'équipement enzymatique présent. Des isomérases et des réductases transforment la PGH<sub>2</sub> en prostaglandines (PGs) : PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, en TxA<sub>2</sub> puis TxB<sub>2</sub>, en prostacycline (PGI<sub>2</sub>) instable puis en 6-céto-PGF<sub>1α</sub>.

Le clonage et le séquençage de la COX ont permis de mettre en évidence deux gènes, celui de la COX-1 et celui de la COX-2 (Yokoyama et al., 1989 ; Kosaka et al., 1994). Les gènes des deux COX ne sont pas présents sur les mêmes chromosomes et ne contiennent pas le même nombre d'exons et d'introns.



**Figure 7 :** Métabolisme de l'acide arachidonique (d'après Chilton et al., 1996).

De plus, le promoteur de COX-2 possède plusieurs éléments de réponse à des facteurs de transcription, dont les éléments de réponse à NF- $\kappa$ B, AP-2, C/EBP et NF-IL-6, contrairement au promoteur de COX-1 qui ne contient que deux éléments cis-régulateurs Sp1 (Yamamoto et al., 1998 ; Thomas et al., 2000). La COX-1 est une enzyme exprimée de façon constitutive et est ubiquitaire. Les prostanoides qu'elle synthétise participent au maintien de l'homéostasie : coagulation, maintien du flux sanguin rénal, fonctions gastro-intestinales, reproduction et immunité. La COX-1 est fortement exprimée dans les plaquettes, les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires et les glandes séminales. Par contre, la COX-2 est faiblement exprimée dans les cellules quiescentes et dans les tissus normaux *in vivo* (tissu cérébral, muqueuse gastrique, rein et endothélium vasculaire). Elle est induite par différents stimuli : les lipopolysaccharides (LPS), des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , PDGF, EGF, FGF-1), des cytokines (IL-1 et TNF- $\alpha$ ) (Hla et al., 1993 ; Angel et al., 1994).

Les différents stimuli qui induisent l'expression de COX-2 agissent par des récepteurs membranaires pouvant être des récepteurs tyrosine kinases. Une fois activés, ces récepteurs induisent différentes voies de transduction du signal conduisant à la phosphorylation de facteurs trans-régulateurs. Ces facteurs peuvent alors se fixer sur certaines séquences du promoteur du gène de COX-2 et activer sa transcription. Les différentes protéines de transduction du signal intracellulaire impliquées sont les « extracellular-regulated protein » kinases (ERK), les kinases p38s, les « c-Jun N-terminal » kinases (JNKs), la PI3K et NF- $\kappa$ B (Yamamoto et al., 1998 ; Lasa et al., 2000 ; Chen et al., 2001 ; Thomas et al., 2002 ; Jang et al., 2004). L'induction de COX-2 est associée à l'activation de la voie MEK/ERK-1/2/c-Fos/AP-1 dans les cellules du cancer du colon, les cellules épithéliales intestinales, les kératinocytes (Glinghammar et al., 2001 ; Guo et al., 2002 ; Chang et al., 2004). Dans les ostéoblastes en culture, l'inhibition de la voie d'ERK par un inhibiteur sélectif (PD 098059) bloque la production de PGE<sub>2</sub> et l'expression de COX-2 induites par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (Chae et al., 2004). La MAP kinase p38 joue un rôle important dans l'induction de l'expression de COX-2 dans les cellules épithéliales intestinales traitées par l'anisomycine, dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses traitées par le NO (Shafer et al., 2005 ; Park et al., 2005), dans les chondrocytes articulaires différenciés traités par l'IL-1 $\beta$  (Thomas et al., 2002). Dans les cellules synoviales fibroblastiques en culture exposées à un adénovirus recombinant, les taux d'ARNm, de protéine COX-2 et de PGE<sub>2</sub> sont augmentés avec phosphorylation d'ERK-1/2, p38 et JNK (Crofford et al., 2005). Un inhibiteur de p38 (RWJ 67 657) inhibe l'expression de l'ARNm de COX-2 dans les cellules synoviales rhumatoïdes en culture (Westra et al., 2004).

Une nouvelle isoforme de COX a récemment été décrite par Chandrasekharan et al. (2002). Ces auteurs ont décrit plusieurs variants de COX issus d'épissage alternatif de l'ARNm de COX-1 :

l'ARNm de COX-3 et l'ARNm de PCOX-1 (« partial COX-1 »). COX-3 possède des caractéristiques de structure et d'activité voisines de celles de COX-1 et COX-2. Cependant, certaines modifications au niveau de la protéine pourraient diminuer son activité enzymatique, ce qui expliquerait l'inhibition de cette enzyme par le paracétamol (Berenbaum, 2004). La COX-3 est exprimée majoritairement dans le cortex cérébral (Chandrasekharan et al., 2002).

## C / LES PROSTAGLANDINES

Les actions diverses des PGs sont contrôlées par la diversité des PGs produites selon le type cellulaire et l'existence de multiples récepteurs liés à une protéine G. La sous-famille des récepteurs des prostanoides comporte 9 membres (EP-1 à EP-4 pour la PGE<sub>2</sub>, DP et CRTH2 pour la PGD<sub>2</sub>, FP pour la PGF<sub>2α</sub>, IP pour la PGI<sub>2</sub>, TP pour le TxA<sub>2</sub>) (Hata et al., 2004). Les rôles précis de ces récepteurs varient en fonction de multiples facteurs : le contexte cellulaire, le profil d'expression du récepteur, l'affinité du ligand et le couplage à différentes voies de transduction du signal (Hata et al., 2004). Ainsi, en fonction de tout cela, les PGs peuvent avoir une action pro- ou anti-inflammatoire et une action immuno-régulatrice. Toutefois, les PGs sont en quantité importante dans les foyers inflammatoires. Elles sont susceptibles de reproduire les signes cardinaux de l'inflammation : œdème, érythème, hyperthermie, hyperalgésie et infiltration cellulaire. La PGE<sub>2</sub> et la PGI<sub>2</sub> ont des propriétés vasodilatatrices. Elles potentialisent l'exsudation plasmatique induite par d'autres médiateurs tels le leucotriène B<sub>4</sub>, la bradykinine et l'histamine. La PGE<sub>2</sub> participe à l'hyperalgésie en sensibilisant les nocicepteurs périphériques à l'action de l'histamine et de la bradykinine, elle modulerait les canaux sodiques des neurones nociceptifs (Khasar et al., 1998). La PGE<sub>2</sub> est également produite dans le système nerveux central au cours de la réponse inflammatoire périphérique et contribue à l'hyperexcitabilité centrale observée lors de la douleur inflammatoire, notamment dans la corne postérieure de la moelle (Samad et al., 2001). *In vitro*, la PGE<sub>2</sub> inhibe l'activation et la prolifération des lymphocytes T, diminue la sécrétion de cytokines, module l'activation des cellules B et donc la production d'anticorps et module les fonctions des cellules dendritiques (Hata et al., 2004). Il est possible que la PGE<sub>2</sub> fasse pencher la balance vers la réponse immune lymphocytaire de type Th2 en partie par l'intermédiaire de l'inhibition de la production d'IL-12 par les monocytes et macrophages et en agissant directement sur les cellules T pour inhiber la production d'IL-2 et d'IFN-γ (Hata et al., 2004). Elle aurait ainsi un rôle positif dans la PR, en rééquilibrant la balance d'une réponse Th1 vers une réponse Th2. La PGE<sub>2</sub>, à faible dose, a un effet inhibiteur sur la libération des hydrolases lysosomiales des polynucléaires neutrophiles, la mobilité et la phagocytose des macrophages, ces effets étant inversés à forte dose.

Dans la PR, des taux élevés de PGE<sub>2</sub> sont détectés dans le liquide articulaire, comparé à l'arthrose. Les synoviocytes fibroblastiques humains en culture produisent de la PGE<sub>2</sub>, de la PGF<sub>2α</sub> et de la 6-céto-PGF<sub>1α</sub>, avec une majorité de PGE<sub>2</sub> (Martel-Pelletier et al., 2003). La PGE<sub>2</sub> produite par la membrane synoviale et par les cellules osseuses est capable de stimuler la production d'IL-6 et d'augmenter la prolifération des précurseurs ostéoclastiques favorisant ainsi la destruction articulaire (Marie et al., 1993; Portanova et al., 1996). D'autre part, la PGE<sub>2</sub> semble diminuer la synthèse de collagène par les chondrocytes et augmenter la production de MMPs par les synoviocytes fibroblastiques. Cependant, d'autres travaux ont montré des effets inverses sur le collagène et les MMPs (Martel-Pelletier et al., 2003). Des souris génétiquement délétées pour l'un des récepteurs membranaires à la PGE<sub>2</sub> (EP4) ou pour la PGES microsomale ne développent plus d'arthrite au collagène (Rannou et al., 2005). Les PGs contribuent à l'angiogenèse en stimulant la prolifération des cellules endothéliales ou en prévenant leur apoptose (Martel-Pelletier et al., 2003). La PGE<sub>2</sub> augmente la production du VEGF dans les cellules synoviales de PR (Leahy et al., 2000).

## **D / CYCLOOXYGENASES ET PR**

La protéine COX-2 joue un rôle important dans beaucoup d'états pathologiques, dont l'inflammation et l'angiogenèse. L'expression des COX est augmentée dans la membrane synoviale des patients atteints de PR et dans les arthrites expérimentales chez le rat (Sano et al., 1992). Crofford et al. (1994) ont mis en évidence par immunohistochimie la présence de la protéine COX-2 *in vivo* dans le tissu synovial de PR. La fixation de l'antisérum anti-COX-2 se situait sur les cellules mononucléées, les cellules endothéliales et les synoviocytes fibroblastiques. L'IL-1β et le phorbol myristate acétate (PMA) augmentaient la synthèse *de novo* de COX-2 (ARNm et protéine), mais pas celle de COX-1 dans les explants de tissu synovial de PR et dans les synoviocytes fibroblastiques en culture. La dexaméthasone inhibait cet effet stimulateur de l'IL-1 et du PMA. Siegle et al. (1998) ont confirmé ces résultats avec une augmentation de l'expression de COX-2 et non COX-1 dans le tissu synovial de différentes arthrites (PR, spondylarthrites ankylosantes et rhumatismes psoriasiques). L'expression de COX-2 dans les synoviocytes fibroblastiques humains peut être augmentée par la PGE<sub>2</sub> dans le cadre d'un mécanisme de feedback positif où interviendraient l'activation de la MAPkinase p38 et une stabilisation de l'ARNm de COX-2 (Martel-Pelletier et al., 2003). L'IL-1 et le TNF-α augmentent la production de PGE<sub>2</sub>. Par contre, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 la diminuent dans différents types cellulaires (Martel-Pelletier et al., 2003). Dans les synoviocytes humains, l'expression de COX-2 induite après stimulation par l'IL-1 dépend de l'activation de la MAPkinase p38 (Faour et al., 2001).

NF- $\kappa$ B joue également un rôle important dans l'expression de COX-2 dans les synoviocytes fibroblastiques humains. Le traitement par l'IL-1 entraîne la liaison de l'hétérodimère p65-p50 et de l'homodimère p50 au promoteur de COX-2 (Crofford et al., 1997). En plus de son action sur NF- $\kappa$ B, le TNF- $\alpha$  induit la liaison de C/EBP au promoteur de COX-2 et stimule ainsi la transcription de COX-2 (Martel-Pelletier et al., 2003). Dans les chondrocytes articulaires, les facteurs C/EBP ont un rôle important dans la transcription du gène de COX-2 induite par l'IL-1 $\beta$  (Thomas et al., 2000). D'autre part, dans différents modèles de culture de cellules ostéoblastiques, l'expression de COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub> passent par l'activation d'ERK (Choudhary et al., 2003 ; Chae et al., 2004).

### **III / VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE ET POLYARTHRITE RHUMATOÏDE**

Dans la PR, l'activation des différents acteurs cellulaires peut passer par la transduction d'un signal, c'est-à-dire la transmission d'un signal intracellulaire induit par la liaison d'un ligand à son récepteur. Les cytokines et autres stimuli agissent sur des récepteurs couplés aux voies de signalisation par un appareil sous-membranaire qui vont aboutir à l'activation de facteurs de transcription contrôlant la synthèse de différents facteurs de l'inflammation (cytokines, protéases, facteurs de croissance, etc...). Les principales voies de signalisation impliquées dans l'inflammation sont les voies des « mitogen-activated protein kinases » (MAP Kinases), de la phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K), de « janus kinase/signal transducer and activator of transcription » (JAK/STAT) et du « nuclear factor kappa B » (NF- $\kappa$ B) (Morel et Berenbaum, 2004).

La liaison d'un ligand à son récepteur membranaire provoque une modification de conformation du récepteur qui aboutit à la phosphorylation du récepteur lui-même ou d'une enzyme qui lui est associée. Cette première phosphorylation entraîne l'activation en cascade d'autres enzymes appelées les protéines kinases qui activent à leur tour les facteurs de transcription : phosphorylation permettant la translocation du facteur de transcription du cytoplasme vers le noyau. Les facteurs de transcription sont des protéines constituées de plusieurs domaines : certains participent à la liaison avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) génomique, tandis que d'autres sont impliqués dans la régulation génique en induisant ou en inhibant la synthèse des protéines (Morel et Berenbaum, 2004).

Après la liaison ligand-récepteur, les phosphatases sont des enzymes qui s'opposent à l'action des protéines kinases en favorisant la déphosphorylation de leur substrat. La réponse finale dépend donc de l'équilibre entre ces deux voies enzymatiques : protéine-kinases et phosphatases La

régulation s'effectue également au niveau post-transcriptionnel par des protéines (TIA-1 et TIAR) capables de se fixer sur des séquences spécifiques de l'acide ribonucléique messenger (ARNm), appelées AURE (adenosine-uridine rich element). La fixation des protéines TIA-1 et TIAR sur ces séquences favorise la dégradation de l'ARNm et réduit la synthèse protéique. La phosphorylation de TIA-1 et TIAR par une protéine kinase de la voie de p38 inhibe la dégradation de l'ARNm et augmente la production de protéines.

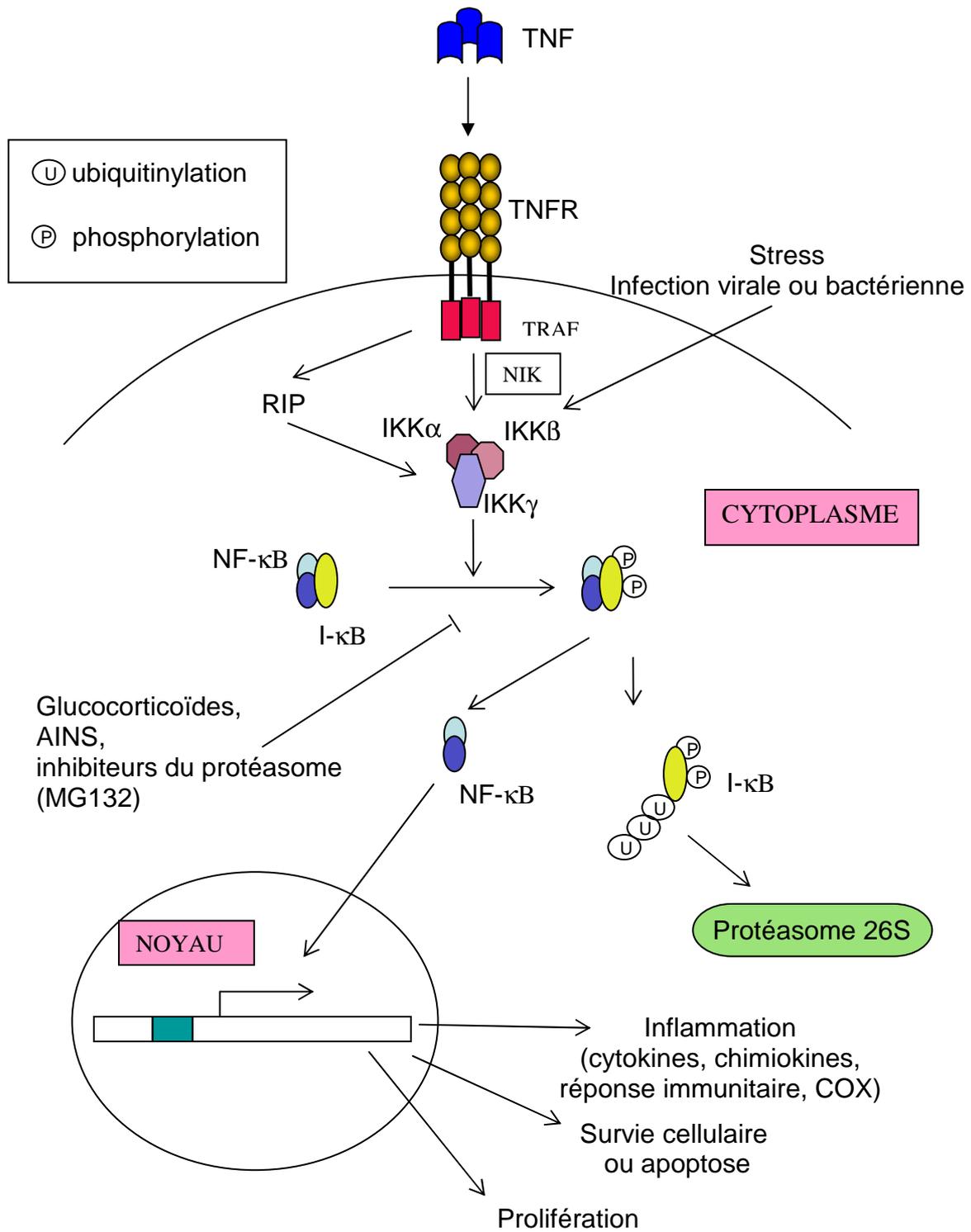
## **A / LA VOIE TRAF/NIK/I $\kappa$ BK/NF- $\kappa$ B**

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un homo- ou hétérodimère présent dans le cytoplasme de la plupart des cellules humaines. La famille NF- $\kappa$ B est constituée de plusieurs membres incluant NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB et c-Rel. NF- $\kappa$ B contrôle la synthèse de nombreux médiateurs impliqués dans l'inflammation comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , les collagénases mais aussi les molécules d'adhésion et les chimiokines (May et al., 1998 ; Morel et Berenbaum, 2004). L'expression de NF- $\kappa$ B est augmentée dans la synoviale rhumatoïde associée à un marquage immunohistochimique de p65 et p50 dans le noyau des cellules synoviales (Tak et al., 2001). Les expériences de retard sur gel montrent une translocation de NF- $\kappa$ B sur l'ADN plus importante à partir du tissu synovial de PR comparé à celui d'arthrose (Morel et Bernebaum, 2004).

En l'absence de stimulation, NF- $\kappa$ B est couplé avec la protéine inhibitrice I $\kappa$ B ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$ ) qui l'empêche d'être transloqué au noyau. NF- $\kappa$ B est activé par une variété de stimuli comprenant entre autres les cytokines pro-inflammatoires, le LPS, les protéines virales, les ultraviolets ou encore le stress cellulaire (figure 8). Après stimulation par une cytokine pro-inflammatoire, il existe un recrutement de protéines de costimulation tels les TRAFs (TNF receptor-associated factors) qui aboutit à l'activation de la kinase NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase). Les facteurs TRAFs sont formés de six familles de protéines capables d'activer en cascade des protéines kinases. Ils sont impliqués dans la transduction du signal induite par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . NIK se lie à I $\kappa$ B kinase (ou IKK composée de 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et induit son activation. IKK peut alors phosphoryler I $\kappa$ B, ce qui induit son ubiquitinylation et donc sa dégradation par le protéasome. La dissociation de I $\kappa$ B et NF- $\kappa$ B permet alors la migration de NF- $\kappa$ B dans le noyau (figure 8). La phosphorylation de I $\kappa$ B dépend essentiellement des TRAFs, mais aussi des MAP Kinases. TRAF-6 pour l'IL-1 et TRAF-2 pour le TNF- $\alpha$  activent successivement les protéines kinases NIK, puis IKK (Inoue et al., 2000). L'activation d'IKK peut être également induite par la « mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase-1 » (MEKK-1).

Dans la PR, les cytokines induites par NF- $\kappa$ B comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  peuvent également activer NF- $\kappa$ B. Il existe ainsi une boucle d'auto-entretien qui amplifie la réponse inflammatoire et lui permet de se pérenniser. NF- $\kappa$ B intervient aussi dans la croissance cellulaire. Il permet notamment la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la différenciation des lymphocytes T (Gerondakis et al., 1998). NF- $\kappa$ B stimule également l'expression de la COX-2 (Pahl, 1999), et intervient dans l'apoptose. En effet, il a été décrit comme un inhibiteur de l'apoptose principalement induite par le TNF- $\alpha$  (Baldwin, 1996). Cet autre rôle de NF- $\kappa$ B sera revu plus en détail dans le chapitre sur « l'apoptose ».

Les glucocorticoïdes, très utilisés dans le traitement de la PR, agissent grâce à leurs récepteurs spécifiques et peuvent induire l'expression de I $\kappa$ B $\alpha$  et favoriser la rétention cytoplasmique de NF- $\kappa$ B, mais ils peuvent également moduler l'activation de ce facteur par interaction directe avec NF- $\kappa$ B. Une autre hypothèse de régulation pourrait s'expliquer par une compétition entre glucocorticoïdes et NF- $\kappa$ B vis-à-vis de coactivateurs comme les protéines de liaison à CREB («AMPc regulatory binding protein») (Yamamoto et al., 2001). Parmi les anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'aspirine inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B en altérant la phosphorylation de I $\kappa$ B $\beta$  (Yin et al., 1998), alors que le sulindac et ses dérivés (sulfide et sulfone de sulindac) agissent sur IKK pour inhiber NF- $\kappa$ B (Yamamoto et al., 2001) (Figure 8). Parmi les agents immuno-suppressifs, la cyclosporine est un inhibiteur de la calcineurine (sérine/thréonine phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline) qui normalement active NF- $\kappa$ B. Il semblerait que la cyclosporine agisse également par compétition avec le protéasome empêchant la dégradation de I- $\kappa$ B. Le tacrolimus bloque la translocation du cytoplasme vers le noyau de la sous-unité c-Rel de NF- $\kappa$ B (Yamamoto et al., 2001). Par contre, la diosgénine, un stéroïde végétal, induit l'apoptose sur les cellules d'ostéosarcome et active NF- $\kappa$ B (Moalic et al., 2001a).



**Figure 8:** Activation et rôles de NF- $\kappa$ B

## B / LA VOIE DES MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN (MAP) KINASES

Les MAP kinases se divisent en trois familles : « extracellular signal regulating kinases » (ERK1/2), « c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase » (JNKs) et p38. Chacune comporte plusieurs isoformes. Les facteurs mitogènes et les facteurs de croissance activent plutôt les MAP kinases ERK1/2, tandis que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- $\alpha$  activent plutôt les MAP kinases p38 et JNKs (Raigneaud et al., 1995 ; Hammaker et al., 2003 ; Morel et Berenbaum, 2004). L'activation de ces MAP kinases est secondaire à la phosphorylation d'une thréonine (Thr) ou d'une tyrosine (Tyr) située dans un motif ThrXTyr où X représente un acide aminé quelconque. Les MAP kinases sont activées par une MAPK kinase (MAPKK ou MEK) qui est activée à son tour par une MAPKK kinase (MAPKKK ou MEKK). La MAPKK kinase est elle-même activée par un membre de la famille des protéines G tels que Ras, directement ou par une autre kinase en amont (figure 9) (Morel et Berenbaum, 2004 ; Lioté et Bernebaum, 2004). Les différentes MAP kinases contrôlent l'activation de nombreux facteurs de transcription, tels que AP-1 (homo- ou hétérodimère formé des protéines c-fos et c-jun), NF- $\kappa$ B ou C/EBP (Hammaker et al., 2003 ; Lioté et Berenbaum, 2004).

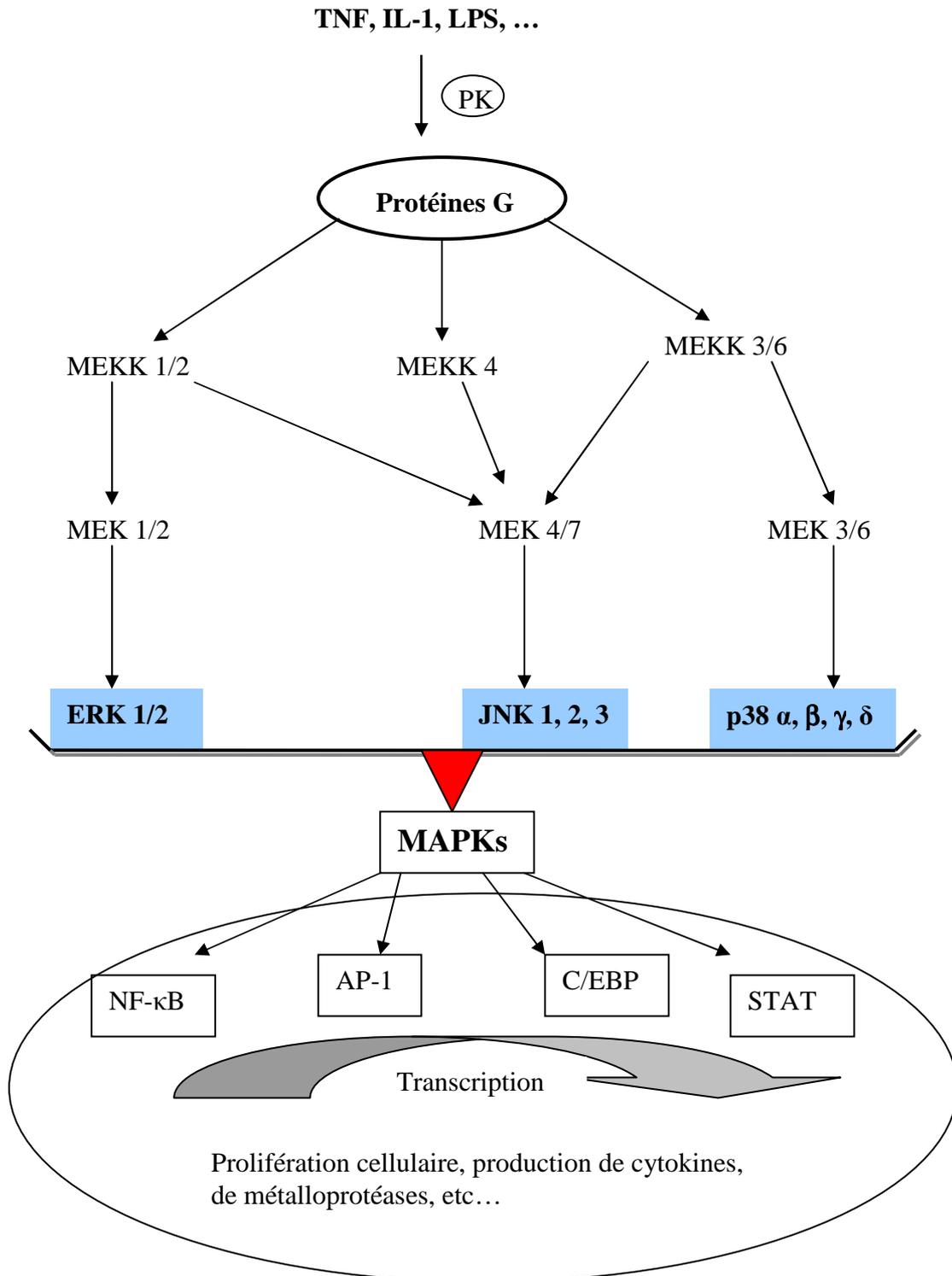
Les trois familles de MAP kinases sont exprimées dans le tissu synovial des patients atteints de PR mais avec des localisations différentes. L'activation de ERK s'observe plutôt au niveau des microvaisseaux synoviaux, JNKs autour et dans les infiltrats de cellules mononucléées et p38 dans la couche bordante synoviale et les cellules endothéliales (Schett et al., 2000). Dans ces différents types cellulaires, les MAP kinases étaient surtout activées par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . Parmi les trois familles de MAP kinases, p38 et plus particulièrement son isoforme p38 $\alpha$  est principalement activée dans les cellules impliquées dans l'inflammation (Herlaar et al., 1999). L'activation de p38 induit la synthèse des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8, soit par activation directe de la transcription des gènes, soit par stabilisation de l'ARNm (Lee et al., 1994; Suzuki et al., 2000). La MAPK p38 est capable de stabiliser l'ARNm grâce à son substrat la MAPKAK2 (« MAP kinase-activated protein kinase 2 ») qui agirait sur une ou plusieurs protéines capables de se lier à l'ARNm (Winzen et al., 1999).

La MAP kinase p38 contrôle aussi la synthèse d'autres molécules impliquées dans l'inflammation comme les chimiokines et les molécules d'adhésion, mais aussi la synthèse des métalloprotéases et des prostaglandines responsables de la destruction ostéo-cartilagineuse (Hammaker et al., 2003 ; Westra et al., 2004). L'implication de la MAPK p38 dans les différentes étapes de l'inflammation a abouti à la synthèse de plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de p38 : SB203580, RWJ 67657, L-167307, VX-745, RPR200765A. Ces inhibiteurs chimiques appartiennent à une nouvelle classe thérapeutique appelée *cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs* (CSAID) (Morel et Berenbaum, 2004) . Dans les synoviocytes fibroblastiques rhumatoïdes

stimulés par l'IL-1 et/ou le TNF- $\alpha$ , RWJ 67657 inhibe la production de MMP-1, MMP-3, IL-6, IL-8 et l'expression de l'ARNm de COX-2 (Westra et al., 2004). Dans les modèles d'arthrites expérimentales chez l'animal, les inhibiteurs de p38 préviennent le développement des arthrites et érosions osseuses (Badger et al., 2000). Après injection d'entoxine chez l'homme volontaire sain, RWJ 67657 supprime la fièvre et la production de cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8 (Hammaker et al., 2003).

Dans le modèle d'arthrite à l'adjuvant chez le rat, l'inhibition des trois formes de JNK protège le rat de la destruction osseuse avec diminution de l'activation d'AP-1 et de l'expression de MMP-3 dans la synoviale (Han et al., 2001).

Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les voies de signalisation intracellulaire, impliquant entre autres les MAP kinases, constituées d'un réseau complexe de molécules s'activant en cascade avec de nombreuses communications entre les voies. Ainsi, plusieurs stratégies de contrôle de la signalisation pourraient être envisageables et avoir des conséquences thérapeutiques dans la PR.



**Figure 9** : Description schématique de l'activation des MAP kinases (MAPKs) (Lioté et Berenbaum, 2004). Les MAPKs (ERK-1/2, JNKs, p38) sont activées par phosphorylation sous l'effet d'une cascade enzymatique. Elle sont au centre du phénomène de *cross-talk* où s'établit une communication entre les voies, stimulant NF-κB (nuclear factor kappaB), AP-1 (activating protein 1), C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein), STAT (signal transducers and activation of transcription). MEK (MAPK kinase), MEKK (MAPKK kinase), PK (protéine kinase).

## C / LA VOIE PHOSPHATIDYL INOSITOL-3 KINASE (PI3K)

La voie de la PI3K est également activée par les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 mais aussi par l'IL-18 dans les synoviocytes fibroblastiques. Les cytokines en se liant à leur récepteur activent soit une protéine tyrosine kinase, soit des protéines G. La PI3K est une enzyme induisant la phosphorylation de lipides membranaires, les phosphoinositides (PI). En fonction du nombre de phosphorylation, on distingue le PIP1, PIP2 et PIP3. Ces phosphoinositol phosphates vont activer la protéine kinase Akt ou protéine kinase B (Cantley, 2002 ; Morel et Berenbaum, 2004). Les événements au-delà de Akt sont moins bien connus mais peuvent activer les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1.

Inversement dans les cellules mononucléées du sang périphérique, la PI3K pourrait bloquer la synthèse de TNF- $\alpha$  (Brennan et al., 2002).

La PI3K est également impliquée dans la prolifération et l'adhésion cellulaire, mais aussi dans l'apoptose et l'angiogenèse (Roymans et al., 2001).

## D / LA VOIE JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT est la voie principale activée après la liaison de l'IL-6, l'IL-15 ou de l'IFN- $\gamma$  avec leur récepteur. Elle régule l'expression de gènes impliqués dans l'activation cellulaire, la prolifération et la différenciation. Après fixation du ligand à son récepteur, il y a activation d'une glycoprotéine gp130 qui active en cascade la janus tyrosine kinase (Jak) puis les facteurs de transcription STATs. Les facteurs de transcription STATs s'associent en dimères qui vont alors migrer dans le noyau et activer la transcription de gènes (Morel et Berenbaum, 2004). Parmi les gènes activés par les STATs, celui d'un « *suppressor of cytokine signalling* » (SOCS) conduit à la synthèse d'une protéine qui va inactiver Jak de façon prolongée. Cela constitue une boucle de rétrocontrôle négatif (Lioté et Berenbaum, 2004). Les cytokines majeures de la PR induisent précocement l'expression de SOCS : l'IL-6 induit l'expression de SOCS-1 et le TNF- $\alpha$  de SOCS-3. Dans la synovite rhumatoïde, l'étude immuno-histochimique a permis de montrer un excès d'activation de STAT3 alors qu'elle est inactive dans la synoviale arthrosique. Il en est de même pour SOCS-3, abondamment phosphorylée dans la synovite rhumatoïde, quoique en quantité insuffisante pour contrôler la maladie locale (Shouda et al., 2001).

## IV / L' APOPTOSE

### A / APPROCHES GENERALES DE L' APOPTOSE

Les processus de mort cellulaire peuvent être programmés ou non. Une mort cellulaire non programmée est le résultat d'une exposition de la cellule à un produit toxique ou d'une lésion primaire de la membrane externe de la cellule. L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles disparaissent de l'organisme. L'apoptose désigne une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire, notamment l'externalisation de la phosphatidylsérine membranaire. L'apoptose joue un rôle important dans l'embryogénèse, dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie et la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs. Dans le système immunitaire, l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection des lymphocytes T (délétion des lymphocytes T et B auto-immuns) et dans la suppression des cellules T lors de la dernière phase de la réponse immunitaire.

Les travaux sur l'apoptose se sont étendus au développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), à la drosophile, puis à l'homme et ont permis de mettre en évidence l'existence de deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie intrinsèque ou mitochondriale et la voie extrinsèque ou des récepteurs de mort.

#### 1 / Acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose

##### 1.1 / Les caspases

Les caspases sont des cystéines protéases pouvant intervenir dans le processus de mort cellulaire après stimulation des cellules par différents facteurs comme des molécules chimiques, des signaux physico-chimiques (UV, rayons gamma) ou la privation en facteurs de croissance. Elles ont un rôle primordial dans l'initiation et dans l'exécution de l'apoptose.

Une autre protéase connue pour avoir la même spécificité que les caspases est le Granzyme B, une sérine protéase contenue dans les granules des cellules cytotoxiques qui initie la mort par apoptose des cellules cibles.

### 1.1.1 / Structure et activation des caspases

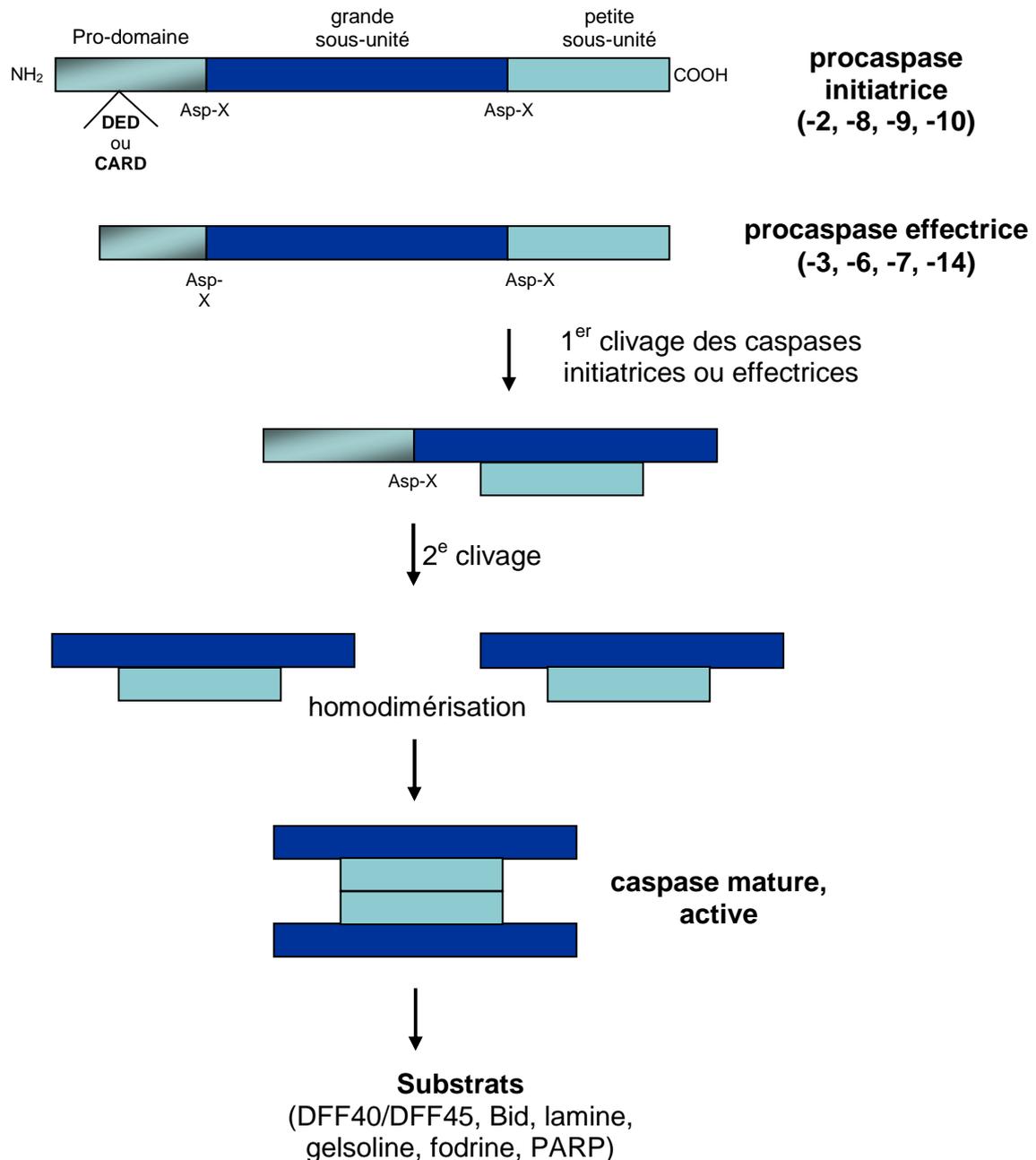
La première caspase, la caspase-1 ou ICE (interleukin-1 $\beta$  converting enzyme) a été mise en évidence chez les mammifères par homologie avec la protéine pro-apoptotique *ced-3* identifiée chez *C. elegans* (Miura et al., 1993). Il existe 14 caspases différentes mises en évidence à ce jour. Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Les caspases sont constituées d'un pro-domaine de taille et de séquence variables localisé dans la partie amino-terminale de la protéine, d'une grande sous-unité (20 kda) située au milieu de la molécule et d'une petite sous-unité (10 kda) localisée dans la partie carboxy-terminale. Le domaine N-terminal semble jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines et donc dans la régulation de l'activation de ces enzymes (Thornberry, 1998) (Figure 10).

L'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus, permettant de couper le pro-domaine et de séparer les deux sous-unités. Les caspases peuvent s'autocliner et activer d'autres caspases ou substrats formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques (Thornberry, 1998). Les deux sites consensus diffèrent selon les caspases mais le clivage se fait toujours après la liaison Asp-X (Figure 10). Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité nécessite la liaison à la petite sous-unité. En effet, les études par cristallographie révèlent que les caspases actives sont sous forme de tétramères formés par l'association de deux hétérodimères, contenant deux sites catalytiques indépendants (figure 10) (Wilson et al., 1994). L'activation des caspases est un événement précoce se produisant au cours de l'apoptose et l'inhibition de ces caspases par des protéines virales ou par des peptides spécifiques empêche l'apparition des caractéristiques morphologiques de l'apoptose alors que l'administration de caspases recombinantes dans des cellules induit leur mort par apoptose (Thornberry et al., 2000).

### 1.1.2 / Les différentes classes de caspases

Toutes les caspases ne sont pas des molécules effectrices du processus de mort. En effet, seules les caspases-3, -6, -7 et -14 ayant un pro-domaine court sont directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose alors que les caspases-2, -8, -9, et -10 à pro-domaines longs sont des molécules initiatrices ou régulatrices (Figure 10). Ces dernières fonctionnent comme des molécules de signalisation, elles sont en effet recrutées au niveau de complexes protéiques par l'intermédiaire de leur pro-domaine et sont capables par autoactivation de transduire le signal et d'activer les caspases effectrices. Il est désormais connu que les caspases-8 et -10 sont activées par la voie des récepteurs de mort alors que la caspase-9 est activée par la voie apoptotique mitochondriale (Amarante-Mendes et Green, 1999 ; Gupta, 2003). Cette différence dans le rôle des caspases est liée à la présence de motifs d'interactions protéines-protéines, tels que les domaines DED pour «death

effector domain» (caspase-8 et -10) ou CARD pour «caspase recrutement domain» (caspase-1, -2, -4 et -9) au niveau du pro-domaine. En effet, les caspases-8 et -10 contiennent des DEDs capables de se lier à d'autres DEDs présents sur des molécules adaptatrices. Le domaine CARD des caspases-1, -2, -4 et -9 leur permet de la même manière de s'associer à d'autres caspases ou à d'autres molécules adaptatrices.



**Figure 10:** Activation des caspases (d'après Amarante-Mendes et Green, 1999)

Certaines caspases comme les caspases-1, -4, -5, -11 et -12 semblent être des caspases impliquées dans l'inflammation en induisant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. L'activation des caspase-1 et -5 se produit à la suite de l'assemblage d'un complexe plurimoléculaire appelé « inflammasome » (Martinon et Tschopp, 2004). L'activation de la caspase-1 entraîne le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature et l'activation de l'IL-18. La caspase-12 bien qu'elle soit une caspase inflammatoire a été récemment décrite comme la caspase médiant l'apoptose à partir d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Oyadomari et *al.*, 2002).

### 1.1.3 / Principaux substrats des caspases et conséquences de leur clivage

Plusieurs substrats des caspases ont été identifiés, notamment des nucléases conduisant à la fragmentation de l'ADN. Ces nucléases coupent l'ADN génomique entre les nucléosomes pour générer des fragments de 180 paires de bases. Ces nucléases portent le nom de DFF pour facteur de fragmentation de l'ADN chez l'homme. Elles existent dans la cellule sous forme de complexe inactif parce qu'elles sont liées à une sous-unité inhibitrice. La nucléase DFF40 est complexée à la protéine inhibitrice DFF45 chez l'homme et, chez la souris, CAD est complexée à ICAD. L'activation de ces nucléases se produit pendant l'apoptose par clivage de la sous-unité inhibitrice par la caspase-3 (Figure 10). La nucléase, ainsi libérée, va entraîner la fragmentation de l'ADN (Samejima et *al.*, 2001). Toutefois, il apparaît que dans certaines formes d'apoptose, cette fragmentation internucléosomale de l'ADN soit remplacée par une fragmentation de haut poids moléculaire. D'autres substrats des nucléases seraient certains membres de la famille Bcl-2, c'est le cas de la protéine Bid clivée et ainsi activée par la caspase-8 dans certaines conditions (Li et *al.*, 1998) (Figure 10).

D'autres événements comme le clivage des lamines par les caspases expliquent la condensation nucléaire observée au cours de l'apoptose. La perte de la morphologie cellulaire est probablement la conséquence du clivage de protéines du cytosquelette comme la fodrine et la gelsoline (Kothakota et *al.*, 1997) (Figure 10). Près de 100 substrats de caspases ont été rapportés jusqu'alors indiquant la complexité du phénomène de mort par apoptose.

Un autre substrat très étudié est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP (Dantzer et *al.*, 1999). Cette protéine enzymatique comporte un domaine amino-terminal de liaison à l'ADN. La famille PARP est donc constituée des protéines PARP-1 et PARP-2 ayant un rôle majoritaire dans la protection du génome, PARP-3 et VPARP jouant un rôle dans le transport cellulaire et enfin de tankyrase jouant un rôle dans la réplication du télomère. Dans des conditions normales, l'enzyme inactive réside dans le nucléoplasme et, en réponse à des lésions sur l'ADN, PARP est recrutée. Elle devient active en se liant à l'ADN et permet alors la réparation de l'ADN en synthétisant de longs polymères d'ADP-ribose. La PARP semble jouer un rôle important au cours de l'apoptose ainsi qu'au cours de la nécrose. Pendant l'apoptose, la PARP est clivée par des protéases telles que les

caspases-3, -7 ou -9, ce qui sépare le domaine de liaison à l'ADN du domaine catalytique et ainsi empêche toute autre réparation de l'ADN (D'Amours et *al.*, 1999) (Figure 10). Lorsque l'ADN est peu endommagé, la PARP peut réparer l'ADN mais lorsque les lésions sur l'ADN sont sévères, la PARP est surexprimée avec une importante déplétion en énergie dans la cellule amenant celle-ci à une mort par nécrose.

## 1.2 / Les membres de la famille Bcl-2

### 1.2.1 / Structure

Les membres de la famille Bcl-2 (« B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins ») sont des régulateurs de l'apoptose. Cette famille, contenant environ 15 membres, peut être divisée en 2 groupes en fonction de leur activité : les protéines possédant une activité anti-apoptotique et les protéines possédant une activité pro-apoptotique. Ces deux groupes diffèrent par leur structure mais quatre régions sont communes et conservées, il s'agit des domaines BH pour « Bcl-2 homology ». Toutes les protéines de la famille Bcl-2 contiennent un domaine carboxy-terminal hydrophobe permettant leur ancrage dans la membrane au niveau de la mitochondrie mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (Gross et *al.*, 1999) (Figure 11).

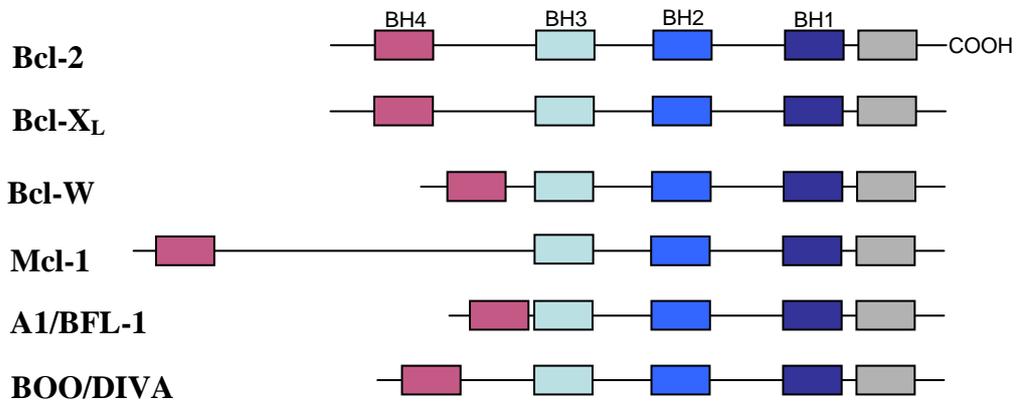
### 1.2.2 / Régulation des membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 sont régulés transcriptionnellement et post-traductionnellement par des cytokines ou des facteurs de survie ou de mort. Outre les processus de dimérisation permettant aux protéines de s'activer (homodimérisation) ou de s'inhiber (hétérodimérisation), d'autres phénomènes comme des modifications post-traductionnelles (phosphorylations ou protéolyses) permettent de réguler l'activité de certains membres de cette famille.

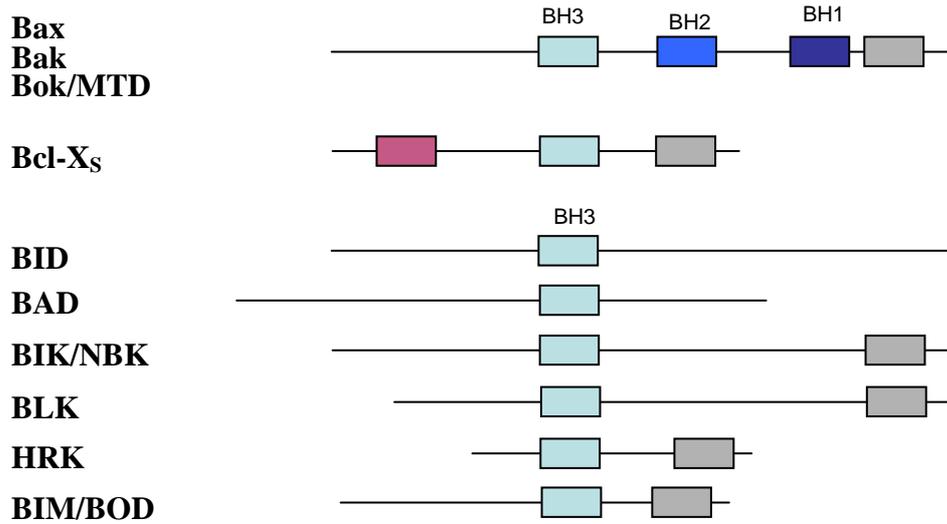
Une hyperphosphorylation de Bcl-2 semble altérer son activité anti-apoptotique dans certaines cellules (Chang et *al.*, 1997). La kinase susceptible de phosphoryler Bcl-2 pourrait être la MAP kinase JNK.

Bad est une protéine pouvant se lier à Bcl-X<sub>L</sub> et inhiber son activité anti-apoptotique, cette liaison n'est permise que si le site de liaison de Bad est déphosphorylé. La protéine Bid pro-apoptotique est un substrat de la caspase-8 et doit être clivée pour être active. Le fragment C-terminal généré par la protéolyse peut ainsi s'insérer au niveau de la membrane mitochondriale et permettre l'activation de la voie mitochondriale amplifiant ainsi le signal de mort initié par la voie des récepteurs (figure 12) (Li et *al.*, 1998 ; Luo et *al.*, 1998).

## Anti-apoptotiques



## Pro-apoptotiques



**Figure 11** : Les membres de la famille Bcl-2 (d'après Gross et al., 1999)

### 1.2.3 / Mode d'action

La plupart de ces petites protéines peuvent donc se dimériser, ce qui se produit souvent entre protéines pro-apoptotiques et protéines anti-apoptotiques. La régulation de l'apoptose par ces protéines résulte par conséquent du niveau d'expression entre protéines pro- ou anti-apoptotiques, les cellules exprimant plus de protéines pro-apoptotiques seront sensibles à la mort, les autres seront résistantes (Hengartner, 2000).

La fonction principale de ces régulateurs est de contrôler la libération de facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. En effet, l'addition de protéines pro-apoptotiques est suffisante pour induire le relargage du cytochrome c, alors que l'addition de protéines anti-apoptotiques prévient ce relargage (Gross et *al.*, 1999).

Bcl-2 semble être très souvent liée à la membrane mitochondriale alors que d'autres protéines comme Bax, Bid, Bad et Bim sont cytosoliques mais se transloquent dans la mitochondrie pendant l'apoptose. La translocation de ces protéines est contrôlée par des modifications post-traductionnelles comme une déphosphorylation pour Bad ou un clivage pour Bid. Bax est premièrement transloquée du cytosol vers la mitochondrie, sa conformation est alors modifiée et l'externalisation de son domaine amino-terminal permet son oligomérisation ainsi que son insertion au niveau de la membrane externe mitochondriale (Jürgensmeier et *al.*, 1998). Cette insertion est en effet rapidement suivie par le relargage du cytochrome c. Ces changements dans la conformation de Bax semblent être favorisés par l'interaction avec Bid (Eskes et *al.*, 2000) et peuvent être réduits ou empêchés par Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub>, ces protéines anti-apoptotiques agissant par liaison directe avec Bax (Desagher et *al.*, 1999). Il a été montré que Bcl-2 pouvait en outre empêcher l'activation des caspases par Bax sans effet sur le relargage du cytochrome c (Rosse et *al.*, 1998). Les protéines anti-apoptotiques pourraient donc agir en aval de la libération du cytochrome c.

## 2 / Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

La mitochondrie joue un rôle vital dans la cellule en produisant une grande partie de l'énergie dont la cellule a besoin, en participant à l'homéostasie calcique, en maintenant le potentiel redox et le pH intracellulaire. Un dysfonctionnement majeur de la mitochondrie peut entraîner l'apoptose. La mitochondrie est un organite constitué d'une membrane externe, d'un espace transmembranaire, d'une membrane interne et d'une matrice. La membrane interne possède de nombreuses protéines comme l'ATP synthase, la chaîne de transport des électrons et le transporteur de nucléotide adénylique (ou *Adenine Nucleotide Translocator*, ANT). Dans des conditions physiologiques normales, ces protéines permettent la formation d'un gradient électrochimique (ou potentiel membranaire,  $\Delta\Psi_m$ ) par la chaîne respiratoire. L'espace intermembranaire contient le

cytochrome c, certaines procaspases (-2, -3 et -9), les protéines Smac/Diablo, AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) et l'endonucléase G. La membrane externe possède un canal anionique voltage-dépendant (VDAC). La perméabilisation de la membrane externe provoque alors le relargage de toutes ces protéines dans le cytoplasme et la perméabilisation de la membrane interne conduit à un changement du potentiel membranaire mitochondrial. La libération de cytochrome c est l'une des étapes majeures dans l'induction de l'apoptose par la mitochondrie.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le relargage de solutés de la mitochondrie vers le cytosol, étape correspondant à la phase effectrice de l'apoptose :

### **2.1 / La théorie de la rupture de la membrane externe mitochondriale**

Le premier modèle implique l'hyperpolarisation de la membrane interne précédant la libération du cytochrome c dans certains systèmes. Cette hyperpolarisation résulterait de l'incapacité de l'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP mitochondrial (Van der Heiden et al., 1999). Cet échange est normalement effectué par les canaux anioniques voltage-dépendant ou VDAC localisés au niveau de la membrane externe et par le transporteur de nucléotide adénylique ou ANT localisé au niveau de la membrane interne. Cette absence d'échange semble empêcher le retour des ions  $H^+$  vers la matrice et par conséquent contribue à l'hyperpolarisation. Une telle augmentation du potentiel membranaire mitochondrial peut être à l'origine du gonflement osmotique de la matrice conduisant à la rupture de la membrane externe mitochondriale.

### **2.2 / Le pore de transition de perméabilité membranaire**

Le pore de transition de perméabilité membranaire ou MPTP est un canal non sélectif de « haute conductance » pouvant être formé par l'apposition de protéines transmembranaires résidant au niveau de la membrane interne et externe de la mitochondrie (Crompton, 1999). Ce pore est principalement formé par l'association de l'ANT, du VDAC et de la cyclophiline D, une protéine de la matrice. L'ouverture du pore peut être induite par différents effecteurs physiologiques comme le calcium, la diminution de la concentration en adénine nucléotide ou en phosphate inorganique, la production de radicaux libres oxygénés ou le changement de pH (Crompton, 1999) ainsi que par la présence de la protéine Bax. L'ouverture du pore augmente la perméabilité de la membrane interne mitochondriale vis-à-vis de protéines de poids moléculaire inférieur à 1,5 kda. Ceci entraîne une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial (proton-dépendant), un déséquilibre chimique entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale, ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative, provoquant alors un gonflement osmotique pouvant conduire à la rupture de la membrane externe. De plus, les membres de la famille Bcl-2 peuvent réguler l'ouverture du pore :

Bcl-2 peut prévenir cette ouverture alors que Bax provoque une chute du potentiel membranaire mitochondrial et en favorise l'ouverture (Kroemer et *al.*, 1997 ; Shimizu et *al.*, 1998).

### **2.3 / La théorie du pore formé par les membres de la famille Bcl-2**

Cependant, plusieurs études divergent quant à la chronologie des évènements, à savoir si l'ouverture du pore est la cause ou la conséquence du relargage du cytochrome c. En effet, plusieurs travaux ont montré que le relargage du cytochrome c pouvait se produire en absence ou avant la chute du potentiel membranaire mitochondrial (Goldstein et *al.*, 2000).

Un autre mécanisme doit donc permettre le relargage du cytochrome c. Il a été suggéré que les protéines de la famille Bcl-2 pouvaient s'insérer, après changement conformationnel, au niveau de la membrane externe mitochondriale. Mais le fait qu'un tel canal puisse être assez gros pour laisser passer de petites protéines reste à démontrer. Les propriétés des canaux formés par des protéines pro- ou anti-apoptotiques diffèrent significativement, ce qui expliquerait leurs effets opposés vis-à-vis du cytochrome c (Schlesinger et *al.*, 1997).

## **3 / Les différentes voies de l'apoptose**

La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extra-cellulaire) est transmis à des caspases initiatrices par des molécules adaptatrices. Il existe deux principales voies caspases-dépendantes de signalisation de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). Elles semblent être bien distinctes, cependant la voie des récepteurs de mort peut provoquer l'apoptose par la voie mitochondriale grâce à la protéine Bid, membre de la famille Bcl-2. Récemment, la voie du réticulum endoplasmique dépendante de la caspase-12 a été mise en évidence (Oyadomari et *al.*, 2002). Une autre voie apoptotique caspase-indépendante est initiée par la mitochondrie grâce à la libération de l'AIF pour «*apoptosis-inducing factor*».

### **3.1 / La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque**

Les ligands, membres de la famille du TNF, jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la modulation de la réponse immunitaire et l'induction de l'inflammation (Pitti et *al.*, 1996). Seize ligands membres de la famille du TNF ont été identifiés : TNF $\alpha$ , FasL, TRAIL (Apo-2L), lymphotoxine  $\alpha$ , lymphotoxine  $\beta$ , CD27L, CD30L, CD40L, CD137L, OX40L, RANKL, LIGHT, TWEAK, APRIL, TL1 et BAFF. La plupart des ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires avant que leurs domaines extracellulaires soient clivés par des métalloprotéases pour former des formes solubles. Les ligands sont produits

sous forme de trimères et se lie à des récepteurs de la famille du récepteur au TNF qui sont des protéines transmembranaires caractérisées par un motif extra-cellulaire riche en cystéines et un domaine de mort (DD, «Death Domain») intracellulaire. Par conséquent, la mort cellulaire initiée par ces ligands requiert la trimérisation des récepteurs. Tous ces ligands n'induisent pas la mort cellulaire. En effet, CD27L, CD30L et CD40L sont impliqués dans la survie cellulaire contrairement aux ligands TNF $\alpha$ , FasL ou TRAIL.

La mort induite par les membres de la famille des récepteurs au TNF conduit à l'activation de caspases et en est dépendante (Longthorne et Williams, 1997).

### **3.1.1 / La voie FasL/Fas (CD95 ou Apo-1)**

La glycoprotéine Fas (CD95, Apo-1) est un récepteur transmembranaire constitutivement exprimé dans les lymphocytes et à la surface de nombreux types cellulaires. La protéine ligand transmembranaire, FasL (CD95L, Apo-1L) peut être libérée de la surface cellulaire par des métalloprotéases et, ainsi soluble, elle peut se lier au récepteur Fas (Tanaka *et al.*, 1995). Les étapes de la voie apoptotique médiée par Fas sont représentées sur la Figure 12. La liaison du ligand à son récepteur entraîne une trimérisation des récepteurs. Le domaine cytoplasmique de Fas ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque mais contient un domaine de mort de 80 acides aminés (DD) permettant à une protéine adaptatrice, Fas-associated death domain (FADD), d'interagir. FADD possède également en plus de son «DD» un domaine effecteur de mort (ou «Death Effector Domain», DED) lui permettant de lier la procaspase-8 (ou Flice pour «FADD-like ICE») ou la procaspase-10. La formation de ce complexe appelé DISC pour «Death-inducing Signaling Complex» initie l'activation enzymatique de l'apoptose. La caspase-8 active est libérée du complexe et va activer d'autres procaspases comme la procaspase-3, caspase effectrice de l'apoptose induisant l'activation de différents substrats à l'origine des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose (Gupta, 2003).

### 3.1.2 / La voie TNF-TNF-R

#### ☞ La voie des récepteurs TNF-RI et II

Le TNF- $\alpha$  agit en se liant aux récepteurs de type I et II (TNF-RI et TNF-RII) et active plusieurs voies de signalisation. Les deux récepteurs sont des récepteurs transmembranaires qui diffèrent par leur partie cytoplasmique, TNF-RI possédant un domaine DD contrairement à TNF-RII. Ces deux récepteurs peuvent induire un signal de survie cellulaire mais TNF-RI peut également provoquer un signal de mort par son domaine DD. La liaison du TNF à son récepteur peut aussi bien conduire à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (anti-apoptotiques) qu'à l'apoptose (Gupta, 2003) (Figure 12).

La fixation du TNF $\alpha$  provoque une trimérisation de TNF-RI permettant la liaison de la protéine adaptatrice TRADD pour « TNF-R associated death domain ». Celle-ci va à son tour recruter FADD par son domaine DD. De la même façon que lors de l'apoptose induite par le récepteur Fas, la caspase-8 ou -10 va être activée par l'apoptosome TNF-RI/TRADD/FADD afin d'agir sur les caspases effectrices -3, -6 et -7 (Figure 12).

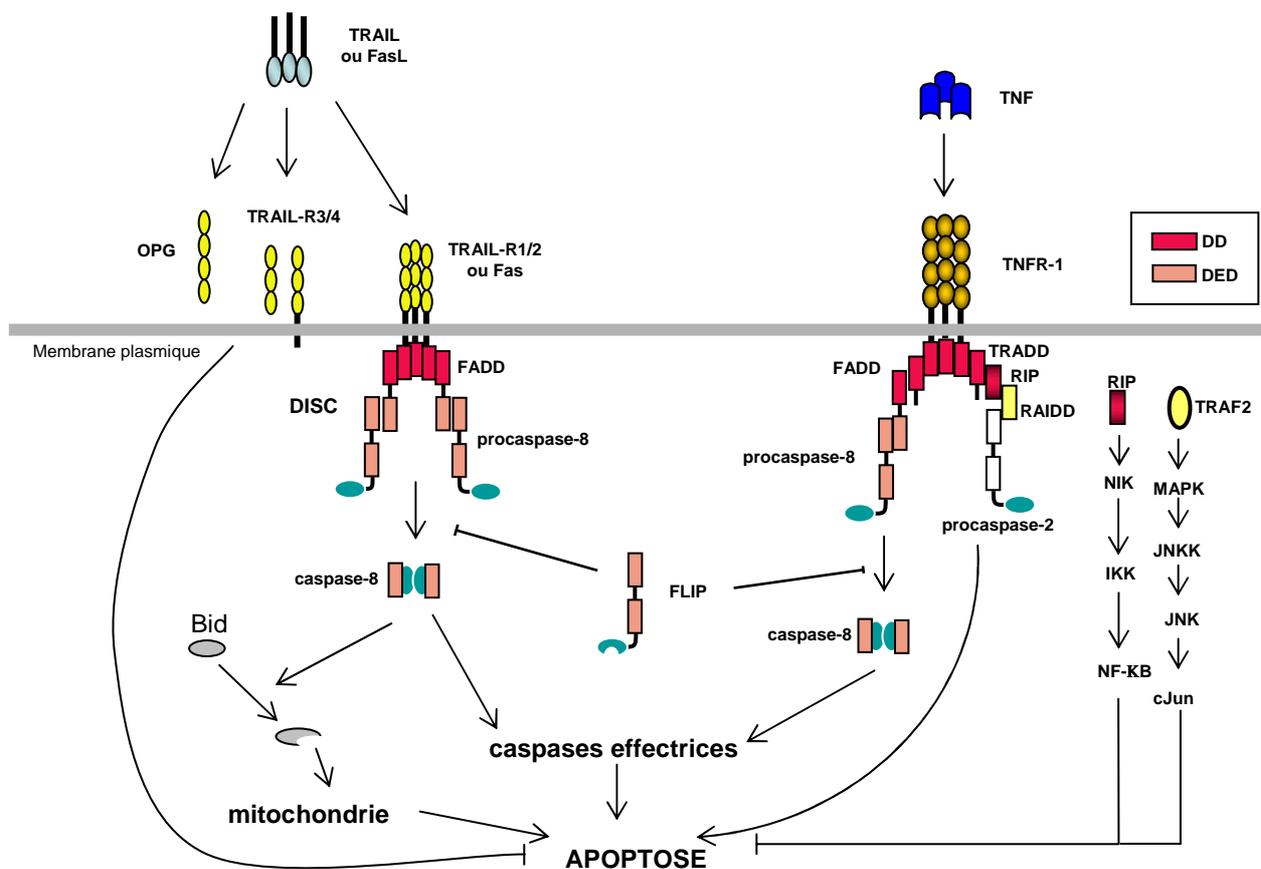
Mais, TNF-RI peut également activer une voie indépendante de FADD via la protéine RIP (« receptor interacting protein »), cette voie étant moins fréquente que la voie dépendante de FADD. TRADD possède un domaine DD qui peut s'associer à la protéine RIP. Cette dernière s'associe à la protéine RAIDD (« RIPK1 Domain containing Adapter with DD») qui possède un domaine CARD (« caspase recruitment domain»), domaine également présent sur les caspases-2, -3 et -9. Bien que l'activation des caspases-8 et -10 soit dépendante de FADD, l'activation de la caspase-2 est indépendante de FADD et se fait grâce à l'apoptosome TNF-RI/TRADD/RIP/RAIDD (Karin et Lin, 2002) (Figure 12).

Le TNF $\alpha$  peut également induire un signal de survie cellulaire grâce à deux types de protéines adaptatrices, TRAF-2 (« TNF-R-associated factor-2») et RIP. TRAF-2 et RIP induisent la survie cellulaire par l'activation des voies MAP kinase et NF- $\kappa$ B respectivement. NF- $\kappa$ B est souvent décrit comme un facteur répresseur de l'apoptose alors que les MAPKs peuvent aussi bien inhiber qu'induire l'apoptose.

Le récepteur TNF-RII ne possède pas de domaine DD cytoplasmique mais la liaison du TNF- $\alpha$  à TNF-RII conduit à l'interaction de TRAF-1 et -2 au domaine de TNF-RII cytoplasmique. Il a été rapporté que TNF-RII jouait un rôle important dans la régulation de l'apoptose médiée par TNF-RI (Declercq et *al.*, 1998).

### ☞ La voie des récepteurs TRAIL (Apo-2L)

Les ligands TRAIL («tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand» ou Apo2L) sont des protéines transmembranaires, pouvant former des trimères. L'interaction entre TRAIL et les récepteurs TRAIL-R1 (DR4) et/ou TRAIL-R2 (DR5, Apo-2, TRICK2, Killer) induit rapidement la mort cellulaire dans les cellules cibles qui sont principalement des cellules tumorales (Pitti et *al.*, 1996). Les ligands TRAIL et leurs récepteurs sont exprimés de façon constitutive dans beaucoup de tissus (Pitti et *al.*, 1996), ce qui suppose l'existence d'un mécanisme de contrôle de l'apoptose induite par TRAIL. La liaison du ligand au récepteur permet l'interaction de ce complexe avec des protéines adaptatrices comme FADD décrite auparavant ou TRADD.



**Figure 12 :** La voie des récepteurs de mort (d'après Gupta, 2003).

Le déroulement de la signalisation induite par les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 se rapproche de celle induite par la voie FasL/Fas (Figure 12). Trois autres récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de TRAIL ont été identifiés : TRAIL-R3 (DcR1, TRID, LIT), TRAIL-R4 (DcR2, TRUNDD) et l'ostéoprotégérine (OPG). Ils fonctionnent comme modulateurs interférant avec l'activité des récepteurs de mort car ils ne possèdent pas de domaine propre intracytoplasmique ; pour cette raison, ils sont considérés comme étant non-apoptotiques et représentent un mécanisme de contrôle de l'apoptose induite par TRAIL (Figure 12). L'ostéoprotégérine a été récemment décrit comme étant un récepteur soluble pouvant se lier à TRAIL et inhiber son action (Emery et *al.*, 1998).

### 3.1.3 / Régulation de la voie apoptotique médiée par les récepteurs

L'apoptose médiée par cette voie est régulée notamment au niveau de l'assemblage du complexe DISC ou au niveau de son activité. La protéine FLIP ou «Flice-inhibitory protein» est une isoforme de la caspase-8. Elle agit en entrant en compétition avec les caspases-8 et -10 et en empêchant leur recrutement au niveau du DISC avec blocage de l'apoptose (Krueger et *al.*, 2001) (Figure 12). De plus, il a été montré que FLIP pouvait induire l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B ainsi que la voie de signalisation impliquant ERK (« extracellular signal-regulated protein kinase ») (Kataoka et *al.*, 2000). Par conséquent ces protéines agissent comme des protéines anti-apoptotiques.

Un autre type de régulation se fait au niveau du récepteur lui-même. En effet, la plupart des récepteurs du TNF existent également sous forme soluble, qui entrent donc en compétition vis-à-vis de la forme transmembranaire du récepteur avec le ligand, bloquant ainsi le recrutement de protéines adaptatrices et par conséquent l'activation des procaspases initiatrices.

### 3.1.4 / Amplification de la voie des récepteurs de mort

La voie classique des récepteurs de mort se produit dans les cellules exprimant la procaspase-8 de façon importante, mais dans les autres types cellulaires, cette voie doit être amplifiée par la voie mitochondriale grâce au recrutement de la protéine Bid par la caspase-8 (Figure 12). En effet, la caspase-8 clive Bid, un membre de la famille Bcl-2, au niveau N-terminal permettant l'exposition de son domaine BH3. L'exposition du domaine BH3 permet à Bid de s'insérer dans la membrane mitochondriale et de se lier à Bax ou à d'autres protéines pro-apoptotiques. Bid provoque ainsi la libération du cytochrome c induisant l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3 (Wang et *al.*, 1996b).

Une autre protéine faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de la protéine BAR (« bifunctional apoptosis regulator »), protéine régulatrice capable de s'associer aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> par un domaine SAM (« sterile alpha motif ») ainsi qu'à la caspase-8 par le domaine DED (Zhang et *al.*, 2000).

### **3.2 / La voie mitochondriale ou voie intrinsèque**

#### **3.2.1 / La voie mitochondriale dépendante des caspases**

De nombreux stimuli, comme les agents thérapeutiques, les radiations UV, les molécules du stress, le manque de facteurs de croissance, semblent induire l'apoptose par la voie mitochondriale.

##### ☞ Le cytochrome c

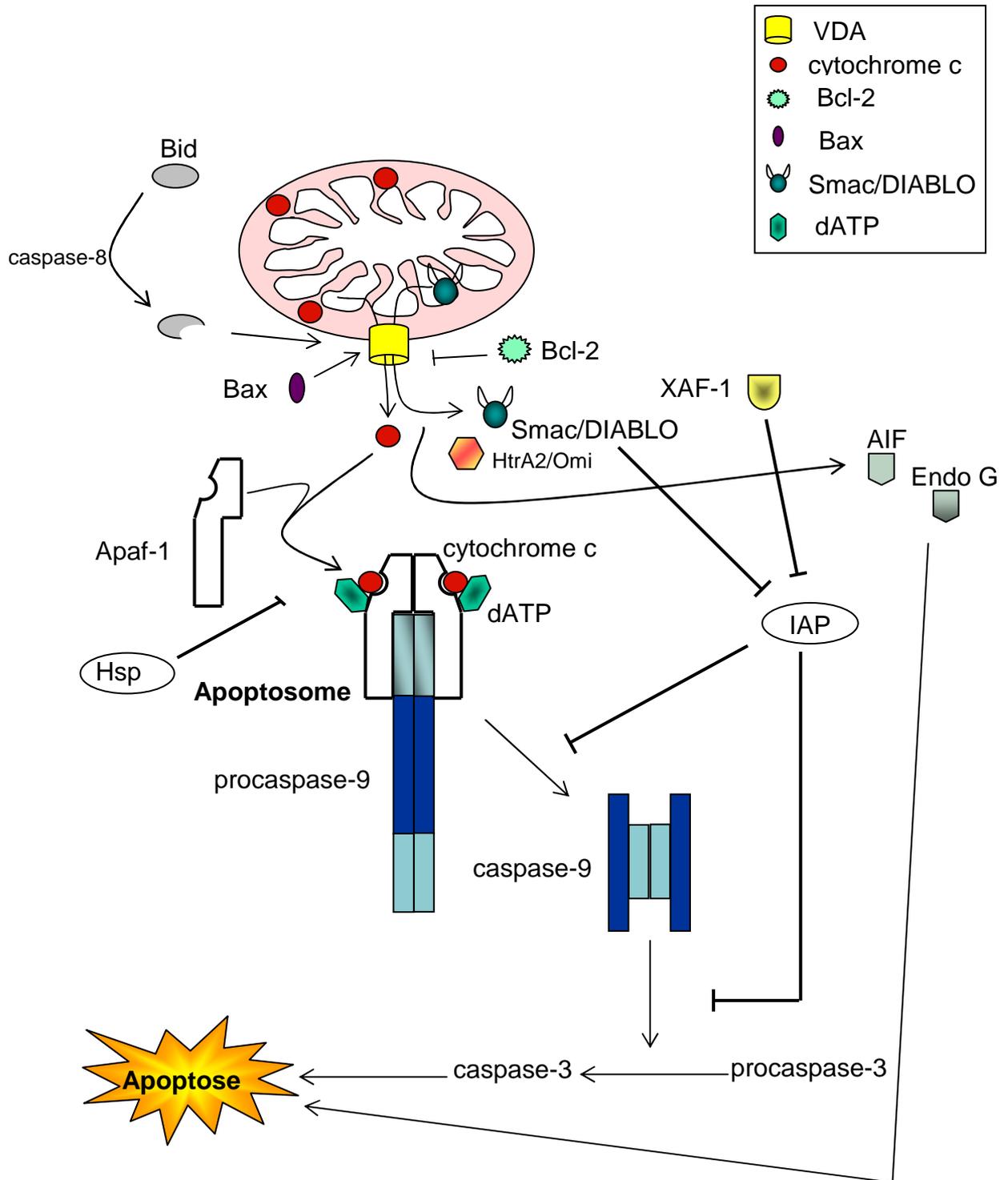
Le cytochrome c est l'une des étapes majeures de l'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale. Il est importé dans la mitochondrie où il subit une maturation. La protéine devenue globulaire se lie à un hème. Le cytochrome c est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial où il exerce sa fonction physiologique de transporteur d'électrons (Ravagnan et *al.*, 2002). Or, le cytochrome c est nécessaire à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la caspase-3.

Dans la majorité des cas, la libération du cytochrome c est dépendante de l'activité des caspases (Bossy-Wetzel et *al.*, 1998). Le mécanisme par lequel le cytochrome c est relargué, ainsi que sa cinétique de libération a été le sujet de nombreuses controverses. Le relargage du cytochrome c semble être dépendant de la présence de Bax ou Bak dans la membrane externe mitochondriale. Le relargage du cytochrome c pourrait se faire avant la chute du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) ou simultanément.

##### ☞ La protéine Apaf-1

Apaf-1 est une protéine d'environ 130 kDa comprenant un domaine CARD dans la partie amino-terminale et un domaine C-terminal contenant plusieurs répétitions WD-40 impliquées dans les interactions protéines-protéines (Cain et *al.*, 2002). Les répétitions WD-40 sont nécessaires à la liaison au cytochrome c mais ne sont pas suffisantes. Le domaine WD joue également un rôle important dans le recrutement de la procaspase-3. Le domaine CARD d'Apaf-1 n'est pas exposé dans des conditions normales et ne peut donc pas interagir avec la caspase-9 ; en revanche en présence d'ATP et de cytochrome c, Apaf-1 change de conformation et peut interagir avec la caspase-9 grâce à l'exposition de CARD (Li et *al.*, 1997) (Figure 13). La partie centrale d'Apaf-1

possède un domaine semblable à un domaine ATPase et l'hydrolyse de l'ATP paraît être nécessaire à la formation de l'apoptosome (Hu et *al.*, 1999).



**Figure 13 :** La voie mitochondriale (d'après Ravagnan et *al.*, 2002).

### ☞ La formation de l'apoptosome

L'apoptosome impliqué dans l'apoptose induite par la mitochondrie est constitué d'Apaf-1, du cytochrome c et de la procaspase-9 (Figure 13). Apaf-1 s'associe à la procaspase-9 et à deux molécules de cytochrome c (Cain et *al.*, 2001). La concentration de K<sup>+</sup> intracellulaire (physiologique) abolit en temps normal l'activation des caspases en inhibant la formation de l'apoptosome mais cette inhibition peut être levée en présence d'une grande quantité de cytochrome c (Cain et *al.*, 2001). Le cytochrome c facilite la liaison de l'ATP à Apaf-1 probablement en favorisant l'exposition du domaine de liaison par changement de la conformation de Apaf-1.

### ☞ Les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs

Les IAPs sont des protéines qui inhibent la mort cellulaire en empêchant le clivage des caspases (Fesik et Shi, 2001) (Figure 13). Les IAPs sont constituées d'un ou plusieurs domaines BIR pour «baculoviral IAP repeat» indispensables à leur activité anti-apoptotique puisqu'ils permettent la liaison aux caspases. Chaque domaine BIR possède des fonctions distinctes et une spécificité de liaison aux caspases. XIAP (*X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein*) est une des molécules les mieux connues de cette famille ; elle peut inhiber l'activation de la caspase-9 initiatrice ainsi que celle des caspases effectrices -3 et -7. En effet, elle peut se lier à la caspase-9 active et l'empêcher d'agir sur la procaspase-3 ou encore séquestrer la procaspase-3 au niveau de l'apoptosome par simple liaison, ce qui bloque la voie apoptotique. Les IAPs peuvent elles-mêmes être régulées de manière négative.

Smac (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*) et son homologue DIABLO (*Direct IAP Binding protein with Low pI*) sont des protéines identifiées récemment, qui bloquent l'activité anti-apoptotique des IAPs (Du et *al.*, 2000 ; Verhagen et *al.*, 2000 ; Srinivasula et *al.*, 2001) (Figure 13).

XAF-1 («XIAP associated factor 1») est une autre protéine capable d'activer les caspases en inhibant les IAPs (Figure 13). Contrairement à Smac/DIABLO, c'est une protéine nucléaire active en permanence se liant à XIAP et la séquestrant dans le noyau, la cellule devient alors plus sensible à un signal de mort.

Récemment, la protéine Omi/HtrA2 (*high temperature requirement protein A2*) a été identifiée comme étant une nouvelle protéine inhibitrice des IAPs (Martins et *al.*, 2002) (Figure 13). Dans les cellules normales humaines, HtrA2 est confinée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Mais sous induction apoptotique avec différents agents, elle est relarguée dans le cytosol et se lie aux IAPs comme XIAP de la même façon que Smac/DIABLO facilitant ainsi l'activation des caspases.

### 3.2.3 / La voie mitochondriale indépendante des caspases

Plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases. C'est le cas du facteur d'induction apoptotique (AIF) et de l'endonucléase G (endo G) qui, une fois libérés de la mitochondrie, sont transloqués dans le noyau provoquant une condensation de la chromatine et une coupure de l'ADN générant de larges fragments d'ADN (Figure 13).

#### ☞ La protéine AIF

L'AIF est une flavoprotéine (Lorenzo et *al.*, 1999). Le précurseur de l'AIF est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie (Susin et *al.*, 1999). Une fois dans l'espace intermembranaire, la protéine AIF est clivée et change de conformation tout en incorporant le groupement prosthétique FAD («Flavin Adénine Dinucléotide»). Après exposition de la cellule à un stimulus pro-apoptotique, l'AIF se transloque de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Le phénomène par lequel l'AIF se transloque vers le cytosol est encore inconnu.

Les effets de l'AIF en tant que molécule apoptogène ont été étudiés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. *In vitro*, il a été montré que l'AIF génère une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'une fragmentation de l'ADN en larges fragments de 50 kpb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence (Ye et *al.*, 2002). Cette interaction peut être modulée par le niveau de translocation dans le noyau. De plus, l'AIF provoque en présence d'extraits cytosoliques une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et par conséquent la libération du cytochrome c et de la procaspase-9 (Susin et *al.*, 1999). Les effets de l'AIF sont abolis par la surexpression de Bcl-2 et sont les mêmes dans des cellules ayant ou non des activités caspases : l'AIF agit donc indépendamment des caspases.

L'AIF est inhibé par une protéine endogène, Hsp70 (Ravagnan et *al.*, 2001). Beaucoup d'évènements concernant l'AIF sont encore inconnus, notamment son mode d'action sur l'ADN, son activité d'oxydoréductase, la transduction du signal permettant sa libération. La condensation de l'ADN observée lors de l'apoptose pourrait être expliquée par l'interaction directe de l'AIF sur l'ADN. En effet, cette interaction pourrait modifier la structure de la chromatine et favoriser l'action des nucléases comme la topoisomérase II ou la cyclophiline qui génèrent elles aussi des fragments de 50 kpb similaires à ceux obtenus après induction de l'AIF.

### ⇨ L'endonucléase G

L'endonucléase G est une nucléase mitochondriale non-spécifique (Li et *al.*, 2001). Pendant l'apoptose, l'endonucléase G est relarguée de la mitochondrie et transloquée dans le noyau. Elle digère l'ADN en l'absence d'activité caspase et en l'absence de la nucléase caspase-dépendante DFF/CAD (van Loo et *al.*, 2001). L'endonucléase G pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire, mais elle peut également générer des fragments oligonucléosomiques.

### **3.3 / La voie du réticulum endoplasmique**

Différentes fonctions importantes pour la cellule comme les modifications post-traductionnelles, l'assemblage et la conformation des protéines nouvellement synthétisées, se font dans le réticulum endoplasmique (RE) mais celui-ci sert également de réserve de calcium cellulaire. Ces fonctions sont vitales pour la survie de la cellule et la moindre modification altérant une de ses fonctions entraîne des dommages cellulaires irréversibles et conduit à l'apoptose. Plusieurs conditions peuvent conduire à un « stress du RE », comme l'inhibition de la glycosylation des protéines, la diminution de la formation des liaisons disulfides, la déplétion du calcium contenu dans le lumen du RE, les altérations du transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi, l'expression de protéines anormalement conformées. Une voie de signalisation contrôle l'accumulation de ces dernières au niveau du RE (Oyadomari et *al.*, 2002).

Plusieurs voies apoptotiques peuvent être induites après un stress du RE. La première est l'induction transcriptionnelle de CHOP (pour «C/EBP homologous protein», nommée également Gadd153), un membre de la famille des facteurs de transcription C/EBP (Ron et Habener, 1992). CHOP est peu ou pas exprimé dans des conditions physiologiques normales et est fortement induit en réponse à un stress du réticulum. Sa surexpression conduit à un arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose (Gotoh et *al.*, 2002). Il a été décrit que CHOP diminuait l'expression de la protéine Bcl-2 et augmentait la concentration intracellulaire de protons et la production de radicaux libres (McCullough et *al.*, 2001). La seconde voie d'induction de l'apoptose met en jeu la voie de transduction JUN-kinase (JNK). L'activation de la caspase-12 est la troisième voie apoptotique induite par un stress du RE. La caspase-12 est localisée au niveau de la membrane du RE côté cytosolique et est activée par un stress au niveau du RE. Son activation conduit à l'apoptose. Il semblerait que JNK agisse comme partenaire dans l'activation de la caspase-12 (Oyadomari et *al.*, 2002).

#### 4 / Le rôle de NF- $\kappa$ B dans l'apoptose

Le facteur NF- $\kappa$ B est également un médiateur clé de l'induction de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Barkett et Gilmore, 1999) (Figure 8). NF- $\kappa$ B a été décrit comme un inhibiteur de l'apoptose principalement induite par le TNF $\alpha$  (Baldwin, 1996). De plus, il a été montré qu'IKK $\beta$  était indispensable pour la survie cellulaire (Li et *al.*, 1999). Les gènes codant pour les IAPs, pour FLAP, TRAF-1 et TRAF-2 et pour des homologues de Bcl-2 sont des gènes anti-apoptotiques directement activés par NF- $\kappa$ B. En activant les IAPs, NF- $\kappa$ B empêche l'activation des caspases mais il peut aussi induire l'expression de membres de la famille Bcl-2 comme Bcl-X<sub>L</sub> qui est anti-apoptotique ou inhiber l'expression de Bax pro-apoptotique (Bentires-Alj et *al.*, 2001).

Inversement, une activation de Hsp70 par l'arsenite diminue l'apoptose dans les cellules endothéliales. Cette activation de Hsp70 semble être liée à une diminution de l'activation de NF- $\kappa$ B. Ceci suggère que NF- $\kappa$ B activé puisse aussi être pro-apoptotique (DeMeester et *al.*, 1997). Ryan et *al.* (2000) ont montré que l'activation de NF- $\kappa$ B était essentielle pour que p53 induise l'apoptose. En effet, l'inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B est corrélée à une absence d'apoptose normalement induite par p53.

#### 5 / Le rôle de p53 dans l'apoptose

p53 est une nucléoprotéine, surnommée le gardien du génome car elle a la tâche de bloquer la prolifération cellulaire si l'ADN de la cellule est endommagé ou modifié. Elle peut réguler une grande variété de gènes en s'associant de façon sélective à différents facteurs de transcription (Bargonetti et *al.*, 2002). L'apoptose médiée par p53 est induite par des lésions sur l'ADN, l'hypoxie ou le manque de facteurs de croissance. La protéine p53 peut inhiber la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> ou induire des gènes pro-apoptotiques comme Bax, Fas et Fas-L (Bargonetti et *al.*, 2002). Mais dans la plupart des cas, son implication dans l'apoptose semble être indépendante de son activité transcriptionnelle (Caelles et *al.*, 1994). Elle peut induire l'apoptose en augmentant la production de radicaux libres au niveau de la mitochondrie. Après une hypoxie ou l'induction de lésions sur l'ADN, p53 est transférée dans la mitochondrie et ce transfert précède le relargage de cytochrome c et l'activation de la procaspase-3 (Marchenko et *al.*, 2000). De plus, Mihara et *al.* (2003) ont montré qu'elle pouvait induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en formant un complexe avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>. Ainsi, p53 interviendrait dans l'apoptose mitochondriale.

## 6 / Le rôle de COX-2 dans l'apoptose

La COX-2 aurait plutôt un rôle anti-apoptotique. En effet, plusieurs travaux sur différentes lignées cancéreuses ont montré une surexpression de COX-2 et une inhibition de l'apoptose (Tsuji et al., 1995). En effet, les PGs rendent les cellules épithéliales et hépatocytaires résistantes à l'induction de l'apoptose (Tsuji et al., 1995 ; Kroll et al., 1998). PGE<sub>2</sub> induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses coliques (Sheng et al., 1998). L'acide arachidonique (AA) exogène en quantité importante peut provoquer l'apoptose, indépendamment de la formation de PGs. Il est possible que COX-2 surexprimée puisse réduire la quantité d'AA et ainsi prévenir l'apoptose (Surette et al., 1999).

Le NS-398, un inhibiteur sélectif de COX-2, réduit la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans les cellules d'hépatocarcinome (Cheng et al., 2002). Cependant, l'indométacine pourrait exercer une activité anti-proliférative de façon indépendante de COX-2 (Smith et al., 2000a). Dans les cellules d'ostéosarcome, le NS-398 à faibles concentrations augmente l'apoptose sans moduler l'expression de COX-2. Par contre, à fortes concentrations, il induit COX-2 et diminue le taux de cellules apoptotiques (Moalic et al., 2001b). Récemment, Wu et al. (2003) ont montré que l'inhibition de la prolifération des cellules de carcinomes et l'induction de l'apoptose par le celecoxib passaient par un mécanisme dépendant de COX-2. Cependant, une autre étude montre que le celecoxib induit l'apoptose par la voie mitochondriale indépendamment de sa capacité à inhiber COX-2 (Jendrossek et al., 2003). Dans les cultures de synoviocytes fibroblastiques de PR, le celecoxib induit l'apoptose de façon dose-dépendante (Kusunoki et al., 2002). Cet effet pro-apoptotique est indépendant de COX-2 et des récepteurs de proliférateurs de péroxisomes (PPARs), en l'occurrence PPAR- $\gamma$ . Les AINS comparateurs, indométacine, rofecoxib, étodolac, méloxicam, nimésulide n'ont pas d'effet sur l'apoptose même à fortes doses. Ainsi les AINS pourraient exercer une activité pro-apoptotique par différents mécanismes dépendants ou non de COX-2.

Les PGs peuvent stimuler des récepteurs de surface comme les récepteurs EP de la PGE<sub>2</sub>. Elles peuvent aussi agir, notamment les PGA, D et J, sur les récepteurs nucléaires PPARs. Les PPARs sont des facteurs de transcription activés par les complexes récepteur/ligand hormonaux nucléaires, qui comportent les récepteurs aux stéroïdes, aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D. Les PPARs se lient à l'élément de réponse proliférateur de péroxisomes (PPRE). Ils sont exprimés dans les macrophages, les lymphocytes T, les synoviocytes, chondrocytes et ostéoclastes (Fahmi et al., 2002 ; Kawahito et al., 2000). Or, les AINS pourraient agir par l'intermédiaire des PPARs. En effet, l'indométacine qui inhibe la prolifération des cellules cancéreuses indépendamment de COX-2, active les récepteurs PPARs et induit l'apoptose (Lehmann et al., 1997). Dans ce sens, Yang et Frucht (2001) ont montré que l'activation des PPARs inhibait

l'expression de COX-2 et induisait l'apoptose dans les cellules de cancer du colon. L'indométacine et le diclofénac induisent l'apoptose des synoviocytes fibroblastiques de PR en association avec l'activation de PPAR- $\gamma$  (Yamazaki et al., 2002). Kawahito et al. (2000) ont montré que des ligands de PPAR- $\gamma$  (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> et la thiazolidine) étaient capables d'induire l'apoptose des synoviocytes de PR *in vitro* et de diminuer *in vivo* la formation du pannus synovial dans l'arthrite à l'adjuvant chez le rat.

## **B / POLYARTHRITE RHUMATOIDE ET APOPTOSE**

Dans la PR, le tissu synovial devient hyperplasique avec une multiplication des cellules synoviales, une infiltration de cellules de l'inflammation lymphocytes et macrophages et une néovascularisation. Les synoviocytes fibroblastiques ont des caractéristiques pseudo-néoplasiques avec une tendance à l'invasion et l'expression de proto-oncogènes (Palmer et al., 1995). L'hypothèse avancée pour expliquer cette hyperplasie synoviale est un déséquilibre entre prolifération cellulaire et apoptose avec probablement un défaut des phénomènes d'apoptose.

### **1 / Intervention de la voie du récepteur de mort Fas/FasL**

Les macrophages du tissu synovial de PR expriment à la fois Fas et FasL (Perlman et al., 2001). Fas est également exprimé par d'autres cellules comme les synoviocytes fibroblastiques et les lymphocytes. Cependant, les synoviocytes sont résistants à l'apoptose médiée par Fas. Les cytokines majeures intervenant dans la physiopathologie de la PR sont capables d'inhiber l'apoptose médiée par Fas *in vitro* dans les cellules synoviales (Wakisaka et al., 1998). Cette résistance à l'apoptose pourrait s'expliquer par une augmentation de l'inhibition de la voie Fas/FasL exercée par la protéine Flip anti-apoptotique. Flip est d'ailleurs exprimée de façon plus importante dans le tissu synovial de PR comparé à celui d'arthrose (Perlman et al., 2001). Flip a été mise en évidence par immunofluorescence dans les macrophages et les synoviocytes fibroblastiques. L'ARNm de Flip est détecté par hybridation *in situ* dans le tissu synovial, notamment au site d'érosion du cartilage (Schedel et al., 2002). Après stimulation par le TNF- $\alpha$ , l'expression de l'ARNm de Flip et le taux de protéine sont augmentés dans les synoviocytes fibroblastiques de PR (Chen et al., 2002).

Inversement, les biothérapies par anti-TNF- $\alpha$  (infliximab et etanercept) restaurent les phénomènes d'apoptose (Catrina et al., 2005).

En ce qui concerne la voie de TRAIL, il semblerait qu'elle soit absente puisque TRAIL et ses récepteurs R1, R2 et R4 ne sont pas détectables par cytométrie de flux dans les lymphocytes et les synoviocytes fibroblastiques de PR (Perlman et al., 2003).

## **2 / Rôle de NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B joue un rôle très important dans la physiopathologie de la PR en régulant la production de cytokines pro-inflammatoires. Il intervient également dans l'apoptose en favorisant la production de molécules anti-apoptotiques comme Flip, XIAP (membre des protéines inhibitrices de l'apoptose) et A1 (membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2) (Liu et al., 2003 ; Bai et al., 2004). L'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B sensibilise les synoviocytes fibroblastiques de PR à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Yamasaki et al., 2001 ; Youn et al., 2002).

## **3 / Rôle des membres de la famille Bcl-2**

Concernant la voie mitochondriale de l'apoptose et les membres de la famille Bcl-2, il semble exister dans la PR une balance en faveur des membres anti-apoptotiques. Ainsi, Bcl-2 est exprimé de façon plus importante dans le tissu synovial de PR comparé à celui d'arthrose, tout particulièrement dans les synoviocytes fibroblastiques CD68 - (Perlman et al., 2000). La stimulation par l'IL-15, une cytokine pro-inflammatoire intervenant dans la physiopathologie de la PR, augmente l'expression de l'ARNm de Bcl-X<sub>L</sub> dans les synoviocytes fibroblastiques et inversement l'inhibition de la production endogène d'IL-15 supprime l'expression des ARNm de Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> et entraîne l'apoptose (Kurowska et al., 2002). Dans un modèle expérimental animal de PR, l'étoposide, qui induit l'apoptose par dysfonctionnement mitochondrial, prévient l'arthrite au collagène (Verdrengh et al., 2002).

## **4 / Rôle de p53**

p53 intervient dans le contrôle du cycle cellulaire et dans l'apoptose. Elle est surexprimée dans le tissu synovial de PR (Firestein et al., 1996 ; Salvador et al., 2005). Cependant, des mutations de p53 ont été mises en évidence notamment dans la couche bordante du tissu synovial (Yamanishi et al., 2002). L'analyse des différents types de mutations de p53 est en faveur de lésions de l'ADN secondaires à un stress oxydatif. Ainsi, le stress oxydatif pourrait entraîner des mutations de p53 et ainsi protéger les cellules contre l'apoptose. Dans un modèle expérimental d'arthrite chez le lapin, l'injection intra-articulaire d'un vecteur viral exprimant p53 induit l'apoptose dans le tissu synovial et réduit l'inflammation (Yao et al., 2001).

## 5 / Intervention de la voie PI3K/Akt-1

La stimulation de la voie PI-3K conduit à l'activation d'Akt-1 qui induit elle-même une résistance à l'apoptose par différents mécanismes. Akt-1 est une sérine/thréonine kinase et peut inhiber l'apoptose en phosphorylant Bad entraînant ainsi une inactivation de l'effet inhibiteur de Bad sur Bcl-X<sub>L</sub>, et donc le maintien de l'intégrité mitochondriale. Akt-1 entraîne également une diminution de l'expression de FasL (Liu et al., 2003). L'inhibition de l'activation d'Akt-1 rend les synoviocytes fibroblastiques de PR sensibles à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Zhang et al., 2001). Il en est de même des macrophages provenant du liquide synovial de PR où l'apoptose peut être induite par l'inhibition de la voie PI-3K (Perlman et al., 2001).

STAT-3, qui intervient dans la transduction du signal de l'IL-6, aurait également un rôle dans la protection contre l'apoptose observée dans la PR (Liu et al., 2003).

## V / LE LEFLUNOMIDE

Le léflunomide (LEF) est un dérivé isoxazole synthétique (N-[4-trifluoro-méthyl-phényl]-5-méthylisoxazol-4-carboxamide). Il s'agit d'un agent immunomodulateur utilisé dans le traitement de fond de la PR, commercialisé sous le nom d'Arava®. Le léflunomide est une prodrogue qui est transformée rapidement, par un métabolisme de premier passage au niveau de la paroi intestinale et du foie, en son métabolite actif, nommé le A77 1726, responsable de la quasi totalité de ses effets pharmacologiques. Le LEF répond à la définition de DMARD pour « *Disease Modifying AntiRheumatic Drug* », avec une amélioration des signes et symptômes de la maladie maintenue à 5 ans, une amélioration de la fonction et enfin une diminution des dommages structuraux comparé au placebo (Osiri et al., 2003 ; Kalden et al., 2003).

Le LEF et son métabolite A77 1726 inhibent la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), une enzyme clé de la voie de biosynthèse *de novo* de pyrimidine dans les cellules à division rapide, comme les lymphocytes activés, aboutissant à l'arrêt réversible du cycle cellulaire (Fox et al., 1998 ; Rückemann et al., 1998). Bien que le mécanisme d'action exact du LEF dans la PR ne soit pas connu, il semblerait avoir plusieurs sites d'action.

Outre son action de blocage de la prolifération des lymphocytes T activés, le LEF, *in vitro*, diminue l'expression par les monocytes de molécules d'adhésion et leur migration trans-endothéliale (Grisar et al., 2004). Ainsi, il pourrait diminuer la migration cellulaire vers le site inflammatoire articulaire. Les études IRM *in vivo* vont dans le même sens puisqu'il existe chez les patients atteints de PR traités par LEF une diminution de la cellularité synoviale (Reece et al., 2002). Le léflunomide modifie le phénotype et les fonctions des cellules dendritiques de façon

indépendante de son activité anti-métabolite (Kirsch et al., 2005). En effet, le léflunomide altère la maturation des cellules dendritiques et leur capacité à stimuler la prolifération des cellules T. Ces effets sont associés à une diminution de l'expression à la surface des cellules dendritiques de certaines molécules de costimulation (CD40 et CD80) et une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF- $\alpha$ ). Ceci pourrait être particulièrement intéressant car les cellules dendritiques ont un rôle central dans la présentation de l'antigène aux cellules T à l'origine du processus pathologique de la PR. Cette modification de phénotype des cellules dendritiques pourrait entraîner une tolérance vis-à-vis des antigènes potentiels impliqués dans le déclenchement de la maladie (Van Parijs et al., 1997 ; Penna et al., 2000). L'A77 1726 diminue la production de PGE<sub>2</sub> dans plusieurs modèles *in vivo et in vitro*, notamment dans les cultures de cellules synoviales (Curnock et al., 1997 ; Burger et al., 2003). Il inhibe l'activité de COX-1 et COX-2 dans le modèle sur sang total humain et diminue la production de protéine COX-2 uniquement à forte dose (>300  $\mu$ g/ml) (Hamilton et al., 1999). Le LEF est un puissant inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B induite par différents stimuli inflammatoires. Notamment, il bloque les réponses cellulaires induites par le TNF- $\alpha$  dans les lymphocytes T (Manna et al., 1999 ; Manna et al., 2000). Ces effets inhibiteurs du LEF sur la transmission du signal intracellulaire du TNF sont complètement supprimés par l'uridine, soulignant le rôle clé de la biosynthèse de pyrimidine dans les réponses cellulaires médiées par le TNF. Les tyrosine kinases sont d'autres cibles du léflunomide comme celles de la famille Src et JAK3 dans les cellules B et T activées (Xu et al., 1995). Plusieurs études ont montré l'action inhibitrice du LEF sur la production de métalloprotéases MMP-1, MMP-3 et MMP-13 (Kraan et al., 2000 ; Burger et al., 2003 ; Elkayam et al., 2003 ; Migita et al., 2004) et de molécules d'adhésion comme ICAM-1 et VCAM-1 (Kraan et al., 2000 ; Cutolo et al., 2003). Le NO participe aussi à la destruction tissulaire dans la PR. L'A77 1726 diminue la production de NO et l'expression de l'ARNm de la NO synthase inductible dans les fibroblastes L929 traités par IFN- $\gamma$  (Jankovic et al., 2000). Chez 33 patients atteints de PR, les taux sériques de nitrite et de citrulline, marqueurs de la production de NO, diminuent de façon significative après 4 semaines de traitement par léflunomide (Reddy et al., 2005).

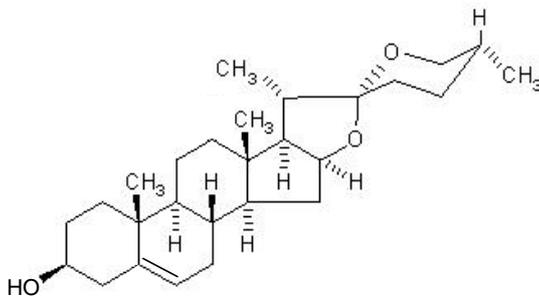
L'activité anti-inflammatoire du LEF passe probablement aussi par l'inhibition de médiateurs pro-inflammatoires et notamment des cytokines intervenant dans la PR. Ainsi, le LEF diminue la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  dans les cultures de tissu synovial humain (Elkayam et al., 2003). Cutolo et al. (2003) ont montré, dans les macrophages synoviaux de PR, une diminution de l'expression intracytoplasmique de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  et une baisse de la concentration extracellulaire de TNF- $\alpha$  après traitement par A77 1726. L'A77 1726 inhibe la production d'IL-6 dans les cultures de cellules synoviales de PR (Burger et al., 2003) et non dans les cultures de monocytes du sang périphérique (Kraan et al., 2004). Le taux sérique d'IL-6 n'est pas non plus

modifié chez les patients traités par LEF (Kraan et al., 2004). Après contact avec les lymphocytes T traités par LEF, le ratio molaire d'IL-1Ra/IL-1 $\beta$  et TIMP-1/MMP-1 produit par les monocytes est augmenté, suggérant que le LEF tend à augmenter les facteurs anti-inflammatoires au-delà de la production des facteurs pro-inflammatoires et facteurs de destruction ostéo-cartilagineuse (Déage et al., 1998). Palmer et al. (2004) ont montré récemment que l'A77 1726 augmente la production d'IL-1Ra induite par l'IL-1 $\beta$  dans les synoviocytes fibroblastiques et les chondrocytes humains.

Enfin, le LEF interviendrait également dans la destruction osseuse. Urushibara et al. (2004) ont étudié *in vitro* les effets du LEF sur la différenciation des ostéoclastes après stimulation par RANKL et M-CSF. Les résultats montrent que le LEF a un effet inhibiteur direct sur la différenciation des ostéoclastes induite par RANKL en bloquant l'induction du facteur nucléaire des cellules T activées c1 (NF-ATc1). NF-ATc1 est un facteur de transcription qui intervient de façon majeure dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes.

## VI / LA DIOSGENINE

La diosgénine est un stéroïde végétal appartenant au groupe des saponines (Figure 14).



Diosgénine

**Figure 14** : Structure de la diosgénine.

Les premières hormones stéroïdiennes utilisées en thérapeutique ont été extraites d'organes animaux mais les quantités obtenues étaient faibles. En 1939, la diosgénine, un précurseur, a été mise en évidence en quantité importante dans une dioscorée mexicaine. Ceci a permis le démarrage d'une production industrielle après mise au point d'un processus de dégradation de ce précurseur. La plus grande partie des hormones stéroïdiennes produites par l'industrie pharmaceutique sont

maintenant obtenues par hémisynthèse à partir de substances naturelles : saponosides, phytostérols, cholestérol ou acides biliaires.

Le genre *Dioscorea* comprend environ 600 espèces souvent tropicales et la plupart de ces espèces ont un tubercule amylofère à partir duquel la diosgénine est extraite. Dans les tubercules, la diosgénine existe sous la forme de dioscine et d'hétérosides voisins. L'extraction débute par un traitement en milieu acide minéral qui provoque l'hydrolyse des hétérosides. Après filtration, la fraction insoluble est neutralisée, lavée et traitée par un solvant apolaire qui extrait la diosgénine. Actuellement, de nombreux pays tels que la Chine ou l'Inde produisent différentes espèces de dioscorées.

Les stéroïdes végétaux sont de plus en plus étudiés dans le domaine biologique en raison de leur diversité structurale, de leurs activités biologiques et de leur faible toxicité.

La diosgénine a différentes actions biologiques :

1. Amigo et al. (1999) ont montré que la diosgénine augmentait la sécrétion du cholestérol biliaire. Cette observation a été confirmée par Yamaguchi et al. (2003) qui ont montré que la diosgénine avait une action cholérétique.
2. Les stéroïdes végétaux comme la diosgénine présentent également des propriétés antioxydantes. En effet, Turchan et al. (2003) ont montré que la diosgénine pouvait diminuer significativement les effets des radicaux libres lors de l'infection par le VIH.
3. La diosgénine est aussi à l'origine de la synthèse de certaines hormones comme la déhydroépiandrostérone (DHEA) (Scott et al., 2000).
4. La diosgénine interviendrait également dans le métabolisme osseux. Dans des modèles de rates adultes ovariectomisées, la supplémentation en diosgénine dans l'alimentation réduit significativement l'ostéoporose, dans les mêmes proportions que l'oestrogène (Higdon et al., 2001). Cette supplémentation en diosgénine chez des rates ovariectomisées entraîne également une réduction de la taille des glandes surrénales (Benghuzzi et al., 2003) et protège les reins contre les modifications morphologiques associées aux ovariectomies (Tucci et Benghuzzi, 2003).
5. Très récemment, dans les cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1, Yen et al. (2005) ont montré que la diosgénine était capable de se lier au récepteur oestrogénique, d'induire l'expression de VEGF par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1alpha). D'autre part, le milieu de culture des cellules traitées par diosgénine est caractérisé par une forte activité angiogénique dans les essais d'angiogenèse *in vitro* (prolifération des cellules HUVECs) et *ex vivo* (explants d'os fœtal). Ainsi, la

diosgénine pourrait intervenir dans les phénomènes d'angiogenèse. Cette action « pro-angiogénique » dans l'os pourrait expliquer en partie son action positive dans l'ostéoporose, car l'angiogenèse joue un rôle important dans le remodelage osseux en permettant notamment l'apport de progéniteurs ostéoblastiques (Erlebacher et al., 1995).

6. L'activité anti-tumorale de plusieurs stéroïdes végétaux a été plus récemment étudiée. Une analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée avec des dérivés glycosylés de la diosgénine sur des cellules leucémiques HL60 montrant que l'effet anti-prolifératif dépend de la structure de la molécule étudiée (Mimaki et al., 2001). Deux autres saponines dérivées de la diosgénine, la dioscine et la méthyl-protodioscine, provoquent un effet anti-prolifératif sur les cellules HL60 en induisant une différenciation et l'apoptose (Wang et al., 2001 ; Cheng et al., 2003), mais aussi sur les cellules HeLa en activant les caspases-9 et -3 (Cai et al., 2002).

Dans le laboratoire, l'intérêt porté à la diosgénine est ancien, puisque l'équipe du Professeur Beneytout avait montré en 1995 que le traitement de la lignée de cellules érythroleucémiques (HEL) par la diosgénine induisait la différenciation de ces cellules en mégacaryocytes, différenciation pendant laquelle l'expression de la 15-lipoxygénase était altérée (Beneytout et al., 1995 ; Nappes et al., 1995).

Toujours dans le laboratoire, l'effet de la diosgénine a été étudié sur la prolifération de différents types de cellules cancéreuses (cellules 1547, Hep-2, M4Beu, HEL). La diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) provoque une forte inhibition de la prolifération des cellules 1547 avec arrêt du cycle cellulaire en phase  $G_1$  et induction de l'apoptose (Moalic et al., 2001a). Ces effets de la diosgénine sont associés à une augmentation de l'expression des ARNm de p53 et p21, une activation de NF- $\kappa$ B et une augmentation de la synthèse de  $\text{PGE}_2$  (Moalic et al., 2001a). L'effet anti-prolifératif de la diosgénine toujours sur les cellules 1547 est plus important que celui de l'hécogénine et de la tigogénine, deux autres stéroïdes végétaux de structure proche de la diosgénine (Corbière et al., 2003). De la même façon, les trois molécules induisent une fragmentation de l'ADN, mais avec des niveaux différents après 24 h de traitement : 5,5 fois pour la diosgénine, 2,2 fois pour la tigogénine et 1,3 fois pour l'hécogénine par rapport aux cellules non traitées. La diosgénine augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine p53 et son activation, ce qui n'est pas le cas de deux autres stéroïdes (Corbière et al., 2003). Les trois stéroïdes augmentent le rapport de Bax (protéine pro-apoptotique) sur Bcl-2 (protéine anti-apoptotique) avec par contre un effet moins important de la diosgénine. Ils sont également responsables d'une activation de NF- $\kappa$ B et d'une augmentation de l'expression de  $\text{PPAR}\gamma$ , mais sans effet sur l'activation de ce récepteur nucléaire (Corbière et al., 2003). Les effets pro-apoptotiques de la diosgénine ont également été étudiés dans deux autres

lignées cellulaires cancéreuses humaines : les cellules HEp-2 de laryngocarcinome et les cellules M4Beu de mélanome. La diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) provoque aussi une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose. L'apoptose induite par la diosgénine est caractérisée par une chute du  $\Delta\Psi\text{m}$ , une activation de la caspase-3, un clivage de PARP, mais aussi une translocation nucléaire de l'AIF (Corbière et al., 2004). Le traitement par diosgénine provoque aussi une activation de p53 et un arrêt du cycle cellulaire en phase S pour les cellules HEp-2 et en phase G<sub>2</sub>/M pour les cellules M4Beu.

Dans les cellules HEL érythroleucémiques, la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) induit aussi un arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>2</sub>/M associé à une induction de l'apoptose, une augmentation de l'expression de p21 et non de p53. Le processus apoptotique est associé à une augmentation du rapport Bax/Bcl-2, un clivage de PARP et une fragmentation de l'ADN. Le  $\Delta\Psi\text{m}$  se trouve ici encore diminué. La diosgénine induit également une augmentation du taux de calcium intracellulaire, une activation de la cPLA2 avec translocation à la membrane cellulaire, ainsi qu'une surexpression de COX-2 couplée avec la production de PGE<sub>2</sub> (Léger et al., 2004). Plus récemment, une autre étude dans le laboratoire a permis de mettre en évidence les effets de la diosgénine (10  $\mu\text{M}$ ) sur la différenciation des cellules HEL en mégacaryocytes. Cette différenciation cellulaire passe par l'activation d'ERK et l'inhibition de p38. La diosgénine induit également une apoptose des cellules différenciées avec inhibition de NF- $\kappa$ B, Akt et Bcl-xL, une activation de la caspase-3 et un clivage de PARP (Léger et al., 2005).

## **Matériels et Méthodes**

# I / CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES SYNOVIALES

## A / PREPARATION ET CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES SYNOVIALES HUMAINES

Les synoviocytes sont isolés à partir de biopsies synoviales recueillies lors d'arthroplasties de la hanche chez des patients atteints de PR. Tous les patients remplissaient les critères diagnostics de l'*American Rheumatism Association* 1987 de la PR (Arnett et al., 1988). L'âge moyen des patients était de  $61,3 \pm 3,3$  ans (58-65 ans). La durée moyenne de la maladie était de  $8,8 \pm 2,6$  ans. Au moment de la chirurgie, le score d'activité de la PR, le DAS 28, était dans tous les cas supérieur à 3,2. La synoviale est disséquée et digérée avec 1,5 mg/ml de collagénase (Worthington) et de dispase (Sigma), 1 mg/ml de hyaluronidase (Sigma) et 0,15 mg/ml de DNase I (Boehringer Ingelheim) dans du « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM, Gibco-BRL) pendant 3 à 4 h à 37°C (Liagre et al., 1997). Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans du DMEM complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Biowhitaker), 4,5 g/l de D-glucose, 25 mM d'Hepes, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco-BRL) et placées dans un flacon de culture cellulaire à 37°C en atmosphère humide de CO<sub>2</sub> 5% /air atmosphérique 95%. Après 48 h, les cellules n'ayant pas adhéré sont éliminées. Les cellules adhérentes sont cultivées en présence du milieu complet. A confluence, ces cellules sont trypsinées : le tapis cellulaire est lavé par du tampon phosphate salin stérile ou PBS pH 7,4 (140 mM NaCl, 27 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et incubé 10 à 15 min en présence d'une solution de trypsine-EDTA (Gibco-BRL). Les cellules dissociées sont centrifugées en présence de DMEM complet et réensemencées dans d'autres flacons de culture. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours. Les cellules sont utilisées entre les passages 4 et 8 lorsqu'elles ressemblent morphologiquement à des fibroblastes. Les cellules sont cultivées pendant 45-60 jours avant l'expérimentation. Ce délai élimine toute interaction possible avec un traitement pré-opératoire.

## **B / CULTURE DES SYNOVIOCYTES HUMAINS DE TYPE B**

Entre les passages 4 et 8, la numération et la viabilité cellulaires sont déterminées et les cellules sontensemencées dans un flacon de culture (Falcon) à  $10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. La viabilité, mesurée par le test d'exclusion au bleu trypan (Glant et al., 1993) au début et à la fin de chaque culture, est toujours supérieur à 95% de cellules.

Pour toutes les expériences, les cellules sont laissées dans du milieu de culture DMEM pendant 48 h avant d'être traitées par la diosgénine ou le léflunomide. Une solution mère de diosgénine à  $10^{-2}$  M est préparée dans l'éthanol, puis diluée dans du milieu de culture pour obtenir une concentration finale allant de 10 à 80  $\mu$ M. De la même façon, une solution mère de A77 1726 à  $10^{-2}$  M est préparée dans l'éthanol et diluée dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale variant de 0,01 à 100  $\mu$ M. La même quantité d'éthanol (<1%) est rajoutée aux cellules contrôles. Le milieu de culture n'est pas changé durant toute la durée des différentes expériences.

## **II / ETUDE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES**

### **A / TEST AU MTT APRES TRAITEMENT PAR LA DIOSGENINE**

Le test au MTT (Mosmann, 1983) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Ce test est utilisé pour comparer la croissance des cellules contrôles à celles des cellules traitées par les molécules.

Les cellules synoviales fibroblastiques ( $10^3$  cellules par puits) sontensemencées dans des plaques 96 puits et cultivées pendant 48 h dans du DMEM contenant 10% de SVF avant d'être traitées par la diosgénine à des concentrations variant de 10 à 80  $\mu$ M. Pour chaque condition analysée, 12 puits différents sont réalisés (n = 12). Le traitement est réalisé pendant la phase de croissance et dure de 24 à 96 h. Le test MTT est réalisé de façon quotidienne comme décrit précédemment (Moalic et al., 2000).

Pour chaque temps étudié, 10  $\mu$ l de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/ml, en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 100  $\mu$ l d'une solution de lyse (SDS : 10 % ; HCl : 0,01 N) sont ajoutés par puits et les plaques sont incubées à

37°C pendant minimum 3 h afin de libérer les cristaux de formazan formés. L'absorbance est mesurée à 550 nm par un lecteur de plaques ELISA (Multiskan EX, Labsystems). Les blancs de lecture correspondent à du milieu à 10 % de SVF contenant du MTT et la solution de lyse.

Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle :

$$(\text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ des cellules traitées} / \text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$$

## **B / MICROSCOPIE OPTIQUE A CONTRASTE DE PHASE**

La morphologie des cellules traitées ou non par la diosgénine a été observée en microscopie optique à contraste de phase. Pour cela, les cellules sontensemencées en plaque 6 puits ( $2 \times 10^5$  cellules /puits), cultivées pendant 48 h puis traitées par de la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 à 72 h. Les cellules synoviales sont fixées dans du PBS (pH 7,4) contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 20 min à température ambiante et lavées avec du PBS pendant 15 min, avant d'être observées au microscope à contraste de phase (grossissement  $\times 400$ ).

La même expérience a été réalisée après traitement des cellules synoviales fibroblastiques par l'A77 1726 à 100  $\mu\text{M}$  pendant 24 h.

## **III / ANALYSE DE L' APOPTOSE**

### **A / ETUDE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ET MARQUAGE AU DAPI**

Le potentiel membranaire mitochondriale ou  $\Delta\Psi\text{m}$  est estimé en utilisant la sonde JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazole carbocyanide iodide) (Molecular Probes). La sonde JC-1 est un composé fluorescent qui existe sous forme de monomères lorsqu'il est à faibles concentrations et sous forme d'agrégats à fortes concentrations. La fluorescence des monomères est verte alors que la fluorescence des agrégats est rouge. La mitochondrie ayant un potentiel membranaire intact concentre JC-1 sous forme d'agrégats qui produisent une fluorescence rouge. Au contraire une mitochondrie ayant un potentiel altéré ne peut concentrer JC-1, les monomères produisent alors une fluorescence verte (Smiley et al., 1991).

Les cellules synoviales sontensemencées et cultivées pendant 48 h avant d'être traitées pendant 24 h par 40  $\mu\text{M}$  de diosgénine. Les cellules contrôles sont cultivées dans du milieu de culture contenant la même concentration d'éthanol que les cellules traitées par diosgénine. Les cellules adhérentes sont incubées dans 1 ml de milieu contenant la sonde JC-1 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 30

min à 37°C. Les photos ont été prises grâce à un microscope Nikon ECLIPSE E800 (grossissement  $\times 500$ ) (Nikon Corporation).

Le marquage des cellules au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) permet d'évaluer la condensation du noyau des cellules et donc d'évaluer l'apoptose. Après 24 h de traitement avec la diosgénine, les cellules synoviales fibroblastiques ont été incubées dans une solution de DAPI à 0,5  $\mu\text{g/ml}$  pendant 5 min à température ambiante dans l'obscurité et les cellules ont été observées par microscopie à fluorescence.

## **B / DOSAGE DE L'ACTIVITE CASPASE-3**

Le dosage de l'activité caspase-3 a été réalisé à partir du kit « CaspACE™ Assay System, Fluorometric » (Promega) après quelques modifications (Duval et *al.*, 2002). Le dosage est basé sur l'activité protéolytique des caspases. En effet, chaque caspase clive son substrat après un motif bien précis : DEVD pour la caspase-3. Les substrats utilisés pour réaliser ce dosage sont rendus lipophiles et sont couplés à un peptide, le 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC), qui est libéré lorsque le substrat est clivé par la caspase. Une fois libéré, l'AMC émet de la fluorescence permettant de quantifier l'activité de chaque caspase.

Après traitement par diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 et 48 h, les cellules synoviales ont été homogénéisées dans du tampon de lyse (0,1 % de citrate de sodium contenant 10 % de triton 100X). La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. Les essais ont été réalisés en plaques de culture tissulaire opaques (Falcon, Becton Dickinson) et les différentes conditions ont été répétées 3 fois. Les quantités de 100  $\mu\text{l}$  de tampon (10 mM de DTT, 2 % de DMSO, tampon caspase) et 75  $\mu\text{g}$  de protéines ont été déposées dans les puits. L'inhibiteur non spécifique de caspase, Ac-DEVD-CHO, a été utilisé à une concentration de 2,5 mM pour vérifier que le clivage du substrat soit réellement lié aux caspases et non à une autre protéine ayant un pouvoir protéolytique. La plaque a été incubée 30 min à 37°C avant de rajouter le substrat de caspase-3 (Ac-DEVD-AMC) à la concentration de 2,5 mM. La fluorescence du bruit de fond a été déterminée dans les puits contenant seulement le tampon caspase et le substrat. La plaque a été de nouveau incubée à 37°C pendant 1 h. La fluorescence est alors mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Fluorolite 1000, Dynatech Laboratories) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. Les résultats sont exprimés en unité relative de fluorescence (RUF) qui correspond à la concentration d'AMC libérée et représentent la moyenne des trois expériences.

## C / ANALYSE QUANTITATIVE DE L' APOPTOSE

Les cellules synoviales ont étéensemencées en plaque 6 puits ( $2 \times 10^5$  cellules /puits) et ont proliféré pendant 48 h avant d'être traitées ou non par 40  $\mu\text{M}$  de diosgénine pendant 24 et 48 h. Pour les expériences avec la diosgénine, les autres conditions sont représentées par les cellules prétraitées pendant 4 h avec de l'IL-1  $\beta$  (1 ng/mL) ou du celecoxib (1  $\mu\text{M}$ ) et ensuite la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) est rajoutée pendant 24 et 48 h dans du DMEM contenant 10% de SVF. Dans nos conditions expérimentales, nous avons vérifié préalablement que le celecoxib (1  $\mu\text{M}$ ) ne soit pas pro-apoptotique. De plus, pour examiner le rôle de la PGE<sub>2</sub> exogène, les cellules ont été préincubées pendant 4 h avec du celecoxib en présence ou en l'absence de PGE<sub>2</sub> (10 nM), suivi de l'incubation avec la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 h.

Pour le léflunomide : Les cellules synoviales ont également étéensemencées en plaque 6 puits ( $2 \times 10^5$  cellules /puits) et ont proliféré pendant 48 h avant d'être traitées ou non par l'A77 1726 à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  pendant 24 h.

Après les différents traitements, les cellules flottantes sont récupérées et mélangées aux cellules adhérentes fraîchement décollées. Les cellules sont récupérées par centrifugation (1500 rpm, 10 min à 4°C), puis lavées une fois dans le PBS 1X avant d'être comptées. Les cellules ( $5 \times 10^4$ ) sont alors prélevées, centrifugées, et lysées par 200  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse avant d'être incubées 30 min à température ambiante. Les lysats peuvent être conservés une nuit à -20°C avant le dosage. L'apoptose est quantifiée par le kit « Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> » (Roche Diagnostics) (Moalic et al., 2001b). Après centrifugation (10 min à 200 g) des lysats, 20  $\mu\text{l}$  de chaque surnageant sont déposés dans les puits de la plaque recouverts de streptavidine, ainsi que 20  $\mu\text{l}$  de contrôle positif (complexe histone-ADN) et 20  $\mu\text{l}$  de contrôle négatif (tampon d'incubation). L'étape suivante consiste à rajouter dans les puits 80  $\mu\text{l}$  d'immunoréactif : mélange d'anticorps (Ac) anti-histones biotinylés et d'Ac anti-ADN conjugués à la peroxydase. Au cours de l'incubation (2 h sous agitation), les mono- et les oligo-nucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN sont complexés avec les Ac anti-histones, eux-mêmes capturés au fond des puits par la streptavidine. De plus, les Ac anti-ADN réagissent avec l'ADN nucléosomique. Après plusieurs lavages avec le tampon d'incubation pour éliminer l'excès d'Ac, une solution d'ABTS (2,2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate], 100  $\mu\text{l}$ /puits), substrat de la peroxydase, est ajoutée dans les puits. Au cours de l'incubation (15 min sous agitation à température ambiante et à l'obscurité), une réaction colorimétrique se développe entre l'ABTS et la peroxydase portée par les Ac anti-ADN. La quantité d'ABTS oxydé correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. Le blanc de lecture étant la solution d'ABTS (longueur d'onde de référence 490 nm).

Chaque condition est testée trois fois et les valeurs à 405 nm et 490 nm obtenues pour le contrôle négatif sont soustraites aux valeurs obtenues pour chaque échantillon. Les valeurs moyennes d'absorbance (405 - 490) sont ensuite déterminées pour chaque échantillon et rapportées aux valeurs obtenues pour les contrôles cellulaires (cellules non traitées). Les résultats sont exprimés en ratio apoptotique des cellules traitées/cellules non traitées.

## **IV / ANALYSE DE L'EXPRESSION DE COX-2**

### **A / EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES**

Pour les expériences concernant la diosgénine, les cellules synoviales fibroblastiques ont étéensemencées dans des flacons de culture de 150 cm<sup>2</sup>. Après 48 h de culture, les cellules ont été traitées ou non par la diosgénine à la concentration de 40 µM pendant 24 et 48 h, ou par IL-1β (1 ng/ml) pendant 24 h.

Pour les expériences avec le léflunomide, les cellules synoviales fibroblastiques ont étéensemencées dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> pendant 48 h avant traitement. Les cellules ont ensuite été incubées avec de l'A77 1726 (10 et 100 µM) pendant 24 h et stimulées par l'IL-1β (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation.

Dans les 2 types d'expériences, les cellules ont été récupérées, puis centrifugées et lavées en tampon PBS 1X froid. Les culots cellulaires peuvent être congelés à -80°C si nécessaire. Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (HEPES : 50 mM pH 7.5 ; Déoxycholate : 1 % ; Nonidet P-40 : 1 % ; SDS : 0,1 % ; NaCl : 150 mM ; Aprotinine : 20 µg/ml) contenant 40 µl/ml d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche Diagnostics). Les lysats sont récupérés par centrifugation (12000 rpm, 20 min à 4°C) et placés dans la glace ou à -20°C avant de déterminer la concentration protéique par la technique colorimétrique de Bradford (1976) utilisant le bleu de Coomassie (Bio-Rad). La lecture au spectrophotomètre à 595 nm est effectuée contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 12,5 µg/ml).

### **B / ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE COX-2**

Les cellules synoviales fibroblastiques ont étéensemencées puis cultivées dans des flacons de culture de 150 cm<sup>2</sup> pendant 48 h. Elles ont été traitées par 40 µM de diosgénine pendant 24 et 48 h ou de l'IL-1β (1 ng/mL) pendant 24 h. Elles ont ensuite été trypsinées et poolées avec la fraction cellulaire flottante.

Pour le léflunomide : les cellules synoviales ont été cultivées dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> pendant 48 h, puis ont été traitées par l'A77 1726 à 10 et 100 µM pendant 24 h avec une stimulation par l'IL-1β (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures de traitement. Les cellules ont été trypsinées et l'expression de la protéine COX-2 a été étudiée par western blot comme décrit précédemment (Moalic et al., 2001b).

Le Western blot a été réalisé en utilisant des anticorps primaires monoclonaux anti-β-actine (anticorps de souris anti-β-actine humaine 1/5000, Sigma), anti-COX-2 (anticorps de souris anti-COX-2 humaine 1/100, Santa Cruz Biotechnology) et un anticorps secondaire polyclonal conjugué à une peroxydase (Dako).

Les protéines (40 µg) ont été mélangées à un volume identique de tampon d'échantillon 2X (Tris-HCl : 50 mM pH 6,8 ; SDS : 2 % ; Glycerol : 10 % ; dithiothréitol (DTT) : 100 mM ; Bleu de Bromophénol : 0,1 %), puis dénaturés 5 min à 100°C dans un bain-marie. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (10 à 15% selon les protéines). La migration s'effectue pendant 2 h (100 V) dans le tampon de migration (Tris-HCl : 25 mM pH 8,5 ; Glycine : 250 mM ; SDS : 0,1%).

Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) (Amersham Biosciences). La membrane a été préalablement trempée quelques secondes dans du méthanol avant d'être rincée à l'eau puis équilibrée quelques minutes dans du tampon transfert (Tris : 48 mM ; Glycine : 39 mM ; Méthanol : 20 % ; SDS : 0,03 % ; pH 8,1-8,5). Le gel de polyacrylamide a également été équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du constructeur (Invitrogen). Le transfert s'effectue pendant 1h30 (20V, 100 mA). Pour vérifier l'efficacité du transfert, la membrane est colorée au rouge Ponceau (Sigma) afin de faire apparaître les différentes bandes de protéines.

Après lavages en tampon PBS 1X-Tween 0,1 %, la membrane a été incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec du tampon de blocage (PBS 1X-caséine 4 %) afin de saturer les sites aspécifiques. Après avoir éliminé le tampon de blocage, les membranes ont été lavées brièvement avant d'être incubées une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage.

Après incubation, les membranes ont été lavées plusieurs fois dans du tampon PBS 1X-Tween 0,1% avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire polyclonal anti-IgG de souris conjugué à une peroxydase. La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation 1 h à température ambiante en présence de l'Ac secondaire dilué au 1/1000 dans le tampon de blocage. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'Ac secondaire.

La révélation est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système ECL™ (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) et les membranes sont exposées à un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) selon la technique donnée par le fabricant.

Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration du marqueur de poids moléculaires connus (Prestained Protein Molecular Weight standards, Low range, Invitrogen). L'intensité relative des bandes est déterminée grâce au logiciel Kodak 1D (BioLabo).

## V / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE PGE<sub>2</sub>

Les cellules synoviales fibroblastiques ont été cultivées dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> pendant 48 h avant traitement. Elles ont été lavées avec du PBS (pH 7,4) et pré-traitées pendant 4 h à 37°C avec de l'IL-1β (1 ng/mL) ou du celecoxib (1 μM). La diosgénine a été rajoutée dans le milieu de culture (DMEM contenant 10 % de SVF), à la concentration de 40 μM pendant 24 et 48 h. Les autres conditions de culture étaient : la diosgénine seule (40 μM), l'IL-1β (1 ng/ml) seule et le celecoxib seul (1 μM) pendant 24 et 48 h.

Pour le léflunomide, les cellules ont également été cultivées dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> pendant 48 h avant traitement. Après lavage avec du PBS (pH 7,4), les cellules ont été incubées avec ou sans A77 1726 (0,01 à 100 μM) pendant 24 h, en rajoutant de l'IL-1β (1 ng/mL) pendant les 6 dernières heures d'incubation dans du DMEM contenant 10 % de SVF en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les autres conditions étaient : traitement des cellules synoviales par l'A77 1726 à la concentration de 100 μM pendant 24 h en rajoutant de l'IL-1β (1 ng/mL) pendant différents temps (5 min, 15 min, 30 min, 1 h ou 6 h).

Pour chaque condition, la concentration de PGE<sub>2</sub> a été déterminée dans le milieu de culture des cellules grâce à un kit ELISA (Cayman Chemical) en accord avec les instructions du fabricant et comme précédemment décrit (Vergne et al., 1998). Ce dosage est basé sur la compétition entre la PGE<sub>2</sub> plus ou moins présente dans nos échantillons et entre un traceur (conjugué PGE<sub>2</sub>-acétylcholinestérase) dont la concentration est constante pour une quantité limitée d'Ac monoclonal de souris anti-PGE<sub>2</sub>. La quantité de traceur capable de se fixer à l'Ac anti-PGE<sub>2</sub> est inversement proportionnel à la concentration de PGE<sub>2</sub> dans le puits. Le complexe Ac-PGE<sub>2</sub> (libre ou conjugué) se lie aux Ac polyclonaux de chèvre anti-souris fixés dans le puits. La plaque est lavée pour éliminer tout ce qui n'a pas été fixé. Afin de déterminer la quantité de traceur fixé, le réactif

d'Ellman contenant le substrat de l'acétylcholinestérase est ajouté à chaque puits. Le produit de la réaction enzymatique est coloré (jaune) et est donc détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 412 nm. L'absorbance ainsi obtenue est proportionnelle à la quantité de traceur fixé et inversement proportionnelle à la quantité de PGE<sub>2</sub> présente dans nos échantillons. La concentration minimale détectable est de 3 pg/ml après 90 min d'incubation et la spécificité de ce test est de 100% pour la PGE<sub>2</sub>. Il existe des réactions croisées avec PGI<sub>2</sub> (1%), PGF<sub>2α</sub> (< 0,01%) et TXB<sub>2</sub> (< 0,01%).

Le dosage des échantillons se fait après reconstitution des réactifs (tampon EIA, tampon de lavage, traceur, anticorps anti-PGE<sub>2</sub>) comme indiqué par le constructeur. Une gamme standard de PGE<sub>2</sub> allant de 0 à 1 ng/ml est réalisée pour permettre la quantification et plusieurs contrôles doivent être faits. Chaque plaque doit contenir 2 blancs (absorbance du réactif d'Ellman), 2 puits TA représentant l'activité enzymatique totale du traceur (traceur, réactif d'Ellman), 2 puits NSB ou puits de contrôle de liaison non spécifique du traceur (tampon EIA, traceur, réactif d'Ellman), 2 puits B0 de liaison maximale du traceur (tampon EIA, traceur, Ac anti-PGE<sub>2</sub>, réactif d'Ellman).

50 µl de chacun des standards et 50 µl de chacun des échantillons dilués au 1/10<sup>e</sup> sont déposés dans les puits en présence de 50 µl de traceur et de 50 µl d'Ac anti-PGE<sub>2</sub>. Les puits NSB contiennent 100 µl de tampon EIA et 50 µl de traceur et les puits B0 contiennent 100 µl de tampon EIA, 50 µl de traceur et 50 µl d'Ac. La plaque est incubée 18 h à 4°C avant d'être vidée et lavée 5 fois avec le tampon de lavage. Ensuite, 5 µl de traceur sont ajoutés dans les puits TA et 200 µl de réactif d'Ellman sont ajoutés dans tous les puits. La plaque est alors incubée à l'obscurité 60 à 90 min sous agitation avant d'être analysée à 412 nm en lecteur de plaque ELISA.

Les résultats sont exprimés en quantité de PGE<sub>2</sub> par ml (pg/ml). La concentration de PGE<sub>2</sub> est obtenue en tenant compte des valeurs d'absorbance des blancs et en utilisant la courbe de référence d'équation standard/B0=f([PGE<sub>2</sub>]).

## **VI / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES**

Les cellules synoviales fibroblastiques ont étéensemencées dans des plaques 24 puits (10<sup>5</sup>cellules par puits) pendant 48 h. Après lavage au PBS (pH 7,4), les cellules ont été incubées à 37°C avec ou sans A77 1726 (0,01 to 100 µM) pendant 24 h dans du DMEM contenant 10% de SVF et stimulées par l'IL-1β (1 ng/mL) pendant les 6 dernières heures d'incubation. Les surnageants ont été récupérés et congelés à -80°C.

La concentration des cytokines (IL6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-15, IL-18, sTNFRI, IL-1Ra) dans le milieu de culture a été mesurée grâce à un kit ELISA correspondant (Quantikine<sup>®</sup> human cytokine immunoassay kit, R&D Systems) en respectant les instructions du constructeur.

Les autres conditions testées étaient les suivantes :

- cellules prétraitées pendant 30 min avec de l'uridine (200  $\mu$ M) avant de rajouter l'A77 1726 à la concentration de 100  $\mu$ M pendant 24 h et de l'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation,
- cellules prétraitées pendant 2 h avec du SB 203580 (un inhibiteur sélectif de la MAP kinase p38) à la concentration de 10  $\mu$ M avant de rajouter 100  $\mu$ M d'A77 1726 pendant 24 h et de l'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) ou du TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation.

Ces deux dernières conditions ont été testées uniquement sur la synthèse de l'IL-10 et de l'IL-11.

Pour la diosgénine, seules l'IL-6 et l'IL-8 ont été testées. Pour ce faire, les cellules synoviales fibroblastiques ont étéensemencées dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> pendant 48 h avant traitement. Après lavage au PBS (pH 7,4), les cellules ont été prétraitées pendant 4 h à 37°C avec de l'IL-1  $\beta$  (1 ng/ml), puis traitées par la diosgénine (40  $\mu$ M) pendant 24 et 48 h dans du DMEM contenant 10% de SVF en atmosphère avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les autres conditions étaient les suivantes : cellules incubées avec de la diosgénine seule (40  $\mu$ M) ou IL-1 $\beta$  seule (1 ng/ml) pendant 24 et 48 h. De la même manière qu'avec l'A77 1726, la concentration de l'IL-6 et de l'IL-8 a été déterminée grâce à un kit ELISA (Quantikine<sup>®</sup> human cytokine immunoassay kit, R&D Systems).

La concentration des cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-15, IL-18) et antagonistes (sTNFRI, IL-1Ra) a été déterminée dans le milieu de culture des cellules grâce à une technique immuno-enzymatique sandwich quantitative (Quantikine<sup>®</sup> human cytokine immunoassay kit, R&D Systems) en accord avec les instructions du constructeur. Un anticorps monoclonal spécifique de chaque cytokine ou antagoniste a été fixé préalablement dans les puits de la plaque. Les cytokines spécifiques présentes dans chaque échantillon de milieu de culture se fixent aux anticorps correspondants immobilisés sur la plaque. Après lavage pour éliminer tout ce qui n'a pas été fixé, un anticorps polyclonal spécifique de chaque cytokine ou antagoniste et conjugué à une enzyme est rajouté dans chaque puits. Après lavage pour enlever toute substance non liée à l'anticorps, la quantité de traceur fixé est déterminée en rajoutant dans chaque puits la solution contenant le substrat de l'enzyme. Le produit de la réaction enzymatique est coloré et est donc détectable par

spectrophotométrie. L'absorbance ainsi obtenue est proportionnelle à la quantité de traceur fixé et proportionnelle à la quantité de cytokines présentes dans les échantillons.

Les résultats sont exprimés en quantité de cytokines ou antagonistes par ml (pg/ml). La concentration est obtenue en soustrayant les valeurs d'absorbance à la longueur d'onde de 450 nm à celles de 540 nm et en utilisant la courbe de référence des standards (log de densité optique sur l'axe des Y et log de la concentration des standards sur l'axe des X).

## **VII / PREPARATION DES EXTRAITS NUCLEAIRES ET ETUDE DE L'ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B**

La translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B a été évaluée par une technique de retard sur gel « Electromobility Shift Assay ou EMSA ».

Les cellules synoviales fibroblastiques ont étéensemencées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> pendant 48 h avant traitement. Après lavage au PBS (pH 7,4), les cellules ont été incubées à 37°C avec ou sans A77 1726 (100  $\mu$ M) pendant 24 h et stimulées par l'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation. Le retard sur gel a été réalisé grâce à un kit « DIG GEL SHIFT » (Roche diagnostics). L'expérience se déroule ainsi : les cellules sont récupérées, lavées dans du PBS froid et remises en suspension dans du tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM KCl ; 0,5 mM dithiothreitol ; 0,2 mM PMSF, inhibiteurs de protéase *Complete™ Mini* ; 0,5% Nonidet P-40). Puis le lysat est centrifugé (2000 g, 10 min à 4°C) et remis en suspension dans un tampon d'extraction nucléaire (20 mM HEPES pH 7,9 ; 420 mM NaCl ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM KCl ; 15% glycerol ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM dithiothreitol ; 0,2 mM PMSF, inhibiteurs de protéase *Complete™ Mini*). Le lysat est ensuite centrifugé (13000 g, 10 min à 4°C) et le surnageant est collecté. La concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford. Puis, 10  $\mu$ g de protéines nucléaires sont incubées avec une sonde spécifique de NF- $\kappa$ B (Boyault et al., 2001) marquée par de la digoxigénine en accord avec les instructions du constructeur. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 5% et la migration a lieu dans du tampon TBE 0,5X. Les protéines nucléaires et les complexes protéines-oligonucléotides sont ensuite transférés sur une membrane en nylon et incubés en présence d'anticorps polyclonaux de chèvre anti-digoxigénine couplés à une phosphatase alcaline. La révélation se fait par incubation de la membrane dans un réactif de chimiluminescence CSPD<sup>®</sup> puis par exposition sur un film autoradiographique. Les bandes spécifiques de NF- $\kappa$ B sont confirmées par compétition avec une sonde non marquée incubée 100 fois en excès et qui donne une bande de faible intensité.

## **VIII / ANALYSE QUANTITATIVE DES MAP KINASES : PHOSPHO-ERK1/ERK2, PHOSPHO-JNK ET PHOSPHO-p38 $\alpha$ HUMAINES**

Les cellules synoviales fibroblastiques ont été cultivées dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> pendant 48 h avant traitement. Après lavage au PBS (pH 7,4), les cellules ont été incubées à 37°C avec ou sans A77 1726 à la concentration de 100  $\mu$ M pendant 24 h, puis stimulées par l'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) pendant différents temps supplémentaires (5 min, 15 min, 30 min, 1 h et 6 h). Les cellules (10<sup>6</sup>) ont ensuite été homogénéisées dans du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases conformément au protocole du constructeur (R&D Systems).

Avant l'expérience, une plaque 96 puits a été recouverte avec 100  $\mu$ l par puits d'anticorps spécifiques d'ERK, de p38 et de JNK (4  $\mu$ g/ml) pendant la nuit à température ambiante. Cet Ac lie la protéine non phosphorylée et phosphorylée. Après trois lavages (400  $\mu$ l/puits de tampon de lavage) et incubation du tampon de blocage (300  $\mu$ l/puits) pendant 1-2 h à température ambiante, 100  $\mu$ l d'échantillons dilués six fois sont ajoutés dans chaque puits et incubés 2 h à température ambiante. Après lavages, un Ac biotinylé spécifique de chaque MAPkinase est rajouté dans les puits pour détecter seulement la forme phosphorylée de chaque MAPkinase. Après 2 h d'incubation, la streptavidine couplée à une peroxydase (HRP) est ajoutée dans chaque puits pendant 20 min. Après lavages, 100  $\mu$ l de substrat sont ajoutés pendant 20 min. La réaction est arrêtée par une solution d'acide sulfurique 2N et la plaque est lue à 450 nm.

La plaque a été lavée trois fois avec 400  $\mu$ l de tampon de lavage, puis du tampon de blocage (300  $\mu$ l) a été rajouté dans chaque puits pendant 1-2 h à température ambiante.

Les lysats cellulaires ont été centrifugés à 2000g pendant 5 min, puis les surnageants ont été dilués six fois. La détection de phospho-ERK1/ERK2, phospho-JNK ou phospho-p38 $\alpha$  a été réalisée selon les instructions du constructeur (R&D Systems).

## **IX / ANALYSES STATISTIQUES**

La médiane et les déviations standard (DS) ont été calculées avec le programme Excel (Microsoft Office, Version 2000).

Les analyses statistiques de différences entre les résultats concernant les cellules traitées et les cellules témoins ont été réalisées par des analyses de variance (ANOVA) en utilisant StatView

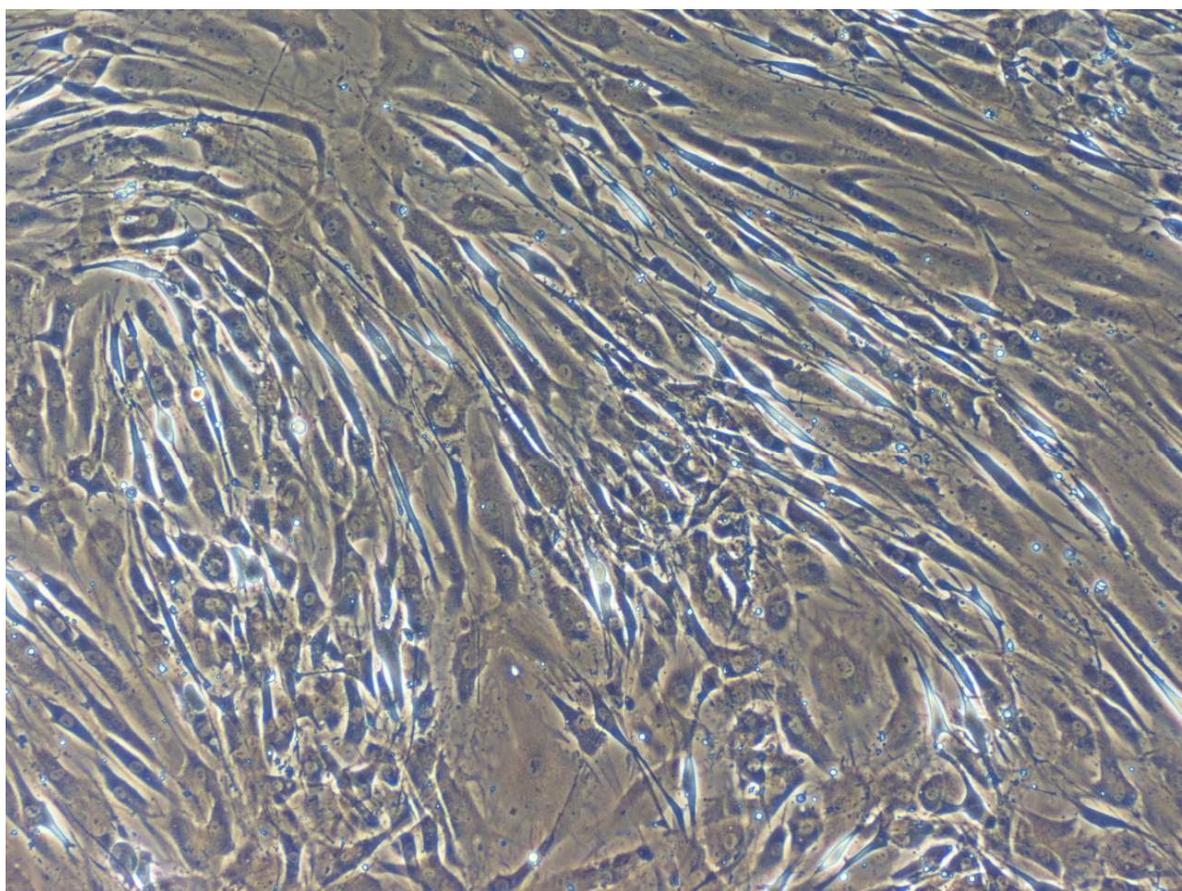
Version 5.0 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina). Une valeur de variance inférieure à 0,05 ( $p < 0,05$  ; Fisher's PLSD test) a été considérée comme significative.

# Résultats

## I / RESULTATS DES EXPERIENCES REALISEES AVEC LA DIOSGENINE

### A / CULTURE DE CELLULES SYNOVIALES

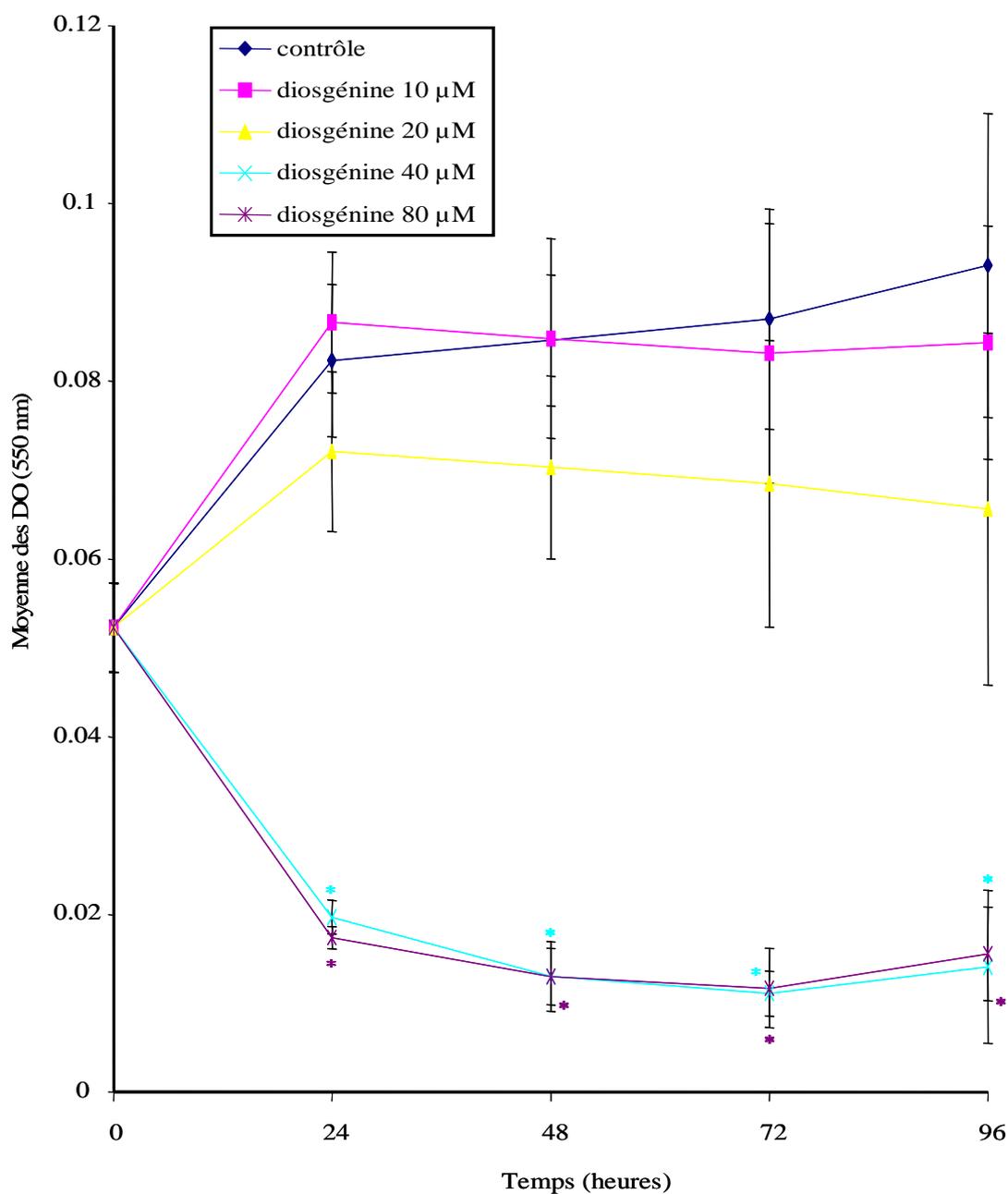
Les synoviocytes sont isolés à partir de fragments de tissu synovial recueillis lors d'interventions chirurgicales sur les articulations de patients atteints de PR. Les cellules sont mises en culture dans du DMEM contenant 10% de SVF. Après 3 passages, les cellules synoviales ont un aspect morphologique de fibroblastes en microscopie optique (figure A1).



**Figure A1 :** Observation en microscopie optique (X 200) d'une culture de synoviocytes humains de type B de PR au 3<sup>ème</sup> passage.

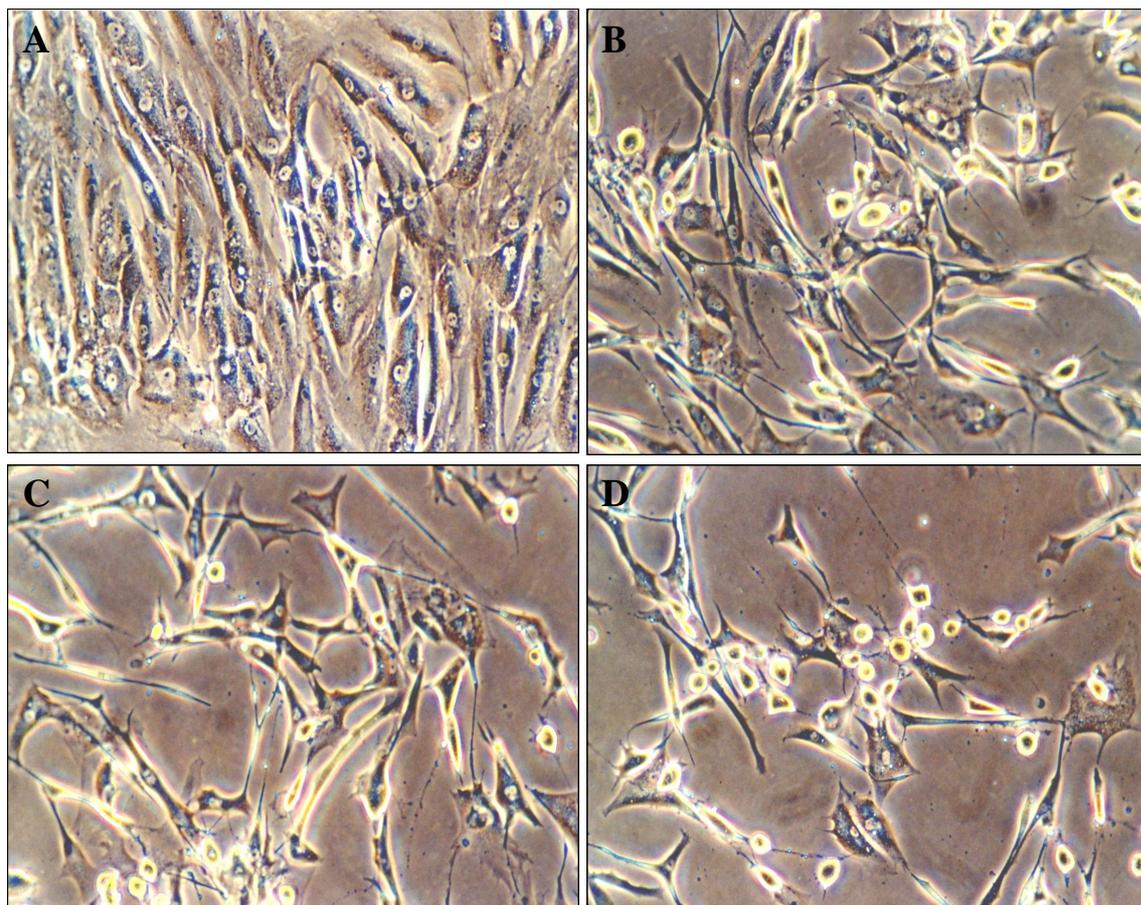
## **B / LES EFFETS DE LA DIOSGENINE SUR LA PROLIFERATION ET LA MORPHOLOGIE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES HUMAINES DE PR**

Les cellules synoviales fibroblastiques sont cultivées dans du milieu contenant 10% de SVF avant d'être traitées par la diosgénine à la concentration de 10 à 80  $\mu\text{M}$  pendant 24 à 96 h afin de déterminer l'effet de cette molécule sur la prolifération cellulaire par rapport à un témoin non traité. La prolifération cellulaire est estimée par le test au MTT. Les résultats montrent que les concentrations de 40 et 80  $\mu\text{M}$  de diosgénine provoquent une diminution importante de la prolifération cellulaire, plus particulièrement après 24 h de traitement avec 40  $\mu\text{M}$  de diosgénine où le pourcentage d'inhibition est de 76% ( $p < 0,05$ ) (figure RI-1). Comme le pourcentage d'inhibition de la prolifération n'augmentait que très peu à la concentration de 80  $\mu\text{M}$  (79%,  $p < 0,05$ ) (figure RI-1), nous avons choisi la concentration de 40  $\mu\text{M}$  pour la suite de l'étude.



**Figure RI-1** : Effet de la diosgénine sur la prolifération des cellules synoviales fibroblastiques de polyarthrite rhumatoïde. Les cellules ont été cultivées dans du milieu contenant 10% de SVF pendant 48 h, puis incubées (temps 0) pendant 24 à 96 h avec de la diosgénine (10-80  $\mu$ M). La prolifération des cellules synoviales a été évaluée par le test au MTT. Les expériences ont été réalisées sur les cellules synoviales de 6 patients atteints de PR. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  DS obtenues à partir des cultures réalisées pour chaque condition (n=12). \* Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative par rapport au contrôle. DO = densité optique.

L'observation directe en microscopie optique permet également de voir que les cellules synoviales fibroblastiques traitées par 40  $\mu\text{M}$  de diosgénine présentent plusieurs différences morphologiques par rapport aux cellules contrôles (figure RI-2A). La figure RI-2 montre une réduction de la taille des cellules, une condensation du cytoplasme et l'apparition de filaments cytoplasmiques après traitement par la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) pendant 24, 48 et 72 h (figures RI-2B, C et D respectivement) par rapport aux cellules contrôles (figure RI-2A).

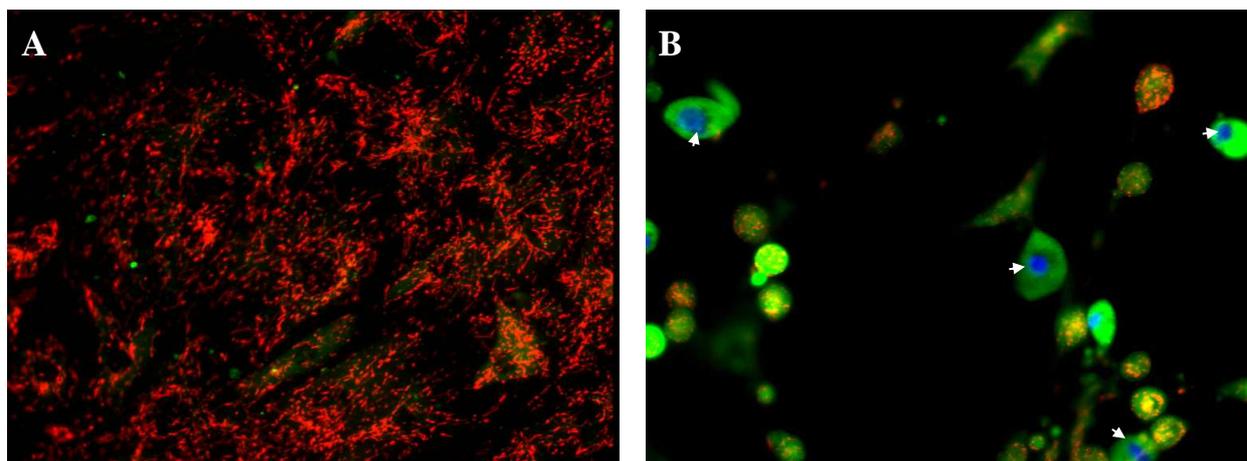


**Figure RI-2 :** Modifications morphologiques des cellules synoviales fibroblastiques de polyarthrite rhumatoïde traitées avec de la diosgénine. Les cellules ont été incubées avec de la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 h (B), 48 h (C) et 72 h (D), ou sans diosgénine (A). Grossissement x 400.

## **C / ANALYSE DE LA CHUTE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ )**

Pour essayer de comprendre les mécanismes par lesquels la diosgénine inhibe la prolifération des cellules synoviales fibroblastiques de PR, nous avons étudié son effet sur le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) car les altérations de la structure et de la fonction mitochondriales peuvent être le déclenchement du processus apoptotique. La chute du  $\Delta\Psi_m$  a été analysée sur les cellules synoviales fibroblastiques après 24 h de traitement par la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) à l'aide de la sonde JC-1. La fluorescence obtenue indique les différences de  $\Delta\Psi_m$  entre les cellules traitées et les cellules contrôles. La fluorescence observée dans la figure RI-3 montre que la diosgénine induit une diminution du  $\Delta\Psi_m$ , caractérisée par l'incorporation des monomères de JC-1 dans les mitochondries (fluorescence verte, figure RI-3B), comparée à la formation d'agrégats de JC-1 à haut potentiel membranaire dans les cellules contrôles (fluorescence rouge, figure RI-3A).

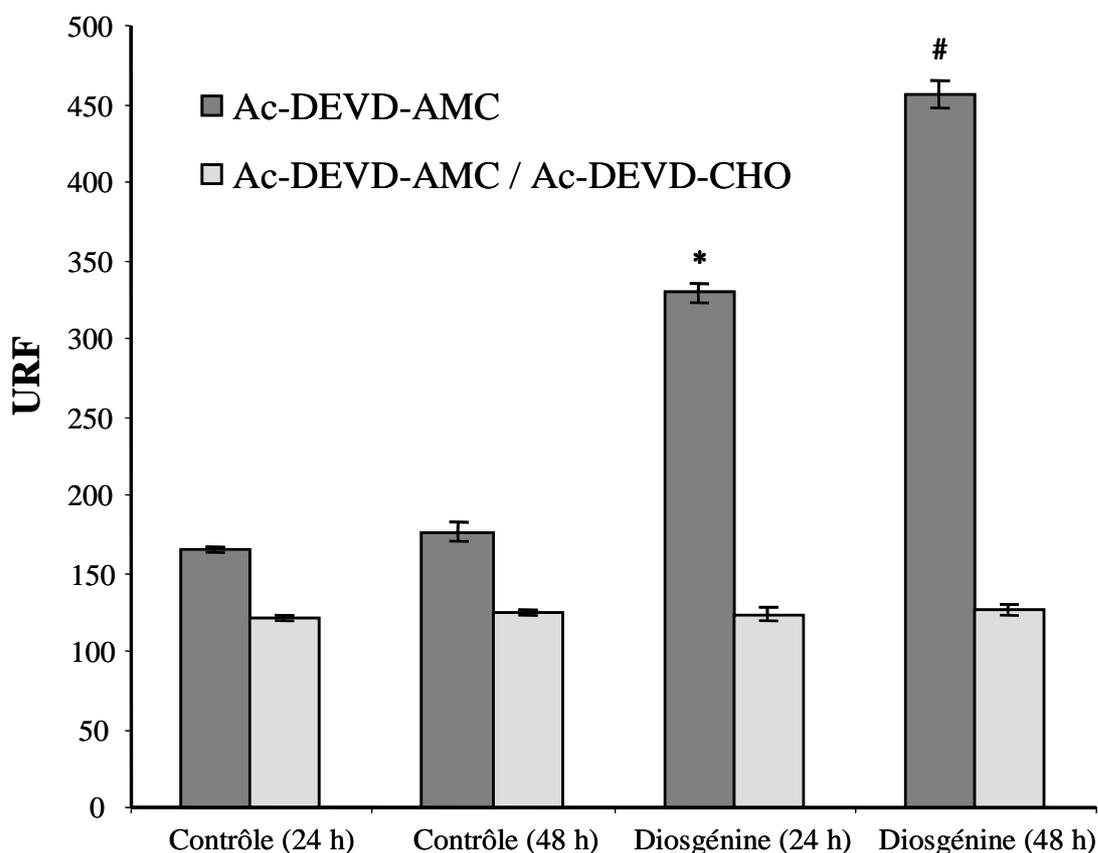
D'autre part, la morphologie des cellules synoviales fibroblastiques traitées a été observée en microscopie à fluorescence après marquage au DAPI, qui permet d'évaluer la condensation du noyau des cellules et donc d'évaluer l'apoptose. Le traitement par diosgénine (40  $\mu\text{M}$  pendant 24 h) altère la perméabilité membranaire nucléaire comme on peut l'observer sur la figure RI-3B avec une localisation nucléaire du DAPI, en comparaison aux cellules non traitées sur la figure RI-3A.



**Figure RI-3** : Analyse du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ) après traitement par la diosgénine. Les cellules synoviales fibroblastiques de PR ont été cultivées dans du milieu contenant 10% de SVF pendant 48 h, puis traitées (B) ou non (A) avec 40  $\mu\text{M}$  de diosgénine.  $\Delta\psi_m$  a été étudié après 24 h de traitement avec le cation JC-1 lipophile formant des agrégats en fonction du potentiel. Une fluorescence rouge (A) représente les mitochondries avec un potentiel de membrane intacte, alors que la fluorescence verte (B) représente un  $\Delta\psi_m$  mitochondrial altéré avec impossibilité pour les mitochondries de concentrer la sonde JC-1. Le marquage au DAPI (4',6- diamidino-2-phenylindole) montre que la diosgénine altère la perméabilité membranaire nucléaire, matérialisé par la localisation nucléaire du DAPI (B, flèches blanches) en comparaison avec les cellules non traitées (A). Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon ECLIPSE E800 (grossissement x400). Une seule des 3 expériences réalisées à partir de 3 patients souffrant de PR est montrée.

#### D / ETUDE DE L'ACTIVITE CASPASE-3

Les cystéine protéases nommées caspases ont un rôle majeur dans l'apoptose, notamment la caspase-3 qui est plus particulièrement impliquée dans l'exécution de l'apoptose. Dans notre étude, l'activité de la caspase-3 a été analysée sur les cellules synoviales fibroblastiques traitées ou non par la diosgénine (40  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 et 48 h. Les résultats montrent que l'activité de la caspase-3 est significativement augmentée au cours du temps (2 fois à 24 h et 2,6 fois à 48 h dans les cellules traitées par la diosgénine par rapport aux cellules témoins,  $p < 0,05$ ) (figure RI-4).



**Figure RI-4** : Effets de la diosgénine sur l'activation de la caspase-3 dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Après 48 h d'adhérence, les cellules ont été cultivées dans du milieu contenant 10% de SVF et traitées ou non par 40  $\mu$ M de diosgénine pendant 24 et 48 h. L'activité de la caspase-3 a été mesurée avec un substrat de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC) en accord avec les instructions du constructeur (voir « Matériel et méthodes »). Ac-DEVD-CHO correspond à un inhibiteur non spécifique de caspase. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  DS de 3 expériences réalisées à partir de 3 patients souffrant de PR et sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF). Une valeur de  $p^{*,\#} < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les contrôles.

## E / ANALYSE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN

L'apoptose a également été évaluée en étudiant la fragmentation de l'ADN qui est un évènement se produisant lors de la dernière étape de l'apoptose avant que les cellules ne se divisent en plusieurs corps apoptotiques ensuite phagocytés par les cellules environnantes.

La fragmentation de l'ADN a été étudiée sur les cellules synoviales fibroblastiques traitées ou non par la diosgénine (40  $\mu$ M) pendant 24 et 48 h à l'aide d'une technique ELISA. Les résultats

montrent que la fragmentation de l'ADN est respectivement augmentée de 7 et 19 fois ( $p < 0,05$ ) pour les cellules traitées pendant 24 h et 48 h, comparées aux cellules contrôles. Le tableau RI-1 montre la fragmentation de l'ADN au cours du traitement. Le ratio apoptotique, qui est le rapport de la fragmentation de l'ADN des cellules traitées sur celle des cellules témoins, indique que la diosgénine induit une forte génération d'oligonucléosomes (tableau RI-1).

**Tableau RI-1** : fragmentation de l'ADN dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR après traitement par la diosgénine.

<b>Temps (h)</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
<b>Contrôle</b>	1	1
<b>Diosgénine</b>	$7,0 \pm 1,4 *$	$19,0 \pm 3,8 \#$

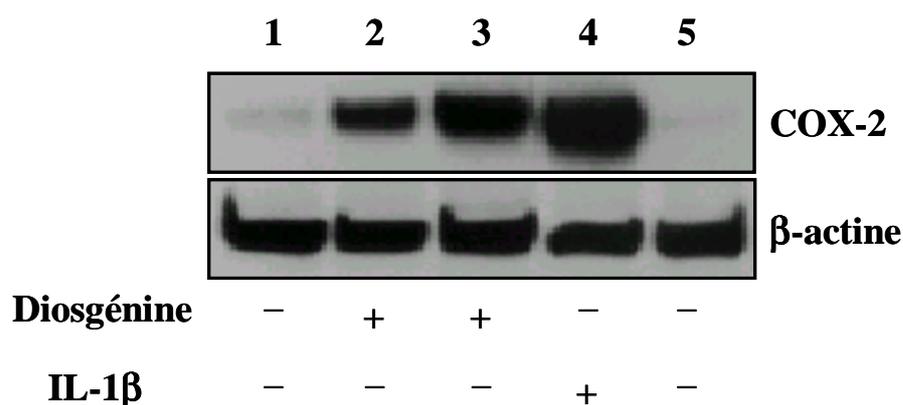
L'apoptose a été quantifiée sur les cellules adhérentes et flottantes à l'aide d'une technique ELISA (voir Matériel et méthodes). Les valeurs données dans le tableau représentent le ratio apoptotique, soit le rapport de la fragmentation de l'ADN des cellules traitées et des cellules témoins. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  DS à partir de 3 expériences réalisées avec 3 patients souffrant de PR.

Une valeur de  $p^*$  ou  $\# < 0.05$  a été considérée comme significative par rapport au contrôle.

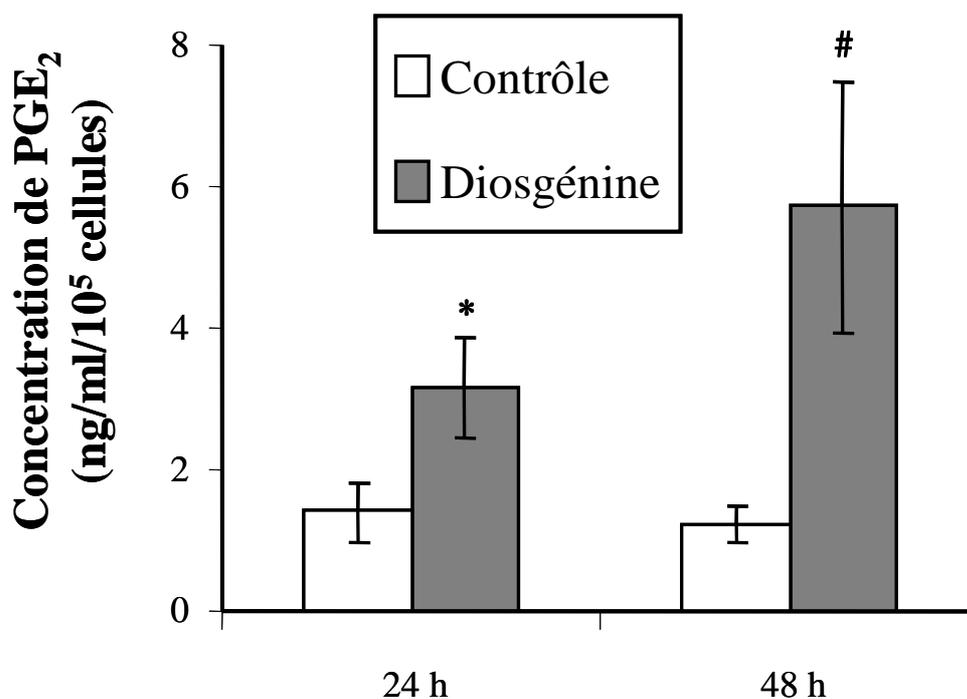
## F / ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE LA COX-2 DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA DIOSGENINE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR

Plusieurs études ont montré que la COX-2 aurait plutôt un rôle anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses, plus particulièrement dans le cancer du colon (Tsuji et al., 1995). Cependant les effets de COX-2 et de la PGE<sub>2</sub> dans la régulation de l'apoptose pourraient varier selon le type cellulaire. En effet, de façon contradictoire, il existe une relation entre apoptose et COX-2 pour les chondrocytes et les synoviocytes (Pelletier et al., 2001 ; Jovanovic et al., 2002).

Dans le cadre des synoviocytes de type B et de nos conditions de culture, les résultats montrent que la diosgénine à 40 µM induit l'expression de COX-2 (figure RI-5). La surexpression de COX-2 est corrélée à une augmentation de l'activité COX-2, puisque la production de PGE<sub>2</sub> est augmentée au cours du temps après traitement par la diosgénine : 2,3 et 4,7 fois à 24 et 48 h respectivement en comparaison avec les cellules contrôles ( $p < 0,05$ ) (figure RI-6).



**Figure RI-5 :** Analyse de l'expression de COX-2 par western blot dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Les cellules ont été cultivées sans traitement (pistes 1 et 5, contrôles à 24 et 48 h respectivement) ou ont été incubées avec 40 µM de diosgénine pendant 24 h (piste 2) ou 48 h (piste 3) ou avec de l'IL-1β (1 ng/ml) pendant 24 h (piste 4). Les protéines ont été extraites, puis soumises à une analyse par western blot. Les expressions de la COX-2 et de la β-actine ont été mesurées à l'aide d'anticorps de souris anti-COX-2 et anti-β-actine humaines, comme décrit dans Matériel et méthodes. Chaque bande a été quantifiée par analyse densitométrique. La figure montre les résultats d'une des trois expériences réalisées à partir de trois patients souffrant de PR.



**Figure RI-6 :** Effets de la diosgénine sur la production de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Les cellules ont été cultivées dans du milieu contenant 10% de SVF pendant 48 h et ensuite traitées ou non par 40 µM de diosgénine pendant 24 et 48 h. Le taux de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture a été mesuré par méthode immuno-enzymatique. Les expériences ont été réalisées à partir des cellules synoviales de 4 patients souffrant de PR. Les données représentent les moyennes ± DS des 4 expériences. \*, # Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles.

Pour compléter ces résultats, nous avons cherché à savoir si COX-2 était directement associée à l'apoptose des cellules synoviales fibroblastiques induite par la diosgénine. Pour cela, nous avons réalisé des expériences avec un inhibiteur spécifique de l'activité de COX-2 et analysé le niveau de fragmentation de l'ADN après traitement par diosgénine. Nous avons examiné quels pouvaient être les effets de la PGE<sub>2</sub> exogène sur l'apoptose des synoviocytes toujours induite par la diosgénine. Enfin, nous avons recherché un éventuel effet synergique de l'induction de COX-2 par l'IL-1β sur la fragmentation de l'ADN après traitement par la diosgénine.

## G / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE PGE<sub>2</sub> ENDOGENE DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA DIOSGENINE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES

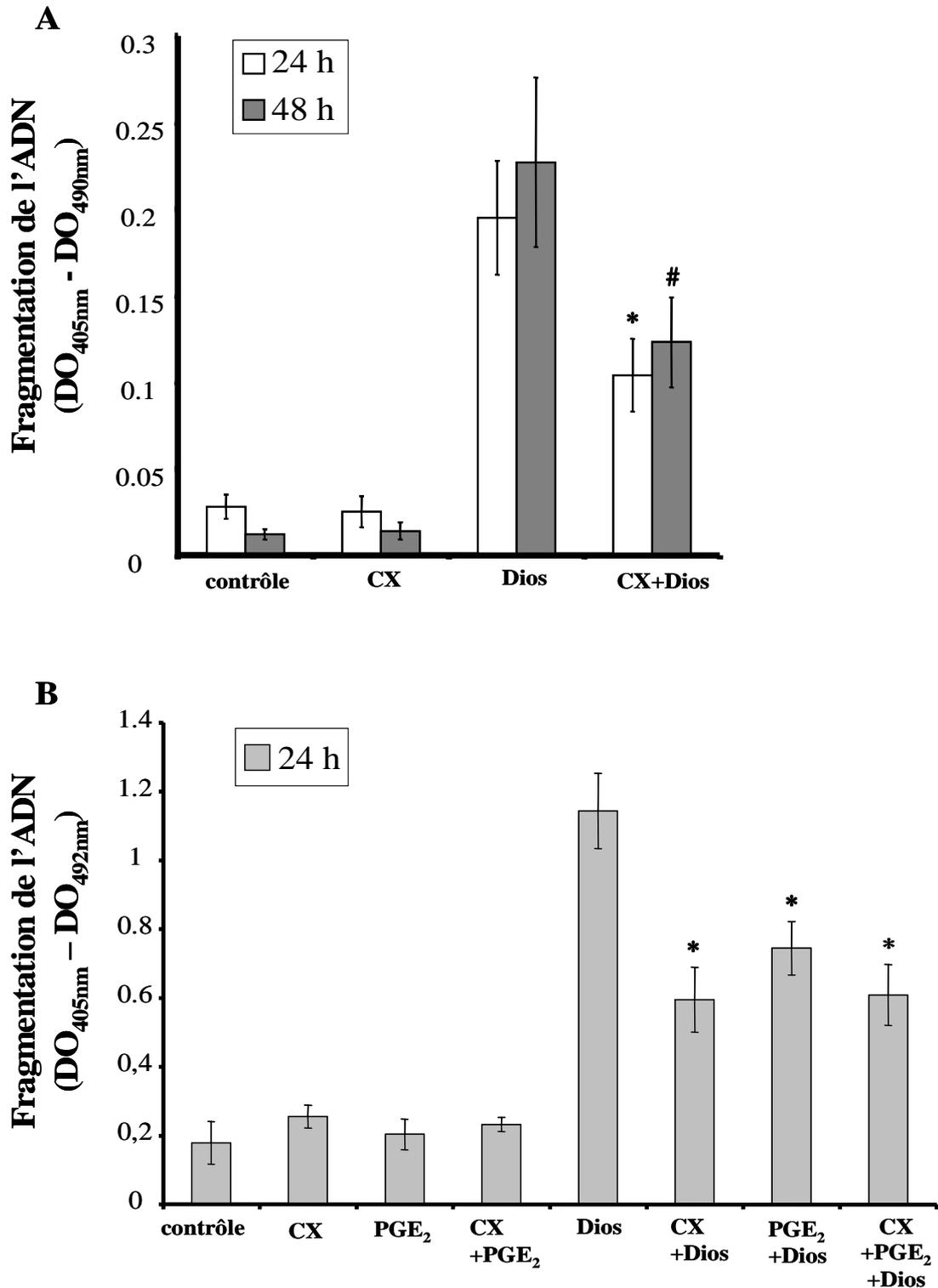
Nos résultats montrent que le célécoxib rajouté dans le milieu de culture avant le traitement par la diosgénine inhibe l'activité de COX-2 : la production de PGE<sub>2</sub> est diminuée de 73% et 95% (p<0,05) à 24 et 48 h respectivement par rapport aux cellules contrôles traitées seulement avec la diosgénine (tableau RI-2).

**Tableau RI-2** : Effet de la diosgénine sur la production de PGE<sub>2</sub> après inhibition ou induction de la COX-2 dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR.

Temps (h)	24	48
	Concentration de PGE <sub>2</sub>	
<b>Diosgénine</b>	3,15 ± 0,7	5,71 ± 1,79
<b>Célécoxib + Diosgénine</b>	0,86 ± 0,16*	0,29 ± 0,08 <sup>#</sup>
<b>IL-1β + Diosgénine</b>	120,40 ± 17,44*	792,24 ± 56,33 <sup>#</sup>

Les cellules synoviales fibroblastiques ont été préincubées avec ou sans célécoxib (1 μM) ou IL-1β (1 ng/ml) pendant 4 h, puis 40 μM de diosgénine ont été rajoutés pendant 24 et 48 h. La concentration de PGE<sub>2</sub> a été mesurée par technique immuno-enzymatique et est exprimée en ng/ml pour 10<sup>5</sup> cellules. Les données représentent les concentrations moyennes ± DS de PGE<sub>2</sub> de 3 expériences différentes à partir des cellules synoviales de 3 patients souffrant de PR. Dans les autres conditions, les concentrations de PGE<sub>2</sub> à 24 et 48 h respectivement, étaient de 1,39 ± 0,41 et 1,21 ± 0,26 pour le milieu de culture seul; 0,73 ± 0,19 et 0,66 ± 0,12 pour le célécoxib seul; et 20,26 ± 3,19 et 17,42 ± 3,03 pour l'IL-1β seule. \*<sup>#</sup>Une valeur de p<0,05 a été considérée comme significative en comparaison aux résultats obtenus avec la diosgénine seule.

La fragmentation de l'ADN a été étudiée dans les mêmes conditions. Le pré-traitement des cellules synoviales par le célécoxib avant le traitement à la diosgénine diminue la production de mononucléosomes et d'oligonucléosomes de 47% et 46% à 24 et 48 h respectivement (p<0,05), par rapport aux cellules contrôles traitées par diosgénine seule (figure RI-7A). Inversement, la PGE<sub>2</sub> exogène n'a pas les mêmes effets que la PGE<sub>2</sub> endogène. En effet, l'addition de 10 μM de PGE<sub>2</sub> exogène seule ou en présence de célécoxib avant traitement par la diosgénine réduit la fragmentation de l'ADN par rapport aux cellules contrôles (figure RI-7B) et n'inverse pas le phénomène.

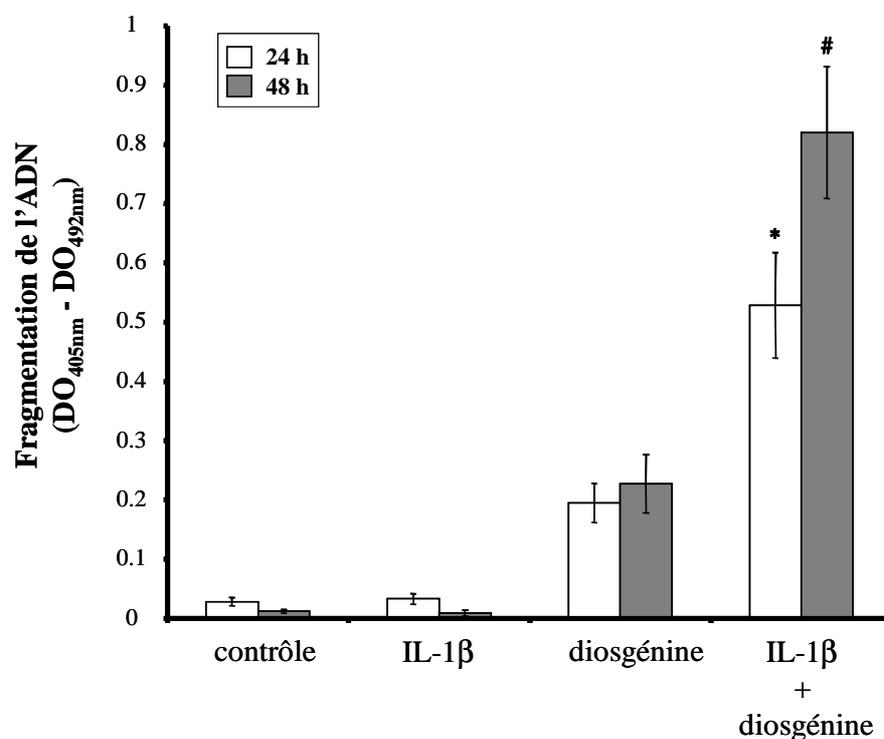


**Figure RI-7 :** Effet de la diosgénine (Dios) sur la fragmentation de l'ADN après incubation avec le célécoxib (CX) (A) ou après addition de PGE<sub>2</sub> exogène (B). (A) Les cellules synoviales fibroblastiques de PR ont été pré-incubées avec ou sans CX (1  $\mu$ M) pendant 4 h, puis 40  $\mu$ M de Dios ont été rajoutés pendant 24 ou 48 h. Les mesures ont été réalisées sur les cellules synoviales de 4 patients souffrant de PR. Les données représentent les moyennes  $\pm$  DS des 4 expériences. \*, # Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles traitées par Dios seule. (B) Les cellules ont été pré-incubées avec ou sans CX (1  $\mu$ M) en présence ou en l'absence de PGE<sub>2</sub> exogène (10 nM) pendant 4 h, puis traitées par 40  $\mu$ M de Dios pendant 24 h supplémentaires. Les mesures ont été faites sur les cellules synoviales de 4 patients souffrant de PR. Les données représentent les moyennes  $\pm$  DS des 4 expériences. \*Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles traitées par Dios seule. DO : densité optique.

## H / ETUDE DE L'EFFET DE LA DIOSGENINE SUR LA FRAGMENTATION DE L'ADN APRES SUREXPRESSION DE COX-2 INDUITE PAR L'IL-1 $\beta$

La stimulation des cellules synoviales fibroblastiques de PR par l'IL-1 $\beta$  avant traitement par diosgénine augmente de façon très importante l'activité de COX-2. En effet, la synthèse de PGE<sub>2</sub> est multipliée par 38 et 139 ( $p < 0,05$ ) à 24 et 48 h respectivement, par rapport aux cellules traitées par diosgénine seule (tableau RI-2).

La stimulation des cellules synoviales fibroblastiques par l'IL-1 $\beta$  seule n'a aucun effet sur l'apoptose (figure RI-8). Par contre, la fragmentation de l'ADN est augmentée de façon significative après stimulation des cellules synoviales par l'IL-1 $\beta$  puis traitement par la diosgénine (2,7 et 3,6 fois à 24 et 48 h respectivement,  $p < 0,05$ ) par rapport aux cellules traitées par diosgénine seule (figure RI-8).



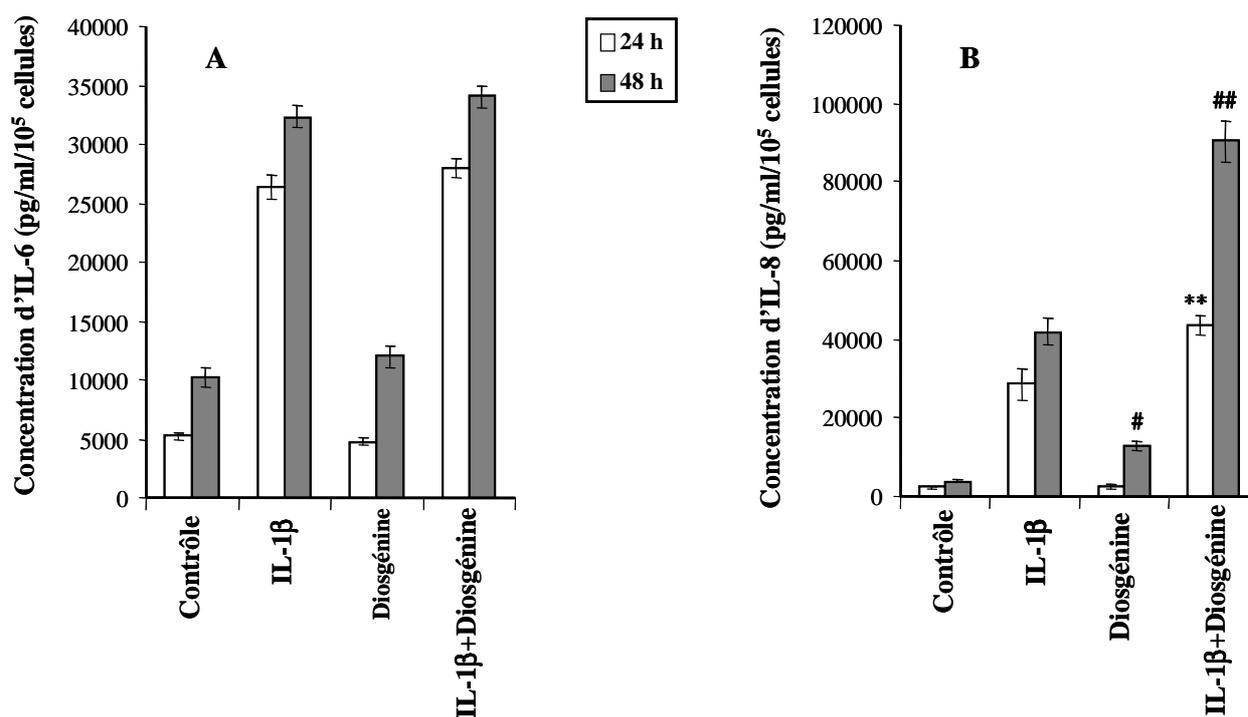
**Figure RI-8 :** Effet de la diosgénine sur la fragmentation de l'ADN après stimulation par l'IL-1 $\beta$ . Les cellules synoviales fibroblastiques de PR ont été pré-incubées avec ou sans IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) pendant 4 h, puis 40  $\mu$ M de diosgénine ont été rajoutés pendant 24 ou 48 h. Les mesures ont été réalisées sur les cellules synoviales de 4 patients souffrant de PR. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$ DS des 4 expériences. \*,# Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules traitées par diosgénine seule. DO : densité optique.

## **I / LES EFFETS DE LA DIOSGENINE SUR LA PRODUCTION D'IL-6 ET D'IL-8 PAR LES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR**

Dans la PR, les cellules synoviales fibroblastiques de la membrane synoviale produisent de l'IL-6 et de l'IL-8, deux cytokines pro-inflammatoires participant à la physiopathologie de ce rhumatisme inflammatoire. D'autre part, dans la littérature, la production de cytokines pro-inflammatoires peut être augmentée au cours de l'apoptose dans d'autres types cellulaires.

Dans notre modèle de culture de cellules synoviales fibroblastiques, nous avons voulu étudier les effets de la diosgénine sur la production d'IL-6 et d'IL-8. Les résultats montrent que seule la production d'IL-8 (figure RI-9B) est significativement augmentée après 48 h de traitement par la diosgénine (taux multiplié par 3,3 ;  $p < 0,05$ ) en comparaison aux cellules contrôles non traitées avec la diosgénine (figure RI-9A).

D'autre part, la diosgénine a un effet synergique avec l'IL-1 $\beta$  sur la production d'IL-8 par les cellules synoviales (figure RI-9B), ce qui n'est pas le cas avec l'IL-6 (figure RI-9A). La production d'IL-8 stimulée par l'IL-1 $\beta$  est augmentée de 1,5 et 2,2 fois ( $p < 0,05$ ) après traitement par la diosgénine pendant 24 et 48 h respectivement, en comparaison avec les cellules traitées par l'IL-1 $\beta$  seule (figure RI-9B).



**Figure RI-9** : Effet de la diosgénine sur la production d'IL-6 (A) et d'IL-8 (B) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Les cellules ont été stimulées ou non par l'IL-1β (1 ng/ml) pendant 4 h, puis 40 μM de diosgénine ont été rajoutés pendant 24 ou 48 h. Les contrôles sont les cellules non stimulées. Les concentrations d'IL-6 et d'IL-8 ont été déterminées dans les surnageants de culture par technique ELISA. Les mesures ont été réalisées à partir des cellules de 3 patients souffrant de PR. Les données sont exprimées en moyennes ±DS des 3 expériences. # Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles et \*\*, ## une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules stimulées par l'IL-1β uniquement.

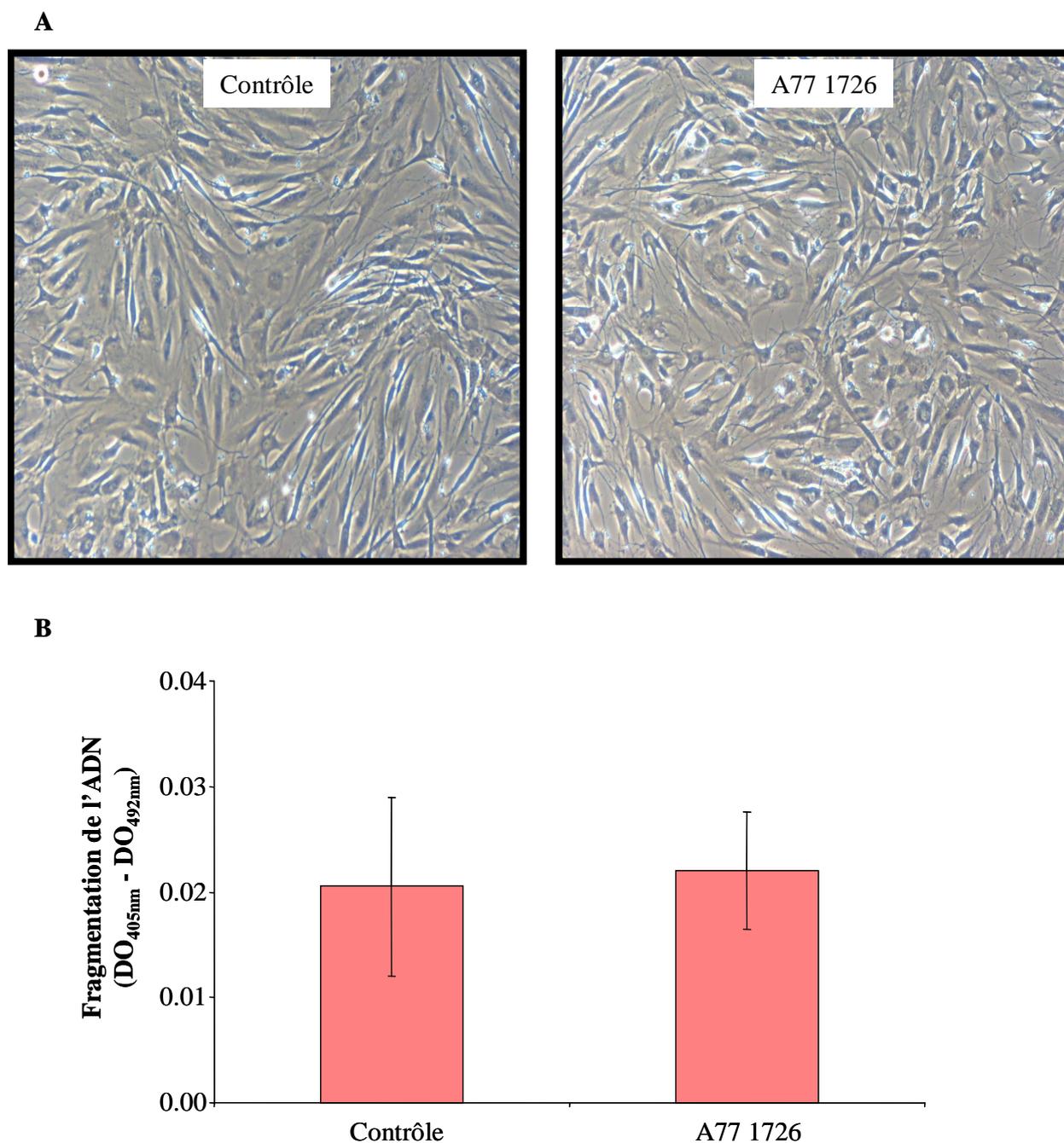
## **II / RESULTATS DES EXPERIENCES REALISEES AVEC L'A77 1726**

### **A / EFFETS DE L'A77 1726 SUR LA FRAGMENTATION DE L'ADN DANS LES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR**

L'observation directe en microscopie à contraste de phase montre que les cellules synoviales traitées avec 100  $\mu$ M d'A77 1726 dans du milieu contenant 10% de SVF n'ont aucune différence morphologique lorsqu'elles sont comparées aux cellules contrôles non traitées (figure RII-1A). La fragmentation de l'ADN a été étudiée dans les mêmes conditions de culture : il n'y a pas d'augmentation de la production de mono- et oligonucléosomes après traitement avec l'A77 1726 (figure RII-1B).

### **B / EFFETS DE L'A77 1726 SUR LA PRODUCTION DE CYTOKINES ET ANTAGONISTES DES CYTOKINES : IL-6 , IL-8, IL-10, IL-11, IL-15, IL-18, sTNFRI, IL-1Ra**

L'A77 1726 diminue la production de certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 dans des cultures de cellules synoviales (Burger et al., 2003 ; Cutolo et al., 2003) et au contraire augmente le taux d'IL-1Ra (Deage et al., 1998 ; Palmer et al., 2004). L'A77 1726 semble donc faire pencher la balance du côté de la production des facteurs anti-inflammatoires en diminuant la synthèse des facteurs pro-inflammatoires. Ainsi, nous avons choisi d'étudier les effets de l'A77 1726 sur d'autres molécules anti-inflammatoires comme le sTNFRI et l'IL-10 et sur la production d'autres facteurs pro-inflammatoires : l'IL-8, l'IL-15, l'IL-18 et l'IL-11, bien que le rôle exacte de l'IL-11 reste encore un sujet de controverse. C'est pour cette raison que nous avons choisi de décrire séparément les effets de l'A77 1726 sur la synthèse de l'IL-11. Dans le même temps, nous avons confirmé les effets de l'A77 1726 sur l'IL-6 et l'IL-1Ra dans notre modèle de culture de cellules synoviales de PR.



**Figure RII-1 :** (A) Photographies (grossissement  $\times 400$ ) des cellules synoviales fibroblastiques de PR traitées ou non avec l'A77 1726 (100  $\mu\text{M}$ ) et (B) quantification de l'apoptose par technique ELISA (kit « Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> ») basée sur la fragmentation de l'ADN. Les cellules ont été incubées avec ou sans A77 1726 à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  pendant 24 h. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$ DS des 3 expériences réalisées à partir des cellules synoviales de 3 patients souffrant de PR. Une seule des 3 expériences est présentée.

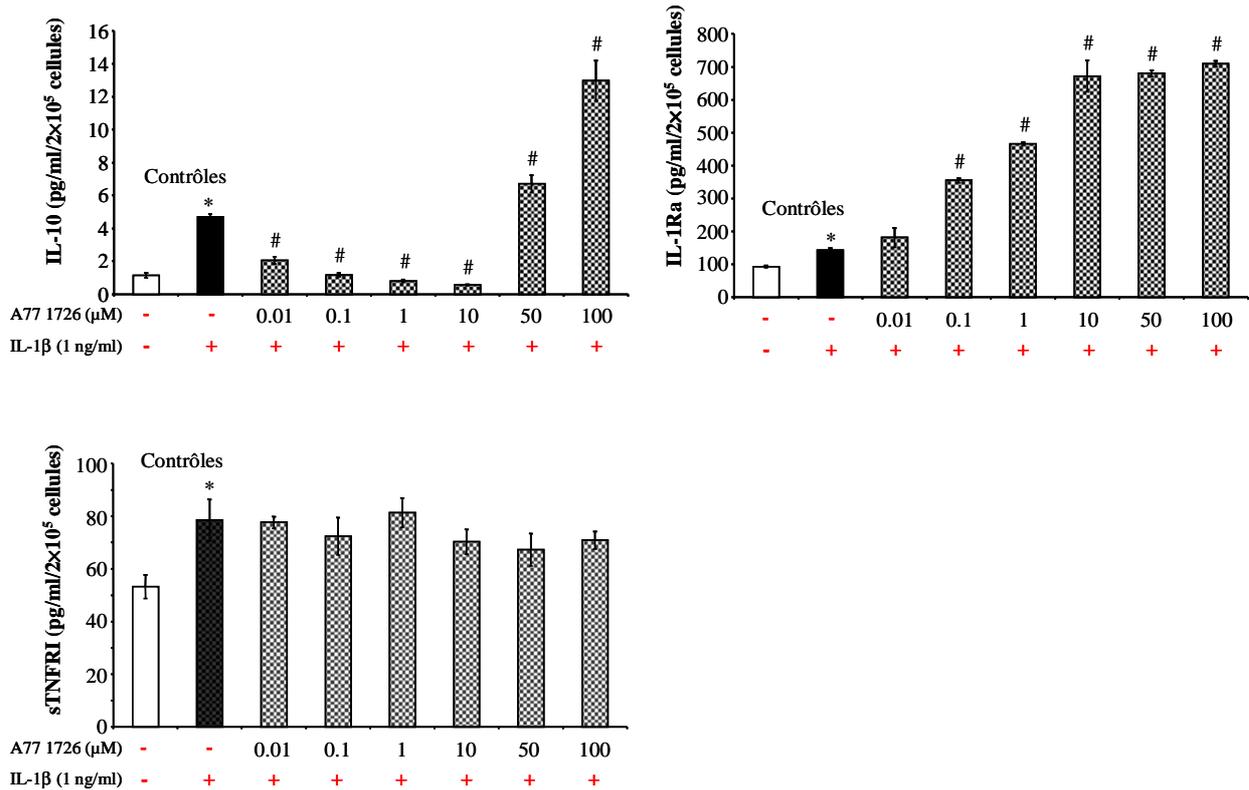
Nos résultats sont les suivants :

→ L'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) augmente de façon importante la sécrétion d'IL-10 (+ 311% versus les cellules contrôles non stimulées,  $p < 0,05$ ), mais également celle d'IL-1Ra et celle de sTNFRI (+ 54% et + 47% respectivement versus les cellules contrôles non stimulées,  $p < 0,05$ ) (figure RII-2).

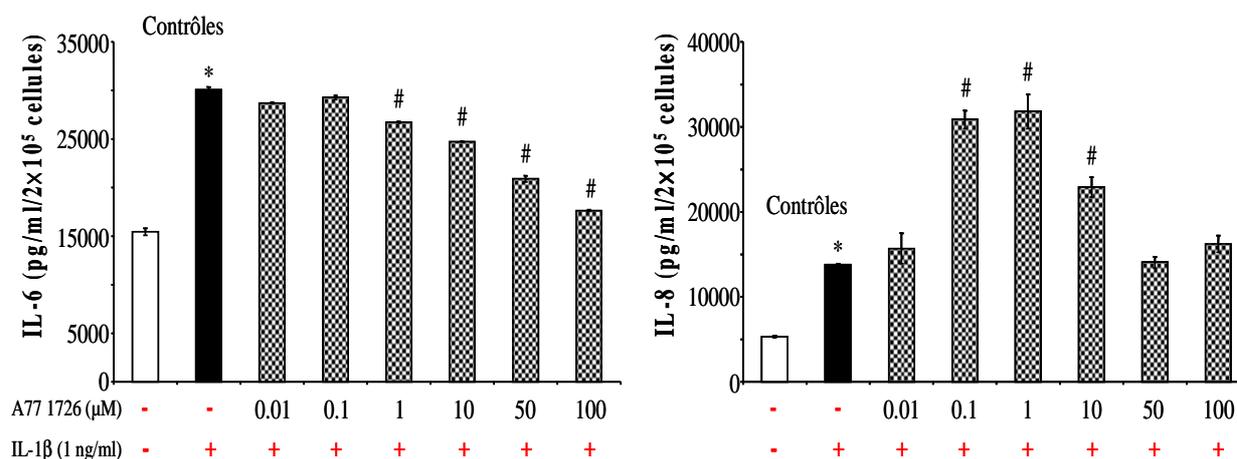
→ En présence d'A77 1726, les résultats montrent des effets différentiels dépendants de la concentration utilisée. Les effets de l'A77 1726 sur la sécrétion d'IL-10 stimulée par l'IL-1 $\beta$  sont dose-dépendants : les faibles concentrations (0,01 à 10  $\mu$ M) provoquent une diminution de la sécrétion d'IL-10 (- 28% à - 80% respectivement versus les cellules stimulées par l'IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ ) ; alors que les fortes concentrations (50 et 100  $\mu$ M) entraînent une augmentation très importante de l'IL-10 (+ 137% et + 359% respectivement versus les cellules stimulées par l'IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ ) (figure RII-2). Concernant les deux autres cytokines anti-inflammatoires, IL-1Ra et sTNFRI, l'A77 1726 (de 0,1 à 100  $\mu$ M) augmente la sécrétion d'IL-1Ra (+ 149% à + 371% respectivement versus les cellules stimulées par l'IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ ) et par contre n'a pas d'effet sur la libération de sTNFRI induite par l'IL-1 $\beta$  quelle que soit la concentration utilisée (figure RII-2).

→ Comme cela a été décrit dans la littérature, l'IL-1 $\beta$  augmente la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 dans nos conditions de culture de cellules synoviales fibroblastiques de PR. L'A77 1726 est responsable d'une inhibition de la sécrétion d'IL-6 dose-dépendante : de -11% à 1  $\mu$ M jusqu'à -41% à 100  $\mu$ M versus les cellules stimulées par l'IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) (figure RII-3). D'autre part, nous observons à nouveau des effets différentiels de l'A77 1726 sur la sécrétion de l'IL-8. En effet, l'A77 1726 augmente la sécrétion d'IL-8 à 0,1 , 1 et 10  $\mu$ M (+124%, +130% et +66% respectivement versus les cellules stimulées par l'IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ ) et n'a aucun effet sur le taux d'IL-8 à 50 et 100  $\mu$ M (figure RII-3).

→ Pour l'IL-15 et l'IL-18, ces deux cytokines n'ont pas été détectées dans le surnageant de culture des cellules synoviales, même après stimulation par l'IL-1 $\beta$ .

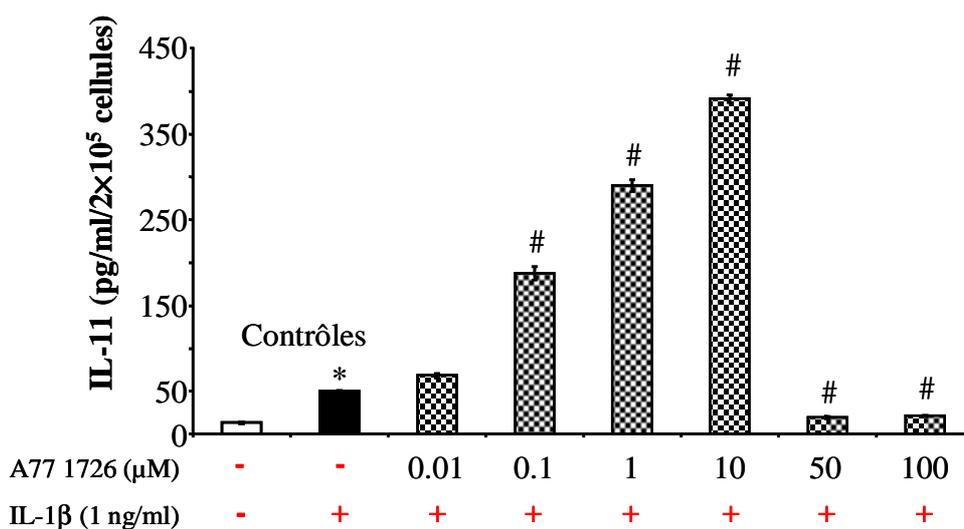


**Figure RII-2 :** Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1Ra et sTNFRI) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Les cellules ont été incubées ou non avec l'A77 1726 (0,01 à 100 μM) pendant 24 h et stimulées avec de l'IL-1β (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation. Les conditions contrôles sont les cellules non traitées et les cellules uniquement stimulées avec de l'IL-1β. Les concentrations d'IL-10, d'IL-1Ra et de sTNFRI ont été déterminées par technique ELISA dans les surnageants de culture des cellules synoviales obtenues à partir de 3 patients souffrant de PR. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$ DS des 3 expériences. \*Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles non traitées et # une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules stimulées par l'IL-1β uniquement.



**Figure RII-3 :** Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion de l'IL-6 (cytokine pro-inflammatoire) et de l'IL-8 (chémokine) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Les cellules ont été incubées ou non avec de l'A77 1726 pendant 24 h et stimulées avec de l'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation. Les contrôles sont représentés par les cellules non traitées et les cellules uniquement stimulées par l'IL-1 $\beta$ . Les concentrations d'IL-6 et d'IL-8 ont été déterminées par technique ELISA dans les surnageants de culture des cellules synoviales obtenues à partir de 3 patients souffrant de PR. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$ DS des 3 expériences. \*Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles non traitées et # une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules stimulées par l'IL-1 $\beta$  uniquement.

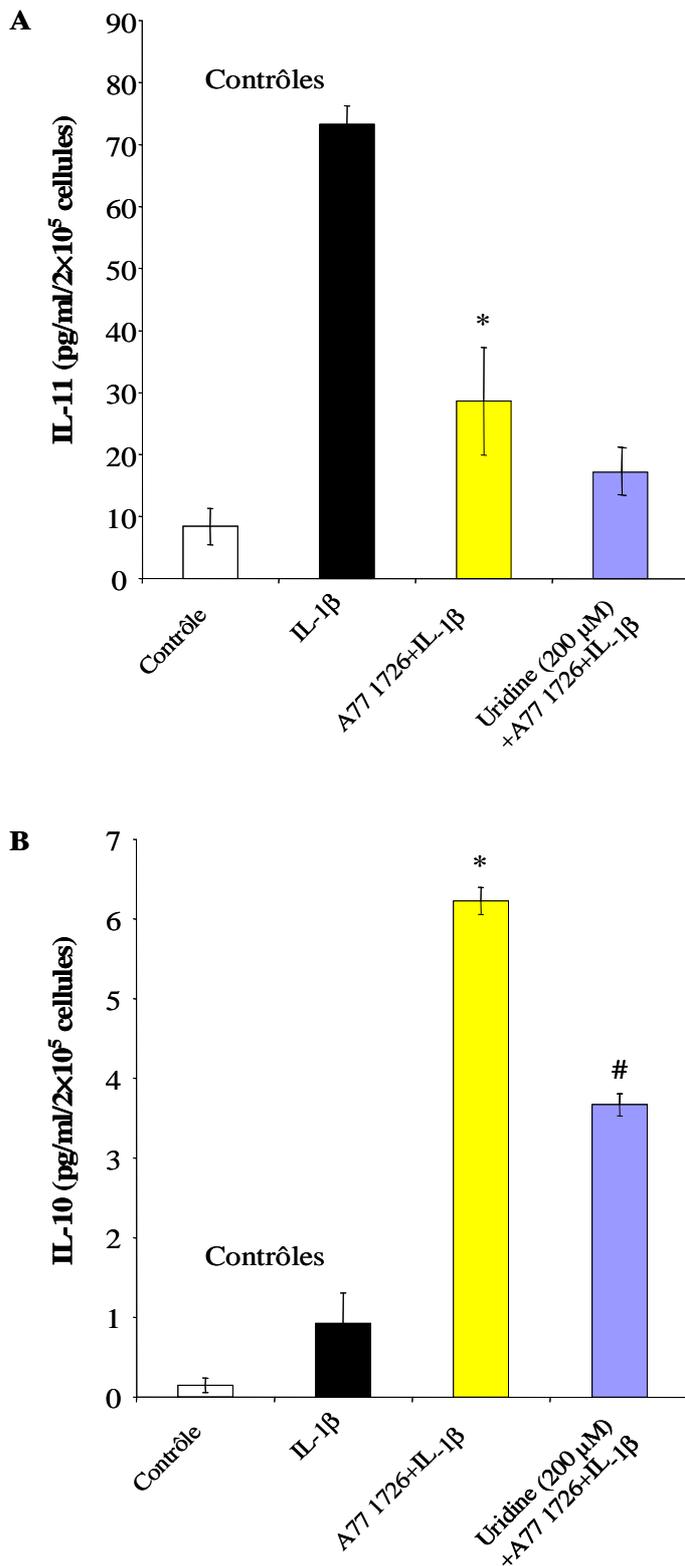
→ Concernant l'IL-11, nos résultats montrent que l'IL-1 $\beta$  augmente de façon importante sa sécrétion (+274% versus les cellules contrôles non stimulées,  $p < 0,05$ ) (figure RII-4). L'A77 1726 à faibles concentrations (0,1 à 10  $\mu$ M) augmente la sécrétion d'IL-11 en présence d'IL-1 $\beta$ . Par contre, les fortes doses (50 et 100  $\mu$ M) diminuent de façon significative la sécrétion d'IL-11 stimulée par l'IL-1 $\beta$  (-60% pour 50 et 100  $\mu$ M versus les cellules stimulées par l'IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ ) (figure RII-4).



**Figure RII-4 :** Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion d'IL-11 par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Les cellules ont été incubées ou non avec de l'A77 1726 pendant 24 h et stimulées avec de l'IL-1β (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation. Les contrôles sont représentés par les cellules non traitées et les cellules uniquement stimulées par l'IL-1β. Les concentrations d'IL-11 ont été déterminées par technique ELISA dans les surnageants de culture des cellules synoviales obtenues à partir de 3 patients souffrant de PR. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$ DS des 3 expériences. \*Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles non traitées et # une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules stimulées par l'IL-1β uniquement.

→ Nous avons ensuite cherché à savoir si l'inhibition de l'IL-11 par les fortes doses d'A77 1726 était liée à l'inhibition de la synthèse de pyrimidine, mécanisme d'action bien décrit de l'A77 1726. Pour ce faire, nous avons rajouté dans les cultures des cellules synoviales de l'uridine de manière à annuler l'effet inhibiteur de l'A77 1726. Les résultats montrent que l'inhibition de la sécrétion d'IL-11 par l'A77 1726 (100 μM) n'est pas significativement modifiée par 200 μM d'uridine (figure RII-5A).

Par contre, l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 provoquée par l'A77 1726 (100 μM) est annulée par l'addition d'uridine (200 μM) dans le milieu de culture (-41% versus A77 1726 + IL-1β,  $p < 0,05$ ) (figure RII-5B).



**Figure RII-5 :** Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion de l'IL-11 (A) et de l'IL-10 (B) en présence d'uridine. Les cellules synoviales fibroblastiques ont été incubées pendant 30 min avec de l'uridine (200  $\mu$ M), avant de rajouter de l'A77 1726 (100  $\mu$ M) pendant 24 h et de l'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures d'incubation. Les contrôles sont représentés par les cellules non traitées et les cellules uniquement stimulées par l'IL-1 $\beta$ . Les concentrations d'IL-11 et d'IL-10 ont été déterminées par technique ELISA dans les surnageants de culture des cellules synoviales obtenues à partir de 3 patients souffrant de PR. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$ DS des 3 expériences. \*Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules uniquement stimulées par l'IL-1 $\beta$  et # une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules traitées par A77 1726 et l'IL-1 $\beta$ .

## C / ANALYSE DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE COX-2 APRES TRAITEMENT DES CELLULES SYNOVIALES PAR L'A77 1726

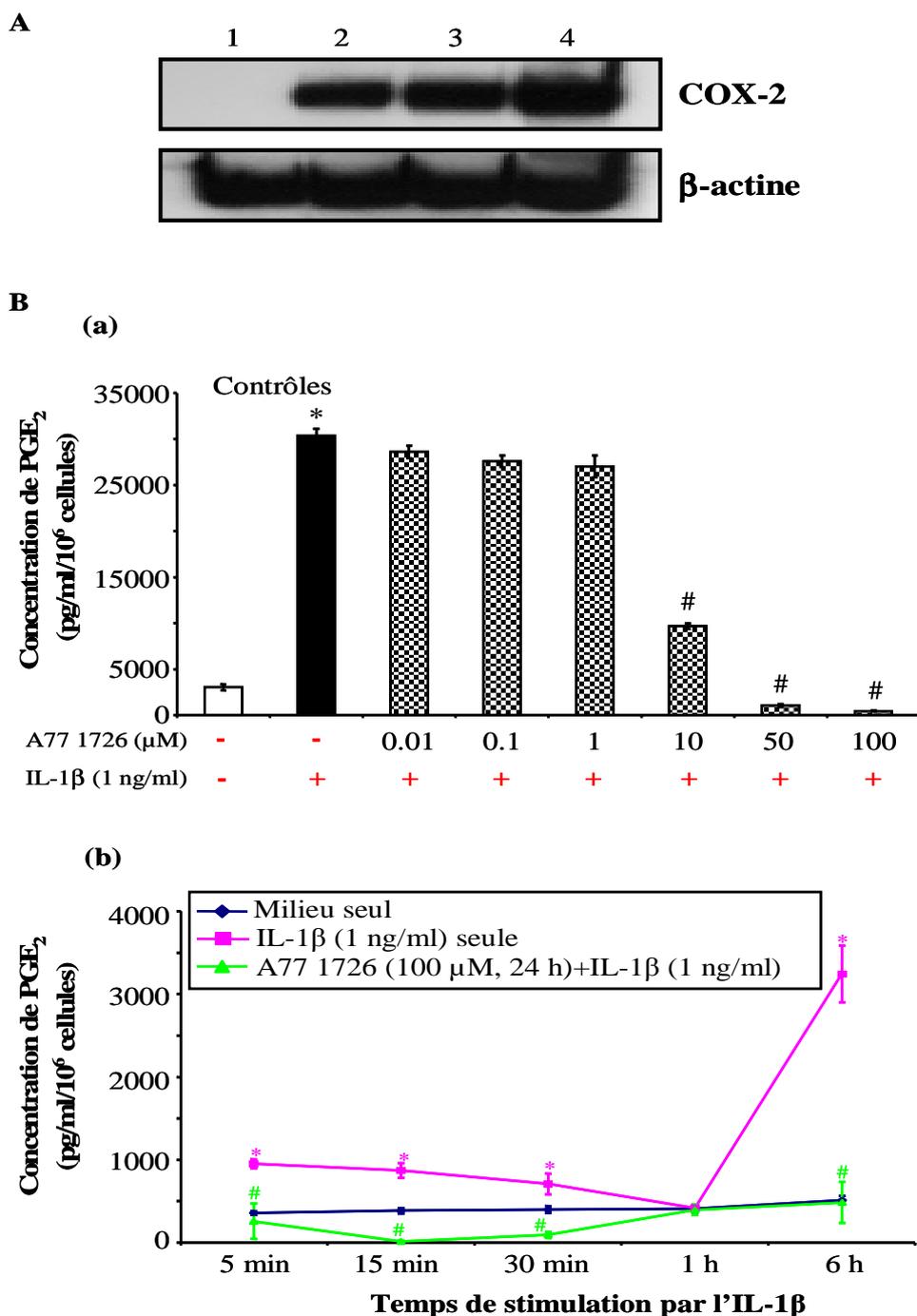
L'inflammation est associée à l'induction de COX-2, responsable de la synthèse des PGs. Les PG<sub>S</sub> et surtout la PGE<sub>2</sub> sont des médiateurs lipidiques produits en quantité importante dans les sites inflammatoires et notamment dans la membrane synoviale des PR.

La figure 6A montre que l'A77 1726 à la dose de 10 µM (piste 3) n'a aucune action sur l'expression de COX-2, en comparaison avec la stimulation par l'IL-1β responsable d'une nette augmentation de l'expression de COX-2 (piste 2). Par contre, l'A77 1726 à forte concentration (100 µM) augmente l'expression de COX-2 (piste 4).

Nous avons ensuite étudié l'activité de COX-2 dans nos conditions de culture, c'est-à-dire l'effet de l'A77 1726 sur la production de PGE<sub>2</sub> en présence d'IL-1β. Les résultats montrent, après stimulation par l'IL-1β (1 ng/ml), que l'A77 1726 diminue la production de PGE<sub>2</sub> de façon dose-dépendante : -68% à 10 µM, -96% à 50 µM et -98% à 100 µM versus les cellules stimulées uniquement par l'IL-1β (p<0,05) (figure 6B,a).

Pour les expériences suivantes, seule la concentration de 100 µM d'A77 1726 a été testée car cette concentration d'A77 1726 donnait les résultats les plus intéressants au regard des effets sur les différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées. En effet dans nos conditions de culture des cellules synoviales fibroblastiques, 100 µM d'A77 1726 provoquaient une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et d'IL-1Ra et une diminution de la production d'IL-6 et d'IL-11. D'autre part, la dose recommandée de léflunomide (ARAVA®) chez l'homme est de 20 mg/j. A cette dose, le taux sérique d'A77 1726 à l'état d'équilibre varie de 25 à 45 µg/ml, soit de 92,5 à 166 µM (Williams et al., 2002).

Nous avons ensuite observé l'évolution de la production dans le temps de PGE<sub>2</sub> sous stimulation par l'IL-1β et sous traitement par A77 1726, et notamment sur de courtes périodes. Les courtes périodes d'incubation avec l'IL-1β entraînent une augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> : +166%, +125% et +77% après 5, 15 et 30 min versus les contrôles (milieu de culture seul) (p<0,05) (figure 6B,b). Par contre, cette augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> n'est plus observée à 1 h de stimulation par l'IL-1β (figure 6B,b). Après 6 h d'incubation avec l'IL-1β, la production de PGE<sub>2</sub> augmente à nouveau et ce de façon très importante : +532% versus les cellules contrôles non traitées (p<0,05) (figure 6B,b). Les effets de l'A77 1726 sur la production de PGE<sub>2</sub> ont été étudiés sur ces différents temps de stimulation avec l'IL-1β. En dehors de la stimulation pendant 1h, l'A77 1726 à la dose de 100 µM inhibe la production de PGE<sub>2</sub> sur les différents temps de stimulation par l'IL-1β : -72% après 5 min, -98% après 15 min, -81% après 30 min et -85% après 6 h de traitement par l'IL-1β (p<0,05) (figure 6B,b).

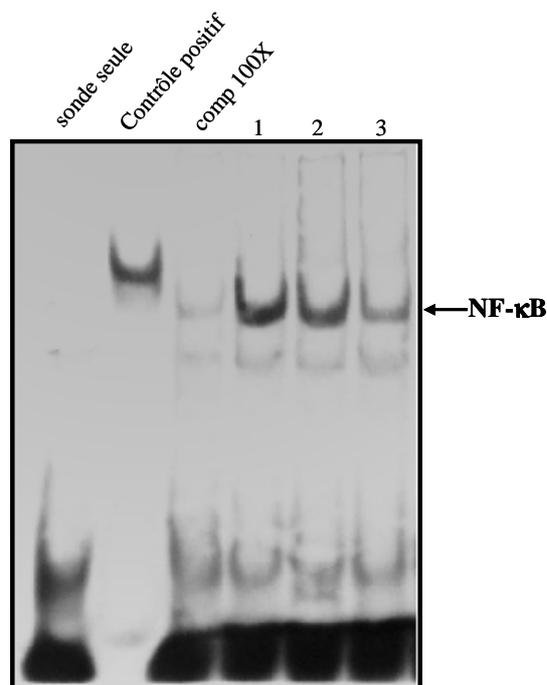


**Figure RII-6 :** Effet de l'A77 1726 sur l'expression de COX-2 (A) et la production de PGE<sub>2</sub> (B) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. (A) Les cellules ont été cultivées avec du milieu seul pendant 24 h (piste 1), ou avec de l'IL-1β (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures (piste 2), ou avec 10 et 100 μM d'A77 1726 pendant 24 h et de l'IL-1 β pendant les 6 dernières heures d'incubation (pistes 3 et 4 respectivement). Un western blot a été réalisé avec les protéines extraites à partir des cellules. Les expressions de COX-2 et β-actine ont été estimées en utilisant des anticorps de souris anti-COX-2 et anti-β-actine humaines. Parmi les 4 expériences réalisées, une seule est représentée sur la figure. (B)(a) Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture avec 10% de SVF pendant 48 h, puis traitées ou non par A77 1726 pendant 24 h en rajoutant de l'IL-1β (1 ng/ml) les 6 dernières heures. Les contrôles sont les cellules non traitées et les cellules stimulées uniquement par l'IL-1β. (b) Production de PGE<sub>2</sub> dans le temps. Les cellules ont été incubées ou non avec de l'A77 1726 (100 μM) pendant 24 h, puis stimulées par de l'IL-1β pendant différents temps. Les contrôles sont aussi les cellules non traitées et les cellules avec uniquement de l'IL-1β. Les taux de PGE<sub>2</sub> ont été mesurés par méthode immuno-enzymatique dans le milieu de culture de cellules synoviales provenant de 4 patients. Les données sont exprimées en moyennes ± DS. \*Une valeur de p<0,05 a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles non traitées et # une valeur de p<0,05 a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules stimulées uniquement par l'IL-1β.

## D / EFFETS DE L'A77 1726 SUR L'ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B ET DES MAP KINASES (ERK1/ERK2, p38 $\alpha$ , JNK)

L'expression et l'activité de COX-2, mais aussi la production des cytokines sont corrélées avec les activités des protéines de signalisation intracellulaire comme les MAP-kinases (ERKs, p38s et JNKs) et l'activation de NF- $\kappa$ B. En revanche, les relations entre les effets du léflunomide sur la production des cytokines et l'activation de ces différents facteurs de signalisation n'ont pas été étudiées dans le modèle de culture des cellules synoviales fibroblastiques. L'activation de NF- $\kappa$ B étant un évènement clef dans les phénomènes inflammatoires et le léflunomide ayant des propriétés anti-inflammatoires, nous avons recherché si l'A77 1726 pouvait avoir un impact sur l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR.

Nos résultats montrent que l'A77 1726 (100  $\mu$ M) inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B induite par l'IL-1 $\beta$  (figure RII-7, piste 3) en comparaison avec les cellules traitées uniquement par l'IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) (figure RII-7, ligne 2).



**Figure RII-7 :** Effet de l'A77 1726 sur l'activation de NF- $\kappa$ B induite par l'IL-1 $\beta$ . Les cellules synoviales fibroblastiques de PR ont été cultivées dans du milieu de culture seul contenant 10% de SVF pendant 24 h (piste 1) ou ont été incubées avec de l'IL-1 $\beta$  seule (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures (piste 2), ou traitées par A77 1726 (100  $\mu$ M) pendant 24 h avec toujours de l'IL-1 $\beta$  pendant les 6 dernières heures d'incubation (piste 3). Les protéines nucléaires ont été extraites et 10  $\mu$ g de chaque échantillon ont été utilisés pour évaluer la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B par une technique de retard sur gel « Electromobility Shift Assay ou EMSA ». Les complexes sont visualisés par autoradiographie. Contrôle positif = contrôle Oct2A donné par le constructeur (Roche Diagnostics) ; comp 100X = sonde non marquée concentrée 100 fois. Les expériences ont été réalisées 3 fois. Une seule des 3 expériences est présentée sur la figure.

Nous avons ensuite vérifié, dans nos conditions de culture, si l'activation des MAP-kinases pouvait être induite par l'IL-1 $\beta$  sur de courtes périodes de stimulation :

- L'activation d'ERK1/ERK2 est maximale après 5 min de stimulation par l'IL-1 $\beta$  (3 fois versus les cellules contrôles non stimulées,  $p < 0,05$ ) et diminue ensuite (2,5 fois à 15 min en comparaison avec les cellules contrôles non stimulées,  $p < 0,05$ ) (figure RII-8A). Pour les stimulations avec l'IL-1 $\beta$  pendant 30 min, 1 h et 6 h, la phosphorylation d'ERK1/ERK2 diminue de façon proportionnelle au temps.

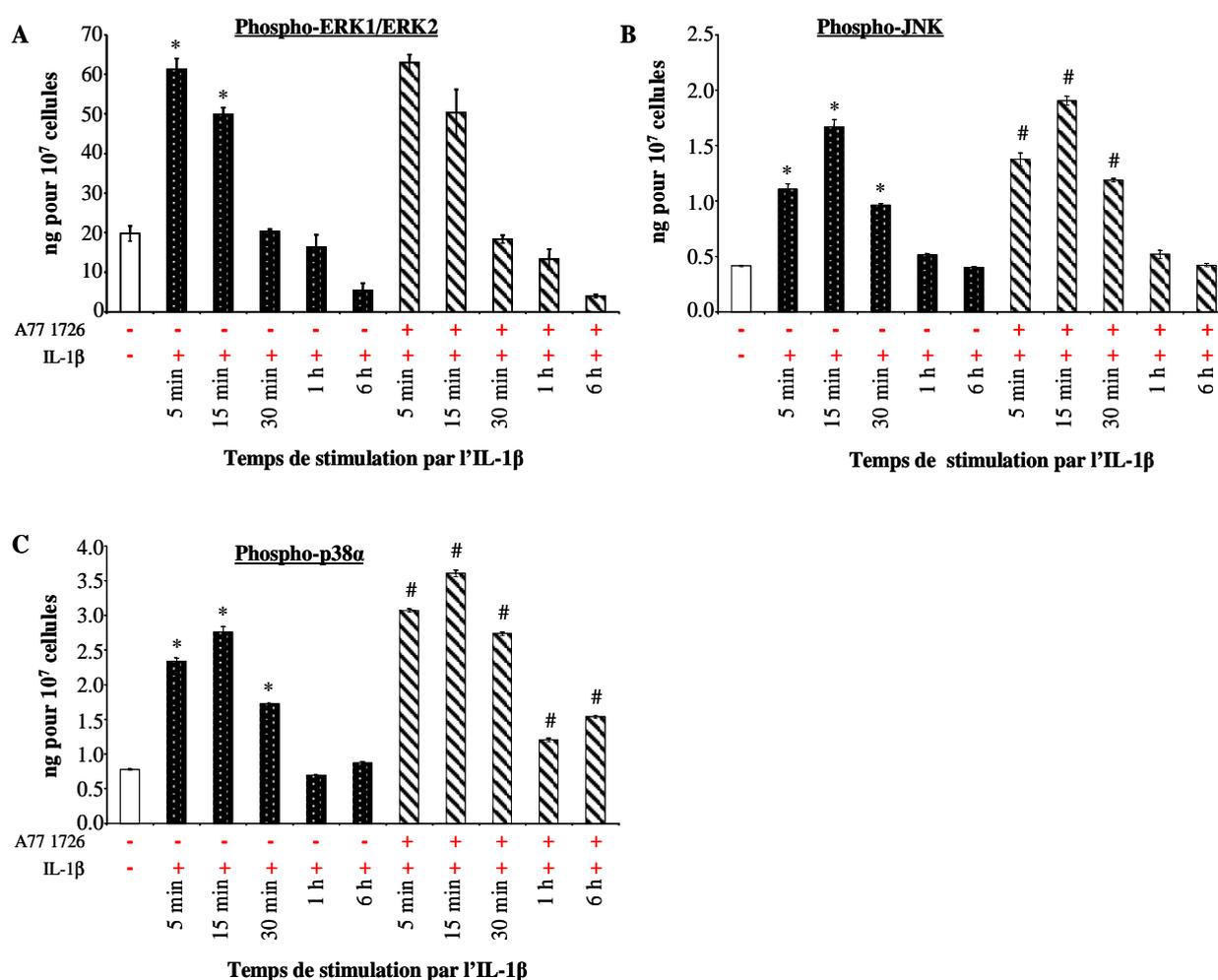
- En ce qui concerne la phosphorylation de JNK et de p38 $\alpha$  induite par l'IL-1 $\beta$ , l'effet maximal est observé après 15 min (respectivement 4 et 3,5 fois versus les cellules contrôles non stimulées,  $p < 0,05$ ) et diminue nettement après 30 min de traitement par l'IL-1 $\beta$  (respectivement 2,3 et 2,2 fois versus les cellules contrôles non stimulées,  $p < 0,05$ ) (figure RII-8B et C).

Nous avons donc étudié les effets de l'A77 1726 sur l'activation d'ERK1/ERK2, JNK et p38 $\alpha$  induite par différents temps de stimulation avec l'IL-1 $\beta$ . Les résultats montrent :

- L'A77 1726 (100  $\mu$ M) n'a pas d'effet sur la phosphorylation d'ERK1/ERK2 en présence d'IL-1 $\beta$  versus les cellules traitées uniquement avec l'IL-1 $\beta$  (figure RII-8A).

- L'A77 1726 induit une légère augmentation de la phosphorylation de JNK induite par l'IL-1 $\beta$  (maximum 1,2 fois après stimulation par l'IL-1 $\beta$  pendant 30 min versus les cellules traitées avec l'IL-1 $\beta$  seule,  $p < 0,05$ ) (figure RI-8B).

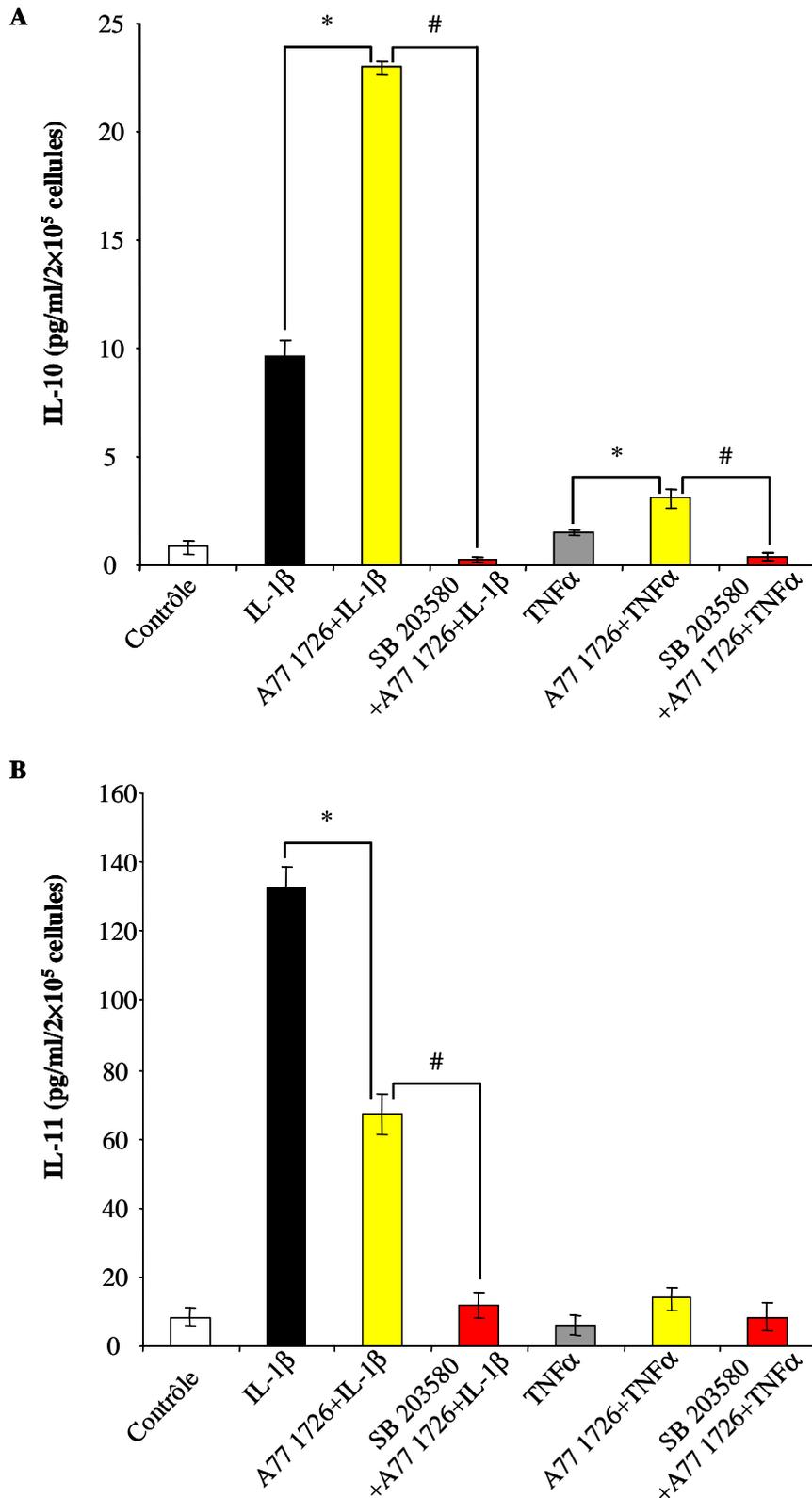
- Par contre, l'A77 1726 est responsable d'une augmentation plus importante de la phosphorylation de p38 $\alpha$  induite par l'IL-1 $\beta$ , qui est observée à tous les temps (1,3 fois après 5 min, 1,3 fois après 15 min, 1,6 fois après 30 min, 1,7 fois après 1 h et 1,8 fois après 6 h versus les cellules traitées par IL-1 $\beta$  seule,  $p < 0,05$ ) (figure RII-8C).



**Figure RII-8 :** Quantification par ELISA d'ERK1/ERK2 (A), JNK (B) et p38α (C) phosphorylées dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR stimulées par l'IL-1β et traitées par A77 1726. Les cellules ont été incubées ou non avec 100 μM d'A77 1726 pendant 24 h, puis avec de l'IL-1β (1 ng/ml) pendant 5, 15, 30 min, 1 h et 6 h. Les contrôles sont représentés par les cellules non traitées et les cellules stimulées uniquement par l'IL-1β. Les cellules ont été lysées et les MAP-kinases phosphorylées ont été quantifiées avec des kits DuoSet<sup>®</sup> IC (R&D Systems). Les kits DuoSet<sup>®</sup> IC respectifs contiennent les réactifs et Ac nécessaires pour réaliser des techniques ELISA sandwich permettant de mesurer phospho-ERK1 (T202/Y204) et phospho-ERK2 (T185/Y187), JNK1 et JNK2 phosphorylés en T183/Y185 et phospho-JNK3 (T221/Y223), et phospho-p38α (T180/Y182) dans les lysats cellulaires.

Les expériences ont été réalisées avec les cellules synoviales de 3 patients. Les données sont exprimées en moyennes ± DS. \*Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles non traitées et # une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules stimulées uniquement par l'IL-1β.

Comme p38 semblait plus impliquée dans le mécanisme d'action du léflunomide, nous avons étudié les effets d'un inhibiteur sélectif de p38, le SB 203580, sur la sécrétion d'IL-10 et d'IL-11. Les différentes expériences ont été réalisées en présence d'IL-1 $\beta$ , mais aussi en présence de TNF- $\alpha$  compte tenu de son importance dans la physiopathologie de la PR et son rôle dans l'induction de la synthèse de différentes cytokines. Dans un premier temps, nous avons montré que, contrairement à l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ne stimulait pas la production d'IL-10 et d'IL-11 en comparaison avec les cellules contrôles non stimulées (figure RII-9A et B respectivement). L'A77 1726 (100  $\mu$ M) en présence de TNF- $\alpha$  augmente la sécrétion d'IL-10 (+107% versus les cellules avec du TNF- $\alpha$  seul,  $p < 0,05$ ), mais n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion d'IL-11. Le pré-traitement avec le SB 203580 (10  $\mu$ M) inhibe totalement l'effet de l'A77 1726 sur la sécrétion d'IL-10 en présence d'IL-1 $\beta$  ou de TNF- $\alpha$  (figure RII-9A). D'autre part, le SB 203580 augmente l'effet inhibiteur de l'A77 1726 sur la sécrétion d'IL-11 et ceci uniquement en présence d'IL-1 $\beta$  (figure RII-9B).



**Figure RII-9 :** Effet d'un inhibiteur sélectif de p38 (SB 203580) sur la sécrétion d'IL-10 (A) et celle d'IL-11 (B) dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Les cellules ont été pré-incubées pendant 2 h avec 10  $\mu$ M de SB 203580 avant de rajouter de l'A77 1726 (100  $\mu$ M) pendant 24 h et de l'IL-1 $\beta$  ou du TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) pendant les 6 dernières heures. La concentration d'IL-10 et d'IL-11 a été déterminée par technique ELISA dans les surnageants de culture des cellules synoviales obtenues à partir de 3 patients. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  DS des 3 expériences. \*,#Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative en comparaison avec les cellules contrôles.

## **Discussion**

Bien que les mécanismes exacts conduisant à l'inflammation et à la destruction ostéo-articulaire dans la PR ne soient pas connus, il existe au centre de cette maladie une activation inappropriée du système immunitaire. La cascade des événements est complexe impliquant de multiples cellules immunitaires, des cytokines, dont l'activité aboutit à l'activation des acteurs cellulaires de l'articulation (synoviocytes, chondrocytes et ostéoclastes) eux mêmes responsables de la synthèse des molécules effectrices de la destruction articulaire. Un rôle central est actuellement attribué aux lymphocytes T qui seraient activés à la suite de la présentation d'un antigène arthritogène inconnu par les CPA et en particulier les cellules dendritiques. Les cellules T activées produisent une réponse de type Th1 avec synthèse d'IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et GM-CSF. Rapidement, cet emballement cytokinique touche les synoviocytes avec synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6). Il s'établit un déséquilibre entre la production de cytokines pro-inflammatoires et celle des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-1Ra, sTNFR) au profit des premières. L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  vont stimuler la production des effecteurs de la destruction (MMPs, PGs, ...), augmenter l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et permettre ainsi la migration d'autres cellules immunitaires vers la synoviale. L'IL-6 va jouer un rôle clef dans la différenciation des lymphocytes B en cellules sécrétant des anticorps. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle crucial bien mis en évidence par l'efficacité spectaculaire des nouveaux traitements anti-TNF. Il favorise la synthèse des autres cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, la production de MMPs, la prolifération des synoviocytes, l'angiogénèse et l'ostéoclastogénèse. A cet emballement des phénomènes immunitaires s'opposent des mécanismes de défense comme les cellules Treg, la synthèse d'inhibiteurs des MMPs (TIMPs) ou les différentes cytokines anti-inflammatoires. L'IL-10, cytokine immunorégulatrice, inhibe la prolifération des lymphocytes T, certaines fonctions macrophagiques et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

D'autre part les PGs, médiateurs lipidiques issus de la voie des cyclo-oxygénases, participent activement à la réaction inflammatoire. Dans la PR, la PGE<sub>2</sub> favorise la destruction articulaire en augmentant la prolifération des précurseurs ostéoclastiques, en augmentant la synthèse des MMPs et de l'IL-6, et en favorisant l'angiogénèse. En partie sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires, l'expression de COX-2 est élevée dans le tissu synovial de PR.

Cependant l'activation des différents acteurs cellulaires et l'activité des médiateurs de l'inflammation comme les cytokines nécessitent la transmission d'un signal intracellulaire. Les principales voies de signalisation impliquées dans l'inflammation sont les voies des MAP kinases, de la PI3K, de JAK/STAT et de NF- $\kappa$ B. Par exemple, NF- $\kappa$ B intervient dans l'expression des cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, dans la différenciation des lymphocytes T et B et dans l'expression de COX-2. Inversement l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  activent NF- $\kappa$ B pour aboutir à une boucle d'auto-entretien de la réponse inflammatoire. Les trois familles de MAP kinases sont exprimées

dans le tissu synovial de PR. L'activation de p38 induit la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion, des MMPs et de la COX-2. Ainsi, ces différentes voies de signalisation représentent une nouvelle cible thérapeutique.

Enfin, la destruction articulaire est liée à la formation du pannus synovial conséquence d'un infiltrat de cellules de l'inflammation et d'une multiplication des cellules synoviales. L'hypothèse avancée pour expliquer cette hyperplasie synoviale est un défaut des phénomènes d'apoptose, comme en témoignent la résistance des synoviocytes à l'apoptose médiée par Fas, leurs caractéristiques pseudo-néoplasiques, une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Flip et la présence de mutations de p53 dans le tissu synovial.

Notre travail réalisé dans le laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire de la Faculté de Pharmacie de Limoges s'intègre dans les différents domaines d'intérêt de l'équipe, à savoir la PR et ses traitements, le modèle de culture de cellules synoviales de PR mis en place depuis plusieurs années et ayant fait l'objet de publications (Bonnet et al., 1995 ; Liagre et al., 1997a ; Liagre et al., 1997b ; Vergne et al., 1998 ; Liagre et al., 1999 ; Lapique et al., 2000 ; Liagre et al., 2002) et enfin les stéroïdes végétaux et notamment la diosgénine. La diosgénine est une saponine stéroïdienne, extraite à partir de tubercule de dioscorée (*Dioscorea villosa*). Elle a différentes actions biologiques : augmentation de la sécrétion du cholestérol biliaire (Accatino et al., 1998 ; Amigo et al., 1999), des propriétés antioxydantes (Turchan et al., 2003), une activité anti-tumorale avec induction de différenciation et d'apoptose (Wang et al., 2001 ; Cai et al., 2002 ; Cheng et al., 2003) et une activité anti-ostéoporotique (Higdon et al., 2001) en partie grâce à des propriétés angiogéniques (Yen et al., 2005).

Dans le laboratoire, différents travaux ont montré que la diosgénine était capable d'altérer le cycle cellulaire, d'induire l'apoptose et l'expression de COX-2 dans différents types de cellules cancéreuses (Moalic et al., 2001a ; Corbière et al., 2003 ; Corbière et al., 2004a ; Corbière et al., 2004b ; Léger et al., 2004 ; Liagre et al., 2005). Compte tenu de l'importance de ces deux éléments dans la physiopathologie de la PR, nous avons consacré la première partie du travail à l'étude de l'apoptose et de l'expression de COX-2 dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR en culture traitées par la diosgénine.

La deuxième partie du travail est consacrée à la compréhension des mécanismes d'action du léflunomide, un traitement immunomodulateur ayant prouvé son efficacité dans le traitement de la PR. Outre son action de blocage de la prolifération des lymphocytes T, l'efficacité du léflunomide est probablement due à différentes activités à plusieurs niveaux de la cascade inflammatoire et immunologique. En plus de ses actions déjà décrites sur la production de PGE<sub>2</sub>, IL-6 et IL-1Ra, nous avons étudié ses effets sur l'IL-8, l'IL-10, l'IL-11 et le sTNFRI dans le modèle de culture des

cellules synoviales fibroblastiques de PR. Puis nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation pouvant intervenir dans les effets du léflunomide sur l'IL-10 et l'IL-11.

## I / PREMIERE PARTIE

Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois une inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose des cellules synoviales fibroblastiques de PR traitées par la diosgénine. Les résultats en microscopie optique montrent des modifications morphologiques des cellules synoviales qui deviennent arrondies, séparées des cellules adjacentes avec condensation du cytoplasme et apparition de filaments cytoplasmiques. D'autre part, la diosgénine est responsable d'une augmentation très importante de l'expression de COX-2, associée à une forte production de PGE<sub>2</sub>. Ces résultats suggèrent une association entre apoptose et surexpression de COX-2 dans notre modèle de culture.

L'apoptose est une forme contrôlée et organisée de mort cellulaire, différente du processus pathologique de nécrose survenant à la suite d'un dommage cellulaire. L'apoptose se caractérise par des stimuli initiateurs, des signaux intra-cellulaires et nécessite l'expression d'un certain nombre de gènes bien définis qui accomplissent un programme cellulaire. En général, l'apoptose comporte des activations séquentielles avec une cascade protéolytique d'enzymes appelées caspases (Thornberry, 1998). L'activation de la caspase-3 est considérée comme un marqueur d'apoptose et comme un point de non retour dans la cascade de signalisation pro-apoptotique. Nos résultats montrent que la mort des cellules synoviales fibroblastiques traitées par la diosgénine est liée à l'activation de la cascade des caspases, puisque la diosgénine augmente l'activité de la caspase-3.

Il existe deux principales voies caspases-dépendantes de signalisation de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). En ce qui concerne la voie intrinsèque, la mitochondrie joue un rôle vital dans la cellule. Un dysfonctionnement majeur de la mitochondrie peut déclencher l'apoptose. La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie provoque un relargage dans le cytoplasme de cytochrome c, de procaspases-2, -3 et -9, des protéines Smac/Diablo, d'AIF et de l'endonucléase G. Il y a ensuite formation de l'apoptosome, constitué du cytochrome c, de la protéine Apaf-1 et de la procaspase-9 (Figure 13) (Ravagnan et al., 2002). Il en découle une activation de la caspase-9, puis de la caspase-3. D'autre part, la perméabilisation de la membrane interne conduit à un changement du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Dans notre étude, la diosgénine induit également une chute du  $\Delta\Psi_m$ , constatation plaidant pour l'activation de la voie mitochondriale dans l'apoptose des cellules synoviales traitées par la diosgénine. Récemment, Itoh et al. (2004) ont montré l'implication

cruciale de la mitochondrie dans l'apoptose médiée par Fas des cellules synoviales fibroblastiques, avec chute du  $\Delta\Psi_m$ , relargage de cytochrome c et activation des caspases-9 et -3.

Le processus apoptotique déclenché par la diosgénine aboutit à l'activation de la caspase-3. Cependant l'activation de la caspase-3 peut également être liée à l'activation de la voie extrinsèque des récepteurs de mort. En effet, l'interaction de la glycoprotéine Fas avec son ligand (FasL) ou l'interaction du TNF- $\alpha$  avec son récepteur TNF-RI permet l'activation de la caspase-8 ou -10, puis l'activation de la caspase-3 (figure 12) (Gupta, 2003). Or, les synoviocytes fibroblastiques expriment la protéine Fas, mais sont résistants à l'apoptose médiée par Fas. En effet, les cytokines pro-inflammatoires majeures impliquées dans la physiopathologie de la PR (IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) sont capables d'inhiber l'apoptose médiée par Fas *in vitro* dans les cellules synoviales (Wakisaka et al., 1998), peut-être par l'intermédiaire de la protéine Flip anti-apoptotique (Perlman et al., 2001 ; Schedel et al., 2002 ; Chen et al., 2002). En effet, la protéine Flip est capable d'inhiber l'activation de la caspase-8. Or l'expression de l'ARNm et de la protéine Flip est plus importante dans le tissu synovial de PR comparé à l'arthrose, notamment au niveau des sites d'érosion du cartilage (Perlman et al., 2001 ; Schedel et al., 2002). Alors que les phénomènes apoptotiques sont rares et l'expression de Flip élevée dans le tissu synovial de PR précoces, les résultats s'inversent après traitement avec diminution de l'expression de la protéine Flip et augmentation de l'apoptose (Catrina et al., 2002). Ainsi, les traitements pourraient moduler l'expression de Flip. Bai et al. (2004) ont montré que, dans les cellules synoviales fibroblastiques, la résistance à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  était liée à l'activation de NF- $\kappa$ B et l'augmentation de l'expression de Flip.

D'autre part, la voie extrinsèque des récepteurs de mort peut être amplifiée par la voie mitochondriale grâce au recrutement de la protéine Bid par la caspase-8. La caspase-8 clive la protéine Bid, ce qui lui permet de s'insérer dans la membrane mitochondriale et de provoquer la libération de cytochrome c, l'activation de la caspase-9, puis de la caspase-3 (Wang et al., 1996). Ainsi la protéine Bid peut relier les deux voies d'induction de l'apoptose. Itoh et al (2004) ont d'ailleurs mis en évidence dans leur étude le clivage de Bid après liaison de Fas avec son ligand dans les synoviocytes. Cependant, dans les cellules 1547, la diosgénine active bien la caspase-8 sans induire le clivage de Bid et le relargage de cytochrome c (Corbière et al., 2004a et 2004b). Les deux voies pourraient donc agir indépendamment l'une de l'autre sans que la protéine Bid ne soit impliquée.

L'apoptose des cellules synoviales induite par la diosgénine a été quantifiée par étude de la fragmentation de l'ADN. Le ratio apoptotique, qui est le rapport de la fragmentation de l'ADN des cellules traitées et celle des cellules témoins, augmente de façon significative au cours du temps pour les cellules traitées par diosgénine.

Curieusement, une surexpression de COX-2 est associée au phénomène d'apoptose des cellules synoviales traitées par diosgénine. Ces résultats sont contradictoires avec ceux rapportés dans les études sur des cellules cancéreuses, où l'expression de COX-2 prévient l'apoptose induite par d'autres molécules pro-apoptotiques. La COX-2 est surexprimée dans un certain nombre de pathologies cancéreuses, comme le cancer du colon et a même été soupçonnée de jouer un rôle initiateur ou favorisant dans les processus tumoraux (Prescott, 2000 ; Steinbach et al., 2000).

Cependant, Kemick et al. (1989) ont montré une association entre l'induction de l'apoptose des chondrocytes et l'augmentation de PGE<sub>2</sub>. Plus récemment, Pelletier et al. (2001) ont trouvé que l'apoptose des chondrocytes *in situ* dans un modèle d'arthrose expérimentale était dépendante des caspases et était influencée par l'augmentation du taux de COX-2.

Concernant les synoviocytes, une étude a montré que le NO était capable d'induire la mort des synoviocytes par l'intermédiaire de l'augmentation de l'expression de COX-2 et la synthèse de PGE<sub>2</sub>, avec modification du potentiel de membrane mitochondrial et activation de la caspase-3 (Jovanovic et al., 2002). Ces résultats sont tout à fait en accord avec nos résultats sur l'effet de la diosgénine dans les synoviocytes humains en culture.

Dans le laboratoire, d'autres études ont montré une association entre apoptose et surexpression de COX-2. En effet, l'apoptose induite par la diosgénine dans différentes lignées cellulaires cancéreuses était à chaque fois associée à une augmentation de l'expression de COX-2 et de la production de PGE<sub>2</sub> (Moalic et al., 2001a ; Léger et al., 2004). Très récemment, Liagre et al. (2005) ont démontré que la lignée érythroleucémique K562, déficiente en COX-2, était sensible à l'effet pro-apoptotique de la diosgénine. Cette étude a été réalisée en parallèle avec une autre lignée érythroleucémique (HEL) sur laquelle l'effet apoptotique de la diosgénine était corrélé à une surexpression de COX-2.

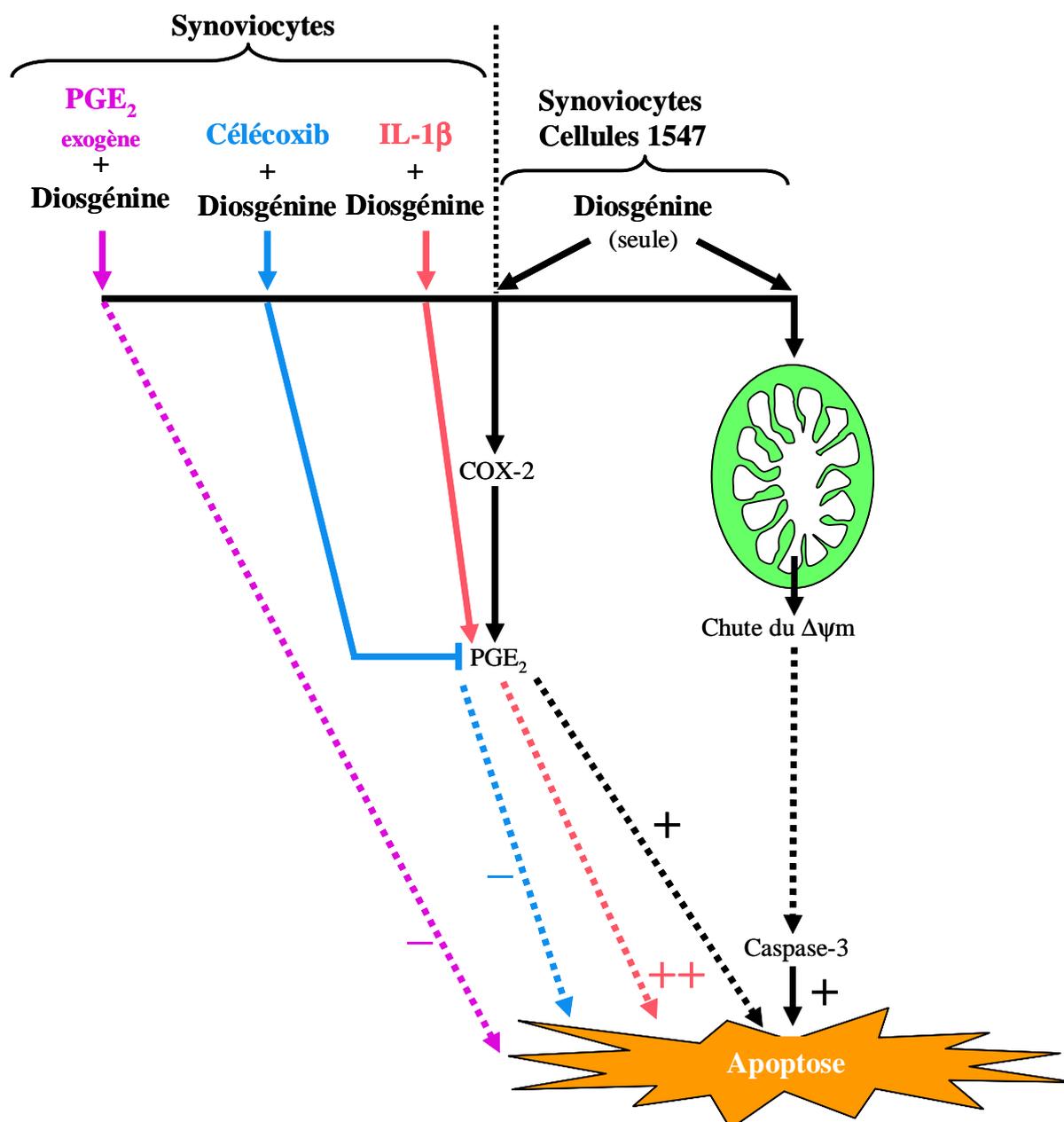
Tous ces travaux montrent que les effets de COX-2 et par conséquent de PGE<sub>2</sub> dans la régulation de l'apoptose induite par la diosgénine reflètent les différences de réponses entre divers types cellulaires. C'est pour cette raison que nous avons centré notre étude sur COX-2 et essayé de répondre à la question suivante : la surexpression de COX-2 est-elle une cause ou une conséquence de l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules synoviales de PR ?

Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 ou coxibs sont des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens. L'un d'entre eux, le célécoxib à forte concentration (> 10 µM) entraîne l'apoptose des cellules synoviales fibroblastiques de PR (Kusunoki et al., 2002), mais également l'apoptose des cellules d'adénocarcinome du colon (Yamazaki et al., 2002b). En utilisant une concentration de célécoxib sélective sur COX-2 (1 µM) (Warner et al., 1999), nous avons montré que l'inhibition de COX-2 par le célécoxib entraînait une importante diminution de l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Ceci se vérifie même en présence de

PGE<sub>2</sub> exogène, puisque l'addition de PGE<sub>2</sub> exogène seule ou en présence de célécoxib avant traitement par la diosgénine réduit la fragmentation de l'ADN par rapport aux contrôles. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Jovanovic et al. (2002), où l'inhibition sélective de COX-2 par le NS-398 inhibait de façon significative l'apoptose induite par le nitroprussiate de sodium dans les synoviocytes humains d'arthrose, même en présence de PGE<sub>2</sub> exogène.

D'autre part, après stimulation des cellules par l'IL-1 $\beta$ , qui augmente l'expression de COX-2, nos résultats montrent que le traitement par diosgénine induit une importante augmentation de l'apoptose des synoviocytes de PR dans le temps, avec une augmentation de la concentration de PGE<sub>2</sub>, en comparaison avec les cellules traitées par diosgénine seule (Figure 15). Ces expériences confirment que la modulation de COX-2 est associée à l'apoptose induite par la diosgénine des cellules synoviales. Cependant, comme la PGE<sub>2</sub> exogène seule n'induit aucun phénomène d'apoptose des synoviocytes, le mécanisme exact par lequel la PGE<sub>2</sub> endogène sensibiliserait les synoviocytes de PR à l'apoptose reste inconnu. Comme la PGE<sub>2</sub> endogène est synthétisée à partir de l'acide arachidonique endogène, une des hypothèses pourrait être basée sur la participation de cet acide gras dans l'apoptose induite par la diosgénine. Cette hypothèse pourrait expliquer les différents effets observés entre PGE<sub>2</sub> endogène et exogène.

Une autre hypothèse pourrait reposer sur les récepteurs activés par les inducteurs de la prolifération des peroxyosomes ou PPARs qui font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes, de la vitamine D et de l'acide rétinoïque (Gelman et al., 1999 ; Youssef et Badr, 2002). Les PPARs sont exprimés dans les synoviocytes de PR (Fahmi et al., 2002). Différents ligands naturels comme les prostaglandines des séries D et J sont capables de se lier et d'activer les PPARs (Yu et al., 1995) et notamment la 15-deoxy-Delta(12,14)PGJ<sub>2</sub> (15-d-PGJ<sub>2</sub>) est un ligand de PPAR $\gamma$  (Maxey et al., 2000).



**Figure 15** : Schéma résumant les événements dans l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. L'effet de la diosgénine est associé à une chute du  $\Delta\Psi_m$ , une activation de la caspase-3 et une fragmentation de l'ADN. La diosgénine est responsable d'une inhibition de la prolifération des synoviocytes avec induction d'apoptose associée à une augmentation de l'expression de la protéine COX-2. Le célécoxib provoque une importante diminution de l'apoptose induite par la diosgénine et l'IL-1 $\beta$  l'amplifie. L'apoptose des cellules synoviales induite par la diosgénine est donc associée à la modulation de COX-2. Cependant, la PGE<sub>2</sub> exogène n'induit pas d'apoptose des cellules synoviales. Ainsi, la PGE<sub>2</sub> endogène sensibilise les cellules synoviales à la mort par un mécanisme encore inconnu.

Les agonistes des PPARs ont une activité anti-tumorale associée à l'induction du processus apoptotique dans différents types cellulaires (Yang et Frucht, 2001 ; Nunez et al., 2005 ; Shen et al., 2005) et *in vivo* dans le cancer gastrique chez la souris (Lu et al., 2005). Ainsi, dans les cellules synoviales, la diosgénine augmente l'expression de COX-2 et le taux de PGE<sub>2</sub>, mais pourrait également augmenter la production de 15-d-PGJ<sub>2</sub>, qui elle-même pourrait induire l'apoptose en activant les PPARs. En effet, la 15-d-PGJ<sub>2</sub> et la troglitazone, un autre agoniste de PPAR $\gamma$ , induisent l'apoptose des synoviocytes *in vitro* (Kawahito et al., 2000). Cependant, dans les cellules 1547, la diosgénine n'entraîne pas l'activation de PPAR $\gamma$  (Corbière et al., 2004b). Dans les cellules synoviales fibroblastiques, la 15-d-PGJ<sub>2</sub> entraîne une activation de PPAR $\gamma$  et une inhibition de l'expression des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Ji et al., 2001). Par contre, ces auteurs n'ont pas observé d'inhibition de la prolifération des synoviocytes, ni de phénomène d'apoptose.

## II / DEUXIEME PARTIE

Dans la deuxième partie du travail, nous avons étudié pour la première fois les effets de l'A77 1726, métabolite actif du léflunomide, sur la sécrétion des interleukines-8, -10 et -11 et du sTNFR1 par les cellules synoviales fibroblastiques de PR en culture. Nous avons également confirmé ses actions sur l'IL-6 et l'IL-1Ra, comme l'avaient déjà décrit certains auteurs dans les synoviocytes (Cutolo, 2002 ; Burger et al., 2003 ; Palmer et al., 2004) ou dans d'autres types cellulaires (Deage et al., 1998 ; Miljkovic et al., 2002).

L'IL-6 et l'IL-8 sont deux cytokines importantes dans la physiopathologie de la PR. L'IL-6 induit la différenciation des lymphocytes B et la prolifération des cellules synoviales (Mihara et al., 1995 ; Wong et al., 2003). Elle favorise l'ostéoclastogénèse et donc la résorption osseuse péri-articulaire (Kotabe et al., 1996). L'IL-8 intervient dans l'angiogénèse au sein du pannus synovial (Badolato et al., 1996). Parmi les chimiokines, l'IL-8 est un puissant inducteur du recrutement des polynucléaires neutrophiles (Badolato et al., 1996).

Dans notre étude, les faibles concentrations d'A77 1726 (0,1-10  $\mu$ M) augmentent la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$  dans les cellules synoviales rhumatoïdes. Aux fortes doses (50 et 100  $\mu$ M), l'A77 1726 n'a aucun effet sur les taux d'IL-8. Dans la littérature, il existe une seule étude qui montre que l'A77 1726 est responsable d'une diminution dose-dépendante du taux d'ARNm du récepteur de type A de l'IL-8 dans une lignée de cellules épidermiques humaines (Mirmohammadsadegh et al., 1998). D'autre part, comme cela avait été décrit antérieurement (Cutolo et al., 2003 ; Burger et al., 2003), nous avons observé une inhibition dose-dépendante de la

sécrétion d'IL-6 stimulée par l'IL-1 $\beta$  dans nos conditions de culture des cellules synoviales rhumatoïdes.

A côté des cytokines pro-inflammatoires, les inhibiteurs naturels des cytokines comme l'IL-1Ra et le sTNFRI sont présents dans le liquide et la membrane synoviale de PR et dans les cultures de synoviocytes fibroblastiques (Roux-Lombard et al., 1992 et 1993 ; Jovanovic et al., 1998 ; Maret et al., 2004). L'abondance relative des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs inhibiteurs semble déterminer l'activité de la PR (Dayer et al., 1992). Ainsi un traitement efficace de la PR devrait pouvoir faire basculer la balance qui penche du côté de l'inflammation avec abondance de cytokines pro-inflammatoires vers le côté opposé représenté par les facteurs inhibiteurs du processus inflammatoire trop peu représentés dans la maladie.

De la même façon que dans le travail de Palmer et al. (2004), l'A77 1726 est responsable d'une augmentation dose-dépendante de la sécrétion d'IL-1Ra stimulée par l'IL-1 $\beta$  dans les cellules synoviales fibroblastiques, avec un maximum à la concentration de 100  $\mu$ M. Par contre, l'A77 1726 quelle que soit la concentration n'a aucun effet sur le taux de sTNFRI même après stimulation par l'IL-1 $\beta$ .

Nous avons également étudié les effets du léflunomide sur la sécrétion d'IL-10 et d'IL-11. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont la principale action est l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T et les monocytes/macrophages (De Waal Malefyt et al., 1991a et b ; Katsikis et al., 1994 ; Morita et al., 1998). L'IL-10 stimule aussi l'expression du sTNFR par les monocytes (De Waal Malefyt et al., 1991b) et augmente la production d'IL-1Ra (De Waal Malefyt et al., 1993 ; Jenkins et al., 1994). Enfin, Morita et al (2001) ont montré que l'IL-10 était capable d'inhiber la production d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 et interféron- $\gamma$  dans les cultures de tissu synovial fraîchement isolé. Une étude récente a montré que la protéine de choc thermique hsp 70 mycobactérienne était capable d'induire la production d'IL-10 associée à une diminution de TNF- $\alpha$  dans les cellules synoviales rhumatoïdes (Detanico et al., 2004). Compte tenu de ses propriétés anti-inflammatoires, l'IL-10 a été testée comme agent biologique thérapeutique dans la PR. Chez les patients souffrant de PR, l'efficacité de l'IL-10 reste limitée, même en association avec le méthotrexate (Keystone et al., 1998). Cependant, ces résultats ne permettent pas de rayer définitivement cette cytokine de la recherche thérapeutique dans la PR.

En effet, Chang et al. (2004) ont montré qu'une protéine de fusion IL-1Ra/IL-10 supprimait les arthrites et l'inflammation synoviale dans le modèle d'arthrite à l'adjuvant chez le rat. Ainsi, les résultats que nous avons obtenus avec le léflunomide sont intéressants puisque l'A77 1726 à fortes concentrations provoque une importante augmentation du taux d'IL-10, avec un maximum observé à 100  $\mu$ M d'A77 1726. D'autre part, nos résultats montrent qu'à 100  $\mu$ M d'A77 1726, il existe également une augmentation de la sécrétion d'IL-1Ra.

Mirmohammadsadegh et al. (1998) ont montré que l'A77 1726 induisait l'expression du gène du récepteur de l'IL-10 dans une lignée de cellules épidermiques. Korn et al. (2004) ont obtenu des résultats très proches des nôtres, puisque dans leur étude l'A77 1726 entraîne une augmentation de l'IL-10 dans une lignée T spécifique et dans des cultures de cellules microgliales. Par contre, à notre connaissance, les effets de l'A77 1726 sur la sécrétion d'IL-10 par les cellules synoviales rhumatoïdes n'avaient pas encore été étudiés.

Nous avons également observé l'effet différentiel de l'A771726 sur la sécrétion d'IL-11 par les cellules synoviales fibroblastiques. En effet, nos expériences montrent que l'IL-1 $\beta$  augmente de façon très nette la sécrétion d'IL-11 et l'A77 1726 aux faibles concentrations (0,1 à 10  $\mu$ M) augmente la sécrétion d'IL-11 stimulée par l'IL-1 $\beta$  alors que les fortes concentrations (50 et 100  $\mu$ M) la diminue (moins 60% pour les 2 concentrations versus les cellules contrôles stimulées par l'IL-1 $\beta$ ). Le rôle de l'IL-11 dans la physiopathologie de la PR reste controversé. Quel que soit son rôle délétère ou non dans la physiopathologie de la maladie, l'IL-11 est une cytokine abondante dans la membrane et le liquide synovial (Okamoto et al., 1997 ; Hermann et al., 1998). Dans la littérature, l'IL-1 seule (Taki et al., 2000) ou l'IL-1 en synergie avec le TNF- $\alpha$  stimule la production d'IL-11 dans les cultures de cellules synoviales rhumatoïdes (Mino et al., 1998). Plusieurs données dans la littérature permettent de lui attribuer un rôle plutôt anti-inflammatoire. En effet, dans le tissu synovial de PR, l'IL-11 exogène inhibe la production de TNF- $\alpha$  uniquement en présence de récepteur soluble de l'IL-11 (Hermann et al., 1998). Dans les mêmes conditions, elle inhibe la production spontanée de métalloprotéinases et inversement augmente celle de TIMPs (Hermann et al., 1998). Dans les cultures de macrophages péritonéaux, l'IL-11 inhibe la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B induite par le LPS (Trepicchio et al., 1997) et diminue la translocation de NF- $\kappa$ B stimulée par le TNF- $\alpha$  dans les cultures de cellules synoviales humaines d'arthrose (Alaeddine et al., 1999). Inversement, un certain nombre d'activités de l'IL-11 permettraient de la classer plutôt dans les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'IL-11 provoque l'ostéoclastogenèse et pourrait ainsi contribuer à la destruction articulaire observée dans la PR. Dans l'arthrite au collagène de la souris, le traitement par l'IL-11 recombinante humaine n'est efficace que lors de la phase précoce de l'arthrite (Walsley et al., 1998), et chez l'homme une étude randomisée contrôlée contre placebo échoue à montrer l'efficacité thérapeutique de l'IL-11 dans la PR, même si les résultats d'une seule étude sont toujours discutables (Moreland et al., 2001). D'autre part, l'IL-11 est classée dans la grande famille des cytokines de type IL-6, cette classification étant basée sur des similarités fonctionnelles avec l'IL-6 et l'utilisation partagée d'une protéine, la glycoprotéine 130 (gp 130), dans leurs récepteurs (Kishimoto et al., 1994 ; Heinrich et al., 2003). Comme cela a été décrit plus haut, l'A77 1726 inhibe la sécrétion d'IL-6 dans nos conditions de culture, mais également dans les autres études (Miljkovic et al., 2002 ; Burger et al., 2003). Nous avons montré pour la première fois

que l'A77 1726 (100  $\mu$ M) diminuait également la sécrétion d'IL-11 dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. Le même effet de l'A77 1726 sur la sécrétion de ces deux cytokines pourrait s'expliquer par les similarités entre leurs structures.

En ce qui concerne le mécanisme d'action du léflunomide sur la sécrétion d'IL-11, il semblerait que celui-ci ne passe pas par l'action bien connue du léflunomide sur la DHODH. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'IL-11 par le léflunomide n'est pas annulée par le rajout dans le milieu de culture d'uridine, à l'inverse de ce que Burger et al. (2003) avait décrit sur la sécrétion d'IL-6.

Eicosanoïdes et prostanoides sont des médiateurs lipidiques qui jouent un rôle important dans l'inflammation. Ils sont présents et à des taux importants dans le liquide synovial et le pannus synovial qui caractérise la PR. Il s'agit surtout de la prostaglandine  $E_2$  produite entre autres par les cellules synoviales fibroblastiques (Liagre et al., 1997 ; Vergne et al., 1998 ; Liagre et al., 1999 ; Martel-Pelletier et al., 2003 ; Martel-Pelletier et al., 2004). Le léflunomide est capable de diminuer le taux de  $PGE_2$  en inhibant directement l'activité de COX-2, avec par contre à fortes doses une augmentation de l'expression de la protéine COX-2 (Hamilton et al., 1999). Nos expériences montrent que l'A77 1726 à 100  $\mu$ M augmente l'expression de la protéine COX-2. En ce qui concerne l'activité, à partir de 10  $\mu$ M, l'A77 1726 diminue la production de  $PGE_2$  stimulée par l'IL-1 $\beta$ . Cette inhibition est quasi-totale (98%) à 100  $\mu$ M. Ces résultats sont identiques à ceux de Burger et al. (2003) qui ont également mis en évidence une diminution du taux de  $PGE_2$  produite par les synoviocytes rhumatoïdes en culture après traitement par l'A77 1726. Nous avons également observé que l'A77 1726 était responsable d'une diminution de la production de  $PGE_2$  après de courtes périodes de stimulation par l'IL-1 $\beta$  (5, 15 et 30 min). L'étude de Mino et al. (1998) montre que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  stimulent de façon synergique la production d'IL-11 qui est dépendante de la  $PGE_2$  dans les cellules synoviales en culture. Dans nos expériences, à fortes concentrations (50 et 100  $\mu$ M), l'A77 1726 entraîne une diminution de la production de  $PGE_2$  et également d'IL-11. D'autre part, Taki et al. (2000) ont étudié les effets inhibiteurs différentiels de l'indométacine et de la dexaméthasone sur la production d'IL-11 dans les cellules synoviales rhumatoïdes. Ces deux traitements, responsables d'une diminution de la synthèse de  $PGE_2$ , diminuent également la production d'IL-11 dans les cultures de cellules synoviales suggérant que les taux élevés d'IL-11 dans le tissu synovial pourraient être liés en partie à la présence en quantité importante de  $PGE_2$ .

Notre travail montre que, en présence de faibles doses d'A77 1726 (0,01 à 1  $\mu$ M), la production endogène de  $PGE_2$  stimulée par l'IL-1 $\beta$  n'est pas abolie et la sécrétion d'IL-11 est augmentée de façon dose-dépendante. Lorsque la production de  $PGE_2$  endogène est totalement

inhibée sous l'effet de fortes doses d'A77 1726 (50 et 100  $\mu$ M), la sécrétion d'IL-11 diminue de façon drastique en comparaison des cellules contrôles. D'autres investigations sont nécessaires afin de clarifier le mécanisme d'inhibition de la production d'IL-11 par le léflunomide, médicament que l'on peut également classer dans les inhibiteurs de la synthèse de PGE<sub>2</sub> comme la dexaméthasone et l'indométacine utilisées par Taki et al. (2000).

Les MAP kinases représentent une cible très attractive dans le traitement de la PR car elles interviennent dans la régulation de la prolifération cellulaire, dans l'apoptose, dans l'expression des cytokines (Neff et al., 2003) et la production des métalloprotéinases (Han et al., 2001). Notamment la synthèse des cytokines pro-inflammatoires est contrôlée par la voie des MAP kinases (Lee et al., 1994; Suzuki et al., 2000). Les trois grandes familles de MAP kinases sont : ERK, JNK et p38. Elles diffèrent par leur spécificité de substrat et par leurs réponses au stress variables d'un type cellulaire à l'autre et variables en fonction des influences environnementales. Ces MAP kinases sont exprimées dans le tissu synovial de PR et dans les cellules synoviales rhumatoïdes en culture (Han et al., 1999 ; Schett et al., 2000 ; Hammaker et al., 2003). Ces différents auteurs ont utilisé des analyses par immuno-histochimie et western blot pour détecter les formes activées phosphorylées des MAP kinases, alors que nous avons utilisé dans nos expériences une méthode quantitative de type ELISA. Nos résultats montrent que le traitement par 100  $\mu$ M d'A77 1726 n'a aucun effet sur l'activation d'ERK. Par contre, il existe une légère augmentation de la phosphorylation de JNK stimulée par l'IL-1 $\beta$  et surtout une nette activation de p38 $\alpha$  toujours stimulée par l'IL- $\beta$ . La corrélation entre l'effet de l'A77 1726 sur la production de cytokines et l'activation des MAP kinases n'a pas été beaucoup étudiée dans les cellules synoviales fibroblastiques en culture. Seul le travail récent de Migita et al. (2004) porte sur le sujet et montre que l'A77 1726 inhibe l'activation des MAP kinases JNK1/2 et seulement partiellement celle des MAP kinases p38 et ERK1/2 induites par l'IL-1 $\beta$  dans les synoviocytes fibroblastiques de PR en culture. Ces effets de l'A77 1726 sur les voies de signalisation des MAP kinases s'associent à une diminution importante de la synthèse des métalloprotéinases de type 1, 3 et 13. Ces résultats sont différents des nôtres, alors que la dose utilisée d'A77 1726 était identique à 100  $\mu$ M. La régulation de la production des cytokines dans la PR est directement associée avec l'activation des MAP kinases (Sweeney et Firestein, 2004). Dans notre étude, l'A77 1726 est responsable d'une augmentation importante de la sécrétion d'IL-10 et d'IL-1Ra par les cellules synoviales rhumatoïdes. Or dans les monocytes humains, le traitement avec de l'IL-10 entraîne une augmentation de la production d'IL-1Ra (de Waal Malefyt et al., 1993 ; Jenkins et al., 1994). D'autre part, Foey et al. (1998) ont montré que l'inhibition de p38 diminuait de façon très importante la synthèse d'IL-10 dans les monocytes humains. Nos résultats vont dans le même sens et ainsi l'activation de p38 que nous avons observée sous A77 1726 pourrait expliquer l'importante sécrétion d'IL-10 que nous obtenons après traitement par 100  $\mu$ M

d'A77 1726. Pour vérifier cela, nous avons recommencé les expériences avec traitement au préalable par un inhibiteur sélectif de p38. Les résultats montrent que celui-ci abolit totalement l'effet de l'A77 1726 sur la sécrétion d'IL-10.

La relation entre l'expression de COX-2 et l'activation de la voie de signalisation de p38 est actuellement bien établie. Des études récentes ont montré que l'inhibition de l'expression de COX-2 était directement corrélée avec l'inhibition de la cascade des MAP kinases incluant p38 dans les cellules synoviales rhumatoïdes (Westra et al., 2004 ; Fumimori et al., 2004 ; Crofford et al., 2005). Dans notre étude, l'A77 1726 (100  $\mu$ M) augmente la phosphorylation de la kinase p38 stimulée par l'IL-1 $\beta$ . Cette activation de p38 est associée à une augmentation de l'expression de la protéine COX-2. Par contre, la production de PGE<sub>2</sub> est totalement inhibée par l'A77 1726 sans qu'il y ait d'inhibition de l'activation de p38. Cette action anti-inflammatoire du léflunomide est probablement liée à une inhibition de l'activité de la protéine COX-2 en accord avec les résultats de Hamilton et al. (1999) qui avaient montré une inhibition de l'activité enzymatique de COX-2 dans un essai sur sang total humain.

D'autre part nos résultats montrent que l'A77 1726 est un puissant inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B induite par l'IL-1 $\beta$ , comme cela a été déjà décrit par d'autres auteurs (Manna et Aggarwal, 1999 ; Manna et al., 2000). En effet, dans une lignée de cellules T (Jurkat), le léflunomide bloque l'activation de NF- $\kappa$ B stimulée par le TNF, mais également induite par d'autres agents inflammatoires comme l'ester de phorbol, le LPS et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Manna et Aggarwal, 1999). Manna et al. (2000) ont ensuite montré dans les mêmes cellules que le léflunomide pouvait bloquer la transduction du signal du TNF en supprimant l'activation d'IKK et donc la phosphorylation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  aboutissant à l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B. Dans cette étude, le léflunomide inhibe également l'activation de JNK et d'AP-1 induite par le TNF. Tous ces effets sont annulés par l'addition d'uridine, soulignant l'importance de l'inhibition par le léflunomide de la synthèse *de novo* de pyrimidine. Enfin, Kirsch et al. (2005) ont confirmé cet effet inhibiteur de l'A77 1726 sur la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B induite par le LPS dans les cellules dendritiques. Ainsi, le léflunomide inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules T, les cellules dendritiques et les synoviocytes. Le léflunomide pourrait donc agir sur les processus pathologiques initiant et entretenant la PR. Initialement, il pourrait perturber l'interaction entre cellules dendritiques et cellules T, les cellules dendritiques étant les principales cellules présentatrices d'antigène et à l'origine de l'activation des cellules T. Il agirait également sur les éléments d'entretien de la maladie en interférant avec les fonctions des synoviocytes.

# Conclusion

La PR est une maladie auto-immune complexe dont l'étiologie n'est pas connue, ce qui en complique la prise en charge thérapeutique. Il semblerait qu'un antigène encore indéterminé puisse activer les lymphocyte T avec afflux des cellules immunitaires dans l'articulation, activation des lymphocytes B, des macrophages, multiplication des cellules synoviales et néoangiogenèse. Un déséquilibre s'installe avec production très importante de facteurs inflammatoires et destructeurs (cytokines pro-inflammatoires, métalloprotéases, prostaglandines, ...) et insuffisance des mécanismes de défense physiologique (cytokines anti-inflammatoires, inhibiteurs naturels des cytokines, TIMPs,...). Cette cascade d'évènements aboutit à la destruction articulaire. La synovite rhumatoïde se caractérise aussi par une hyperplasie des cellules synoviales avec un faible taux d'apoptose et *in vitro* une résistance des synoviocytes à l'apoptose, favorisant ainsi leur prolifération qualifiée de « pseudo-tumorale ».

La diosgénine est un stéroïde végétal appartenant au groupe des saponines et ayant différentes actions biologiques. *In vitro*, elle a une activité anti-tumorale grâce à son pouvoir pro-apoptotique.

Nous avons montré pour la première fois que la diosgénine inhibait la prolifération et induisait l'apoptose des cellules synoviales fibroblastiques de PR en culture. Le processus apoptotique déclenché par la diosgénine est associé à une chute du  $\Delta\Psi_m$ , une activation de la caspase-3 et une fragmentation de l'ADN, constatations plaçant pour l'intervention de la voie mitochondriale dans l'apoptose induite par la diosgénine. Nos expériences montrent également une augmentation de l'activité de COX-2 endogène associée au phénomène apoptotique. En effet, le celecoxib, un inhibiteur sélectif de COX-2, diminue de façon très importante l'apoptose induite par la diosgénine. Inversement, l'IL-1 $\beta$ , un inducteur de COX-2, l'augmente significativement. D'autre part, l'addition de PGE<sub>2</sub> exogène ne modifie pas les résultats, laissant supposer que l'induction de l'apoptose soit liée à l'excès de production de PGE<sub>2</sub> endogène. Cependant le mécanisme sous-tendant cette association PGE<sub>2</sub> endogène/apoptose reste à élucider.

Afin de mieux caractériser l'apoptose des cellules synoviales induite par la diosgénine et de mieux définir la part des différentes voies d'induction de l'apoptose, il serait intéressant de savoir s'il existe ou non une activation des caspases-8 et -9, un relargage de cytochrome c, un clivage de la protéine Bid, mais aussi une augmentation de l'expression de la protéine Flip ou des protéines pro-apoptotiques comme p53.

La diosgénine ayant une forte homologie de structure avec les stéroïdes humains, leurs récepteurs intracellulaires spécifiques pourraient être la cible privilégiée de la diosgénine dans la transduction du signal. En effet, il a été démontré très récemment que les stéroïdes humains via leurs récepteurs pouvaient avoir des actions appelées « extra-nucléaires » en activant par exemple ERK1/ERK2 ou la voie PI3 kinase (Cheskis, 2004). Ainsi, nous pourrions étudier les voies de

signalisation impliquées dans ce processus apoptotique induit par la diosgénine dans les cellules synoviales. Il serait intéressant d'analyser l'état d'activation des MAP kinases (ERK, JNK, p38) et l'expression de la protéine kinase C (PKC) qui régule leur activité. En effet, alors que la voie de ERK a été associée à la survie et prolifération cellulaire, p38 et JNK interviennent dans la transduction du signal apoptotique dans différents types cellulaires cancéreux ou non. Les mêmes expériences pourraient être réalisées en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques des MAP kinases. En parallèle, le niveau d'activation de NF- $\kappa$ B pourrait être recherché. Le projet expérimental pourrait s'étendre à d'autres stéroïdes végétaux (hécogénine, tigogénine) de structure voisine de la diosgénine, en présence ou non d'antagonistes des récepteurs aux stéroïdes. De plus, nos expériences ayant mis en évidence une relation entre l'apoptose induite par la diosgénine et la PGE<sub>2</sub> endogène, afin d'en comprendre le mécanisme, il serait intéressant d'étudier les effets de la diosgénine sur les différentes étapes de la voie métabolique de l'acide arachidonique. En effet, la voie métabolique de biosynthèse des prostanoides débute par la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par la PLA<sub>2</sub>. La translocation de la cPLA<sub>2</sub> à la membrane pourrait être recherchée dans les cellules synoviales traitées par diosgénine, comme cela a pu être montré dans le laboratoire avec les cellules HEL (Léger et al., 2004). Si cette intervention de la cPLA<sub>2</sub> dans l'apoptose induite par la diosgénine se confirmait, il serait là aussi intéressant de rechercher les voies de signalisation mises en jeu, comme l'ont montré Berenbaum et al. (2003) dans les chondrocytes articulaires où l'ATP induit l'activation de la cPLA<sub>2</sub> par l'intermédiaire de l'activation de p38 et ERK1/2. Dans la cascade du métabolisme de l'acide arachidonique, celui-ci est converti en PGG<sub>2</sub> par les cyclooxygénases (COX-1 et -2), puis en PGH<sub>2</sub>. Ensuite, des enzymes terminales permettent la conversion de PGH<sub>2</sub> en différents prostanoides. Parmi celles-ci, la PGE synthase (PGES) est une enzyme clef pour la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub>. Il existe trois formes de PGES clonées et caractérisées, mais la PGES-1 microsomale (mPGES-1) est une enzyme inductible par différents stimuli inflammatoires, notamment l'IL-1, et couplée fonctionnellement à la COX-2. Une autre étape pourrait donc consister à étudier les effets de la diosgénine sur l'expression de l'ARNm et de la protéine mPGES-1 dans les synoviocytes de PR en culture. Enfin, il serait probablement instructif d'explorer la voie des lipoxygénases, notamment les effets de la diosgénine sur la synthèse des leucotriènes (voie de la 5-lipoxygénase) et des produits de la voie de la 12-lipoxygénase qui ont des propriétés pro-inflammatoires.

La deuxième partie du travail a permis de confirmer l'action immunorégulatrice de l'A77 1726, le métabolite actif du léflunomide. Nous avons vérifié dans un modèle de culture de cellules synoviales fibroblastiques de PR que l'A77 1726 entraînait une diminution de la production d'IL-6 et une augmentation de la synthèse d'IL-1Ra. Par contre, il n'a aucun effet sur celles de l'IL-8 à

fortes doses et du sTNFRI quelle que soit la dose. Nous avons montré pour la première fois que l'A77 1726 à fortes doses augmentait la sécrétion d'IL-10, cytokine ayant des propriétés anti-inflammatoires, et diminuait celle d'IL-11 dont le rôle exact dans la PR reste controversé. Les effets du léflunomide sur l'IL-10 sont en partie liés aux propriétés anti-métaboliques de l'A77 1726 puisque l'addition d'uridine diminue la sécrétion d'IL-10. Ils sont également associés à une activation de la MAP kinase p38. Par contre, les effets du léflunomide sur l'IL-11 ne sont liés à aucun de ces mécanismes. D'autre part, nos expériences montrent que l'A77 1726 augmente l'expression de la protéine COX-2, mais par contre diminue la production de PGE<sub>2</sub> suggérant que le léflunomide puisse avoir une action anti-inflammatoire en inhibant l'activité enzymatique de COX-2. Nous avons également constaté que la diminution du taux de PGE<sub>2</sub> était dose-dépendante et parallèle à celle de l'IL-11. Ainsi, il pourrait exister une relation entre PGE<sub>2</sub> et IL-11 comme cela a pu être suggéré dans la littérature. Enfin, nos résultats montrent que l'A77 1726 est un puissant inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B induite par l'IL-1 $\beta$  dans les cellules synoviale de PR en culture. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour essayer de mieux comprendre les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans les différents effets du léflunomide sur la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires, notamment l'IL-6 et l'IL-1Ra.

## **Références bibliographiques**

## A

Accatino L, Pizarro M, Solis N, Koenig CS. Effects of diosgenin, a plant-derived steroid, on bile secretion and hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. *Hepatology* 1998, 28, p.129-40.

Alaaedine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-11 (anti-inflammatory) on TNF- $\alpha$ -induced PGE2 release and on signalling pathways in human OA synovial fibroblasts. *Cytokine*, 1999, 11, p.1020-30.

Alam A, Lulé J, Coppin H, Lambert N, Mazières B, De Préval C, Cantagrel A. T-cell receptor variable region of the  $\beta$ -chain gene use in peripheral blood and multiple synovial membranes during rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.*, 1995, 42, p.331-9.

Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WER, La Cava A, Montemayor AC. Positive selection in auto-immunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nature Med.*, 1995, 1, p.448-52.

Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, 32, p.1053-61.

Amigo L, Mendoza H, Zanlungo S, Miquel JF, Rigotti A, Gonzalez S, Nervi F. Enrichment of canalicular membrane with cholesterol and sphingomyelin prevents bile salt-induced hepatic damage. *J. Lipid. Res.*, 1999, 40, p.533-42.

Angel J, Berenbaum F, Le Denmat C, Nevalainen T, Masliah J, Fournier C. Interleukin-1-induced prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis in human synovial cells involves the activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase-2. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 15, p.125-31.

Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1990, 33, p.305-15.

Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1995, 38, p.151-60.

Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Res.*, 2001a, 45, p. 101-6.

Arend WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.*, 2001b, 3 (suppl2), p. 1-6.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM Jr, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1988, 31, p.315-24.

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy. Review of a new approach. *Pharmacol. Rev.*, 2003, 55, p.241-69.

Athanasou NA, Quinn JM. Immunocytochemical analysis of human synovial lining cells: phenotypic relation to other marrow-derived cells. *Ann. Rheum. Dis.*, 1991, 50, p.311-5.

Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann. Rheum. Dis.*, 1995, 54, p.392-4.

## B

Badger AM, Griswold DE, Kapadia R, Blake S, Swift BA, Hoffman SJ, Stroup GB, Webb E, Rieman DJ, Gowen M, Boehm JC, Adams JL, Lee JC. Disease-modifying activity of

- SB 242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, 43, p.175-83.
- Badolato R, Oppenheim JJ. Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.*, 1996, 26, p.526-38.
- Bai S, Liu H, Chen KH, Eksarko P, Perlman H, Moore TL, Pope RM. NF- $\kappa$ B-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated apoptosis. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, p.3844-55.
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.*, 1996, 14, p.649-83.
- Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr. Opin. Oncol.*, 2002, 14, p.86-91.
- Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, 18, p.6910-6924.
- Beneytout JL, Nappez C, Leboutet MJ, Malinvaud G. A plant steroid, diosgenin, a new megakaryocytic differentiation inducer of HEL cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 207, p.398-404.
- Benghuzzi H, Tucci M, Eckie R, Hughes J. The effects of sustained delivery of diosgenin on the adrenal gland of female rats. *Biomed. Sci. Instrum.*, 2003, 39, p.335-40.
- Bentires-Alj M, Dejardin E, Viatour P, Van Lint C, Froesch B, Reed JC, Merville MP, Bours V. Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene*, 2001, 20, p.2805-13.
- Berek C, Schroder AE. A germinal center-like reaction in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1997, 815, p.211-7.
- Berenbaum F, Humbert L, Bereziat G, Thirion S. Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub> via ATP in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2003, 18, p.13680-7.
- Berenbaum F. La COX-3 existe-t-elle ? *Rev. Rhum.*, 2004, 71, p.1095-97.
- Bessis N, Boissier MC. Nouvelles interleukines pro-inflammatoires dans la polyarthrite rhumatoïde : cibles thérapeutiques potentielles. *Rev. Rhum. [Ed fr]*, 2001, 68, p.1173-8.
- Boissier MC. Pistes pathogéniques de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum. [Ed Fr]*, 2002, 69 (suppl 5), p.172-81.
- Bonnet C, Bertin P, Cook-Moreau J, Chable-Rabinovitch H, Treves R, Rigaud M. Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells. *Prostaglandins*, 1995, 50, p.127-135.
- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.*, 1998, 17, p.37-49.
- Boyault S, Simonin MA, Bianchi A, Compe E, Liagre B, Mainard D, Becuwe P, Dauca M, Netter P, Terlain B, Bordji K. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1 $\beta$  effects in human chondrocytes by inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett.*, 2001, 501, p.24-30.
- Brennan FM, Hayes AL, Ciesielski CJ, Green P, Foxwell BM, Feldmann M. Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells : involvement of phosphatidylinositol-3 kinase and nuclear factor kappa B pathways in tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, p.31-41.

Burger D, Begue-Pastor N, Benavent S, Gruaz L, Kaufmann MT, Chicheportiche R, Dayer JM. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of prostaglandin E(2), matrix metalloproteinase 1 and interleukin 6 in human fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*, 2003, 42, p.89-96.

## C

Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*, 1994, 370, p.220-3.

Cai J, Liu M, Wang Z, Ju Y. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002, 25, p.193-6.

Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG, Cohen GM. Physiological concentrations of K<sup>+</sup> inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, p.41985-90.

Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 2002, 84, p.203-14.

Cantagrel A, Alam A, Mazières B, Coppin H. Activation des lymphocytes T au cours de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum. [Ed. Fr.]*, 1995, 62 (7-8 bis), p.166S-173S.

Cantley LC. The phosphoinositide-3 kinase pathway. *Science*, 2002, 296, p.1655-7.

Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25 bright CD4<sup>+</sup> T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 2003, 33, p.215-23.

Catrina AI, Ulfgren AK, Lindblad S, Grondal L, Klareskog L. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002, 61, p.934-6.

Catrina AI, Trollmo C, Af Klint E, Engstrom M, Lampa J, Hermansson Y, Klareskog L, Ulfgren AK. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints. *Arthritis Rheum.*, 2005, 52, p.61-72.

Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, Van Der Berg W, Miossec P. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, 2001, 3, p.168-77.

Chae HJ, Chae SW, Reed JC, Kim HR. Salicylate regulates COX-2 expression through ERK and subsequent NF- $\kappa$ B activation in osteoblasts. *Immunopharm. Immunotox.*, 2004, 26, p.75-91.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, p.13926-31.

Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW, Thompson CB. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J.*, 1997, 16, p.968-77.

Chang DM, Shyue SK, Liu SH, Chen YT, Yeh CY, Lai JH, Lee HS, Chen A. Dual biological functions of an interleukin-1 receptor antagonist-interleukin-10 fusion protein and its suppressive effects on joint inflammation. *Immunology*, 2004, 112, p.643-50.

Chang MC, WU HL, Lee JJ, Lee PH, Chang HH, Hahn LJ, Lin BR, Chen YJ, Jeng JH. The induction of PGE<sub>2</sub> production, IL-6 production, cell cycle arrest and cytotoxicity in primary oral keratinocytes and KB cancer cells by areca nut ingredients is differentially regulated by MEK/ERK activation. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, p.50676-83.

Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*, 2001, 20, p.3921-6.

Chen KH, Jurgens J, Liu HT, Pope RM. NF- $\kappa$ B regulation of Flip: potential role in rheumatoid arthritis synovial fibroblast resistance to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, p.S602.

Cheng J, Imanishi H, Amuro Y, Hada T. NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 2002, 99, p.755-61.

Cheng MS, Wang QL, Tian Q, Song HY, Liu YX, Li Q, Xu X, Miao HD, Yao XS, Yang Z. Total synthesis of methyl protodioscin: a potent agent with antitumor activity. *J. Org. Chem.*, 2003, 68, p.3658-62.

Cheskis BJ. Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *J. Cell. Biochem.*, 2004, 93, p.20-7.

Choudhary S, Wadhwa S, Raisz LG, Alander C, Pilbeam CC. Extracellular calcium is a potent inducer of cyclooxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signalling pathway. *J. Bone Miner. Res.*, 2003, 18, p.1813-24.

Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor  $\alpha$  in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1991, 34, p.1125-32.

Clavel G, Bessis N, Boissier MC. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2003, 70, p.321-6.

Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, Bordji K, Dauca M, Netter P, Beneytout JL. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.*, 2003, 22, p.899-905.

Corbière C, Liagre B, Terro F, Beneytout JL. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell. Res.*, 2004a, 14, p.188-96.

Corbière C, Battu S, Liagre B, Cardot PJP, Beneytout JL. SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2004b, 808, p.255-62.

Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T. Cyclooxygenases-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues: effects of interleukin-1 $\beta$ , phorbol ester and corticosteroids. *J. Clin. Invest.*, 1994, 93, p.1095-1101.

Crofford LJ, Tan B, Mc Carthy CJ, Hla T. Involvement of nuclear factor  $\kappa$ B in the regulation of cyclooxygenase 2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum.*, 1997, 40, p.226-36.

Crofford LJ, McDonagh KT, Guo S, Mehta H, Bian H, Petruzelli LM, Roessler BJ. Adenovirus binding to cultured synoviocytes triggers signaling through MAPK pathways and induces expression of cyclooxygenase-2. *J. Gene Med.*, 2005, 7, p.288-96.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, 1999, 341, p.233-49.

Curnock AP, Robson PA, Yea CM, Moss D, Gadher S, Thomson TA, Westwood R, Ruuth E, Williamson RA. Potencies of leflunomide and HR325 as inhibitors of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2: comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1997, 282, p.339-47.

Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, Fujita K, Lipsky PE. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1995, 38, p.96-104.

Cutolo M. Effects of DMARDs on IL-1Ra levels in rheumatoid arthritis: is there any evidence? *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2002, 20, p.S26-31.

Cutolo M, Sulli A, Ghiorzo P, Pizzorni C, Craviotto C, Villaggio B. Anti-inflammatory effects of leflunomide on cultured synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003, 62, p.297-302.

## D

Dai SM, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  production induced by direct contact with T lymphocytes. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, p.432-43.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.*, 1999, 342, p.249-68.

Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie*, 1999, 81, p.69-75.

Dayer JM, Fenner H. The role of cytokines and their inhibitors in arthritis. *Baillieres Clin. Rheumatol.*, 1992, 6, p.485-516.

Dayer JM. Cytokines et anti-cytokines dans les rhumatismes inflammatoires. *Rev. Rhum. [Ed. Fr.]*, 1994, 61 (10 bis), p.173S-180S.

Dayer JM. Rôle de l'interleukine-1 dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum.*, 2002, 69 (suppl. 5), p.94s-205s.

Déage V, Burger D, Dayer JM. Exposure of T lymphocytes to leflunomide but not to dexamethasone favors the production by monocytic cells of interleukin-1 receptor antagonist and the tissue-inhibitor of metalloproteinase-1 over that of interleukin-1 $\beta$  and metalloproteinases. *Eur. Cytokine Netw.*, 1998, 9, p.663-8.

Declercq W, Denecker G, Fiers W, Vandenaabeele P. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J. Immunol.*, 1998, 161, p.390-9.

DeMeester SL, Buchman TG, Qiu Y, Jacob AK, Dunnigan K, Hotchkiss RS, Karl I, Cobb JP. Heat shock induces IkappaB-alpha and prevents stress-induced endothelial cell apoptosis. *Arch. Surg.*, 1997, 132, p.1283-7.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell. Biol.*, 2000, 10, p.369-77.

Detanico T, Rodrigues L, Sabritto AC, Keisermann M, Bauer ME, Zwickey H, Bonorino C. Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, 135, p.336-42.

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 1991a, 174, p.1209-20.

De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.*, 1991b, 174, p.915-24.

De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J. Immunol.*, 1993, 151, p.6370-81.

Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.*, 1994, 8, p.1314-25.

Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J. Interferon. Cytokine Res.*, 1999, 19, p.563-73.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, 102, p.33-42.

Duval R, Bellet V, Delebasse S, Bosgiraud C. Implication of caspases during measles virus-induced apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 2002, 83, p.3153-61.

## E

Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 1990, 343, p.341-6.

Eliaou JF. Génétique de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum. [Ed. Fr.]*, 1995, 62 (7-8 bis), p.157S-165S.

Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, Judovitch R, Caspi D, Yaron M. Active leflunomide metabolite inhibits interleukin-1 $\beta$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ , nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003, 62, p.440-3.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, p.14363-7.

Emilie D, Miossec P., Fradelizi D. Cytokines et polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum. [Ed. Fr.]*, 1995, 62 (7-8 bis), p.174S-181S.

Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, 1995, 80, p.371-8.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.*, 2000, 20, p.929-35.

## F

Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses in arthritis. An overview. *J. Rheumatol.*, 2002, 29, p.3-14.

Falgarone G, Jaen O, Boissier MC, Breban M. Dialogue entre lymphocytes et cellules dendritiques au cours de l'inflammation rhumatoïde. *Rev. Rhum.*, 2005, 72, p.297-302.

Faour WH, He Y, He QW, De Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, Di Battista JA. ProstaglandinE(2) regulates the level and stability of cyclo-oxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, p.31720-31.

Fesik SW, Shi Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science*, 2001, 294, p.1477-8.

Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis ? *Arthritis Rheum.*, 1990, 33, p.768-73.

Firestein GS, Nguyen K, Aupperle KR, Yeo M, Boyle DL, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am. J. Pathol.*, 1996, 149, p.2143-51.

Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, p.10895-900.

Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial membrane cellularity and vascularity. *Ann. Rheum. Dis.*, 1995, 54, p.611-5.

Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J. Immunol.*, 1998, 160, p.920-8.

Fournier C. Que reste-t-il du lymphocyte T dans la polyarthrite rhumatoïde ? *Rev. Rhum.*, 2005, 72, p.290-6.

Fox RI. Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 1998, 53, p.20-6.

Fox DA. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1997, 40, p.598-609.

Fumimori T, Honda S, Migita K, Hamada M, Yoshimuta T, Honda J, Fukuda T, Suzuki R, Gotoh M, Eguchi K, Aizawa H. Erythromycin suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in rheumatoid synovial cells. *J. Rheumatol.*, 2004, 31, p.436-41.

## G

Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol. Life Sci.*, 1999, 55, p.932-43.

Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nature Immunol.*, 2001, 2, p.108-15.

Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M. The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, 10, p.353-9.

Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J. Clin. Invest.*, 1994, 93, p.1516-24.

Glinghammar B, Rafter J. Colonic luminal contents induce cyclooxygenase 2 transcription in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology*, 2001, 120, p.401-10.

Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2003, 42 (suppl 2), p.ii11-ii16.

Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.*, 2000, 2, p.156-62.

Gotoh T, Oyadomari S, Mori K, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, p.12343-50.

Grisar J, Aringer M, Köller MD, Stummvoll GH, Eselböck D, Zwölfer B, Steiner CW, Zierhut B, Wagner L, Pietschmann P, Smolen JS. Leflunomide inhibits transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, 63, p.1632-7.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 1999, 13, p.1899-911.

Guo YS, Cheng JZ, Jin GF, Gutkind JS, Hellmich MR, Townsend CM. Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, p.48755-63.

Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int. J. Oncol.*, 2003, 22, p.15-20.

## H

Hamilton LC, Vojnovic I, Warner TD. A77 1726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. *Br. J. Pharmacol.*, 1999, 127, p.1589-96.

Hammaker D, Sweeney S, Firestein GS. Signal transduction networks in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003, 62, p.ii86-ii89.

Han Z, Boyle DL, Aupperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS. Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, 291, p.124-30.

Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.*, 2001, 108, p.73-81.

Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E, Kaneko M, Takano H, Nagata S, Ochi T. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, p.657-62.

Hata AH, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharm. Therap.*, 2004, 103, p.147-66.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.*, 2003, 374, p.1-20.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407, p.770-6.

Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol. Med. Today*, 1999, 5, p.439-47.

Hermann JA, Hall MA, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Important immunoregulatory role of interleukin-11 in the inflammatory process in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, p.1388-97.

Higdon K, Scott A, Tucci M, Benghuzzi H, Tsao A, Puckett A, Cason Z, Hughes J. The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. *Biomed. Sci. Instrum.*, 2001, 37, p.281-6.

Hla T, Ristimäki A, Appleby S. Cyclooxygenase gene expression in inflammation and angiogenesis. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1993, 696, p.197-203.

Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.*, 1999, 18, p.3586-95.

## I

Imamura F, Aono H, Hasunuma T, Sumida T, Tateishi H, Maruo S. Monoclonal expansion of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, p.1979-86.

Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signalling. *Exp. Cell Res.*, 2000, 254, p.14-24.

Itoh K, Hase H, Kojima H, Saotome K, Nishioka K, Kobata T. Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology*, 2004, 43, p.277-85.

## J

Jang BC, Kim DH, Park JW, Kwon TK, Kim SP, Song DK, Park JG, Bae JH, Mun KC, Baek WK, Suh MH, Hla T, Suh SI. Induction of cyclooxygenase-2 in macrophages by catalase: role of NF- $\kappa$ B and PI3K signaling pathways. *BBRC*, 2004, 316, p.398-406.

Jankovic V, Samardzic T, Stosic-Grujicic S, Popadic D, Trajkovic V. Cell-specific inhibition of inducible nitric oxide synthase activation by leflunomide. *Cell. Immunol.*, 2000, 199, p.73-80.

Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell*, 2003, 11, p.293-302.

Jendrossek V, Handrick R, Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J.*, 2003, 17, p.1547-9.

Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res.*, 1994, 13, p.47-54.

Ji JD, Cheon H, Jun JB, Choi SJ, Kim YR, Lee YH, Kim TH, Chae IJ, Song GG, Yoo DH, Kim SY, Sohn J. 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.*, 2001, 17, p.215-21.

Jiang Y, Genant HK, Watt I. A multicenter, double blind, dose ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002, 43, p.1001-9.

Joosten LAB, Lubberts E, Helsen MMA, Saxne T, Coenen-deRoo CJJ, Heinegard D. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res.*, 1999, 1, p.81-91.

Jovanovic D, Pelletier JP, Alaaeddine N, Mineau F, Geng C, Ranger P, Martel-Pelletier J. Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998, 6, p.40-9.

Jovanovic DV, Mineau F, Notoya K, Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Nitric oxide induced cell death in human osteoarthritic synoviocytes is mediated by tyrosine kinase activation and hydrogen peroxide and/or superoxide formation. *J. Rheumatol.*, 2002, 29, p.2165-75.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 95, p.4997-5002.

## K

Kalden JR, Schattenkirchner M, Sørensen H, Emery P, Deighton C, Rozman B, Breedveld F. The efficacy and safety of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis. A five-year followup study. *Arthritis Rheum.*, 2003, 48, p.1513-20.

Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, 2002, 3, p.221-7.

Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacovics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.*, 2000, 10, p.640-8.

Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, p.1517-27.

Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Inoue D, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> induces synoviocytes apoptosis and suppresses adjuvant arthritis in rats. *J. Clin. Invest.*, 2000, 15, p.189-97.

Kemick ML, Chin JE, Wuthier RE. Role of prostaglandins in differentiation of growth plate chondrocytes. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, 1989, 19, p.423-6.

Keystone E, Wherry J, Grint P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1998, 24, p.629-39.

Khasar SG, Gold MS, Levine JD. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in rat. *Neurosci. Lett.*, 1998, 256, p.17-20.

Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmtich F. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1995, 54, p.501-4.

Kirsch BM, Zeyda M, Stuhlmeier K, Grisar J, Smolen JS, Watschinger B, Stulnig TM, Horl WH, Zlabinger GJ, Saemann MD. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, interferes with dendritic cell function. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, 7, p.R694-703.

Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell*, 1994, 76, p.253-62.

Koch AE, Kundel SL, Strieter RM. Cytokines in rheumatoid arthritis. *J. Invest. Med.*, 1995, 43, p.28-37.

Konttinen Y, Nykänen P, Nordström D. DNA synthesis in prolyl-4-hydroxylase positive fibroblasts in situ in synovial tissue. An autoradiography-immunoperoxidase double labeling study. *J. Rheumatol.*, 1989, 16, p.339-45.

Korn T, Magnus T, Toyka K, Jung S. Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide: mechanisms independent of pyrimidine depletion. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, 76, p.950-60.

Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J. Bone Miner. Res.*, 1996, 11, p.88-95.

Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara H, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 221, p.889-97.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 1997, 278, p.294-8.

Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic auto-immunity. *Cell*, 1996, 87, p.811-22.

Kraan M, Reece RJ, Barg EC, Smeets TJM, Farnell J, Rosenburg R, Veale DJ, Breedveld FC, Emery P, Tak PP. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, 43, p.1820-30.

Kraan MC, Smeets TJ, van Loon MJ, Breedveld FC, Dijkmans BA, Tak PP. Differential effects of leflunomide and methotrexate on cytokine production in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, 63, p.1056-61.

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, 1997, 18, p.44-51.

Kroll B, Kunz S, Tu N, Schwarz LR. Inhibition of transforming growth factor-beta1 and UV light-induced apoptosis by prostanoids in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1998, 152, p.240-50.

Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 2001, 21, p.8247-54.

Kurowska M, Rudnicka W, Kontny E, Janicka I, Chorazy M, Kowalczewski J, Ziolkowska M, Ferrari-Lacraz S, Strom TB, Maslinski W. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J. Immunol.*, 2002, 169, p.1760-7.

Kusunoki N, Yamazaki R, Kawai S. Induction of apoptosis in rheumatoid synovial fibroblasts by celecoxib, but not by other selective cyclooxygenase 2 inhibitors. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, p.3159-67.

## L

Lacey DL, Timms E, Tan HL. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93, p.165-76.

Lapicque F, Vergne P, Jouzeau JY, Loeuille D, Gillet P, Vignon E, Thomas P, Velicitat P, Türck D, Guillaume C, Gaucher A, Bertin P, Netter P. Articular diffusion of meloxicam after a single oral dose. Relationship to cyclo-oxygenase inhibition in synovial cells. *Clin. Pharmacokinet.*, 2000, 39, p.369-82.

Lasa M, Mahtani KR, Finch A, Brewer G, Saklatvala J, Clark AR. Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol. Cell Biol.*, 2000, 20, p.4265-74.

Leahy KM, Koki AT, Masferrer JL. Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Cur. Med. Chem.*, 2000, 7, p.1163-70.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 1994, 372, p.739-46.

Léger DY, Liagre B, Corbière C, Cook-Moreau J, Beneytout JL. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 expression. *Int. J. Oncol.*, 2004, 25, p.555-62.

Léger DY, Liagre B, Beneytout JL. Role of MAPKs and NF- $\kappa$ B in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation and subsequent apoptosis in HEL cells. *Int. J. Oncol.*, 2005, sous presse.

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, p.3406-10.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91, p.479-89.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, 94, p.491-501.

Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1999, 189, p.1839-45.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 2001, 412, p.95-9.

Liagre B, Vergne P, Rigaud M, Beneytout JL. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. *FEBS Lett.*, 1997a, 414, p.159-64.

Liagre B, Charissoux JL, Leboutet MJ, Bernache-Assollant D, Beneytout JL. Interactions of hydroxyapatite and fluorapatite particles on human osteoarthritis type B synoviocytes: effects on interleukin-1 alpha levels and lipoxygenase pathways. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997b, 38, p.243-56.

Liagre B, Vergne P, Rigaud M, Beneytout JL. Arachidonate 15-lipoxygenase of reticulocyte-type in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes and modulation of its activity by proinflammatory cytokines. *J. Rheumatol.*, 1999, 26, p.1044-51.

Liagre B, Moalic S, Vergne P, Charissoux JL, Bernache-Assollant D, Beneytout JL. Effects of alumina and zirconium dioxide particles on arachidonic acid metabolism and proinflammatory interleukin production in osteoarthritis and rheumatoid synovial cells. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2002, 84, p.920-30.

Liagre B, Bertrand J, Léger DY, Beneytout JL. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF- $\kappa$ B binding. *Int. J. Mol. Med.*, 2005, sous presse.

Lioté F, Ea HK, Berenbaum F. Signalisation cellulaire, de la membrane cytoplasmique aux gènes: de nouvelles voies thérapeutiques. Dans *l'Actualité Rhumatologique*, De Sèze et Ryckewaert, Ed. Elsevier, 2004, p.305-17.

Liu H, Pope RM. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Pharm.*, 2003, 3, p.317-22.

Lopez-Bote JP, Bernabeu C, Marquet A, Fernandez JM, Larraga V. Adjuvant-induced polyarthritis: synovial cell activation prior to polyarthritis onset. *Arthritis Rheum.*, 1988, 31, p.769-75.

Longthorne VL, Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.*, 1997, 16, p.3805-12.

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.*, 1999, 6, p.516-24.

Lu J, Imamura K, Nomura S, Mafune K, Nakajima A, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Ishii G, Ochiai A, Esumi H, Kaminishi M. Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res.*, 2005, 1, p.4769-74.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, 94, p.481-90.

## M

Maier R, Ganu V, Lotz M. Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, p.21527-32.

Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, p.1552-63.

Manna SK, Aggarwal BB. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression. *J. Immunol.*, 1999, 162, p.2095-102.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Leflunomide suppresses TNF-induced cellular responses: effects on NF- $\kappa$ B, Activator Protein-1, c-Jun N-terminal protein kinase, and apoptosis. *J. Immunol.*, 2000, 165, p.5962-9.

Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, p.16202-12.

Maret M, Chicheportiche R, Dayer JM, Gabay C. Production of intracellular IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1Ra isoforms by activated human dermal and synovial fibroblasts: phenotypic differences between human dermal and synovial fibroblasts. *Cytokine*, 2004, 25, p.193-203.

Marie P, De Vernejoul MC. Facteurs locaux du remodelage osseux. *Rev. Rhum.*, 1993, 60, p.54-63.

Mariette X. Le lymphocyte B: une nouvelle cible thérapeutique dans la polyarthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes. *Rev. Rhum.*, 2004, 71, p.729-33.

Martel\_Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin. arthritis Rheum.*, 2003, 33, p.155-67.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. New insights into prostaglandin biology. *J. Rheumatol.*, 2004, 31, p.14-6.

Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, 2004, 117, p.561-74.

Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, p.439-44.

Maxey KM, Hessler E, MacDonald J, Hitchingham L. The nature and composition of 15-deoxy-Delta(12,14)PGJ(2). *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.*, 2000, 62, p.15-21.

May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today*, 1998, 19, p.80-8.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell Biol.*, 2001, 21, p.1249-59.

McInnes IB, Liew FY. Interleukin 15 : a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol. Today*, 1998, 19, p.75-9.

Meyer O. La balance des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum. [Ed. Fr.]*, 2002, 69 (suppl 5), p.182-93.

Migita K, Miyashita T, Ishibashi H, Maeda Y, Nakamura M, Yatsunami H, Ida H, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K. Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1beta stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, 137, p.612-6.

Mihara M, Moriya Y, Kishimoto T, Ohsugi Y. Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *Br. J. Rheumatol.*, 1995, 34, p.321-5.

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell*, 2003, 11, p.577-90.

Miljkovic DJ, Samardzic T, Drakulic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. Immunosuppressants leflunomide and mycophenolic acid inhibit fibroblast IL-6 production by distinct mechanisms. *Cytokine*, 2002, 19, p.181-6.

Mimaki Y, Yokosuka A, Kuroda M, Sashida Y. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24, p.1286-9.

Mino T, Sugiyama E, Taki H, Kuroda A, Yamashita N, Maruyama M, Kobayashi M. Interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  synergistically stimulate prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent production of interleukin-11 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, p.2004-13.

Mirmohammadsadegh A, Homey B, Abts HF, Kohrer K, Ruzicka T, Michel G. Differential modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine receptors by N-(4-trifluoromethylphenyl)-2-cyano-3-hydroxy-crotonic acid amide (A77 1726), the physiologically active metabolite of the novel immunomodulator leflunomide. *Biochem. Pharmacol.*, 1998, 55, p.1523-9.

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, 1993, 75, p.653-60.

Miossec P, Chomarant P, Dechanet J, Moreau JF, Roux JP, Delmas P, Banchereau J. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1994, 12, p.1715-22.

Moalic S, Liagre B, Labrousse F, Beneytout JL. Enhanced apoptosis in retrovirally transfected osteosarcoma cells after exposure to sodium butyrate. *Int. J. Oncol.*, 2000, 16, p.695-700.

Moalic S, Liagre B, Corbiere C, Bianchi A, Dauca M, Bordji K, Beneytout JL. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Lett.*, 2001a, 506, p.225-30.

Moalic S, Liagre B, Le Bail JC, Beneytout JL. Dose-dependent modulation of apoptosis and cyclooxygenase-2 expression in human 1547 osteosarcoma cells by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Int. J. Oncol.*, 2001b, 18, p.533-40.

Morel J, Berenbaum F. Les voies de signalisation intracellulaire : de nouvelles cibles thérapeutiques dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum.*, 2004, 71, p.1104-13.

Moreland L, Gugliotti R, King K, Chase W, Weisman M, Greco T, Fife R, Korn J, Simms R, Tesser J, Hillson J, Caldwell J, Schnitzer T, Lyons D, Schwertschlag U. Results of a phase-I/II randomized, masked, placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 in the treatment of subjects with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, 2001, 3, p.247-52.

Morita Y, Yamamura M, Kawashima M, Harada S, Tsuji K, Shibuya K, Maruyama K, Makino H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, p.1669-76.

Morita Y, Yamamura M, Kawashina M, Aita T, Harada S, Okamoto H, Inoue H, Makino H. Differential in vitro effects of IL-4, IL-10 and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.*, 2001, 20, p.49-54.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, p.55-63.

## N

Nappez C, Liagre B, Beneytout JL. Changes in lipoxygenase activities in human erythroleukemia (HEL) cells during diosgenin-induced differentiation. *Cancer Lett.*, 1995, 96, p.133-40.

Neff L, Zeisel M, Druet V, Takeda K, Klein JP, Sibilia J, Wachsmann D. ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, p.27721-8.

Nepom GT. The role of DR4 shared epitope in selection and commitment of autoreactive T cells in rheumatoid arthritis. *Dis. Clin. North America*, 2001, 27, p.305-15.

Niuro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*, 1997, 89, p.1621-8.

Nunez NP, Liu H, Meadows GG. PPAR-gamma ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. *Cancer lett.*, 2005, 22, en ligne.

## O

Ogata Y, Kukita A, Kukita T, Komine M, Miyahara A, Myazaki S. A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J. Immunol.*, 1999, 162, p.2754-60.

Okamoto H, Yamamura M, Morita Y, Harada S, Makino H, Ota Z. The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1997, 40, p.1096-105.

Osiri M, Shea B, Robinson V, Suarez-Almazor M, Strand V, Tugwell P, Wells G. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J. Rheumatol.*, 2003, 30, p.1182-90.

Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*, 2002, 7, p.335-45.

## P

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, 18, p.6853-66.

Palmer DG. The anatomy of rheumatoid lesion. Dans « Immunology of rheumatoid disease » Saklatvala J. et Walport M.J. *Br. Med. Bull.*, 1995, 51, p.286-95.

Palmer G, Burger D, Mezin F, Magne D, Gabay C, Dayer JM, Guerne PA. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, increases the production of IL-1 receptor antagonist in human synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.*, 2004, 6, p.R181-9.

Panayi GS. B cell-directed therapy in rheumatoid arthritis. Clinical experience. *J. Rheumatol.*, 2005, 32 (Suppl 73), p.19-24.

Park SW, Sung MW, Heo DS, Inoue H, Shim SH, Kim KH. Nitric oxide upregulates the cyclooxygenase-2 expression through the cAMP-response element in its promoter in several cancer cell lines. *Oncogene*, 2005, 20, en ligne.

Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, Kelleher K, Wood CR, O'Hara RM Jr, Leary AC, Sibley B, Clark SC, Williams DA, Yang YC. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, p.7512-6.

Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J. 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.*, 2001, 28, p.2509-19.

Penna G, Adorini L. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.*, 2000, 164, p.2405-11.

Perlman H, Georganas C, Pagliari LJ, Koch AE, Haines K, Pope RM. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J. Immunol.*, 2000, 164, p.5227-35.

Perlman H, Pagliari LJ, Liu H, Koch AE, Haines JK, Pope RM. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1 beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum.*, 2001, 44, p.21-30.

Perlman H, Nguyen N, Liu H, Eslick J, Esser S, Walsh K, Moore TL, Pope RM. Rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages express decreased tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R2 and increased decoy receptor tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R3. *Arthritis Rheum.*, 2003, 48, p.3096-101.

Persson S, Mikulowska A, Narula S, O'Garra A, Holmdahl R. Interleukin-10 suppresses the development of collagen type 2-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats. *Scand. J. Immunol.*, 1996, 44, p.607-14.

Pilling D, Akbar AN, Girglestone J, Orteu CH, Borthwick NJ, Amft N. Interferon- $\beta$  is the principle mediator of stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29, p.1041-50.

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, p.12687-90.

Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Sattouet-Roche P, Siegfried C, Alouani S. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. *J. Clin. Invest.*, 2001, 12, p.1825-32.

Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia and interleukin-6 production in vivo. *J. Exp. Med.*, 1996, 184, p.883-91.

Prescott SM. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, p.1511-3.

**R**

Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, p.7420-6.

Rannou F, François M, Corvol MT, Berenbaum F. Dégénération du cartilage et polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum.*, 2005, 72, p.322-30.

Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, p.839-43.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell Physiol.*, 2002, 192, p.131-7.

Reddy SV, Wanchu A, Khullar M, Govindraj S, Bamberg P. Leflunomide reduces nitric oxide production in patients with active rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, 2005, 5, p.1085-90.

Reece RJ, Kraan MC, Radjenovic A, Veale DJ, O'Connor PJ, Ridgway JP. Comparative assessment of leflunomide and methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, p.366-72.

Ritchlin CT. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.*, 2000, 2, p.356-60.

Ritchlin CT. Mechanism of erosion in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2004, 31, p.1229-37.

Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NF $\kappa$ B ligand and tumor necrosis factor- $\alpha$  in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone*, 2002a, 30, p.340-6.

Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JW, Ryan PF, Dunstan CR, Martin TJ, Gillespie MT. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am. J. Pathol.*, 2002b, 161, p.1419-27.

Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.*, 1992, 6, p.439-53.

Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 1998, 391, p.496-9.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1992, 89, p.1890-3.

Roux-Lombard P, Modoux C, Vischer T, Grassi J, Dayer JM. Inhibitors of interleukin 1 activity in synovial fluids and in cultured synovial fluid mononuclear cells. *J. Rheumatol.*, 1992, 19, p.517-23.

Roux-Lombard P, Punzi L, Hasler F, Bas S, Todesco S, Gallati H, Guerne PA, Dayer JM. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum.*, 1993, 36, p.485-9.

Roymans D, Slegers H. Phosphatidylinositol-3 kinase in tumor progression. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, p.487-98.

Rückemann K, Fairbanks LD, Carrey EA, Hawrylowicz CM, Richards DF, Kirschbaum B, Simmonds HA. Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, p.21682-91.

Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 2000, 404, p.892-7.

## S

Salvador G, Sanmarti R, Garcia-Peiro A, Rodriguez-Cros JR, Munoz-Gomez J, Canete JD. P53 expression in rheumatoid and sporadic arthritis synovial tissue and association with joint damage. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, 64, p.183-7.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 2001, 410, p.471-5.

Samejima K, Tone S, Earnshaw WC. CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, p.45427-32.

Sany J. Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. Dans « Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte », Ed John Libbey Eurotext, 2003, p.17-33.

Sano H, Hla T, Maier JAM, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J. Clin. Invest.*, 1992, 89, p.97-108.

Sarkar S, Fox DA. Dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci.*, 2005, 10, p.656-65.

Schedel J, Gay RE, Kuenzler P, Seemayer C, Simmen B, Michel BA, Gay S. FLICE-inhibitory protein expression in synovial fibroblasts and at sites of cartilage and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, p.1512-8.

Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, 43, p.2501-12.

Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1997, 94, p.11357-62.

Scott A, Higdon K, Benghuzzi H, Tucci M, Cason Z, England B, Tsao A, Hughes J. TCPL drug delivery system: the effects of synthetic DHEA and diosgenin using an ovariectomized rat model. *Biomed. Sci. Instrum.*, 2000, 36, p.171-6.

Shafer LM, Slice LW. Anisomycin induces COX-2 mRNA expression through p38 (MAPK) and CREB independent of small GTPases in intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 27, en ligne.

Shen ZN, Nishida K, Doi H, Oohashi T, Hirohata S, Ozaki T, Yoshida A, Ninomiya Y, Inoue H. Suppression of chondrosarcoma cells by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> is

associated with altered expression of Bax/Bcl-xL and p21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 11, p.375-82.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 1998, 58, p.362-6.

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 95, p.1455-9.

Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.*, 2001, 108, p.1781-8.

Siegle I, Klein T, Backman JT, Saal JG, Nusing RM, Fritz P. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, p.122-9.

Sigal E. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *J. Physiol.*, 1991, 260, p.L13-L28.

Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1991, 88, p.3671-5.

Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.*, 1989, 259, p.315-24.

Smith ML, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur. J. Cancer*, 2000, 36, p.664-74.

Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 2001, 410, p.112-6.

Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.*, 2000, 342, p.1946-52.

Surette ME, Fonteh AN, Bernatchez C, Chilton FH. Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis*, 1999, 20, p.757-63.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999, 397, p.441-6.

Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S, Watanabe N, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett.*, 2000, 465, p.23-7.

Szekanecz Z, Gaspar L, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci.*, 2005, 10, p.1739-53.

## T

Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB : a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, p.7-11.

Taki H, Sugiyama E, Kuroda A, Mino T, Kobayashi M. Interleukin-4 inhibits interleukin-11 production by rheumatoid synovial cells. *Rheumatology*, 2000, 39, p.728-31.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.*, 1995, 14, p.1129-35.

Thomas B, Berenbaum F, Humbert L, Bian H, Bereziat G, Crofford L, Olivier JL. 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.*, 2000, 267, p.6798-809.

Thomas B, Thirion S, Humbert L, Tan L, Goldring MB, Bereziat G, Berenbaum F. Differentiation regulates interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 in human articular chondrocytes: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.*, 2002, 362, p.367-73.

Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem. Biol.*, 1998, 5, p.R97-103.

Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol.*, 2000, 322, p.100-10.

Trepicchio WL, Wang L, Bozza M, Dorner AJ. IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappaB. *J. Immunol.*, 1997, 159, p.5661-70.

Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 1995, 83, p.493-501.

Tucci M, Benghuzzi H. Structural changes in the kidney associated with ovariectomy and diosgenin replacement therapy in adult female rats. *Biomed. Sci. Instrum.*, 2003, 39, p.341-6.

Turchan J, Pocerlich CB, Gairola C, Chauhan A, Schifitto G, Butterfield DA, Buch S, Narayan O, Sinai A, Geiger J, Berger JR, Elford H, Nath A. Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants. *Neurology*, 2003, 60, p.307-14.

## U

Urushibara M, Takayanagi H, Koga T, Kim S, Isobe M, Morishita Y, Nakagawa T, Löeffler M, Kodama T, Kurosawa H, Taniguchi T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, p.794-804.

## V

Van den Berg WB. Uncoupling of inflammatory and destructive mechanism in arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2001, 3 (suppl 2), p.7-16.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-X<sub>L</sub> prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell*, 1999, 3, p.159-67.

Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenaabeele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.*, 2001, 8, p.1136-42.

Van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK. Role of interleukin-12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J. Exp. Med.*, 1997, 186, p.1119-28.

Van Roon JAG, Lafeber FPJG, Bijlsma JW. Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2001, 44, p.3-12.

Verdrengh M, Jonsson IM, Zaether O, Bajtner E, Holmdahl R, Tarkowski A. Total abrogation of collagen II-induced arthritis and the B cell response to type II collagen using suboptimal doses of a topoisomerase II antagonist. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002, 61, p.829-31.

Vergne P, Liagre B, Bertin P, Cook-Moreau J, Treves R, Beneytout JL, Rigaud M. Methotrexate and cyclooxygenase metabolism in cultured human rheumatoid synoviocytes. *J. Rheumatol.*, 1998, 25, p.433-40.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, 102, p.43-53.

## W

Walmsley M, Butler DM, Marinova-Mutafchieva L, Feldmann M. An anti-inflammatory role of interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis. *Immunology*, 1998, 95, p.31-7.

Wakisaka S, Szuki N, Takeba Y, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Takeno M, Saito N, Yokoe T, Kaneko A, Asai T, Sakane T. Modulation by pro-inflammatory cytokines of Fas/Fas-L-mediated apoptotic cell death of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998, 114, p.119-28.

Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.*, 1996, 10, p.2859-69.

Wang Z, Zhou J, Ju Y, Zhang H, Liu M, Li X. Effects of two saponins extracted from the polygonatum *Zanlanscianense* pamp on the human leukemia (HL-60) cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24, p.159-62.

Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, p.7563-8.

Westra J, Limburg PC, de Boer P, van Rijswijk MH. RWJ 67657, a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, 63, p.1453-9.

Williams JW, Mital D, Chong A, Kottayil A, Millis M, Longstreth J, Huang W, Brady L, Jensik S. Experiences with leflunomide in solid organ transplantation. *Transplantation*, 2002, 73, p.358-66.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 1994, 370, p.270-5.

Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J.*, 1999, 18, p.4969-80.

Wong PKK, Campbell IK, Egan PJ, Ernst M, Wicks IP. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. *Arthritis Rheum.*, 2003, 48, p.1177-89.

Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J. Gastroenterol.*, 2003, 9, p.1302-6.

## X

Xu X, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A, Chong AS. Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J. Biol. Chem.*, 1995, 26, p.12398-403.

## Y

Yamaguchi A, Tazuma S, Ochi H, Chayama K. Choleric action of diosgenin is based upon the increases in canalicular membrane fluidity and transporter activity mediating bile acid independent bile flow. *Hepatol. Res.*, 2003, 25, p.287-295.

Yamamoto S, Yamamoto H, Kurobe H, Yamashita R, Yamaguchi H, Ueda N. Transcriptional regulation of fatty acid cyclooxygenases-1 and -2. *Int. J. Tissue React.*, 1998, 20, p.17-22.

Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, p.135-42.

Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, Green DR, Zvaifler NJ, Firestein GS. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, p.10025-30.

Yamasaki S, Kawakami A, Nakashima T, Nakamura H, Kamachi M, Honda S, Hirai Y, Hida A, Migita K. Importance of NF-kappaB in rheumatoid synovial tissues: in situ NF-kappaB expression and in vitro study using cultured synovial cells. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001, 60, p.678-84.

Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in rheumatoid synovial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002a, 302, p.18-25.

Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.*, 2002b, 531, p.278-84.

Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 2001, 22, p.1379-83.

Yao Q, Wang S, Glorioso JC, Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Oligino TJ. Gene transfer of p53 to arthritic joints stimulates synovial apoptosis and inhibits inflammation. *Mol. Ther.*, 2001, 3, p.901-10.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 9, p.680-4.

Yen ML, Su JL, Chien CL, Tseng KW, Yang CY, Chen WF, Chang CC, Kuo ML. Diosgenin induces HIF-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related PI3K/Akt and p38 MAPK pathways in osteoblasts. *Mol. Pharmacol.*, 2005, 5, en ligne.

Yin TG, Schendel P, Yang YC. Enhancement of in vitro and in vivo antigen-specific antibody responses by interleukin 11. *J. Exp. Med.*, 1992, 175, p.211-6.

Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*, 1998, 396, p.77-80.

Yokoyama C, Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 165, p.888-94.

Youn J, Kim HY, Patk JH, Hwang SH, Lee SY, Cho CS, Lee SK. Regulation of TNF- $\alpha$ -mediated hyperplasia through TNF receptors, TRAFs, and NF- $\kappa$ B in synoviocytes obtained from patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.*, 2002, 83, p.85-93.

Youssef J, Badr M. Enhanced hepatocarcinogenicity due to agonists of peroxisome proliferator-activated receptors in senescent rats: role of peroxisome proliferation, cell proliferation, and apoptosis. *ScientificWorld Journal*, 2002, 2, p.1491-500.

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, p.23975-83.

## Z

Zeng X, Ai M, Tian X, Gan X, Shi Y, Song Q. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2003, 30, p.1451-5.

Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2000, 97, p.2597-602.

Zhang HG, Wang Y, Xie JF, Liang X, Liu D, Yang P, Hsu HC, Ray RB, Mountz JD. Regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase Akt. *Arthritis Rheum.*, 2001, 44, p.1555-67.

Zhang M, Guo R, Zhai Y, Yang D. LIGHT sensitizes IFN $\gamma$ -mediated apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells leading to down-regulation of anti-apoptosis Bcl-2 family members. *Cancer Lett.*, 2003, 195, p.201-10.

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>SOMMAIRE</b> .....	5
<b>PUBLICATIONS</b> .....	8
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	9
<b>INTRODUCTION</b> .....	15
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	18
<b>I / PHYSIOPATHOLOGIE DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE (PR)</b> .....	19
<b>A / LA SYNOVITE RHUMATOÏDE</b> .....	19
<b>B / ROLE DES CELLULES T</b> .....	21
1 / Le paradigme de la cellule T.....	21
2 / Migration des cellules T dans l'articulation rhumatoïde et apparition d'un organe lymphoïde secondaire intrasynovial.....	22
3 / Implication du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	23
4 / Réponse des lymphocytes T dans la synoviale .....	24
5 / Les cellules T régulatrices.....	25
<b>C / ROLE DES CELLULES B</b> .....	26
1 / Les auto-anticorps dans la PR.....	26
2 / Le rôle du lymphocyte B dans l'auto-immunité .....	27
<b>D / ROLE DES CELLULES SYNOVIALES</b> .....	27
1 / Fibroblastes synoviaux.....	27
2 / Les macrophages synoviaux .....	28
<b>E / ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES</b> .....	29
<b>F / CYTOKINES ET POLYARTHRITE RHUMATOÏDE</b> .....	30
1 / Généralités.....	30
2 / Les principales cytokines intervenant dans la physiopathologie de la PR.....	34
2.1 / L'interleukine-1 (IL-1).....	34
2.2 / Le facteur de nécrose tumorale ou tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	37
2.3 / L'interleukine -4 (IL-4).....	38
2.4 / L'interleukine-6 (IL-6).....	39
2.5 / L'interleukine-8 (IL-8).....	39
2.6 / L'interleukine 10 (IL-10) .....	39
2.7 / L'interleukine-11.....	40
2.8 / L'interleukin-15 (IL-15).....	41
2.9 / L'interleukine-17 (IL-17).....	42

2.10 / L'interleukine-18 (IL-18).....	42
G / LA DESTRUCTION OSTEO-CARTILAGINEUSE .....	42
H / L' ANGIOGENESE .....	44
II / LE METABOLISME DES CYCLO-OXYGENASES .....	45
A / METABOLISME DE L' ACIDE ARACHIDONIQUE .....	45
B / LES TROIS TYPES DE CYCLO-OXYGENASES (COX) .....	46
C / LES PROSTAGLANDINES .....	48
D / CYCLOOXYGENASES ET PR.....	49
III / VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE ET POLYARTHRITE RHUMATOIDE .....	50
A / LA VOIE TRAF/NIK/I $\kappa$ BK/NF- $\kappa$ B .....	51
B / LA VOIE DES MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN (MAP) KINASES .....	54
C / LA VOIE PHOSPHATIDYL INOSITOL-3 KINASE (PI3K) .....	57
D / LA VOIE JAK/STAT.....	57
IV / L' APOPTOSE.....	58
A / APPROCHES GENERALES DE L' APOPTOSE .....	58
1 / Acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose .....	58
1.1 / Les caspases .....	58
1.1.1 / Structure et activation des caspases .....	59
1.1.2 / Les différentes classes de caspases .....	59
1.1.3 / Principaux substrats des caspases et conséquences de leur clivage .....	61
1.2 / Les membres de la famille Bcl-2 .....	62
1.2.1 / Structure .....	62
1.2.2 / Régulation des membres de la famille Bcl-2 .....	62
1.2.3 / Mode d' action .....	64
2 / Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose .....	64
2.1 / La théorie de la rupture de la membrane externe mitochondriale.....	65
2.2 / Le pore de transition de perméabilité membranaire.....	65
2.3 / La théorie du pore formé par les membres de la famille Bcl-2.....	66
3 / Les différentes voies de l'apoptose .....	66
3.1 / La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque .....	66
3.1.1 / La voie FasL/Fas (CD95 ou Apo-1).....	67
3.1.2 / La voie TNF-TNF-R .....	68
3.1.3 / Régulation de la voie apoptotique médiée par les récepteurs .....	70
3.1.4 / Amplification de la voie des récepteurs de mort.....	70
3.2 / La voie mitochondriale ou voie intrinsèque.....	71
3.2.1 / La voie mitochondriale dépendante des caspases .....	71
3.2.3 / La voie mitochondriale indépendante des caspases .....	74
3.3 / La voie du reticulum endoplasmique .....	75
4 / Le rôle de NF- $\kappa$ B dans l'apoptose .....	76
5 / Le rôle de p53 dans l'apoptose.....	76
6 / Le rôle de COX-2 dans l'apoptose.....	77
B / POLYARTHRITE RHUMATOIDE ET APOPTOSE.....	78
1 / Intervention de la voie du récepteur de mort Fas/FasL.....	78
2 / Rôle de NF- $\kappa$ B .....	79
3 / Rôle des membres de la famille Bcl-2 .....	79
4 / Rôle de p53 .....	79
5 / Intervention de la voie PI3K/Akt-1 .....	80
V / LE LEFLUNOMIDE.....	80
VI / LA DIOSGENINE .....	82

<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	86
I / CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES SYNOVIALES .....	87
A / PREPARATION ET CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES SYNOVIALES HUMAINES.....	87
B / CULTURE DES SYNOVIOCYTES HUMAINS DE TYPE B.....	88
II / ETUDE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES.....	88
A / TEST AU MTT APRES TRAITEMENT PAR LA DIOSGENINE.....	88
B / MICROSCOPIE OPTIQUE A CONTRASTE DE PHASE.....	89
III / ANALYSE DE L' APOPTOSE.....	89
A / ETUDE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ET MARQUAGE AU DAPI.....	89
B / DOSAGE DE L' ACTIVITE CASPASE-3 .....	90
C / ANALYSE QUANTITATIVE DE L' APOPTOSE .....	91
IV / ANALYSE DE L' EXPRESSION DE COX-2 .....	92
A / EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES .....	92
B / ANALYSE DE L' EXPRESSION DE LA PROTEINE COX-2 .....	92
V / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE PGE <sub>2</sub> .....	94
VI / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES .....	95
VII / PREPARATION DES EXTRAITS NUCLEAIRES ET ETUDE DE L' ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B .....	97
VIII / ANALYSE QUANTITATIVE DES MAP KINASES : PHOSPHO-ERK1/ERK2, PHOSPHO-JNK ET PHOSPHO-p38 $\alpha$ HUMAINES .....	98
IX / ANALYSES STATISTIQUES.....	98
 <b>RÉSULTATS</b> .....	 100
I / RESULTATS DES EXPERIENCES REALISEES AVEC LA DIOSGENINE.....	101
A / CULTURE DE CELLULES SYNOVIALES .....	101
B / LES EFFETS DE LA DIOSGENINE SUR LA PROLIFERATION ET LA MORPHOLOGIE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES HUMAINES DE PR.....	102
C / ANALYSE DE LA CHUTE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ).....	105
D / ETUDE DE L' ACTIVITE CASPASE-3 .....	106
E / ANALYSE DE LA FRAGMENTATION DE L' ADN.....	107
F / ETUDE DE L' EXPRESSION ET DE L' ACTIVITE DE LA COX-2 DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR LA DIOSGENINE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR .....	109
G / ANALYSE DE LA PRODUCTION DE PGE <sub>2</sub> ENDOGENE DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR LA DIOSGENINE DES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES.....	111
H / ETUDE DE L' EFFET DE LA DIOSGENINE SUR LA FRAGMENTATION DE L' ADN APRES SUREXPRESSON DE COX-2 INDUITE PAR L' IL-1 $\beta$ .....	113
I / LES EFFETS DE LA DIOSGENINE SUR LA PRODUCTION D' IL-6 ET D' IL-8 PAR LES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR .....	114
II / RESULTATS DES EXPERIENCES REALISEES AVEC L' A77 1726.....	116
A / EFFETS DE L' A77 1726 SUR LA FRAGMENTATION DE L' ADN DANS LES CELLULES SYNOVIALES FIBROBLASTIQUES DE PR .....	116
B / EFFETS DE L' A77 1726 SUR LA PRODUCTION DE CYTOKINES ET ANTAGONISTES DES CYTOKINES : IL-6 , IL-8, IL-10, IL-11, IL-15, IL-18, sTNFRI, IL-1Ra .....	116

C / ANALYSE DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE COX-2 APRES TRAITEMENT DES CELLULES SYNOVIALES PAR L'A77 1726 .....	123
D / EFFETS DE L'A77 1726 SUR L'ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B ET DES MAP KINASES (ERK1/ERK2, p38 $\alpha$ , JNK).....	125
<b>DISCUSSION</b> .....	130
I / PREMIERE PARTIE.....	133
II / DEUXIEME PARTIE .....	138
<b>CONCLUSION</b> .....	144
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	148
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	173
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	177
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	178
<b>ANNEXES</b> : publications élaborées au cours de la thèse.....	180
ANNEXE 1 .....	181
ANNEXE 2 .....	182

# Liste des tableaux

<b>Tableau n°1.</b> Classification fonctionnelle des cytokines selon Meyer (2002).....	32
<b>Tableau n°2:</b> Expression des cytokines dans la synoviale rhumatoïde selon Meyer (2002). .....	33
<b>Tableau n°3:</b> Les principaux facteurs pro- et anti-angiogéniques. ....	44
<b>Tableau RI-1 :</b> fragmentation de l'ADN dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR après traitement par la diosgénine. ....	108
<b>Tableau RI-2 :</b> Effet de la diosgénine sur la production de PGE <sub>2</sub> après inhibition ou induction de la COX-2 dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR.....	111

# Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Séquence pathogénique de la polyarthrite rhumatoïde d'après Boissier (2002). .....	20
<b>Figure 2:</b> Présentation de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité au récepteur à l'antigène de la cellule T (TCR) d'après Boissier (2002). .....	24
<b>Figure 3 :</b> Déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires dans la synoviale rhumatoïde d'après Sany (2003). .....	31
<b>Figure 4 :</b> Les familles IL-1 et récepteurs de l'IL-1 d'après Dayer (2002).....	35
<b>Figure 5 :</b> Rôle pivot de l'IL-1 dans les principaux mécanismes du processus pathogénique de la PR (d'après Meyer, 2002). .....	36
<b>Figure 6 :</b> Les différentes activités du TNF- $\alpha$ (d'après Sany, 2003).....	38
<b>Figure 7 :</b> Métabolisme de l'acide arachidonique (d'après Chilton et al., 1996).....	46
<b>Figure 8:</b> Activation et rôles de NF- $\kappa$ B.....	53
<b>Figure 9 :</b> Description schématique de l'activation des MAP kinases (MAPKs) (Lioté et Berenbaum, 2004). .....	56
<b>Figure 10:</b> Activation des caspases (d'après Amarante-Mendes et Green, 1999) .....	60
<b>Figure 11 :</b> Les membres de la famille Bcl-2 (d'après Gross et al., 1999) .....	63
<b>Figure 12 :</b> La voie des récepteurs de mort (d'après Gupta, 2003).....	69
<b>Figure 13 :</b> La voie mitochondriale (d'après Ravagnan et al., 2002). .....	72
<b>Figure 14 :</b> Structure de la diosgénine.....	82
<b>Figure A1 :</b> Observation en microscopie optique (X 200) d'une culture de synoviocytes humains de type B de PR au 3 <sup>ème</sup> passage. ....	101
<b>Figure RI-1 :</b> Effet de la diosgénine sur la prolifération des cellules synoviales fibroblastiques de polyarthrite rhumatoïde. ....	103
<b>Figure RI-2 :</b> Modifications morphologiques des cellules synoviales fibroblastiques de polyarthrite rhumatoïde traitées avec de la diosgénine. ....	104
<b>Figure RI-3 :</b> Analyse du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ) après traitement par la diosgénine.....	106
<b>Figure RI-4 :</b> Effets de la diosgénine sur l'activation de la caspase-3 dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. ....	107
<b>Figure RI-5 :</b> Analyse de l'expression de COX-2 par western blot dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. ....	109
<b>Figure RI-6 :</b> Effets de la diosgénine sur la production de prostaglandine E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. ....	110
<b>Figure RI-7 :</b> Effet de la diosgénine (Dios) sur la fragmentation de l'ADN après incubation avec le célécoxib ou après addition de PGE <sub>2</sub> exogène . ....	112
<b>Figure RI-8 :</b> Effet de la diosgénine sur la fragmentation de l'ADN après stimulation par l'IL-1 $\beta$ .....	113

<b>Figure RI-9</b> : Effet de la diosgénine sur la production d'IL-6 (A) et d'IL-8 (B) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR.....	115
<b>Figure RII-1</b> : (A) Photographies (grossissement $\times 400$ ) des cellules synoviales fibroblastiques de PR traitées ou non avec l'A77 1726 (100 $\mu\text{M}$ ) et (B) quantification de l'apoptose par technique ELISA (kit « Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> ») basée sur la fragmentation de l'ADN.....	117
<b>Figure RII-2</b> : Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1Ra et sTNFRI) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR.....	119
<b>Figure RII-3</b> : Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion de l'IL-6 (cytokine pro-inflammatoire) et de l'IL-8 (chémokine) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR.....	120
<b>Figure RII-4</b> : Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion d'IL-11 par les cellules synoviales fibroblastiques de PR. ....	121
<b>Figure RII-5</b> : Effet de l'A77 1726 sur la sécrétion de l'IL-11 (A) et de l'IL-10 (B) en présence d'uridine. ....	122
<b>Figure RII-6</b> : Effet de l'A77 1726 sur l'expression de COX-2 (A) et la production de PGE <sub>2</sub> (B) par les cellules synoviales fibroblastiques de PR.....	124
<b>Figure RII-7</b> : Effet de l'A77 1726 sur l'activation de NF- $\kappa$ B induite par l'IL-1 $\beta$ .....	125
<b>Figure RII-8</b> : Quantification par ELISA d'ERK1/ERK2 (A), JNK (B) et p38 $\alpha$ (C) phosphorylées dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR stimulées par l'IL-1 $\beta$ et traitées par A77 1726.....	127
<b>Figure RII-9</b> : Effet d'un inhibiteur sélectif de p38 (SB 203580) sur la sécrétion d'IL-10 (A) et celle d'IL-11 (B) dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. ....	129
<b>Figure 15</b> : Schéma résumant les événements dans l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules synoviales fibroblastiques de PR. ....	137

## **Annexes : publications élaborées au cours de la thèse**

**ANNEXE 1**

**ANNEXE 2**

## Résumé

Bien que les mécanismes exacts conduisant à l'inflammation et à la destruction ostéo-articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) ne soient pas connus, cette maladie auto-immune se caractérise par l'activation de multiples cellules immunitaires aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de différents effecteurs de la destruction ostéo-articulaire comme les métalloprotéases et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). D'autre part, l'hyperplasie synoviale agressive est probablement liée à un défaut d'apoptose des cellules synoviales. Notre travail a été réalisé dans un modèle de culture de synoviocytes fibroblastiques humains de PR. La première partie du travail est consacrée à l'étude de l'apoptose et de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les cellules synoviales traitées par la diosgénine, un stéroïde végétal. La deuxième partie concerne les mécanismes d'action du léflunomide, utilisé dans le traitement de la PR et notamment ses effets sur les cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Nos résultats montrent pour la première fois que la diosgénine entraîne une inhibition de la croissance, une apoptose des cellules synoviales, associées à une induction de l'expression de COX-2. Le processus apoptotique déclenché par la diosgénine entraîne une chute du potentiel membranaire mitochondrial, l'activation de la caspase-3 et une fragmentation de l'ADN. Les effets pro-apoptotiques de la diosgénine sont associés à une surexpression de COX-2 corrélée à une augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> endogène.

L'A77 1726, métabolite actif du léflunomide, est responsable à forte dose (100 µM) d'une augmentation de la sécrétion d'interleukine (IL)-10, d'une diminution de la production d'IL-11 et n'a pas d'effet sur celles du récepteur soluble du *tumor necrosis factor-α* (sTNFRI) et de l'IL-8. Nos résultats confirment que l'A77 1726 est responsable d'une diminution de la production d'IL-6 et de PGE<sub>2</sub> et d'une augmentation de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra). Les effets de l'A77 1726 semblent associés à une activation de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38. Enfin, l'A77 1726 est un puissant inhibiteur de l'activation du *nuclear factor-κB* (NF-κB) induite par l'IL-1β.

**Mots clés :** polyarthrite rhumatoïde, synoviocytes humains, diosgénine, léflunomide, cytokines, interleukine-10, interleukine-11, apoptose, MAPK, NF-κB, cyclooxygénase-2

---

## Abstract

**“The effect of different products (diosgenin, leflunomide) on cytokine secretion, cyclooxygenase-2 expression in cultured human rheumatoid arthritis type B synovial cells. Identification of signal transduction pathways.”**

Although the exact pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA) is unknown, this chronic inflammatory joint disease is characterized by the activation of multiple immune cells, production of pro-inflammatory cytokines and synthesis of different destructive factors such as metalloproteases and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). In addition, alterations in the apoptosis of synovial cells is probably responsible for synovial hyperplasia. We studied the effects of diosgenin, a plant steroid, and the effects of leflunomide, a disease-modifying antirheumatic drug in a model of cultured human RA fibroblast synovial cells (RA FLS).

First, diosgenin inhibits RA FLS growth with apoptosis induction associated with cyclooxygenase-2 (COX-2) upregulation. We observed a loss of mitochondrial membrane potential, caspase-3 activation and DNA fragmentation after diosgenin treatment. These results suggest that the proapoptotic effect of diosgenin is associated with COX-2 overexpression correlated with overproduction of endogenous PGE<sub>2</sub>.

In the second part of the study, we showed that high dose of A77 1726 (100 µM), the active metabolite of leflunomide, increased interleukin(IL)-10 secretion, decreased IL-11 release and had no effect on tumor necrosis factor-α soluble receptor I (sTNFRI) and IL-8 secretion in IL-1β-stimulated RA FLS. Furthermore, our results confirmed that A77 1726 decreases IL-6 and PGE<sub>2</sub> synthesis while it increases IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) secretion. The effect of A77 1726 on IL-10 and IL-11 secretion seemed to be associated with the status of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. Furthermore, A77 1726 was a potent inhibitor of nuclear factor-κB (NF-κB) activation induced by IL-1β in human RA FLS.

**Key words :** rheumatoid arthritis, human synoviocytes, diosgenin, leflunomide, cytokines, interleukin-10, interleukin-11, apoptosis, MAPK, NF-κB, cyclooxygenase-2.