

Université de Montréal

**Inhibition de l'expression des gènes des métalloprotéinases matricielles (MMPs) par
interception de la transduction du signal des cytokines pro-inflammatoire dans le
cartilage et les chondrocytes articulaires**

**Mécanismes cataboliques des cytokines pro-inflammatoires de TNF- α , de l'IL-1 et de
l'IL-17**

par

ABDELHAMID LIACINI

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Sciences biomédicales
option Biologie moléculaire et biologie cellulaire humaine**

Février-2005

© LIACINI, 2005



W

4

U58

2005

V. 029

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Cette thèse intitulée :

Inhibition de l'expression des gènes des métalloproteinases matricielles (MMPs) par interception de la transduction du signal des cytokines pro-inflammatoire dans le cartilage et les chondrocytes articulaires.

présentée par :

ABDELHAMID LIACINI

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Florina Moldovan, président-rapporteur

Dr. Muhammad Zafarullah, directeur de recherche

Dr. Hassan Fahmi, membre du jury

Dr. Suzanne Bernier, examinateur externe

Dr. Sylvain Meloche, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 sont les cytokines pro-inflammatoires les plus importantes dans le déclenchement du catabolisme cartilagineux observé chez les patients arthrosiques (OA) et arthritiques (RA). Nous avons démontré que celles-ci induisent l'expression des gènes MMP-3, MMP-13 (IL-1 β , TNF- α) et ADAM-TS4 (IL-17). Les mécanismes moléculaires de ces inductions ont été investigués en traitant les chondrocytes avec des inhibiteurs des voies de signalisation MAPKs et avec les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. L'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 assurent une activation rapide par phosphorylation des trois cascades des MAPKs (ERK, p38 et JNK) dans les chondrocytes. L'inhibition de l'expression des gènes MMPs par PD98059, U0126, SB203580, curcumin, SP600125, Bay-11-7085, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), N-acetyl-L-cysteine (NAC) et pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) suggère bien que les voies de signalisation ERK, p38 et JNK-MAPK ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B sont des médiateurs puissants de l'expression des gènes MMPs en réponse à une stimulation avec ces cytokines. Cette induction de MMP-13, MMP-3 (IL-1 β , TNF- α) et ADAM-TS4 (IL-17) par les chondrocytes indique que, d'abord, ce type cellulaire répond à l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 et ensuite que les gènes MMP13, MMP-3 et ADAM-TS4 constituent une cible de ces cytokines. Dans la pathologie RA, ces cytokines exercent leurs effets destructifs en stimulant l'expression des MMPs dont la MMP-13, la MMP-3 et l'ADAM-TS4. Ces enzymes protéolytiques entraînent la dégénérescence tissulaire des articulations (la hanche, le genou, la cheville et l'épaule) chez les patients RA et OA. La répression de l'expression des gènes MMP-13, MMP-3 et ADAM-TS4 avec les inhibiteurs spécifiques d'ERK

(U0126, PD98059) montre bien l'implication de cette voie dans la transduction de signal de l'IL-1 β , de TNF- α et de l'IL-17 qui aboutit à l'expression des gènes MMPs et ADAM-TS4 dans les chondrocytes. De même, l'inhibition de ces trois gènes par les inhibiteurs de p38, JNK (SB203580, SB203590, curcumin) plaide en faveur de l'implication de ces voies dans la transcription des gènes MMP-13, MMP-3 et ADAM-TS4. L'inhibition de l'expression de MMP-3, MMP-13 et ADAM-TS4 induites par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 avec le curcumin, SP600125 montre bien l'implication des voies JNK, NF κ B ainsi que le facteur de transcription AP-1 dans la transcription des gènes MMPs et ADAM-TS4. Nous avons démontré le rôle, jusqu'à présent inconnu, des voies de signalisation d'ERK, p38 et de JNK MAPKs. Les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B se sont révélés comme médiateurs essentiels pour l'expression de MMP-13, MMP-3 et ADAM-TS4 induites par le TNF- α , l'IL-17, et l'IL-1 β . Ces inhibiteurs devraient être évalués pour améliorer l'efficacité des molécules utilisées dans le traitement de l'arthrose ou pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette pathologie.

Mots-clés : Arthrite; Arthrose; Cartilage; Chondrocyte; Transduction du signal; Métalloprotéinases matricielles; aggrecanases; Interleukine-1; Interleukine-17; TNF- α .

Abstract

IL-1 β , TNF- α and IL-17 are major proinflammatory cytokines, which induce arthritic joint inflammation and resorption of cartilage, promote cartilage breakdown by inducing matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif, ADAMTS) in arthritic joints. We investigated cytokines signaling pathways inducing MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 genes in chondrocytes. IL-1, TNF- α and IL-17 rapidly activated phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs), p38, and c-jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein (MAP) kinases in human and bovine chondrocytes.

Mechanisms of this induction were investigated by pretreating primary human femoral head chondrocytes, bovine chondrocytes or chondrosarcoma cells with the potential inhibitors of cytokines signal transduction and downstream target transcription factors (PD98059, U0126, SB203580, curcumin, SP600125, Bay-11-7085, NAC, NDGA, PDTC) followed by stimulation with IL-1, TNF- α or IL-17 and analysis of MMPs RNA/protein (MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4). ERK pathway inhibitors, PD98059 and U0126, down-regulated IL-1, TNF- α and IL-17-induced MMP and ADAM-TS4 (IL-17 only) gene expression. Protein 38 and JNK pathway inhibitors, SB203580 and SP600125, also reduced induction of these genes. Antioxidants and activating protein-1 transcription factor inhibitors, nordihydroguaiaretic acid and N-acetyl-L-cysteine (NAC) suppressed MMP and ADAM-TS4 genes. Similarly, nuclear factor kappa B (NF κ B) pathways inhibitors curcumin and Bay-11-7085 also blocked their induction. Thus MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 genes are coordinately up-regulated by IL-1, TNF- α or IL-17 via MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and NF κ B mediators, which could be targeted as novel

therapeutic strategies for reducing IL-1, TNF- α and IL-17 -triggered cartilage damage in arthritis.

Keywords: Osteoarthritis; Rheumatoid arthritis; Cartilage; Chondrocytes; Signal transduction; matrix metalloproteinases; aggrecanases; Interleukin-1; Interleukin-17; TNF- α .

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures	ix
Remerciements.....	xiii
La liste des abréviations.....	xiv
I. Introduction.....	1
1. Le cartilage.....	2
2. Les composants cellulaires.....	2
3. La matrice extracellulaire (ECM)	6
4. Arthrose ou ostеоarthritіs (OA)	9
5. Pathologie et hypothèses de la pathogénie de l'arthrose (OA)	12
6. Processus arthrosique et le rôle de chondrocyte dans la destruction	13
7. L'arthrite rhumatoïde (RA).....	16
8. Les Métalloprotéinases (MMPs).....	21
8.1. Structure	22
8.2. Protéinases : MMPs/ADAMTS dans la pathogénie OA /RA	25
9. Le système de cytokines dans la pathologie RA.....	27
9.1. La famille de l'IL-1 et ses récepteurs.....	30
9.1.1. Rôle central de l'IL-1 dans la pathologie RA	31
9.1.2. Interaction cellulaire et production d'IL-1 et du TNF- α	33
9.2. Le TNF- α et ses récepteurs	34
9.3. La Signalisation de TNF- α	35
9.4. Rôle de TNF- α dans la pathogénie RA	38
9.5. L'IL-17 dans l'arthrite rhumatoïde	39
9.5.1. Structure de l'IL-17.....	40
9.5.2. Les effets de l'IL-17 sur les populations cellulaires de synovium.....	41
9.5.3. Les effets destructifs de l'IL-17	42
9.5.4. La signalisation de l'IL-17	44

10. Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)	47
10.1. Extracellular signal-regulated kinases (ERK).....	50
10.2. La protéine p38 kinase	51
10.3. c-Jun N terminal kinase (JNK).....	53
11. La voie de NF- κ B.....	54
12. Hypothèse de recherche	56
12.1. But de la recherche.....	56
12.2. Hypothèse.....	56
II. Articles	58
1. Article 1.....	59
2. Article 2.....	72
3. Article 3.....	84
III. Discussion	93
IV. Conclusion	101
V. Bibliographie.....	104

Liste des figures

Figure 1: Schéma de la topographie des cartilages chez l'humain.	4
Figure 2: Représentation schématique du cartilage articulaire adulte.	5
Figure 3: Le chondrocyte et sa matrice extracellulaire.	8
Figure 4: Représentation schématique de trois étapes hypothétiques impliquées dans la progression de la dégradation cartilagineuse OA.....	11
Figure 5: Le TNF α et l'IL-1 β sont deux cytokines pro-inflammatoires agissant comme ...	20
Figure 6: Représentation schématique de la structure des métalloprotéinases (MMPs).....	24
Figure 7: Régulation du métabolisme cartilagineux par les cytokines et les facteurs de croissance.	29
Figure 8: Représentation schématique des effets de l'IL-1 β , le TNF- α et de l'IL-17.....	46
Figure 9: Mitogen-activated protein Kinase (MAPK) cascades.	49
Figure 10: Représentation schématique des effets cataboliques des cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-17.	103
Article I, figure 1 : Time course of ERK, p38 and JNK MAP kinases phospho-rylation in human chondrocytes in response to IL-1.	63
Article I, figure 2 : Down-regulation of IL-1-induced MMP-3 and MMP-13 RNA and protein expression by ERK-MAP kinase inhibitor, PD98059.	64
Article I, figure 3: Suppression of IL-1-induced MMP-3 and MMP-13 RNA and protein expression by MAPKK inhibitor, U0126.	65
Article I, figure 4 : Inhibition of IL-1-increased MMP-3 and MMP-13 protein expression by p38 and JNK inhibitor, SB203580.....	66
Article I, figure.5 : Reduction in IL-1-stimulated MMP-3 and MMP-13 expression by curcumin.....	67
Article I, figure 6 : Repression of IL-1-inducible MMP-3 and MMP-13 RNA expression by the NF κ B inhibitor, PDTC.....	68

Article II, figure 1 : Expression of MMP-13 mRNA in human nonarthritic and OA femoral head cartilage.	77
Article II, figure 2 : Activation of the ERK, p38, and JNK MAP kinases in chondrocytes in response to TNF- α	77
Article II, figure 3 : Suppression of TNF- α -induced MMP-13 RNA/protein expression by the MAPKK inhibitor U0126.....	78
Article II, figure 4 : Inhibition of TNF- α -induced MMP-13 protein expression by an antisense ERK oligonucleotide.	78
Article II, figure 5 : Down-regulation of TNF- α -induced MMP-13 RNA expression by MAP kinase inhibitors.	79
Article II, figure 6 : Down-regulation of TNF- α -induced MMP-13 gene expression by the JNK inhibitor SP600125	79
Article II, figure 7 : Impact of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on TNF- α -increased MMP-13 gene expression.	80
Article II, figure 8 : Reduction in TNF- α -stimulated MMP-13 expression by curcumin. ..	80
Article II, figure 9 : Decrease in TNF- α -stimulated MMP-13 RNA expression by the NF- κ B inhibitor Bay-11-7085.....	81
Article II, figure 10 : Suppression of TNF- α -induced MMP-13 RNA expression by proteasome inhibitors.....	81
Article III, figure 1 : Induction of MMP-3, -13 and ADAM-TS4 RNA by IL-17 in primary bovine chondrocytes.....	86
Article III, figure 2 : Time-dependent phosphorylation of ERK, p38 and JNK MAP kinases in bovine chondrocytes after stimulation with IL-17.....	86
Article III, figure 3 : Down-regulation of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by ERK-MAPK inhibitors, PD98059 (A) and U0126 (B).....	87
Article III, figure 4 : Reduction of IL-17 increased MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by p38 and JNK inhibitor, SB203580.	88

Article III, figure 5 : Down-regulation of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by JNK inhibitor, SP600125	88
Article III, figure 6 : Down-regulation of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by the AP-1 inhibitor, nordihydroguaiaretic acid (NDGA).....	89
Article III, figure 7 : Suppression of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by the AP-1 inhibitor, N-acetyl-L-cysteine (NAC).....	89
Article III, figure 8 : Suppression of IL-17-stimulated MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 gene expression by curcumin.	90
Article III, figure 9 : Repression of IL-17-inducible MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by Bay-11-7085.	90

Avec toute ma tendresse, je dédie ce travail à ma famille. C'est du fond du cœur que je remercie ma mère Hilal Mina, mon père LIACINI Abbes, mes frères et mes sœurs d'avoir considéré mes études comme une priorité et de m'avoir accordé leur confiance. Je n'oublierai jamais l'inépuisable patience avec laquelle ma famille m'a soutenu tout au long de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon affection et de mon estime.

Remerciements

Mes remerciements vont à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde reconnaissance au professeur Zafarullah Muhammad qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis, grâce à sa disponibilité et sa rigueur intellectuelle, de réaliser ce travail, je lui en suis infiniment reconnaissant. Je le remercie aussi de sa patience, de m'avoir encouragé à affronter les problèmes rencontrés, dont beaucoup ont été résolus grâce à ses judicieux conseils.

Je suis également très redevable envers le Docteur Elmabrouk Mohammed pour m'avoir guidé et conseillé tout au long de la rédaction de cette thèse, et particulièrement pour les nombreuses heures qu'il m'a patiemment consacrées afin de m'aider à surmonter les obstacles auxquels se heurtait mon inexpérience.

Je tiens aussi à remercier Sylvester Judith pour les marques de sympathies qu'elle m'a apporté, pour l'aide inépuisable qu'elle m'a apporté au cours de ce travail. Qu'elle soit assurée de ma reconnaissance et de mon estime.

Mes remerciements s'adressent également à tous les autres membres pour les marques de sympathies qui m'ont apporté.

Avec toute ma tendresse, je dédie ce travail à ma famille. C'est du fond du cœur que je remercie ma mère Hilal Mina, mon père LIACINI Abbes, mes frères et mes sœurs d'avoir considéré mes études comme une priorité et de m'avoir accordé leur confiance. Je n'oublierai jamais l'inépuisable patience avec laquelle ma famille m'a soutenu tout au long de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon affection et de mon estime.

La liste des abréviations

ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif
ADAM-TS4	aggrecanase-1
ADAM-TS5	aggrecanase-2
AIA	adjuvant-induced arthritis
AP-1	activating protein-1
APRIL	a proliferation inducing ligand
ATF-2	activating transcription factor 2
APC	antigen presenting cell
B	lymphocytes B
BAFF	B cell-activating factor
CCR	CC-family chemokine receptor
cDNA	complementary DNA
CIA	collagen-induced arthritis
COMP	cartilage oligomeric protein
COX-2	cyclooxygenase-2
DC	dendritic cell
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signalling complex
DMARD	disease-modifying antirheumatic drug
DMSO	dimethylsulfoxide
DR	death receptor
ECM	extracellular matrix
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
Elk-1	Ets-like transcription factor 1
FADD	Fas-associated death domain protein
FLICE	FADD-like IL-1 converting enzyme
GAG	glycosaminoglycan

G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte –macrophage colony-stimulating factor
HA	hyaluronic acid
HLA	human leucocyte antigens
HPETE	hydro-peroxy eicosa tetraenoic acids
HVS	herpes virus saimiri
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICE	IL-1 converting enzyme
IGF	insulin growth factor
IKK	I κ B kinase
IL-1	interleukin-1
IL-17	interleukin-17
IL-17R	interleukin-17 receptor
IL-1Ra	interleukin-1 receptor antagonist
IL-1RAcP	interleukin-1 receptor accessory protein
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase
IκB	inhibitor of NF κ B
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LIF	leukemia inhibitory factor
LP	link protein
LTB	leukotrien B
MAP2K	MAPK kinase
MAP3K	MAP2K kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	monocyte chemoattractant protein
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MEKK	MEK kinase
MGP	matrix γ -carboxyglutamic acid containing protein

MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MMPs	matrix metalloproteinases
MNK	MAP kinase interacting kinase
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NAC	N-acetylcysteine
NDGA	nordihydroguaiaretic acid
NFκB	nuclear factor kappa B
NO	nitric oxide
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug
OA	osteoarthritis
ODN	oligodeoxynucleotide
OPG	osteoprotegerin
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PEA-3	polyoma virus enhancer
PGE2	prostaglandin-E2
PGs	proteoglycans
PTR	Proteoglycan Tandem Repeat
RA	rheumatoid arthritis
RANKL	receptor activator of nuclear factor κ B ligand
ROS	reactive oxygen species
SCID	severe combined immunodeficient
s-IL-1R	soluble interleukin-1 receptor
STAT	signal transducer and activator of transcription
s-TNF-R	soluble tumor necrosis factor alpha receptor
T	lymphocytes T
TACE	TNF- α converting enzyme
TCR	T cell receptor
TGFβ	transforming growth factor beta
Th-1	T helper cell type 1
Th-2	T helper cell type 2

TIMPs	tissue inhibitor of metalloproteinases
TLR	toll-like receptors
TNF-R	tumor necrosis factor alpha receptor
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TYK	tyrosine kinase
VCAM	vascular cell adhesion molecule
YKL-40	glycoprotein 39 kDa

I. Introduction

QUELQUES CHIFFRES

On compte plus de 100 formes d'arthrite (1):

- L'arthrite est la deuxième cause de consommation de médicament en vente libre au Canada et le troisième motif pour la prise de médicament avec ou sans ordonnance.
- Plus de 4 millions de Canadiens souffrent d'arthrite, soit une personne sur 7. De ce nombre, 3 millions souffrent d'arthrose (OA); 300000 d'arthrite rhumatoïde (RA); 300000 de goutte; 30000 de spondylite ankylosante (AS); 15000 de lupus, etc.
- L'arthrite se situe au troisième rang des maladies chroniques les plus courantes au Canada, derrière les allergies et les maladies artérielles.
- D'ici 2026, en raison de vieillissement de la population, le nombre de personnes atteintes augmentera au rythme effrayant de 1 million par décennie, soit 300 nouveaux cas par jour.
- D'ici 2026, 6.5 millions de Canadiens souffriront d'arthrite. Une hécatombe pour les systèmes de santé puisque l'arthrite et les problèmes musculosquelettiques sont au deuxième rang des maladies les plus coûteuses.

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de cette maladie pourrait remédier à ces problèmes de santé.

1. Le cartilage

Le cartilage et l'os sont les tissus de soutien du corps. Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé connu pour sa fonction biomécanique. Il forme le support de certains organes, les surfaces articulaires des os. Il y a trois types de cartilage dans l'organisme : le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le fibrocartilage. On trouve le cartilage hyalin dans les surfaces articulaires de tous les os, il est entouré d'un périchondre bien matérialisé. Les fibres de collagène sont masquées par les protéoglycans et les glycosaminoglycans (2). Comme son nom l'indique, le cartilage élastique possède une caractéristique d'élasticité. On le trouve dans l'épiglotte, l'oreille externe et le canal auditif. Le fibrocartilage ne se trouve que dans certains endroits : les disques intervertébraux et les endroits où les tendons s'insèrent sur les os (Fig.1). Le cartilage est une structure avasculaire, résistante, légèrement déformable composée de deux entités importantes qui lui confèrent ses propriétés : les chondrocytes et une matrice dans laquelle sont enrobés des composants fibreux (2).

2. Les composants cellulaires

Les composants cellulaires du cartilage sont des chondrocytes, localisés dans des petits espaces ostéocytaires dispersés dans la matrice extracellulaire, des chondroblastes et des cellules chondrogènes, tous les deux dans le périchondre (5). Le développement du cartilage se fait à partir des cellules chondrogènes. Ce sont des cellules mésenchymateuses qui se transforment en chondroblastes, qui sécrètent la matrice cartilagineuse, et se différencient en chondrocytes (2,5). Ces chondrocytes ont la capacité de se diviser, ce qui contribue à la croissance interne du cartilage. Le cartilage est généralement entouré d'une membrane de tissu conjonctif, le périchondre composé d'une couche fibreuse externe qui

est essentiellement composée de fibroblastes, et d'une couche interne formée de cellules chondrogènes formant une zone germinative. Selon le stade de différenciation et de la maturation, le cartilage se divise en quatre couches: une couche superficielle avec des cellules nombreuses aplaties et parallèles à la surface articulaire, une couche intermédiaire avec des chondrocytes plus arrondis et des fibres plus épaisses, une couche radiaire avec des cellules en colonne et des fibres épaisses parallèles entre elles et perpendiculaires à la surface articulaire, et une couche calcifiée adjacente à l'os sous-chondral. Le cartilage articulaire repose sur une fine couche de cartilage calcifié (5) (Fig. 2).

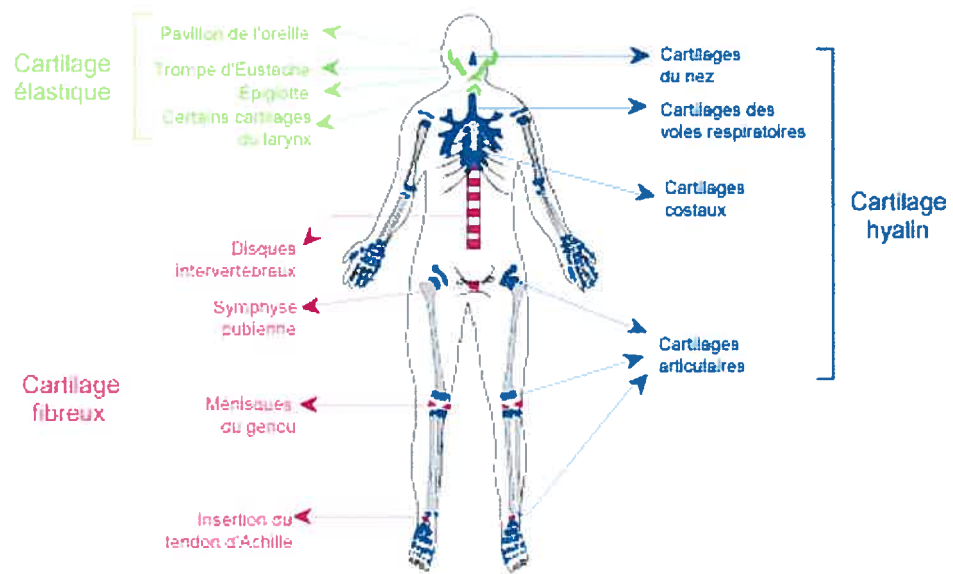


Figure 1 : Schéma de la topographie des cartilages chez l'humain..

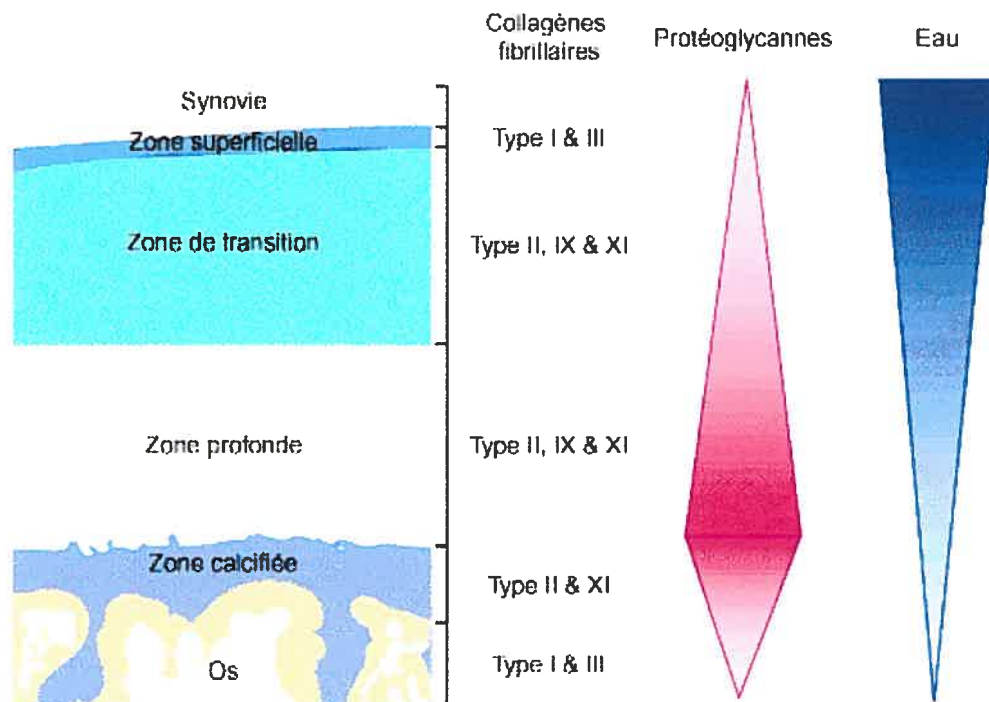


Figure 2 : Représentation schématique du cartilage articulaire adulte. Quatre couches sont décrites dans le cartilage articulaire adulte selon le type et l'orientation des fibres de collagène, la quantité de proteoglycans et d'eau ainsi que la forme et l'activité des chondrocytes.

3. La matrice extracellulaire (ECM)

Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé composé en majeure partie d'une phase fluide qui représente 85% (eau, électrolytes), et d'une phase solide composée par l'unique et le seul type cellulaire du cartilage hyalin : les chondrocytes, et la matrice extracellulaire (ECM) (Fig. 3). La composition de cette dernière confère au cartilage ses propriétés physico-chimiques et la résistance aux contraintes biomécaniques, forces de compression. Les fibres de collagène II sont majoritairement présentes dans l'ECM, dans laquelle sont insérés des protéoglycans (PGs) de haut poids moléculaire (aggrecan, versican, biglycan, decorine, fibromoduline, lumican) (2,5). Il s'agit d'un agrégat de PGs généralement appelé aggrecan. La présence d'autres constituants a été décrite dans le cartilage. C'est le cas de cartilage oligomeric protein (COMP), protéine de liaison (LP), fibronectine, chondroadherine , p148, p55, p58, YKL-40, matrix γ -carboxyglutamic acid containing protein (MGP), l'acide hyaluronique et des collagènes dits mineurs : V; VI; IX; X; XI; XII; et XIV des protéoglycans riches en leucine : décorine, biglycan, fibromoduline, lumican ainsi que des PGs membranaires : betaglycans, glypicans et les syndecans (2,5-7).

L'agrécane est le PG majeur du cartilage, il a une structure organisée en trois domaines globulaires (8):

- ❖ Domaine globulaire G1 à la partie N-terminale liant l'acide hyaluronique (HA) via la protéine de liaison (PL), ce qui forme un complexe G1-HA-PL très stable.
- ❖ Domaine globulaire G2 aussi dans la partie N-terminale séparé de G1 par un domaine interglobulaire caractérisé par la présence de PTR1 et PTR2 (Proteoglycan Tandem Repeat).

- ❖ Domaine G3 de la partie C-terminal, un domaine très allongé qui porte des branches de 80 à 100 chaînes de chondroïtine sulfate et de 15 à 20 chaînes de kératan sulfate. Les propriétés biologiques de l'agrécane sont dues à son caractère fortement chargé négativement et à des multiples interactions de ses différents domaines avec les constituants de l'ECM. En effet, le nombre très important des chaînes de glycosaminoglycans (GAG), et l'interaction avec HA confèrent à l'agrécane un rôle primordial dans l'organisation structurale et les propriétés physicochimiques du cartilage.

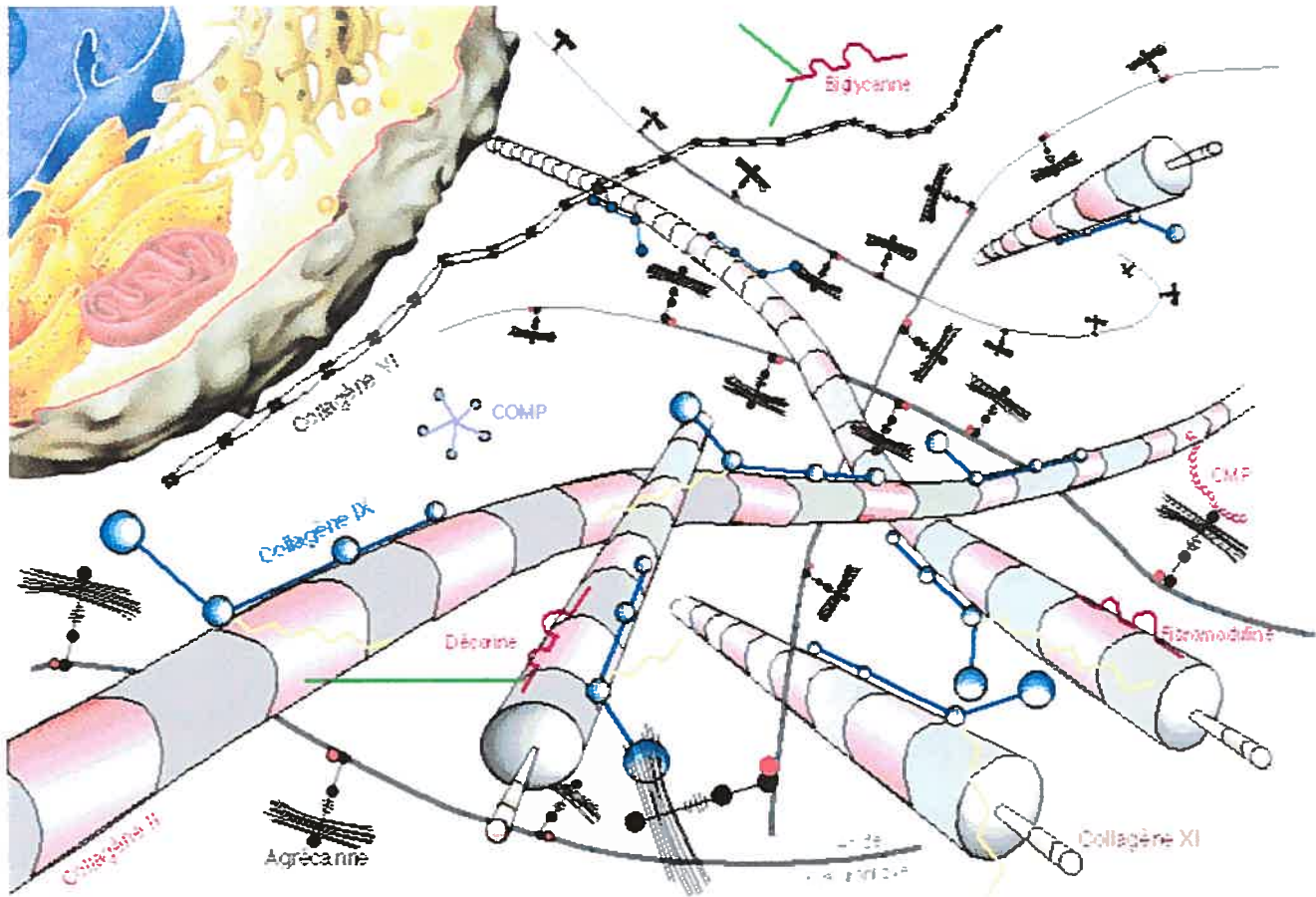


Figure 3 : *Le chondrocyte et sa matrice extracellulaire.*

Le cartilage est composé d'un seul type de cellule : le chondrocyte. Celui-ci produit une matrice cartilagineuse composée de collagènes de type II, IX et XI, de proteoglycans (agrecan, byglycan, décorine, fibromoduline), et diverses autres protéines .

4. Arthrose ou ostеоarthritіs (OA)

L'arthrose est une maladie rhumatismale caractérisée par une altération dégénérative, et une dégradation progressive du cartilage et de l'os souschondral. L'érosion, initialement focale, se propage en conduisant au dénuement de grandes régions à la surface du cartilage. La progression de la maladie se caractérise par une diminution de l'épaisseur du cartilage pouvant se rendre jusqu'à l'os souschondral, ce qui entraîne le développement des ostéophytes et des chondrophytes, autrement dit des excroissances osseuses (3,10-13). L'arthrose est la conséquence d'un déséquilibre entre le phénomène de dégradation et le processus de réparation de cartilage mis en place par les chondrocytes (Fig. 4) (4). Elle se caractérise par une perte progressive de matériaux constitutifs du cartilage. Alors le cartilage s'use, s'amincit et perd sa fonction protectrice, et les articulations atteintes deviennent gonflées, douloureuses au moindre mouvement. Les patients qui en souffrent doivent composer avec la douleur et la limitation de mouvement (12,13). C'est une maladie invalidante. L'arthrose a plusieurs causes : vieillissement, obésité, altération métabolique et stress répétitif. Cependant, il arrive que l'arthrose soit d'origine traumatique ou génétique (14-20). Elle touche plus les femmes que les hommes (12). Les symptômes d'une inflammation locale, et de synovites sont souvent présents chez les patients arthrosiques (OA), et les modèles animaux OA (21-23). La dégradation de la matrice extracellulaire (ECM) est le résultat d'une altération métabolique des chondrocytes engendrée par les cytokines proinflammatoires. Les chondrocytes sont responsables de tous les processus impliqués dans le cycle de renouvellement de la synthèse et de la dégradation de macromolécules en fragments libres (4). Donc, les chondrocytes eux-mêmes constituent

une source principale de toutes sortes de cytokines, chémokines et de facteurs de croissance. Ces molécules exercent une action autocrine, ce qui favorise la synthèse et la libération des enzymes protéolytiques (MMPs, ADAMTS), des cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires : prostaglandines (PGE2), leucotriènes (LTB4), les radicaux réactifs d'oxygène (ROS) (21-23). Les produits dérivés de synovium et de chondrocytes constituent une cible potentielle pour le développement d'agents thérapeutiques. À titre d'exemple les inhibiteurs des MMPs, des ADAM-TS, les antagonistes des cytokines, et les anticorps pour les cytokines, pourraient freiner ou retarder la progression des lésions articulaires chez les patients arthrosiques.

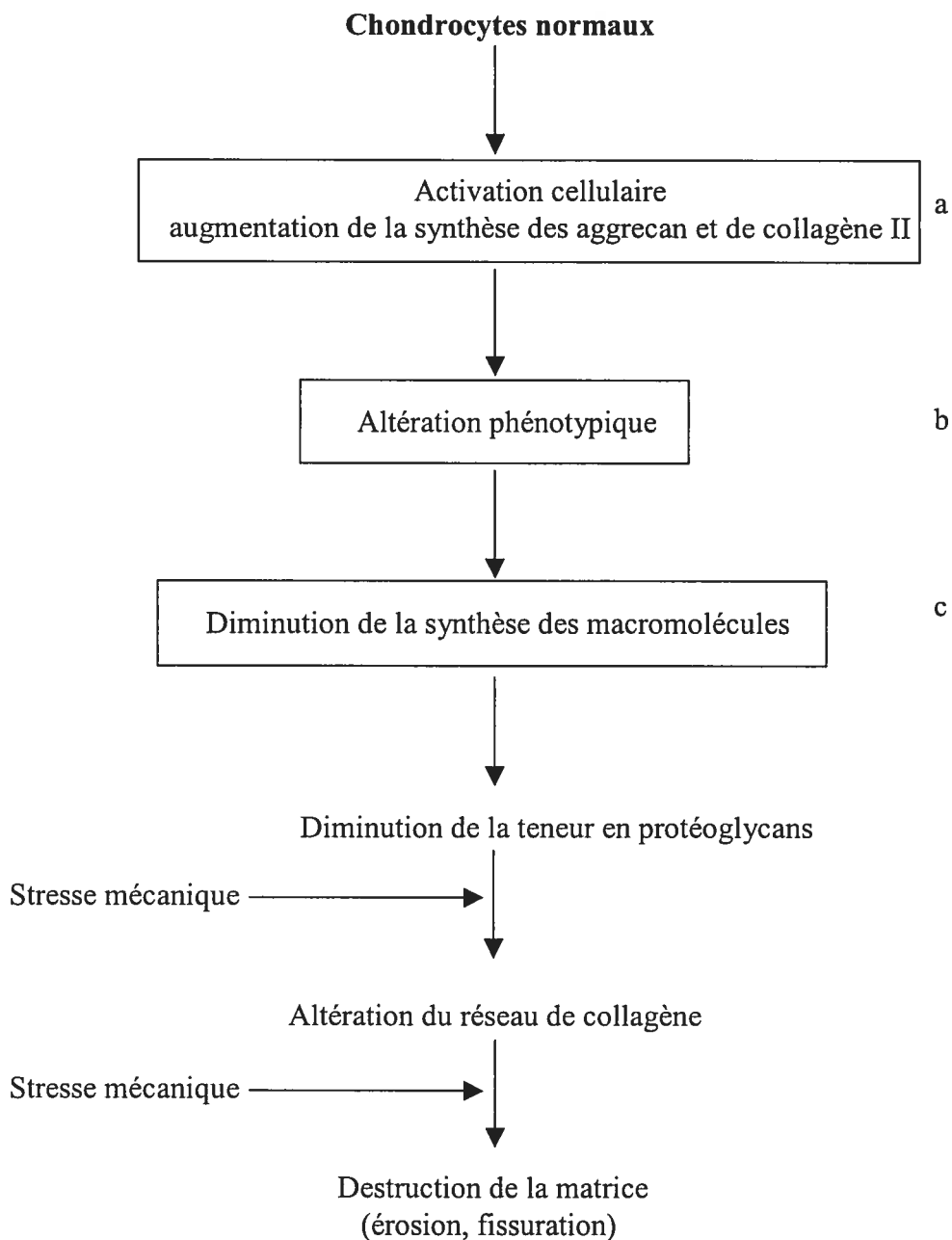


Figure 4 : Représentation schématique de trois étapes hypothétiques impliquées dans la progression de la dégradation cartilagineuse OA : (a) activation des chondrocytes, (b) altération phénotypique, et (c) la diminution de la synthèse des macromolécules.

5. Pathologie et hypothèses de la pathogénie de l'arthrose (OA)

Des modifications au niveau des chondrocytes et de l'ECM ont été observées dans le cartilage arthrosique (4,11,21,22). Le chondrocyte répond par une activité mitotique intense avec synthèse de macromolécules face à une rupture de trame collagénique, à de microfractures à la surface du cartilage ou si la matrice extracellulaire subit une dégénérescence accrue. Le chondrocyte présente des signes de dédifférenciation, perdant ainsi son phénotype et ressemblant à un fibroblaste (4,25). Le processus de réparation mis en place par les chondrocytes semble être insuffisant pour maintenir la texture du cartilage. Le processus de dégradation n'est alors pas contrecarré par celui de la synthèse d'où la survenue de l'arthrose. Une diminution de la quantité et de la qualité de PGs a été observée par une synthèse majeure de PGs de petite sous unité et une diminution de la teneur en protéines de liaison (6). Une augmentation de la synthèse de collagène de type I conduit à un accroissement de la rigidité de cartilage. La teneur en fibronectine est aussi augmentée et constitue un index de changement du cartilage hyalin en fibrocartilage (6). Les collagènes de types V, VI, IX et XI jouent un rôle dans la stabilisation entre les fibres de collagène et les PGs. Ils représentent 5 à 10% des collagènes totaux (3,6,26). L'équilibre de recyclage de la matrice est un processus délicat. Cet équilibre doit être continuellement maintenu par les chondrocytes. Ce type cellulaire produit plusieurs enzymes protéolytiques : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, et les agrécanases (ADAM-TS) en réponse à une stimulation par les cytokines pro-inflammatoires. Ces enzymes sont inhibées par les inhibiteurs tissulaires TIMPs dont l'effet est très important. Le système MMPs/TIMPs permet d'accélérer ou de ralentir la dégradation d'ECM. Les protéases impliquées dans la dégradation du cartilage peuvent être divisées en 4 classes : les

MMPs, les aggrecanases (ADAM-TS4, ADAM-TS5) (27-29), les protéases sérine-dépendantes (élastase, plasmine, AP, urokinase kallikréine, cathepsine G) et les protéases cystéine-dépendantes (cathepsine B, H, L) (30-32). L'influence du milieu extérieur conduirait à la libération des MMPs, des ADAM-TS, et d'autres types de protéases sérine et cystéine dépendantes. Des microfractures de cartilage et de l'os souschondral entraînent une modification de la rigidité du tissu articulaire et de sa capacité à absorber les chocs (6,21-23). Une dérégulation des systèmes MMPs, ADAM-TS/TIMPs, protéases et leurs inhibiteurs physiologiques accélère la dégradation et la survenue de l'arthrose. La perte d'une quantité importante de PGs pourrait être la cause d'une mauvaise protection des fibres de collagènes qui sous l'effet de contraintes biomécaniques se rompent et se dégradent (24). Les anomalies affectant les collagènes de type mineurs (V, VI, IX, X, XI, XII) engendrent des irrégularités dans les liaisons entre les PGs et les fibres de collagène II, ce qui entraîne une détérioration fonctionnelle du cartilage marquée par une mauvaise résistance à une contrainte biomécanique conduisant ainsi à l'apparition de lésions cartilagineuses (6,26).

6. Processus arthrosique et le rôle de chondrocyte dans la destruction

Le processus arthrosique se caractérise par trois étapes : dans un premier temps, une lésion principale apparaît au niveau du cartilage articulaire arthrosique. Elle se manifeste par une déplétion en protéoglycanes (PGs) de la matrice extracellulaire, accompagnée de modifications structurales, d'une diminution de la taille des agrégats, d'une augmentation de la quantité de PGs libres et d'une diminution de la longueur des chaînes de chondroïtine sulfate (CS) avec une structure modifiée. Ces anomalies se retrouvent principalement au niveau des zones de frottement. En réponse à la lésion initiale, les chondrocytes vont tenter

de combler le déficit en PGs et essayer de réparer la texture du cartilage fissuré, ce qui se traduit par la reprise de la division cellulaire (6). Au cours de cette deuxième étape, on assiste à une augmentation de la synthèse des agrécans. Cependant la composition et la structure de ces agrécans néoformés sont modifiées, ce qui entraîne une perte de l'agrégation des PGs. Parallèlement, on observe l'apparition de la synthèse du versicane, marqueur du changement phénotypique du cartilage hyalin en fibrocartilage. L'ensemble de ces modifications qualitatives et quantitatives provoque une altération des propriétés biophysiques du tissu. Puis dans un troisième temps, lorsque l'arthrose devient plus sévère, la capacité de synthèse des chondrocytes décline puis arrête complètement. Cela se traduit sur le plan métabolique par une augmentation de la synthèse et de la libération des enzymes, notamment des métalloprotéases (MMPs) (53,54,58-61) et des aggrecanases (ADAM-TS) (44-48) responsables de la dégradation des agrégats et des monomères de PGs, des collagènes dont la taille diminuée empêche leur agrégation, et de la diminution du diamètre des fibres de collagène de type II. En parallèle, l'apparition de collagène I conduit à un accroissement de la dureté du cartilage articulaire. La diminution de la concentration en PGs, malgré l'augmentation de la synthèse, est la preuve d'une prédominance importante du catabolisme de la matrice extracellulaire. Ces anomalies entraînent l'altération des fonctions biomécaniques du tissu. Les chondrocytes à l'état normal assurent la synthèse et la dégradation de tous les composants du cartilage, et sont responsables de l'équilibre homéostatique du cartilage.

Dans la pathologie destructive du cartilage, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 peuvent agir comme des activateurs des chondrocytes (81,82,84-86,143,157). De plus, ces cytokines sont également synthétisées par ce type

cellulaire et subséquemment elles ont une action autocrine. L'IL-1 joue un rôle prédominant dans le catabolisme du cartilage en activant la dégradation de la matrice extracellulaire par la libération d'enzymes (collagénase, gélatinase, stromelysine, aggrecanases) et en inhibant la synthèse des PGs, des glycosaminoglycanes et la prolifération des chondrocytes (79). À l'inverse, des facteurs de croissance comme l'IGF-1 et le TGF- β 1 ont des activités opposées à celles de l'IL-1. En effet, ils augmentent les activités de synthèse des chondrocytes et diminuent la dégradation.

7. L'arthrite rhumatoïde (RA)

L'arthrite rhumatoïde (RA) est une maladie inflammatoire de l'ensemble du tissu conjonctif prédominant au niveau de la membrane synoviale. Elle se caractérise par ses synovites responsables de douleur et de gonflements articulaires, un épaissement synovial (le pannus), sa chronicité, ses destructions articulaires, ses poussées inflammatoires et engendre souvent un handicap important, altérant la qualité de vie personnelle, familiale et professionnelle. Les conséquences de l'arthrite (RA) sont nombreuses : impotence fonctionnelle, progression radiologique, déformations, chirurgie de remplacement articulaire, mortalité précoce et altération de la qualité de vie (35) (Fig.5). L'arthrite est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation de plusieurs articulations avec une prédilection pour les mains, les poignets, les genoux et les pieds. La forme la plus sévère de l'affection se manifeste par des complications systémiques. La dégradation de l'ECM est le résultat de l'altération métabolique des chondrocytes engendrée par les cytokines pro-inflammatoires à l'image de l'IL-1 β , TNF- α et l'IL-17 (36). Les chondrocytes sont responsables de tous les processus impliqués dans le cycle de renouvellement de la synthèse et de la dégradation des macromolécules en fragments libres. Bien que l'arthrite soit typiquement considérée comme une maladie auto-immune, son étiologie reste inconnue jusqu'à présent. Il n'y a pas de causes déclenchantes scientifiquement démontrées. Comme les autres maladies auto-immunes, l'arthrite est une maladie multifactorielle relevant de deux facteurs potentiels : 1) perturbations immunitaires humores et cellulaires. Actuellement on connaît de mieux en mieux les cellules et les messages impliqués dans une réaction inflammatoire. Les lésions ostéocartilagineuses et tendineuses sont dues au pannus

d'origine immunologique, impliquant une immunité humorale et cellulaire. 2) facteurs génétiques. Des hypothèses génétiques ont montré une fréquence augmentée des molécules de la classe II HLA-DR1 et HLA-DR4 (DRB1 0401, 0404 ou DRB1 0101) (36). Les mécanismes intermédiaires et initiateurs de l'activation cellulaire et les interactions entre les cellules présentatrices d'antigène (APC), les lymphocytes T et B, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les chondrocytes sont actuellement mieux comprises (36-39). Il est clair que les cytokines pro-inflammatoires, par leur action autocrine et paracrine, jouent un rôle prépondérant dans le développement de l'arthrite. De plus, le TNF- α est un élément essentiel pour la phase aiguë et la phase chronique de l'inflammation (36,37). La physiopathologie de RA repose sur le fait que les cellules T jouent un rôle pivot, initiateur de l'inflammation par le biais de leurs récepteurs TCR qui reconnaissent les peptides présentés par les APC. Cette interaction nécessite un contact entre les APC et les lymphocytes T CD4+, ce qui se traduit par la production par ces deux types cellulaires de nombreuses cytokines, parmi lesquelles, il y a des cytokines ayant une activité pléiotrope (cytokine exerçant plusieurs fonctions), redondante (même activité pour plusieurs cytokines) ou antagonistes. Elles fonctionnent sous forme de réseaux ou sous forme de cascades avec un rétrocontrôle (37,40,41). A l'état normal le liquide synovial est dépourvu de cellules, alors que dans l'état pathologique, les neutrophiles, les macrophages, les cellules T et les cellules dendritiques (DC) sont prédominantes. La cellularité de la membrane synoviale arthritique est considérablement augmentée, il y a une activité mitotique intense des fibroblastes, et de plus on y retrouve des cellules sanguines. On peut délimiter trois couches cellulaires de cette membrane qui est devenue épaisse. Cette dernière est composée le plus souvent d'une couche de macrophages activés, d'une couche

sous-jacente de fibroblaste et d'une couche profonde possédant des follicules lymphoïdes dispersés autour des vaisseaux sanguins (37). Les cellules les plus abondantes dans la membrane synoviale sont les macrophages et les lymphocytes T. Les cellules DC, les fibroblastes et les cellules de plasma y sont également présentes (Fig. 5). Ces cellules sont très activées et synthétisent excessivement des molécules d'adhésion, et des molécules HLA de classe II (42,43). La jonction de la couche synoviale avec le cartilage (pannus) est caractérisée par une dégénérescence irréversible du cartilage et de l'os souschondral. Elle est très riche en macrophages (37). Ces cellules migrent d'abord vers le cartilage sous-jacent ensuite vers l'os souschondral entraînant ainsi une destruction de ces tissus. Cette dégénérescence est la conséquence d'une activité enzymatique des métalloprotéinases matricielles (MMPs), produites en grande quantité par les macrophages et les fibroblastes en réponse à une stimulation des cytokines pro-inflammatoires à l'image de l'IL-1 β , TNF- α et de l'IL-17. Ces protéases sont secrétées sous une forme latente, puis activées par un processus protéolytique (clivage du domaine propéptidique). Dans la pathologie RA, les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13) et les stromelysines (MMP-3) sont surexprimées et leur expression est considérablement augmentée dans le liquide synovial. Elles jouent un rôle déterminant dans la dégradation de l'ECM. En plus des MMPs, une autre famille d'enzymes, les aggrecanases (ADAM-TS) qui dégradent spécifiquement les aggrecans a été identifiée. Les aggrecanases 1 et 2 appelées également ADAM-TS4 et ADAM-TS5 respectivement semblent être impliquées dans la destruction du cartilage (44-48). L'activité des MMPs est régulée spécifiquement par les TIMPs. Ces inhibiteurs se lient d'une manière irréversible aux MMPs pour former des complexes dont la stœchiométrie est 1:1 avec les enzymes. Les TIMPs sont synthétisées par les chondrocytes. Ceci suggère leur

rôle ultime dans la régulation de *turnover* de la matrice extracellulaire. Il est vraisemblable qu'une dérégulation de l'équilibre entre les MMPs et les TIMPs affecte l'état du cartilage, provoquant ainsi une destruction tissulaire. Dans l'articulation RA, on note la présence de TGF- β , de l'IL-8, de l'IL-10, et de l'IL13 qui sont des cytokines immunorégulatrices et anti-inflammatoires, et qui non seulement abolissent la production de cytokines pro-inflammatoires mais augmentent également celle de TIMPs. À côté de MMPs, des protéases ayant une activité sérine-dépendante, aspartate-dépendante et cystéine-dépendante, synthétisées par les cellules du cartilage et de l'os, sont capables de dégrader la matrice, c'est à dire les collagènes (I, II, IX, XI) et les protéoglycans.

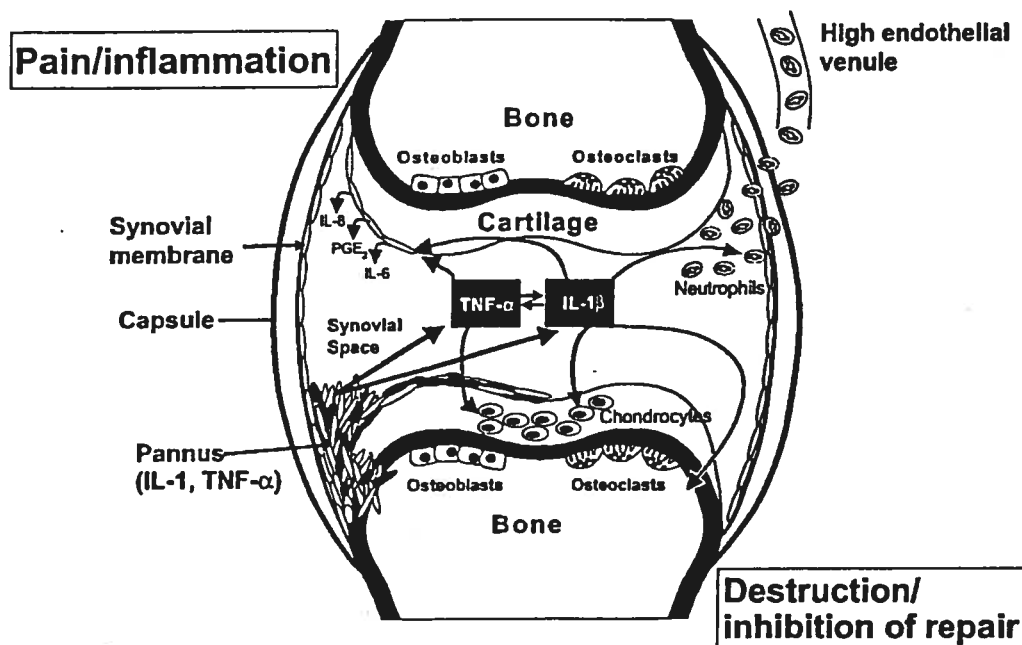


Figure 5: Le TNF α et l'IL-1 β sont deux cytokines pro-inflammatoires agissant comme des médiateurs destructifs dans la pathologie RA. Le TNF- α et l'IL-1 β sont produites par les différents types cellulaires de l'articulation, et agissent d'une manière synergique pour la production d'autres médiateurs inflammatoires comme IL-6, IL-8 et PGE₂, et les molécules d'adhésion, ce qui conduit à l'immigration des cellules inflammatoires dans le liquide synovial et le synovium. Le TNF α et l'IL-1 β assurent l'activation des ostéoclastes et la production de MMPs et ADAM-TS4 par les chondrocytes (37).

8. Les Métalloprotéinases (MMPs)

Les métalloprotéinases (MMPs), une famille d'enzymes qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, sont sécrétées sous forme de pro-enzymes inactives, et activées dans l'espace péricellulaire par clivage protéolytique ; elles doivent leurs noms à la présence d'un ion zinc Zn^{++} dans leur site catalytique.

On rassemble les différents membres identifiés de la famille en 4 sous-groupes:

1. les collagénases destinées à dégrader les collagènes fibrillaires (MMP-1, MMP-8 et MMP-13).

2. les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) qui dégradent le collagène IV des membranes basales et toute forme de collagène dénaturé;

3. les stromélysine et matrylisine (MMP-3 et MMP-7) dont le spectre d'activité est plus large;

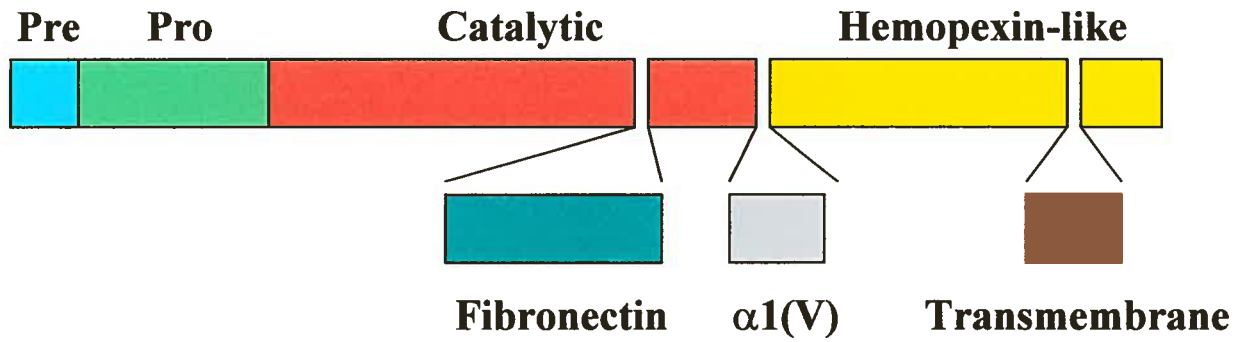
4. Les métalloprotéases membranaires (MT-MMPs). L'action catalytique des métalloprotéases *in vivo* peut être activée par des enzymes telles que certaines métalloprotéases elles-mêmes (MMP-3 et MT-MMP) ou par d'autres enzymes, telles que la plasmine sous le contrôle d'activateurs du plasminogène (PA, soit de type urinaire u-PA ou de type tissulaire t-PA) et inhibée par des inhibiteurs spécifiques, les TIMPs (Tissue Inhibitors MetalloProteinases). *In vitro*, la conversion de la forme latente des MMPs à la forme active peut être induite par des composés organométalliques, des ions métalliques ou encore des agents oxydants. *In vivo*, l'activité protéolytique de ces enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire est le reflet d'un rapport entre leur activation et leur inhibition (34,49-52).

Les MMPs et les TIMPs sont impliqués dans plusieurs processus biologiques tels que le développement embryonnaire, la morphogenèse des organes, la migration cellulaire, l'angiogenèse, le remodelage osseux et l'ovulation. Cependant, l'hyperactivité non contrôlée des MMPs est impliquée dans plusieurs processus pathologiques, comme les maladies rhumatismales RA et OA, les métastases tumorales, la fibrose hépatique, l'emphysèmes pulmonaires, les maladies cardiovasculaires et les maladies dégénératives (34,51). Dans les conditions physiologiques normales, il y a un équilibre entre la synthèse et la dégradation des collagènes, de la laminine, de la fibronectine et des protéoglycanes. Un déséquilibre provoqué par une augmentation de la dégradation et/ou une diminution de la synthèse des composants de l'ECM serait un des éléments de la progression des lésions cartilagineuses. Les facteurs qui augmentent ou diminuent le rapport MMPs sur TIMPs favorisent la dégradation ou l'accumulation de l'ECM respectivement. Les MMPs sont responsables du renouvellement physiologique et pathologique de la matrice (51,52) (Fig. 6).

8.1. Structure

Toutes les MMPs sont synthétisées sous forme de pro-MMPs. Il y a plus de 20 MMPs connues jusqu'à présent chez les vertébrés. La structure primaire des MMPs montre la présence de plusieurs domaines (Fig. 6). À l'extrémité N-terminal (Nt), le domaine propeptidique est responsable du maintien des MMPs sous leurs formes latentes proMMPs. Il est composé de 80 acides aminés avec une séquence hautement conservée PRCGV/NPD. Le domaine catalytique composé de 170 acides aminés contient le motif de la fixation du Zn et du Ca HEXXHXXGXXH, lesquels sont essentiels à la stabilité et à l'activité catalytique de l'enzyme. Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) ont des domaines de

fibronectin-type II insérés dans leurs domaines catalytiques. Ces derniers assurent les interactions avec les collagènes et les gélatines. L'hémopexin-like domaine composé de 210 acides aminés est situé à l'extrémité C-terminal (Ct). Ce domaine confère aux collagénases l'activité protéolytique pour la triple hélice de collagènes interstitielles, alors que le domaine catalytique sans l'hémopexin-like domaine présente une activité catalytique pour d'autres substrats. De même, le domaine hémopectine de MMP-2 est crucial pour l'activation de proMMP-2 par MT1-MMP à la surface cellulaire. La fonction du domaine proline-rich qui s'intercale entre le domaine catalytique et l'hémopectine reste inconnue, et son interaction avec les collagènes est hypothétique. La MMP-23 possède des régions cystéine-rich, proline-rich et IL-1 receptor-like dans son domaine hémopectine. Les MT-MMPs sont caractérisés par un domaine transmembranaire à leur extrémité Ct, il assure leur fixation à la surface cellulaire (34,50-52). (Fig.6).



<u>MMP</u>	<u>Pre</u>	<u>Pro</u>	<u>Cat</u>	<u>Fn</u>	<u>$\alpha1(V)$</u>	<u>Tm</u>	<u>Hpx</u>
Matrilysin	■	■	■				
Collagenase-1,-2,-3	■	■	■				■
Stromelysin-1,-2,-3	■	■	■				■
Macro elastase	■	■	■				■
MT MMP-1 to -4	■	■	■			■	■
Gelatinase A	■	■	■	■			■
Gelatinase B	■	■	■	■	■		■

Figure 6: Représentation schématique de la structure des métalloprotéinases (MMPs).

8.2. Protéinases : MMPs/ADAMTS dans la pathogénie OA /RA

La capacité des chondrocytes à dégrader les constituants du cartilage dépend grandement de leur habilité à synthétiser et à libérer les enzymes protéolytiques (MMPs, ADAMTS). Dans les conditions physiologiques, les activités enzymatiques sont hautement régulées et ce contrôle est nécessaire pour la morphogenèse et le remodelage tissulaire. La régulation de l'activité des MMPs se fait à trois niveaux : au niveau de la synthèse et de la sécrétion, au niveau de l'activation protéolytique de la forme proenzyme, et enfin au niveau de l'inactivation par les inhibiteurs tissulaires. Durant les pathologies destructives du cartilage OA et RA, les MMPs jouent un rôle pivot dans la progression et l'agressivité de la maladie articulaire (53,54,58,60,61). L'analyse du liquide synovial des patients OA a montré une augmentation très importante des MMPs par rapport aux personnes contrôles (55,56). Le collagène natif peut être clivé par les collagénases : MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-8 (neutrophil collagenase) et MMP-13 (collagenase 3) (53,54,57,58). Les fragments de dégradation sont susceptibles d'être clivés par d'autres enzymes. C'est le cas de la MMP-2 (gelatinase A), la MMP-9 (gelatinase B), la MMP-3 (stromélysine 1) et la cathepsine B.

La collagénase-3 (MMP-13) est considérée comme la plus importante enzyme impliquée dans la pathologie OA, du fait de sa double activité collagénolytique et agrécanolytique. Elle dégrade préférentiellement le collagène II (57) et est surexprimée dans le cartilage OA (53,58-60), montrant aussi une affinité particulière pour les agrécans, et les protéoglycans (54,61,62). Son expression est considérablement augmentée dans le liquide synovial des patients RA et est corrélée avec les marqueurs inflammatoires systémiques.

La stromélysine-1 (MMP-3) clive les protéoglycans, agrécans, collagènes, gelatine et la protéine de liaison. La MMP-3 est sécrétée par les fibroblastes, les cellules synoviales, et les chondrocytes. Elle dégrade les protéoglycans et les collagènes II, IX, et XI et active par clivage d'autres MMPs telles que la MMP-2 et la MMP-9. Sa concentration est 20 fois supérieure à celle de la MMP-1, et elle est considérablement augmentée dans le liquide synovial et le sérum des patients RA. D'après ces données, la MMP-3 constitue un bon marqueur pronostique pour les stades précoces de l'arthrite. Les chondrocytes et les fibroblastes synoviaux RA surexpriment la MMP-13 (54) qui est impliquée dans le clivage de collagène II (54) et les agrécans. Le niveau d'expression de la MMP-13 est considérablement augmenté dans le synovium. La MMP-1 et la MMP-13 dérivées des chondrocytes peuvent initier l'invasion de la surface articulaire par la synoviale enflammée. Les enzymes responsables de la dégradation des agrécans font l'objet de plusieurs études. L'analyse de séquences d'acides aminés des fragments de dégradation des agrécans dans le liquide synovial humain a montré la présence de deux sites majeurs de clivage dans le core protéique de l'agrecan (62,63). Le site de clivage des agrécans par les MMPs se trouve entre l'Asn341 et Phe342 (64,65), alors que le site de clivage par les ADAM-TS se situe entre les résidus Glu373 et Ala374 (63,66). Le clivage engendre différents néoépitopes reconnaissables par des anticorps spécifiques (66,67). L'agrecanase-1 et l'agrecanase-2 appelées ADAM-TS4 et ADAM-TS5 respectivement sont des membres de la famille ADAM-TS qui se distingue de la famille MMPs par la présence du motif thrombospondin en plus des domaines disintégrine et métalloprotéase (46). Les ADAM-TS se distinguent des ADAMs par l'absence de domaine transmembranaire et par la présence des régions cysteine-rich et EGF-like (68). L'analyse de la séquence N-terminal a démontré la présence

des fragments de dégradation Nt-Ala-Arg-Gly-Ser dans le liquide synovial de patients RA et OA, montrant ainsi une activité catalytique élevée des ADAM-TS qui coupent au site Glu373-Ala374 (69).

9. Le système de cytokines dans la pathologie RA

Les cytokines représentent un groupe hétérogène de petites protéines qui possèdent des actions de régulation humorale en modulant l'activité fonctionnelle de différents tissus ou cellules. Produites par les cellules du système immunitaire en réponse à une stimulation par des molécules étrangères à l'organisme, elles ont des effets locaux (transmission de signaux entre les cellules voisines) ou systémique en conditions physiologiques ou pathologiques. Le TNF- α , en plus de sa fonction régulatrice de la prolifération et de la mort cellulaire par apoptose, recrute et active les cellules de l'inflammation (neutrophiles, macrophages, APC, lymphocytes) et stimule la sécrétion d'autres cytokines par les cellules de l'inflammation. L'IL-1 β a des actions similaires et synergiques avec celles du TNF- α . D'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17, l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF jouent également un rôle pro-inflammatoire. Parallèlement, des cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10, l'IL-4, l'IGF, le sTNFR, le sIL-1Ra et le TGF β sont également produites. Ces cytokines anti-inflammatoires agissent en inhibant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6) par les macrophages. La plupart des cytokines ont des effets multiples, et comme elles assurent la médiation de la défense immunitaire, elles peuvent devenir des médiateurs pathologiques à caractère inflammatoire chronique à l'image de la pathologie RA. Dans ce chapitre, nous discuterons du rôle joué par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 dans la médiation de la destruction tissulaire RA. Les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-17) sont des protéines agissant comme des médiateurs importants qui, d'une part

régulent spécifiquement la réponse inflammatoire et d'autre part assurent les mécanismes de destruction et de remodelage tissulaire (4,70,71) (Fig. 7).

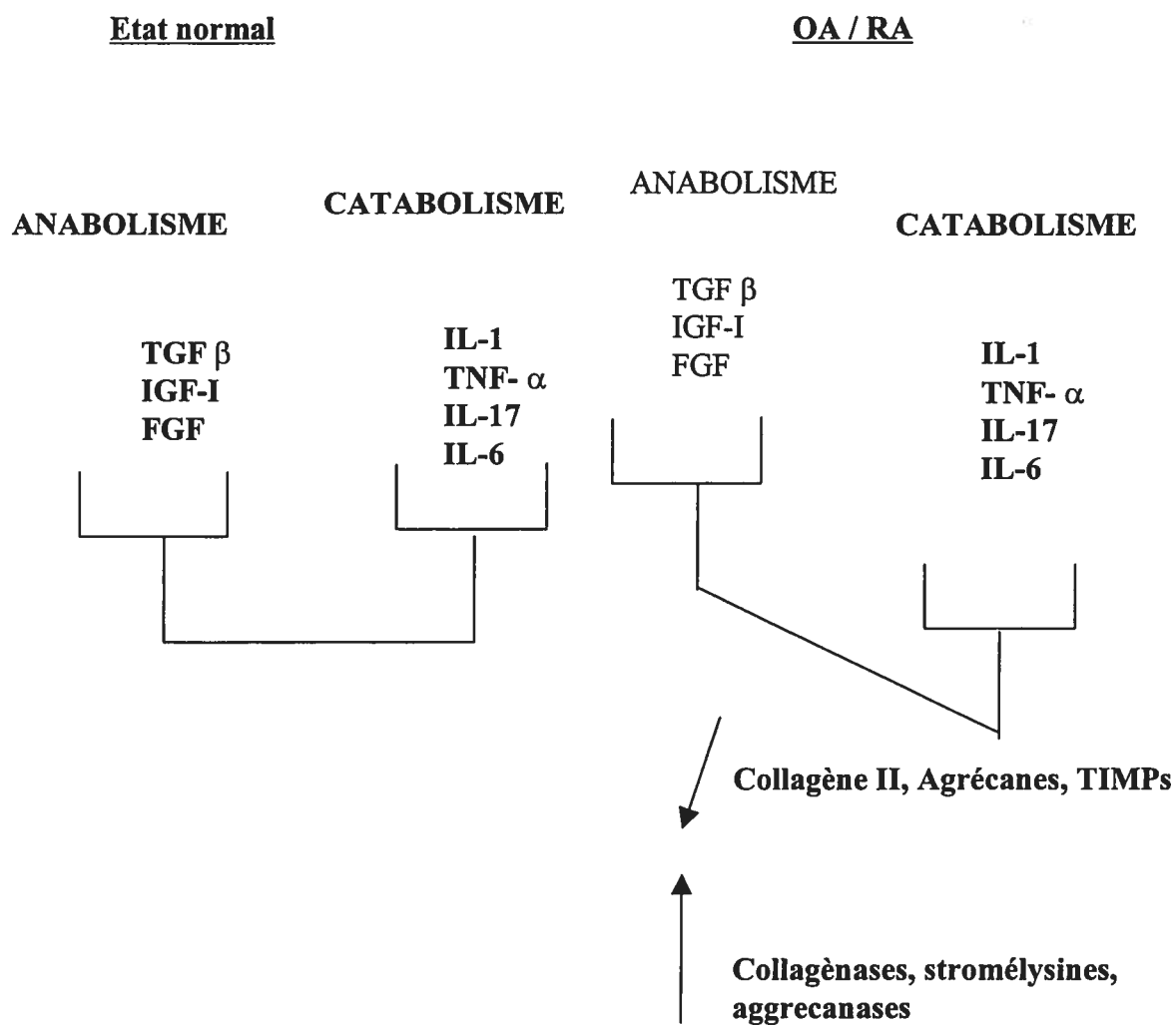


Figure 7: Régulation du métabolisme cartilagineux par les cytokines et les facteurs de croissance au cours de pathologies dégénératives du cartilage

9.1. La famille de l'IL-1 et ses récepteurs

La famille de l'IL-1 est composée de deux cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β) et de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra). Il existe deux types de récepteurs : IL-1RI et IL-1RII. Ces récepteurs sont composés d'un domaine intracellulaire et d'un domaine extracellulaire séparés par un domaine transmembranaire. Le domaine intracellulaire est responsable de la transduction du signal. Après la liaison du récepteur avec son ligand IL-1 β , le domaine TOLL de IL-1R interagit avec la protéine adaptatrice myeloid differentiation factor 88 (MyD88) (72). Cette dernière possède un domaine DD (death domain) à l'extrémité N-terminal qui s'associe à IRAK (IL-1R-associated kinase), ce qui conduit à la formation d'un hétérodimère avec la protéine accessoire du récepteur (IL-1RAcP). Cette dernière active par phosphorylation une autre molécule adaptatrice TRAF-6 (72) et le signal est alors transduit au noyau via différentes voies, dont celle de PI3K et d'IKK mais aussi par les voies de MEKK, de JNK et de p38 MAPK (73-75). Le recrutement du complexe MyD88/IRAK/TRAF-6 avec le domaine cytoplasmique du récepteur active la voie de signalisation MAPK y compris les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. L'activation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire est attribuée à la translocation nucléaire d'AP-1 et de NF κ B (74). L'IL-1Ra inhibe l'engagement du récepteur avec son ligand d'une manière compétitive en empêchant la formation de l'hétérodimère cytoplasmique, d'où l'inhibition de la transduction de signal.

9.1.1. Rôle central de l'IL-1 dans la pathologie RA

L'IL-1 β et IL-1 α sont produites à partir de protéines précurseurs de 31 kD pro-IL1 β et pro-IL1 α . Ces protéines sont clivées par une protéase ICE (IL1 converting enzyme) en protéine de 17 kD. L'IL-1 α reste en général dans l'espace intracellulaire, alors que l'IL-1 β est sécrétée et exerce des effets biologiques sur d'autres cellules. Cette dernière est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages et les monocytes stimulés par des allergènes. Elle assure l'activation des lymphocytes et la migration des leucocytes vers les sites d'infection. Elle a aussi un rôle central dans les maladies inflammatoires aiguës et chroniques (76-78).

Un ensemble d'information sur le rôle de l'IL-1 β fait en sorte que cette cytokine a une action centrale dans la pathogénie de RA (78). Les remarques les plus frappantes sont :

1. L'IL-1 β est un activateur puissant de la production de TNF- α , COX-2, PGE-2, NO (79,80) MMPs (77,81,82) et ADAM-TS (47,48,83-85).
2. L'IL-1 β inhibe la synthèse de PGs d'où elle empêche les processus de réparation tissulaire (79).
3. Le taux élevé de l'IL-1 β et du TNF- α est corrélé avec la sévérité de la dégradation du cartilage et la résorption osseuse (86,87).
4. L'IL-1 β induit la résorption osseuse *in vivo* (77,86).
5. Le blocage du récepteur IL-1R chez des souris CIA et AIA entraîne une réduction significative de l'inflammation et de la dégradation cartilagineuse (88,89).
6. L'utilisation de l'IL-1Ra montre une amélioration significative de la maladie RA (88).

7. Une souris transgénique pour le gène humain de l'IL-1 montre une synovite chronique et une destruction du cartilage (90).

L'IL-1 β induit la différenciation des ostéoblastes en ostéoclastes, et ceci par l'induction de RANK. Ce phénomène est inhibé par l'OPG (antagoniste de RANKL) qui inhibe la différenciation des ostéoblastes (9,91). L'IL-1 β et le TNF- α agissent sur les cellules stromales de la moëlle osseuse pour produire l'OPG. Dans la situation normale, un équilibre entre la quantité d'IL-1 β et la quantité d'IL-1Ra est observé (92). Cependant, chez les patients RA, il y a déséquilibre entre le taux de l'IL-1 β et le taux de l'IL-1Ra, ce qui est marqué par un manque d'IL-1Ra endogène pour neutraliser le taux très élevé de l'IL-1 β . Des souris CIA invalidées pour le gène IL-1Ra (-/-) présentent des signes plus précoces et plus sévères de la maladie (93-95). Des études immunohistologiques ont rapporté que 90% des cellules de la jonction pannus-cartilage, majoritairement, des macrophages, expriment l'IL-1. Les chondrocytes de la zone superficielle adjacente au pannus produisent également de l'IL-1 β et du TNF- α . De plus, il a été démontré que seulement 10% des cellules expriment l'IL-1Ra à la jonction pannus-cartilage (96). Une culture *in vitro* d'explants synoviaux de patients RA a démontré qu'il n'y a pas assez d'IL-1Ra pour neutraliser l'IL-1 β produite localement. Le taux d'IL-1Ra produit par les macrophages synoviaux *in vivo* correspond à moins de 10% de la production d'IL-1Ra produit par les macrophages synoviaux cultivés *in vitro* (92,97). L'utilisation des modèles animaux pour l'arthrite a permis de mettre en évidence les rôles d'IL-1 et IL-1Ra. En effet, le rôle protecteur d'IL-1Ra a été démontré dans plusieurs modèles animaux (78,86,88,89,98). Une injection intra-articulaire d'IL-1 recombinante chez le lapin engendre la destruction cartilagineuse et l'infiltration leucocytaire dans la membrane synoviale. Cependant, l'administration des

récepteurs solubles d'IL-1 (sIL-1R) améliore considérablement l'état de la maladie en réduisant de manière importante l'inflammation et la dégradation tissulaire. L'utilisation combinée de sTNFR et de sIL-1R est encore plus efficace contre la dégradation du cartilage et l'infiltration des leucocytes.

9.1.2. Interaction cellulaire et production d'IL-1 et du TNF- α

Le contact entre les cellules T, les monocytes et les macrophages déclenchent la production d'IL-1 et du TNF- α dans l'articulation des patients RA. Ce contact membranaire entre les lymphocytes T activés, les monocytes et les macrophages joue un rôle clé dans la synthèse du TNF- α , et de l'IL-1 β d'une part et la production des MMPs, et des ADAM-TS d'autre part (99,100). Les cellules Th1 constituent la sous-population majoritairement présente dans la synoviale RA, alors que les cellules Th2 sont absentes. Ceci a été démontré par l'utilisation des marqueurs membranaires CCR5 et CCR3 au niveau des cellules Th1 et Th2, respectivement (101). L'interaction directe entre les cellules Th1 et les macrophages induit la production de quantités importantes d'IL-1 et de TNF- α par contre, l'interaction des cellules Th2 avec les macrophages déclenche la synthèse et la libération d'IL-1Ra, de très peu d'IL-1 et du TNF- α (101). La synthèse d'IL-1 β et du TNF- α est fortement dépendante d'autres cytokines telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18. Chez les patients RA, la stimulation des synoviocytes suite à une interaction avec les cellules T activées entraîne la production des MMPs et des ADAM-TS. Cette production est fortement dépendante de la synthèse et la libération du TNF- α et de l'IL-1 β (36,37). Il y a une synergie entre l'IL-2 et l'IL-15 dans le recrutement des cellules T dans la synoviale ce qui permet d'activer les cellules adjacentes par contact cellulaire (102) (Fig.8).

9.2. Le TNF- α et ses récepteurs

Le TNF- α est une protéine de 17 kDa, active sous forme trimérique. Elle se présente comme une protéine transmembranaire, pouvant agir de façon juxtacrine. Elle peut également être clivée par TACE (TNF- α converting enzyme) et relarguée sous forme soluble. Le TNF- α possède deux récepteurs, le p55 (CD120a) et le p75 (CD120b). La forme p55 est exprimée d'une manière ubiquiste et est responsable de plusieurs aspects de la réponse immunitaire. Au niveau cellulaire le TNF entraîne l'apoptose et dans l'organisme, il est responsable de l'induction de changements tels la fièvre, la perte d'appétit et la cachexie (103). Le p75 est exprimé principalement sur les cellules hématopoïétiques. La famille de TNF- α est composée de plusieurs lymphotoxines tels que LT α 1 β 2, LT α 3, CD27L, CD30L, CD40L, BAFF, APRIL, TRAIL, RANKL, et FasL (36). Le précurseur du TNF- α est synthétisé essentiellement par les monocytes, macrophages activés, ainsi que par d'autres types cellulaires : certains lymphocytes T, les fibroblastes, les chondrocytes et les cellules endothéliales activées. Les membres de la famille du TNF- α jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire, surtout dans le contexte de la réponse immunitaire et de la réaction inflammatoire (103-105). Les récepteurs de la famille du TNF comprennent Fas/CD95, CD27, CD30, TNF-R1, DR3, RANK, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2 et DR6. Une des particularités des récepteurs du TNF réside dans leur capacité à induire la mort cellulaire par apoptose. Les récepteurs de mort cellulaire sont caractérisés par la présence d'un domaine DD (*death domain*) dans leur région cytoplasmique qui permet le recrutement de protéines qui possèdent des motifs homologues (103,105,106). L'activation du récepteur Fas se traduit par une activation rapide de plusieurs tyrosine kinases entraînant l'agrégation du récepteur et la formation d'un

complexe multiprotéique intracellulaire appelé DISC, qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule (106). Le DISC comprend la protéine adaptatrice FADD, RIP ainsi que la procaspase-8. La protéine adaptatrice FADD est recrutée au niveau du récepteur par des interactions impliquant les domaines DD homologues présents sur les deux protéines. La protéine FADD possède un domaine DED (death effector domain) à son extrémité N-terminale et recrute à son tour la procaspase-8 par des interactions homologues DED-DED (103,105,106). Les récepteurs du TNF- α possèdent un domaine cytoplasmique identique et un domaine extracellulaire de taille différente, séparés par un domaine transmembranaire. Les fragments extracellulaires (s-TNFR) sont largués dans le liquide synovial et le plasma. Ces fragments solubles gardent leur pouvoir de liaison avec le TNF- α et ainsi inhibe les activités biologiques du TNF- α .

9.3. La Signalisation de TNF- α

La voie de signalisation du TNF- α est plus complexe. Le TNFR-1 possède un motif DD comparable à celui de Fas ou de TRAILR, et possède des protéines adaptatrices FADD et caspase-8 qui sont indispensables au déclenchement de l'apoptose suite à l'activation de ce récepteur (104). Récemment, Micheau et ses collaborateurs (107) ont démontré que ni FADD ni la procaspase-8 ne sont recrutées lors de l'engagement de TNF-R1 avec le TNF- α , contrairement à ce qui est observé dans l'activation de Fas ou des récepteurs de TRAIL (106). Cette stimulation peut induire des signaux de survie aussi bien que des signaux d'apoptose, ces signaux contradictoires mettant en jeu deux complexes distincts (108). Un premier complexe (complexe I) associé à la membrane est responsable de l'activation de la voie de survie impliquant NF κ B. Un deuxième complexe (complexe II), cytosolique, entraîne la mort cellulaire par apoptose. Le TNFR interagit via le complexe I avec d'autres

protéines contenant des domaines DD comme TRADD et RIP. TRADD, une protéine adaptatrice, s'associe avec TRAF2. Le recrutement de TRAF2 mène à l'activation de la protéine kinase IKK, responsable de la phosphorylation, de la dégradation de I κ B et de la translocation nucléaire du NF- κ B. Ce complexe multiprotéique est responsable de la survie cellulaire induit par le TNF- α . Des modifications au niveau des radeaux riches en lipides de la membrane plasmique sensibilisent les cellules à la mort cellulaire par le TNF (109). Le complexe I assure l'expression des gènes NF κ B-dépendants tels que TRAF-1, TRAF-2, TRAF-6, c-IAP1 et c-IAP2, FLIP (FLICE IP) (110). Il a été démontré que la protéine FLIP exerce une action antiapoptotique, et peut inhiber complètement à elle seule l'action proapoptotique de TNF- α lorsque son expression augmente (111). Le complexe I se dissocie de TNFR, et des modifications de RIP et TRADD déclenchent le passage du complexe I au complexe II, favorisant ainsi la fixation de FADD, et le recrutement des caspases initiateuses 8 et 10 (107). Dans les cellules où NF κ B n'est pas activé en réponse à une stimulation de TNFR1 par le TNF- α , le niveau d'expression de FLIP diminue progressivement permettant alors le recrutement de caspases initiateuses -2,-8,-9,-10 au complexe II et le déclenchement de la cascade protéolytique qui mène à l'apoptose (107). Une fois les caspases initiateuses activées au niveau du complexe II, celles-ci clivent et activent les caspases effectrices -3,-6,-7 dans une réaction en cascade qui amplifie le signal apoptotique.

La liaison du TNF- α à son récepteur active d'autres voies de signalisation dont la spécificité est acquise par les différents adaptateurs recrutés au récepteur. On distingue quatre voies émanant de la liaison du TNF- α à son récepteur (112):

1. La signalisation lipidique : La liaison du TNF- α à son récepteur conduit à la formation de différents médiateurs lipidiques. Bien que les effets et les cascades soient moins décrits que pour le sentier d'apoptose, l'activité des enzymes sphingomyélinases (production de céramide) et phospholipases (production d'acide arachidonique) est augmentée (112).
2. Les sentiers MAP kinases : L'activation des trois sentiers MAP kinase, ERK, JNK et p38 survient rapidement suite à la liaison du TNF- α à son récepteur. Ces trois sentiers sont surtout connus pour leurs effets comme activateurs de facteurs de transcription et de l'expression génique, principalement de l'expression des gènes reliés à l'inflammation (82,112).
3. La voie NF- κ B : Le facteur de transcription NF- κ B est composé de deux sous-unités, p65 et p50. Son activation est régulée par un inhibiteur cytoplasmique, I κ B. Suite à la liaison du TNF- α à son récepteur, I κ B est phosphorylé par sa kinase IKK (I κ B kinase), ce qui amène sa dégradation par le protéasome. NF- κ B transloque par la suite au noyau pour augmenter l'expression de gènes inflammatoires et immuns (82,113). Selon le contexte, ce sentier peut induire des dommages tissulaires avec l'inflammation, mais il peut également protéger de l'apoptose.
4. Les autres cibles signalétiques potentielles : Selon le contexte et le type cellulaire, la liaison du TNF- α à son récepteur peut également activer d'autres sentiers. Citons par exemple la protéine kinase C et le sentier JAK/STAT. L'information disponible sur leurs effets est cependant plus fragmentaire (112). L'effet des cytokines est souvent redondant. Plusieurs effets du TNF- α peuvent être reproduits par l'IL-1 β .

Cette relation s'expliquerait par la similarité des voies de signalisation utilisées dans les deux cas. Les deux cytokines utilisent un membre de la famille TRAF (TNFR-associated factor) TRAF6 pour l'IL-1 β et TRAF2 pour le TNF- α . Ces deux protéines adaptatrices partagent différentes cibles et peuvent même s'associer, ce qui expliquerait l'effet synergique du TNF- α et de l'IL-1 β (112).

9.4. Rôle de TNF- α dans la pathogénie RA

Le TNF- α joue un rôle prépondérant parmi les cytokines pro-inflammatoires. Ceci a été démontré d'une part par des résultats obtenus chez des modèles animaux et d'autre part par des études effectuées sur le liquide synovial et le sérum des patients RA (114,115). Des souris transgéniques pour le gène qui code pour le TNF- α développent d'une manière spontanée une pathologie destructive RA (116,117). L'étude de Douni et ses collaborateurs (117) montre clairement que plusieurs souches des souris développent l'arthrite quand on leur introduit le transgène humain du TNF- α . Ceci est marqué par la présence des foyers inflammatoires intenses uniquement au niveau des articulations (117). Cette pathologie destructive des articulations peut être prévenue en traitant ces souris avec un anticorps monoclonal anti-TNF- α . Le TNF- α est présent d'une manière abondante dans différents endroits de l'articulation RA. On trouve également dans ces tissus synoviaux de l'IL-6, de l'IL-10 et d'IL-1. Le TNF- α se fixe sur le p55 TNFR1 murin ce qui indique que l'engagement de ce récepteur suffit pour pouvoir induire la production de cytokines autocrines et paracrines responsables de la synovite (117) (Fig.8).

L'injection intra-articulaire de TNF- α chez des rats ou souris CIA provoque une accélération et une sévérité de l'arthrite inflammatoire (RA) (115). Le traitement de ces animaux CIA avec l'anti-TNF- α diminue considérablement la sévérité de la maladie induite

par le collagène. Le même résultat a été obtenu en injectant à ces animaux CIA la protéine de fusion IgGTNFR comme inhibiteur de TNF- α . Des résultats d'immunohistochimie de tissus synoviaux dans le modèle murin montrent une surexpression de TNF- α dans les stades précoces de la maladie. De plus, des études *in vitro* sur des explants du cartilage ont montré que le TNF- α provoque la libération des fragments de protéoglycanes au bout de 12 à 24h (118) et une chute de la synthèse de macromolécules comme le collagène II, IX et les protéoglycanes (119), d'où la dégradation du cartilage.

Les études focalisées sur les analyses du liquide synovial et du sérum des patients RA ont clairement démontré des taux très élevés de cytokine pro-inflammatoire TNF- α (114,120). Les types cellulaires contenant le TNF- α sont les cellules de pannus, les macrophages et les jonctions synoviale-cartilage (121). Le TNF- α est capable de retenir les monocytes/les macrophages dans les greffons de synovial RA humain implantés chez les souris immunodéficientes SCID (severe combined immunodeficient) (122,123). Des études immunohistochimiques ont montré la présence de deux types de récepteurs p55 (TNFR1) et p75 (TNFR2) à la surface des macrophages, des fibroblastes, des lymphocytes ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales (124). Les taux de récepteurs solubles de TNF- α (sTNFR) sont augmentés dans le sérum des patients RA, mais aussi dans le liquide synovial où ils sont 4 fois plus élevés que dans le sérum correspondant (120). Les taux de récepteurs solubles de TNF- α en réponse à une stimulation avec le TNF- α sont augmentés significativement dans la culture d'explants de synoviale de patients RA.

9.5. L'IL-17 dans l'arthrite rhumatoïde

Les résultats cliniques obtenus avec les inhibiteurs d'IL-1 et du TNF- α démontrent bien l'importance et le rôle clé des cytokines pro-inflammatoires dans la pathologie destructive

RA. Cependant, une autre cytokine, l'IL-17, récemment identifiée, contribue grandement au développement de cette maladie inflammatoire chronique (125-128). Comme le TNF- α et l'IL-1, l'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire. Cette dernière est produite par les cellules T (CD4+, CD45RO+). L'implication de ce type cellulaire dans le développement de l'arthrite, documentée d'une manière exhaustive dans la littérature, se caractérise par le rôle clé d'IL-17 dans cette pathologie inflammatoire autoimmune (70,128-131). Le rôle de l'IL-17 dans la pathologie découle du fait que son niveau d'expression est considérablement augmenté dans le liquide synovial des patients RA par rapport à celui des patients OA (132). L'IL-17 est excessivement exprimée dans la plupart des échantillons de synoviales des patients RA, et dans quelques échantillons OA, par contre elle n'est pas exprimée dans les échantillons normaux. Ceci a été démontré par la technique de RT-PCR qui a mis en évidence une activité transcriptionnelle importante du gène qui code pour l'IL-17 dans les synovium des patients RA, alors que dans les synovium de patients OA, l'activité de ce gène est quasi absente.

9.5.1. Structure de l'IL-17

Deux groupes de chercheurs ont publié en 1995 et 1996 deux articles décrivant une nouvelle cytokine pro-inflammatoire nommée IL-17 (129,133). L'IL-17 est une protéine de 17 kDa sécrétée sous forme d'un dimère. L'IL-17 humaine et de la souris présentent une homologie de 25% entre les séquences d'acides aminés (134). L'IL-17 humaine agit sur les cellules de la souris, alors que celle de la souris n'a aucun effet sur les cellules humaines (129). L'IL-17 humaine présente une homologie importante de l'ordre de 72% avec celle de Herpes Virus Saimiri (HVS) et 63% avec celle de la CTLA8 murine (129). Les éosinophiles pourraient être la source d'IL-17, étant donné que la plupart des cytokines sont

synthétisées par ce type cellulaire dans la situation asthmatique (135). La contribution de l'IL-17 éosinophilique à celle synthétisée par les autres cellules T reste à élucider. Récemment 4 résidus cystéines ont été mis en évidence par une analyse systématique d'une banque de gènes (gene bank) (136). Cette séquence de 4 cystéines caractérise la famille de l'IL-17, qui est constituée de IL-17B, IL-17D, IL-17E, IL-17F et l'IL25 (131,134). Leur nomenclature reste confuse et leurs fonctions restent à déterminer.

9.5.2. Les effets de l'IL-17 sur les populations cellulaires de synovium

Dans le synovium, les lymphocytes T sont en contact direct avec les synoviocytes, les monocytes et les cellules dendritiques (Fig. 14). Les cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-17 assurent la production d'IL-6 et LIF d'une manière synergique sur les synoviocytes (137). Ce résultat indique que les cytokines produites par les monocytes (TNF- α et IL-1) et celles produites par les cellules T (IL-17) interagissent ensemble sur les synoviocytes, les chondrocytes et les cellules mésenchymateuses en les activant, d'où le déclenchement d'une augmentation importante de la teneur en cytokines pro-inflammatoires (125). Une augmentation de la synthèse des chemokines et d'autres cytokines a été obtenue en réponse à une stimulation avec l'IL-17, un effet additif (synergique) a été observé sur la production de MIP3 α /CCL20 (macrophage inflammatory protein 3 α) en réponse à une stimulation avec le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-17 (138). La MIP3 α est une chémokine responsable de la migration des cellules T mémoires et des cellules dendritiques (DC) immatures vers les foyers inflammatoires (138). L'IL-17 induit la différenciation des cellules dendritiques chez la souris préalablement stimulées avec le granulocyte colony stimulatory factor (G-CSF) et l'IL-4 (139). Dans le synovium RA, une déficience de cellules dendritiques matures a été observée, avec une infiltration de DC

immatures (140). L'IL-17 interagit synergiquement avec le TNF- α , l'IL-1 β sur la production de MIP3 α , ce qui influence la migration des cellules DC vers le foyer inflammatoire (138). Une addition d'IL-17 exogène entraîne une élévation du niveau d'expression de MIP3 α par les explants de synovium. Cependant, l'utilisation des récepteurs solubles pour TNF- α , IL1 et IL-17 répriment considérablement la synthèse de MIP3 α . Ceci montre bien que les interactions entre les monocytes et les cellules T contribuent grandement au recrutement des cellules DC et d'autres cellules T via une augmentation de la synthèse de MIP3 α par les synoviocytes.

9.5.3. Les effets destructifs de l'IL-17

Les cytokines pro-inflammatoires secrétées par le synovium RA exercent des effets destructifs sur l'articulation. Comme le TNF- α et l'IL-1, l'IL-17 augmente spontanément l'activité transcriptionnelle des gènes qui codent pour MMP-1, MMP-3 et MMP-13 par les synoviocytes. L'ajout d'IL-10, d'IL-13 et d'IL-4 à une culture de synoviocytes abolit complètement la production de MMP-1 en réponse à une stimulation avec l'IL-17 et/ou l'IL-1 β . De même la présence de l'anticorps anti-IL-17 réprime d'une part l'expression de la MMP-1, et d'autre part réduit les activités collagénolytiques et gélatinolytiques du synovium des patients RA, avec une diminution remarquable de la libération des fragments néoépitopes type I collagène C telopeptide (CTX) dans le milieu de culture (141). Ce résultat montre bien la contribution directe de l'IL-17 dans la dégradation et la destruction du cartilage et l'os souschondral (141). L'IL-17 assure l'induction de PGE2 et du NO par les chondrocytes. Ceci a été démontré par une simple culture d'explants de cartilage humain. Cette induction se fait d'une manière LIF-dépendante et IL-1 β -indépendante (142-144). D'une manière similaire à l'action de TNF- α et de l'IL-1, l'IL-17 active l'expression

de la collagénase-3 (MMP-13) principalement via l'activation de facteur de transcription AP-1 (145). Des différences de signalisation ont été observées : IL-17 active le fosB, alors que IL-1 β assure l'activation de c-fos, ce qui suggère l'existence des voies de signalisation différentes (145). L'IL-17E membre de la famille de l'IL-17 a aussi un effet destructif sur le cartilage (143). L'IL-17 a également des effets sur les ostéoblastes, où elle induit la production de IL-6 (146). Dans les chondrocytes, l'IL-17 en combinaison avec le TNF- α assure la production du NO par les cellules ostéoblastiques de façon dépendante de NF κ B (147). De plus, l'IL-17 active les interactions entre les ostéoblastes et les ostéoclastes précurseurs, et est responsable de ce que l'on appelle ostéoclastogenèse par l'intermédiaire de PGE2 (132,134). L'IL-17, le TNF- α et l'IL-1 β induisent l'ostéoclastogenèse en augmentant le niveau d'expression du récepteur RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) et en inhibant l'expression d'osteoprotegerin (OPG) dans les ostéoblastes et les cellules stromales (148). Les cellules T excrétrices de l'IL-17 expriment la forme membranaire et la forme soluble de RANKL (149). Toutes ces fonctions montrent bien que l'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire directement impliquée dans la résorption cartilagineuse et osseuse chez les patients RA. Dans le contexte de la pathologie inflammatoire RA, les cellules T qui se trouvent au voisinage de l'os articulaire constituent une source principale de l'IL-17 (150). Dans un modèle humain *ex-vivo* comme une culture d'explants de synovium RA avec de l'IL-17, une augmentation de l'IL-6, une dégradation de collagène et une inhibition de la synthèse de macromolécules sont constatées(138). Sur des explants de cartilage de souris, l'IL-17 provoque la dégradation et la libération de fragments de protéoglycanes et inhibe la synthèse de macromolécules (150,151). De même, sur des explants d'os humain RA, l'IL-17 augmente la résorption de l'os alors qu'elle

diminue sa formation (150). Une injection intra-articulaire de l'IL-17 chez la souris normale entraîne la dégradation de cartilage. De plus, la surexpression de l'IL-17 chez une souris immunisée par le collagène II (CIA) provoque l'arthrite et aggrave la pathologie destructive de l'articulation (125,128). Une neutralisation de l'IL-17 par un anticorps réduit considérablement l'inflammation, la destruction et la résorption osseuse chez une souris CIA (152). L'IL-17 exerce ses effets cataboliques d'une manière indépendante de l'IL1 β , car l'IL-17 déclenche l'inflammation et la destruction de l'articulation chez une souris CIA déficiente du gène qui code pour IL1 β (130). En conclusion, l'IL-17 excrétée par les cellules T de synovium contribue considérablement au développement de l'arthrite et par conséquent elle constitue une cible thérapeutique pour la pathologie inflammatoire RA (152) (Fig.8).

9.5.4. La signalisation de l'IL-17

L'IL-17 est synthétisée par les lymphocytes T activés, et initie ses actions pro-inflammatoires par le biais de son récepteur IL-17R, qui est exprimé d'une manière ubiquitaire à la surface membranaire de toutes les cellules de l'organisme. Toutefois, les mécanismes de la transduction du signal de l'IL-17 ne sont pas complètement élucidés (134). Dans les situations pathologiques chroniques, à l'image de RA, l'IL-17 déclenche directement une destruction tissulaire par une résorption cartilagineuse et osseuse en diminuant la synthèse de l'ECM et en augmentant la dégradation par la synthèse et la libération de MMPs et d'ADAM-TS ou indirectement par le recrutement des cellules inflammatoires et l'induction d'autres cytokines pro-inflammatoires dans les tissus enflés incluant le TNF- α et IL-1 β (134,153). L'IL-17 active l'expression d'iNOS et la production de NO dans les chondrocytes via la voie tyrosine-kinase dépendante, PKA et PKC-

dépendante (154,155). Plusieurs études ont prouvé que l'IL-17 assure l'activation par phosphorylation de voies MAPKs ERK1/2, p38 et JNK1/2, aboutissant ainsi à l'induction de gènes MMPs, ADAM-TS4, COX-2 et iNOS (154,156-159). L'activation de NFκB par l'IL-17 a été observée dans les chondrocytes (154,155), les keratinocytes humains (133,160) et les cellules interstitielles (161). Cependant, le mécanisme par lequel IL-17 active le NFκB reste un sujet d'investigation, mais il pourrait être dépendant de la protéine adaptatrice TRAF-6 (161,162). Des fibroblastes de souris invalidées pour les gènes TRAF2^{-/-} et TRAF6^{-/-} ont permis de mettre en évidence l'importance cruciale de TRAF-6 dans la transduction du signal de l'IL-17, dès lors la TRAF-6 constitue un médiateur puissant pour le recrutement des cascades JNK et NFκB (162). L'expression de la MMP-9 dans les monocytes et les macrophages humains induits par IL-17 se fait via la voie ERK et les facteurs de transcriptions STAT-1 et STAT-3 (153). L'expression de COX-2 dans les chondrocytes en réponse à une stimulation avec IL-17 se fait via la voie JNK1/2 (154). Une étude sur les cellules de la lignée U937 (monocytes humaine leucémique) a prouvé que l'IL-17 déclenche l'activation (tyrosine phosphorylation) de plusieurs familles JAK et STAT, incluant Tyk2, JAK1, -2, et -3, et STAT1, 2, 3, et 4, suggérant ainsi probablement l'implication de la voie JAK/STAT dans la médiation des effets biologiques et cataboliques de l'IL-17 (163).

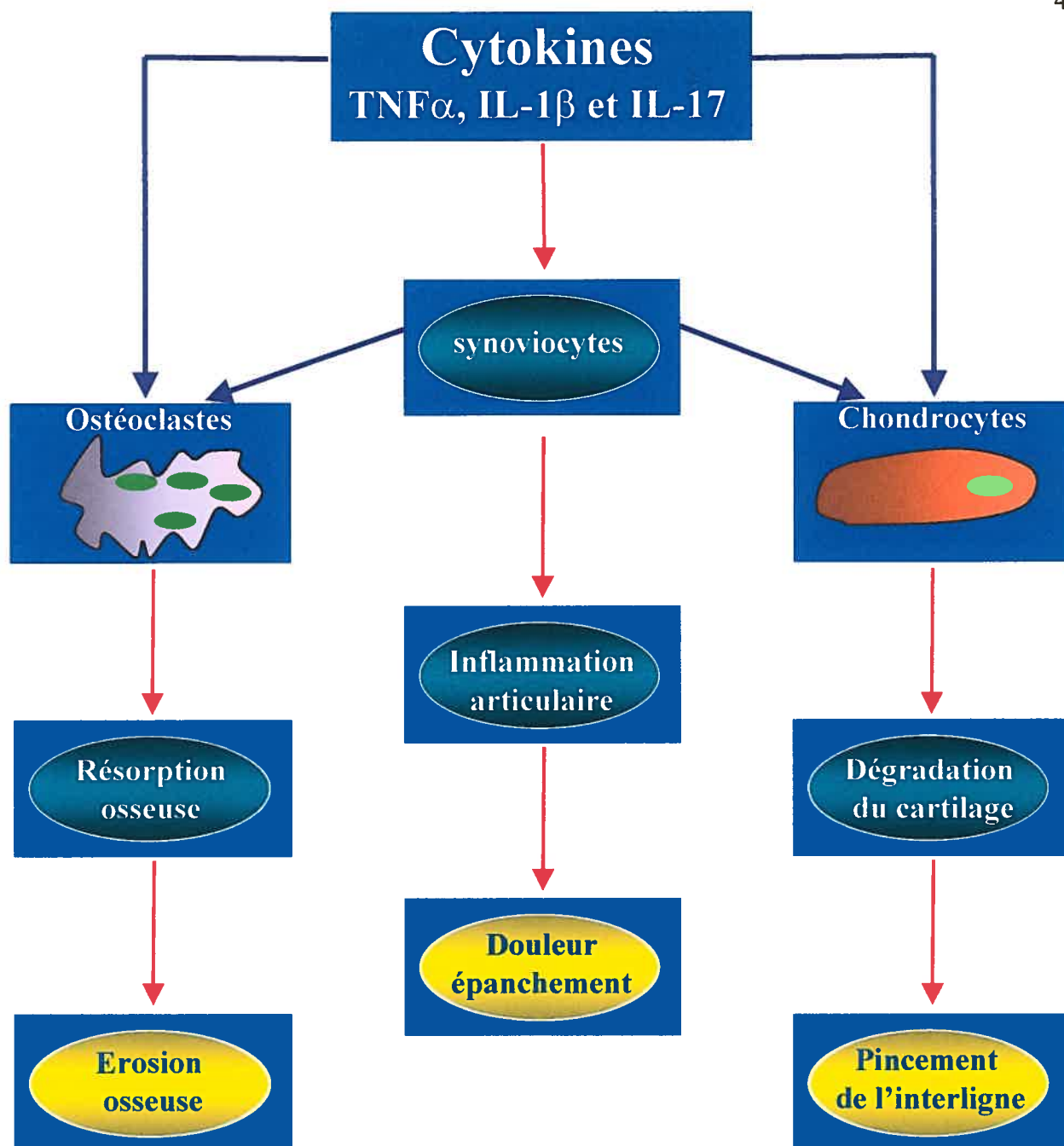


Figure 8: Représentation schématique des effets de l'IL-1 β , le TNF- α et de l'IL-17 sur les population cellulaire

10. Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)

Les voies MAP kinases font partie des systèmes de signalisation des cellules eucaryotes les plus répandus. Toutes les cellules eucaryotes ont différentes voies MAP kinases qui répondent spécifiquement à différents stimuli. Il existe trois familles principales de MAPK, la cascade ERK (extracellular signal-regulated kinase) et les deux sentiers de stress, les SAPK (Stress activated protein kinase) JNK (c-jun NH₂-terminal kinase) et p38 (158) (Fig. 9). Les MAPKs (Mitogen activated Protein Kinases) sont des sérines/thréonines kinases qui possèdent un motif Thr-X-Tyr conservé dans la boucle d'activation du sous-domaine kinase VIII. L'identité du X dans ce motif détermine l'appartenance à une des familles. Ainsi Thr-Gly-Tyr fait partie des kinases p38, Thr-Glu-Tyr fait partie des kinases ERK et Thr-Pro-Tyr fait partie des kinases JNK. La MAPK est phosphorylée par une kinase à double spécificité (thréonine/tyrosine), la MAPK-kinase (MKK ou MEK pour MAPK/ERK-kinases). Les MKKs possèdent également un motif conservé dans la boucle d'activation du sous-domaine kinase VIII. Les MKK sont phosphorylées par les MAPK-kinase-kinase ou MAP3K. Les MAP3K sont pour leur part régulées par une variété d'activateurs et d'inhibiteurs (164,165). Les MAPK peuvent être activés par divers agonistes se liant à des récepteurs à activité tyrosine kinase, à des récepteurs couplés aux protéines-G. Ils peuvent également être activés par les cytokines. Les voies des MAPK comprennent des cascades de kinases impliquées dans la régulation, la survie cellulaire, la prolifération, la production cytokinique, la production des MMPs, et des ADAM-TS. Elles ont des effets sur l'apoptose, la transformation oncogénique, le développement, l'inflammation, la réponse immunitaire et sur divers autres phénomènes (164,166). La réponse à un stimulus donné

pourra varier selon le type et le contexte cellulaire. Les modules ont une organisation spatiale et temporelle dans la cellule. Cependant, les sentiers MAPKs ne sont ni rectilignes, ni hermétiques. Ils peuvent interagir avec d'autres sentiers « parallèles », ce qui est connu sous le nom de cross-talk (167).

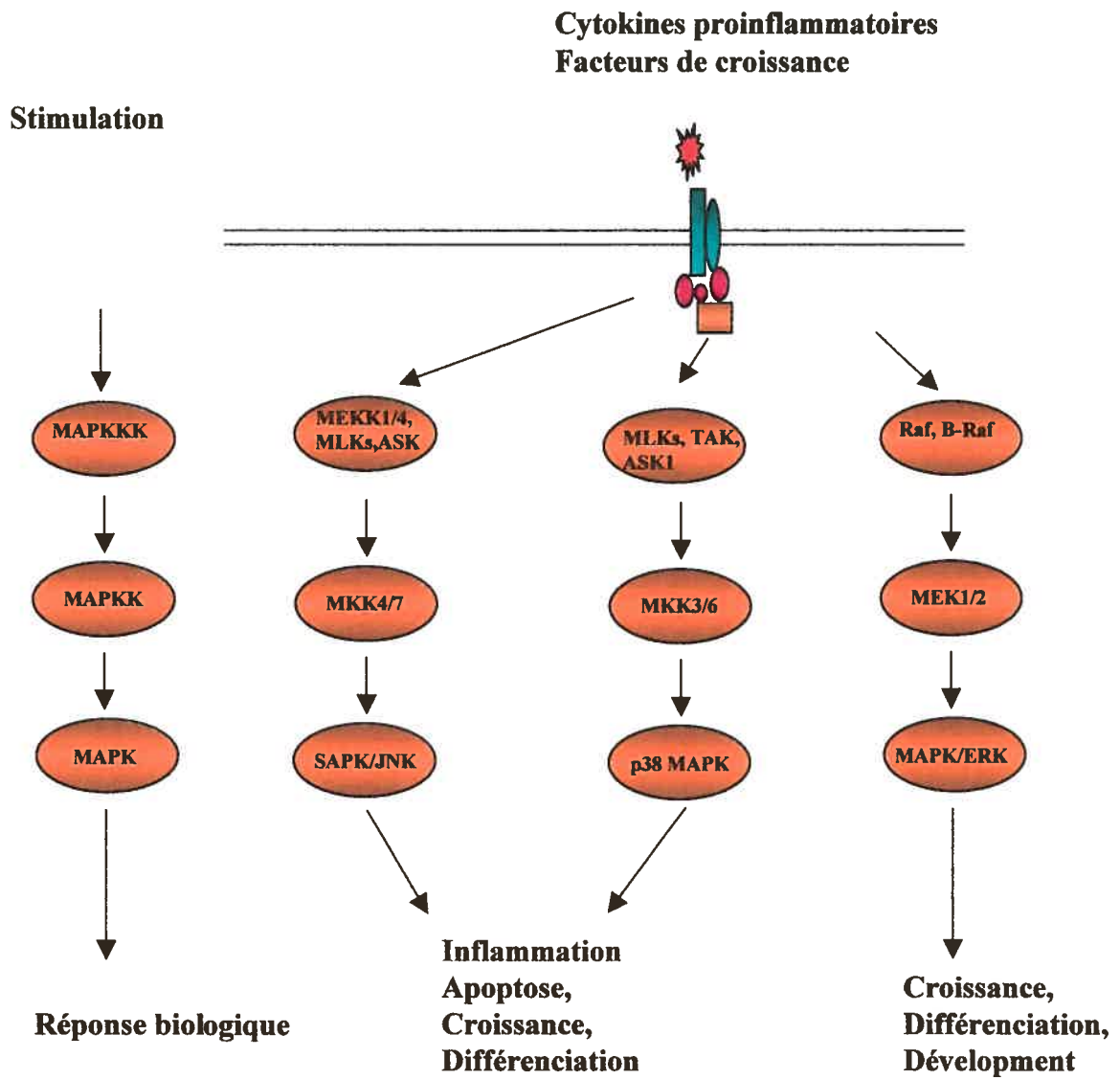


Figure 9: Les voies des MAP kinases.

10.1. Extracellular signal-regulated kinases (ERK)

La cascade ERK est impliquée dans différents phénomènes physiologiques et pathologiques. Citons que 30% de tous les cancers humains ont une mutation dans Ras (en amont de la voie ERK). Ce taux monte à 90% dans le cancer pancréatique et à 50% dans le cancer du côlon. La MAP3K Raf est également mutée dans une grande variété de cancer (168). Divers signaux convergent vers le module Raf-MEK-ERK. ERK phosphoryle diverses protéines qui régulent le métabolisme, le remodelage de la chromatine et divers facteurs de transcription.

Dans la littérature, ERK1^{-/-} et ERK2^{-/-} knockout ont été étudiés. La souris déficiente du gène ERK1 présente un phénotype normal avec un léger effet sur le développement des cellules T (169). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des fonctions assumées par ERK1 sont compensées par ERK2. Cependant, la souris invalidée pour le gène ERK2 montre la fonction fondamentale de la protéine kinase ERK2 dans le développement trophoblastique. La déficience du gène qui code pour ERK2 provoque une létalité embryonnaire (170). Egalement d'autres études ont montré le rôle important de la protéine kinase ERK2 dans le développement normal du placenta (171) et la différenciation mésodermique (172). De même, la souris invalidée pour MEK1 (MEK1^{-/-}) meurt dans l'utérus. Cette létalité embryonnaire est due à un défaut de la vascularisation placentaire (173). Comme les autres voies des MAPKs, ERK est aussi anormalement présente dans le synovium des patients RA (174). Elle joue un rôle clé dans la croissance, la prolifération et

la survie cellulaire. Il existe deux formes, ERK1 (p42) et ERK2 (p44), qui sont constitutivement exprimées. L'activation des récepteurs cellulaires par leurs ligands correspondants engendre l'activation de la protéine G-Ras qui recrute la protéine kinase Raf à la membrane cytoplasmique. La Raf, une fois activée, assure l'activation par phosphorylation de la MEK1/2 (une protéine kinase de deuxième niveau) qui à son tour active par phosphorylation les ERK1/2. Ces deux kinases ERK1/2 vont d'abord activer des protéines cytoplasmiques, puis transloquer vers le noyau afin de réguler par phosphorylation les facteurs de transcription c-Jun, c-fos, ATF2, Elk1 impliqués dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. L'importance de la voie ERK a été mise en évidence par des études effectuées sur des souris transgéniques. En effet, l'inactivation de gène qui code pour MEK1(MEK1^{-/-}) ou Raf est létale chez la souris. De même, des souris déficientes en p44 présentent une maturation anormale du thymus, et une réduction de l'expression des chaînes à la surface des lymphocytes T, d'où l'importance de la voie ERK dans le processus inflammatoire (169).

10.2. La protéine p38 kinase

La voie p38 est fortement activée par les stress (lumière UV, choc thermique, stress oxydant, agents chimiothérapeutiques), les cytokines et divers facteurs de croissance (164,175,176). Le sentier p38 est impliqué dans la réponse inflammatoire, dans l'induction de l'expression de cytokines et de molécules d'adhérence. Le sentier p38 est également impliqué dans la régulation de l'apoptose induite, entre autres, par le stress oxydant et les agents chimiothérapeutiques (177).

La cascade p38 a considérablement attiré l'attention de plusieurs scientifiques comme une cible thérapeutique potentielle, du fait de sa capacité à réguler la production de cytokines pro-inflammatoires tant *in vivo* qu'*in vitro* (178). Quatre formes isométriques de p38 ont été identifiées : p38 α , β , γ et δ . L'inactivation du gène de p38 α chez la souris entraîne une létalité embryonnaire, due à une anomalie de développement du placenta (179,180). L'activation du sentier p38 mène à l'activation de différentes cibles nucléaires et cytoplasmiques. Les cibles nucléaires incluent des facteurs de transcription tels ATF-2, MEF2 et Elk-1, tandis que les cibles cytoplasmiques incluent MAPKAPK-2 (MAPK-activated protein kinase 2) et MNK (164). La MAPKAPK-2 est un facteur important dans la médiation des effets régulateurs des cytokines par la p38 kinase (181). Des études ont déjà montré la présence de la p38 kinase activée dans le synovium des patients arthritiques RA, et dans des cultures de fibroblastes-like synoviocytes (174,182). La MAPK p38 est activée par deux MKKs, soit MKK3 et MKK6. MKK4, qui active la voie de JNK, active l'isoforme α de p38 (183). Les MAP3K et leurs activateurs sont multiples avec plusieurs branchements (164). Les protéines kinases MKK3 et MKK6 sont activées dans le synovium des patients arthritiques RA, et forment un complexe très stable avec la p38 kinase dans les FLS stimulées (184). D'innombrables résultats suggèrent l'implication de la p38 kinase dans la pathogénie de l'arthrite inflammatoire (185,186). En effet, récemment, une étude a montré une réduction significative de la destruction de l'articulation d'un rat CIA (modèle animal de l'arthrite) traité avec un inhibiteur puissant de p38 kinase, FR167653. De même, le niveau plasmatique de TNF- α et de l'IL-1 a été diminué, ainsi que la différenciation de fibroblastes en ostéoclastes (185,187). Cette différenciation cellulaire qui est responsable

de la résorption osseuse est également observée chez les patients RA et est médiée par la p38 kinase (186).

10.3. c-Jun N terminal kinase (JNK)

Une étude a montré une létalité embryonnaire pour une souris invalidée à la fois pour les gènes JNK1 et JNK2 (*jnk1*^{-/-}, *jnk2*^{-/-} double knockout). Le génotype correspondant est une anomalie de développement du tube neuronal (188) et une surexpression de l'IL-2 (189). Un ensemble d'anomalies a également été obtenu chez des souris invalidées pour JNK1(*jnk1*^{-/-}) ou JNK2 (*jnk2*^{-/-}) marqué par une prolifération inadéquate des cellules, une anomalie de production de l'IL-2, anomalie d'activation de la mort des thymocytes, une anomalie de différenciation des cellules T en Th2 (*jnk1*^{-/-}) et une anomalie de différenciation des cellules T en Th1 (*jnk2*^{-/-}) (190-192).

La cascade JNK est la voie de signalisation des MAPK la plus importante pour l'expression des MMPs, et la destruction articulaire chez les modèles animaux expérimentaux de l'arthrite inflammatoire (193). De même, il a été montré une présence anormale de JNK2 dans le synovium des patients RA (174). Chez la souris CIA invalidée pour le gène JNK2 (JNK^{-/-}), une réduction significative de la dégénérescence cartilagineuse, et des effets minimes sur le processus inflammatoire ont été mis en évidence (194). L'inhibition des deux formes de JNK (JNK1, JNK2) est nécessaire pour un contrôle de la transcription des gènes dépendants de la voie JNK. Les régulateurs en amont de JNK qui sont MKK4 et MKK7, forment un complexe avec JNK (195). Ce complexe contient aussi une kinase de troisième niveau MAPKKK, la MEKK2 qui jouerait un rôle pivot dans la production de cytokine via la voie JNK dans la pathologie destructive RA (196).

11. La voie de NF- κ B

La réponse inflammatoire est un processus complexe et crucial qui doit être à la fois efficace pour permettre à l'organisme de se débarrasser et de résister aux agressions extérieures, et mesuré pour éviter l'apparition de lésions tissulaires. Cet équilibre est assuré par l'action des facteurs pro et anti-inflammatoires, parmi lesquels on distingue les facteurs de la famille NF- κ B et les récepteurs des glucocorticoïdes (GR). La famille NF- κ B /Rel dont le précurseur est la protéine p65/RelA est constituée de facteurs de transcription p105/50, RelA, RelB et cRel, dont l'expression est ubiquitaire. Initialement cytoplasmique, les facteurs NF- κ B sont des hétérodimères inactifs dont l'activation induite par les signaux extracellulaires (cytokines, LPS, facteurs mitogéniques de cellules T, B, dsRNA etc) dépend de la dégradation de I κ B par le protéasome (197). L'I κ B, inhibiteur spécifique associé à NF- κ B, est phosphorylée par l'IKK ce qui lui permet de libérer NF- κ B. Le NF- κ B est alors transféré vers le noyau où il exerce son activité transcriptionnelle sur des gènes NF- κ B dépendants (197). La cascade des étapes aboutissant à la dégradation de I κ B se compose d'une succession d'étapes : phosphorylation de I κ B, puis son ubiquitination et enfin sa dégradation par le protéasome. Ces trois étapes sont assurées respectivement par l'IKK, I κ B ubiquitine ligase et le protéasome 26S (198,199). Une activité accrue de la liaison de NF- κ B à l'ADN dans des extraits nucléaires provenant d'explants synoviaux des patients RA a été montré, prouvant ainsi le rôle clé de NF- κ B dans la pathogénie RA (200). L'implication de NF- κ B dans les maladies inflammatoires chroniques, à l'image de RA, vient en fait de sa capacité à induire et à stimuler l'expression de nombreux gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires au niveau des macrophages (201), des MMPs (202,203), de COX-2 et iNOS (204) et des molécules d'adhésion au niveau des FLS (205).

Bondeson et ses collaborateurs ont démontré clairement une inhibition des mécanismes inflammatoires et destructifs de l'arthrite, par blocage de la voie NF- κ B en utilisant des adénovirus (206). Une autre étude à base de thérapie génique qui consiste à transférer de cDNA pour l'I κ B a également prouvé une suppression des réponses inflammatoires par inhibition de la voie NF- κ B dans les monocytes et les cellules stromales (207). Cette voie constitue donc une cible thérapeutique pour la maladie RA et son inhibition permet la répression de plusieurs gènes inflammatoires incluant TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, ICAM et VCAM impliqués dans le développement des maladies auto-immunes comme l'arthrite (RA).

12. Hypothèse de recherche

12.1. But de la recherche

Étudier les mécanismes de la dégénérescence cartilagineuse et identifier de nouveaux agents pharmacologiques ou génétiques ayant la capacité d'interférer avec les transductions de signaux cataboliques des cytokines pro-inflammatoires (le TNF- α , l'IL-1, et l'IL-17) responsables de la transcription des gènes des MMPs et des ADAM-TS chez les patients souffrant d'arthrose (OA) et d'arthrite (RA).

12.2. Hypothèse

Les maladies arthritiques (RA) et arthrosiques (OA) se caractérisent par une perte de la capacité protectrice du cartilage, qui est due à la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM). Cette dernière est le résultat d'une altération du métabolisme cartilagineux, qui se manifeste par une augmentation excessive des activités protéolytiques des MMPs et des ADAM-TS. Des études préalables ont démontré les mécanismes de la dégradation du collagène, de protéoglycans et des aggrecans. Cependant, les connaissances qui régissent l'inhibition de la synthèse des MMPs par interception des signaux cataboliques des cytokines pro-inflammatoires (le TNF- α , l'IL-1, et l'IL-17) restaient à élucider. Nous avons démontré que l'expression des gènes MMP-13 et MMP-3 par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 pourrait être inhibée en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des voies des MAPKs (U0126, PD98059, SB203580, SB203590, SP600125, curcumin) ainsi que des inhibiteurs pour les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B (curcumin, antioxidant, nordihydroguaiaretic acide (NDGA), Bay-11-7085, MG132, proteasome inhibitor). Les

résultats obtenus suggèrent le rôle clé de ces voies dans la transcription des gènes MMPs et ADAM-TS dans les chondrocytes articulaires en réponse à une stimulation avec le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-17. Nous avons supposé que l'induction des MMPs et ADAM-TS par le TNF- α , l'IL-1, et l'IL-17 est assuré par les sentiers MAPK (ERK, p38 et JNK) et les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. Ces données montrent bien que la signalisation de TNF- α , de l'IL-1 et de l'IL-17 se fait via les cascades MAPK, ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. Nos résultats ouvreraient la voie à de nouvelles investigations qui permettront d'élucider leurs mécanismes cataboliques et de cibler des protéines cytoplasmiques afin de contrer la pathologie dégénérative du cartilage chez les patients OA, RA. Nous avons testé ces hypothèses dans les chondrocytes humains, les chondrocytes bovins et les cellules de chondrosarcome SW1353.

II. Articles

1. Article I

Abdelhamid Liacini, Judith Sylvester, Wen Qing Li and Muhammad Zafarullah 2002. **Inhibition of IL-1 stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in human articular chondrocytes. *Matrix Biol.* 21: 251-262.**

CONTRIBUTION :

J'ai réalisé toutes les manipulations qui ont contribué à la réalisation de ce travail. J'ai préparé les chondrocytes humains et bovins à partir du cartilage. J'ai effectué la moitié du travail pour les mesures de l'ARN de la MMP-13, la MMP-3 et le 28S par Northern blot. J'ai effectué tous les western blots et la quantification des bandes de la MMP-13, MMP-3 et de 28S par densitomètre, de même que les colonnes statistiques.

Judith Sylvester a participé à la réalisation de ce travail en effectuant plusieurs manipulations. Elle a préparé les chondrocytes humains et bovins à partir du cartilage, la culture cellulaire et la moitié des mesures de la MMP-13, la MMP-3 et le 28s par northern blot.

Wen Qing Li a cloné le cDNA pour la MMP-13 dans le vecteur pGEM-4Z.

Muhammad Zafarullah a élaboré et planifié cette recherche. Le travail a été réalisé sous sa direction à partir de la conception, l'acquisition, l'analyse et l'interprétation des résultats jusqu'à la préparation du manuscrit et la soumission pour publication.

Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes

Abdelhamid Liacini, Judith Sylvester, Wen Qing Li, Muhammad Zafarullah*

Département de Médecine and Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM),
Hôpital Notre-Dame du CHUM, 1560 Sherbrooke est, Montreal, Québec, Canada H2L 4M1

Received 17 May 2001; received in revised form 14 January 2002; accepted 6 February 2002

Abstract

Interleukin-1 (IL-1), the main cytokine instigator of cartilage degeneration in arthritis, induces matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and MMP-13 RNA and protein in chondrocytes. The molecular mechanisms of this induction were investigated with specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways and activating protein (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors. IL-1 rapidly induced the activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK), protein 38 (p38) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) MAPKs in the first-passage human femoral head OA chondrocytes. The ERK-MAPK pathway inhibitor, PD98059, attained 46–53% (MMP-3) and 59–66% (MMP-13) inhibition of RNA induction in human OA and 47–52% (MMP-3) and 69–73% (MMP-13) inhibition in bovine chondrocytes. U0126 conferred 37–77% (MMP-3) and 43–73% (MMP-13) suppression in human and 77–100% (MMP-3) and 96–100% (MMP-13) in bovine chondrocytes. P38 and JNK inhibitor, SB203580 caused 35–37% reduction of MMP-3 and MMP-13 RNA in human and 36–46% (MMP-3) and 60–88% (MMP-13) in bovine chondrocytes. Inhibitor of JNK, AP-1 and NF- κ B, curcumin, achieved 48–99% suppression of MMP-3 and 45–97% of MMP-13 in human and 8–100% (MMP-3) and 32–100% (MMP-13) in bovine chondrocytes. NF- κ B inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate yielded 83–84% reduction of MMP-3 and 38–55% for MMP-13 in human chondrocytes. In bovine chondrocytes, the induction decreased by 54–64% for MMP-3 and 74–93% for MMP-13 RNA. These results suggest the involvement of MAPKs, AP-1 and NF- κ B transcription factors in the IL-1 induction of MMPs in chondrocytes. Inhibition of IL-1 signal transduction by these agents could be useful for reducing cartilage resorption by MMPs in arthritis. © 2002 Elsevier Science B.V. and International Society of Matrix Biology. All rights reserved.

Keywords: Arthritis; Chondrocytes; Interleukin-1; Matrix metalloproteinases; Signal transduction

1. Introduction

Interleukin-1 (IL-1) is a major proinflammatory cytokine implicated in arthritic joint damage. Its levels are increased in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) (reviewed in Arend and Dayer, 1995; Westacott and Sharif, 1996). It is expressed at high levels in OA cartilage (Tetlow et al., 2001). Interestingly, IL-1beta converting enzyme

expression is also increased in OA cartilage relative to normal tissue (Saha et al., 1999). OA chondrocytes display increased expression of IL-1 receptor and are more sensitive to this cytokine (Martel-Pelletier et al., 1992; Ismaiel et al., 1992). IL-1 significantly alters the physiology of joints and cartilage metabolism by inducing a variety of genes in chondrocytes (Margerie et al., 1997). It decreased the cartilage-specific, type II collagen but increased matrix metalloproteinases (MMP) mRNA expression in immortalized and primary human chondrocytes (Goldring et al., 1994; Mort et al., 1993). Anti-IL-1 therapies in the collagen-induced mouse models of arthritis prevent cartilage and bone loss, suggest-

*Corresponding author. Tel.: +1-514-890-8000 ext. 25690; fax: +1-514-412-7612.

ing its key role in the pathogenesis. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is mostly involved in joint inflammation (Joosten et al., 1999). Inhibition of IL-1 and its actions by IL-1 receptor antagonist via gene therapy and antibodies against IL-1 are beneficial in reducing the symptoms of arthritis including invasion of cartilage by synovium (Oligino et al., 1999; Neidhart et al., 2000; Mehraban and Kasturi, 1998). Some of these effects of IL-1 are mediated by MMPs.

MMPs are a family of proteases comprising of collagenases (e.g. MMP-1 and MMP-13), stromelysins (e.g. MMP-3), gelatinases and membrane-type MMPs (reviewed in Nagase and Woessner, 1999). They are secreted as an inactive form by cytokine-stimulated cells. Activated MMPs can cleave most of the components of cartilage extracellular matrix (ECM) including type II collagen and aggrecan. Stromelysin-1 (MMP-3) cleaves proteoglycans, collagens, gelatins and link protein of aggrecan. Collagenase-3 or MMP-13 has particular affinity for type II collagen but can also cleave aggrecan at specific sites (Fosang et al., 1996). Increased MMP-3 in the serum and synovium of RA patients is an indicator of inflammation and associated joint damage (Yoshihara et al., 2000; Cheung et al., 2000; Yamanaka et al., 2000). The serum levels of MMP-3 are related to disease activity in RA (Ribbens et al., 2000). MMP-3 is in 20-fold excess over MMP-1 in the synovial fluids of patients with RA (Walakovits et al., 1992) and was localized in the superficial zone of cartilage and in the synovium of patients with OA (Okada et al., 1992). The synovia of OA patients have elevated MMP-3 RNA (Zafarullah et al., 1993). IL-1 preferentially induces MMP-3 expression in rabbit and human cartilage (Hutchinson et al., 1992; Nguyen et al., 1992). MMP-3 RNA is elevated in the cartilage of damaged human knee and ankle (Chubinskaya et al., 1999).

MMP-13 from chondrocytes selectively enhances cleavage and denaturation of type II collagen in OA cartilage (Mitchell et al., 1996; Billingham et al., 1997) and aggrecan at the specific sites (Fosang et al., 1996). Its expression is also increased in rheumatoid synovium in 58% of the patients and can be correlated with systemic markers of inflammation (Lindy et al., 1997; Westhoff et al., 1999). Chondrocyte-derived IL-1 and MMP-13 could promote invasion of cartilage by RA synovial fibroblasts (Pap et al., 2000). MMP-13 levels are high in remodeling rabbit synovial connective tissue (Hellio Le Graverand et al., 2000). Human OA cartilage has elevated expression of MMP-13 RNA and protein that can be induced by IL-1 and TNF- α through c-fos in chondrocytes (Reboul et al., 1996; Borden et al., 1996; Shlopov et al., 1997). MMP-13 is a major target for developing cartilage-protective drugs. Thus blocking IL-1-induced MMP-3 and MMP-13 enzymes or their gene expression by novel physiologic and pharmacological inhibitors (van Den Berg, 2000) is an important

therapeutic approach for arthritis. The mechanisms through which IL-1 increases the expression of MMPs have not been fully elucidated. A better understanding of these signaling and regulatory mechanisms in chondrocytes may lead to novel strategies for suppressing the catabolic actions of IL-1. Here we show that blocking ERK, p38 and JNK-MAP kinase signal transduction pathways as well as AP-1 and NF- κ B transcription factors in the first-passage human or bovine femoral head chondrocytes leads to down-regulation of the IL-1-induced MMP-3 and MMP-13 gene expression.

2. Experimental procedures

2.1. Primary cultures of human and bovine chondrocytes and treatments

Human cartilage was from the femoral heads of the OA patients who underwent hip-replacement surgery at the Notre Dame Hospital. Normal bovine articular cartilage was obtained from the knee and femoral head of adult animals from a local abattoir. Chondrocytes were released by pronase (1 mg/ml) digestion for 60 min and collagenase (Sigma type IA) digestion for 9 h in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) at 37 °C. The cells were washed five times with phosphate buffered saline (PBS) and grown in DMEM with 10% FCS as high-density primary monolayer cultures until confluent growth. Cells were distributed in six-well plates, grown to confluence, washed with PBS, kept in serum-free DMEM for 24 h, different inhibitors or their vehicles (DMSO, ethanol or water; control) added at the indicated concentrations 30 min before treatment with IL-1 (10 ng/ml) (R&D Systems (Minneapolis, MN) for 24 h. PD98059 (or 2'-amino-3'-methoxyflavone; from Calbiochem) binds to the inactive forms of MEK-1 (MAPK/ERK kinase) and inhibits the activation of MAPK (Dudley et al., 1995) and was dissolved in DMSO at 30 mM and used at the final concentrations of 15 and 30 μ M. U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene; from Promega) that selectively inhibits both the inactive and active forms of MEK-1 and MEK-2 (Favata et al., 1998), was dissolved in DMSO at 10 mM stock and used at the doses of 25 and 50 μ M final. SB203580 or 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl) 1H-imidazole (from Calbiochem) which inhibits p38 kinase at low (1 μ M) and JNK at higher (25 μ M) concentrations (Han et al., 1999), was dissolved in DMSO at 2.5 mM and used at 10 and 20 μ M final concentrations. Curcumin or diferuloylmethane (from Sigma-Aldrich), an inhibitor of JNK, AP-1 and NF- κ B (Chen and Tan, 1998; Singh and Aggarwal, 1995; Jobin et al., 1999), was dissolved at 1 mM in ethanol and used at the concentrations of 5–15 μ M. PDTC, an inhibitor of NF- κ B (Meyer et al., 1993) was dissolved in water as a 100-mM solution and used at the final

concentrations of 100 and 200 μM . The control cells were exposed to vehicles which had no effect on MMP gene expression.

2.2. Northern hybridization analysis

Total RNA from chondrocytes was extracted by the guanidinium procedure (Chomczynski and Sacchi, 1987) and aliquots of 3–5 μg analyzed by electrophoretic fractionation in 1.2% formaldehyde–agarose gels. The integrity and quantity of RNA were verified by ethidium bromide staining of the 28S and 18S ribosomal RNA bands. The RNA was transferred onto a Zeta-probe nylon membrane with a Bio-Rad Transblot in the presence of $0.5\times$ TAE (Tris acetate EDTA) buffer at a current of 500 mA for 12 h. Northern blots were hybridized with a human stromelysin cDNA probe generously provided by Dr Richard Breathnach (Nantes, France). This probe was made from a 1.6 kbp *EcoRI* cDNA fragment cloned in the plasmid pGEM-4Z (Promega Biotech, Madison, WI) after linearization of the vector with *NarI*. A 491 bp RT-PCR-generated and cloned collagenase-3 cDNA was linearized with *EcoRI*. The human 28S ribosomal RNA plasmid (ATCC, Manassas, VA) was digested with *XbaI*. All antisense RNA probes were synthesized with T7 polymerase according to the protocols of Promega Biotech. and labeled to high-specific activity (1×10^8 cpm/ μg) with [α - P^{32}] CTP (3000 Ci/mmol; DuPont Canada Inc., Mississauga, ON). The intensity of the respective MMP and 28S RNA bands from different experiments was measured by densitometry using an Alpha Imager 2000 and software (Alpha Innotech Corporation San Leandro CA), the MMP values divided by those of control 28S RNA to get a mean quantitative estimate of inhibition and depicted by bar graphs made with the Microsoft EXCEL software.

2.3. Western immunoblot analysis

Total secreted proteins from the 2–3 ml conditioned medium of the human chondrocytes were concentrated 40–50-fold by Microcon YM-10 Centrifugal filter devices (Millipore Corporation, Bedford, MA), quantified by Bio-Rad protein assay system and 10–20 μg aliquots adjusted to 15 μl with $4\times$ sample buffer comprising of 40 mM DTT, 37.6% sucrose, 0.032% Bromophenol Blue and 8.25% SDS. Along with the prestained broad-range molecular weight standards (BioRad), samples were fractionated by a 4% stacking and 10% SDS-PAGE mini gel (Bio-Rad system, Mississauga, ON) and transferred to nitrocellulose membrane by electroblotting in a buffer comprising of 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.04% SDS, 20% ethanol at 200 mA. The membranes were rinsed with distilled water, incubated for 1 h in PBS (pH 7.4) with 5%

Carnation non-fat milk to block non-specific interactions and washed five times (twice for 5 min, once for 15 min and twice for 5 min) with PBS-0.1% Tween. They were then reacted overnight sequentially in the same buffer at 4 $^{\circ}\text{C}$ with 1–2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the mouse anti-human MMP-3 (Ab-1, Clone 55-2A4; Calbiochem, San Diego, CA) and MMP-13 antibodies (Clone 181-15A12; from Fuji Chemical Industries, Toyama, Japan). Similar procedure was utilized for immunoblot analysis of ERK, p38 and JNK MAPKs (antibodies from New England Biolabs). Subsequently, membranes were washed 5 times with PBS-0.1% Tween at room temperature, incubated with the anti-mouse or anti-rabbit secondary peroxidase-conjugated IgG (300 munits/ml), washed seven times with PBS-0.1% Tween. For revelation of the MMP-3 and MMP-13 bands, membranes were incubated with 10 μl of solution A and 990 μl of solution B of the Chemiluminescence detection system of Roche Biochemicals (Laval, Qc) and exposed to film for 2–15 min.

All the experiments reported in this study were performed three (human) to four (bovine) times and the results were reproducible.

3. Results

3.1. IL-1 time-dependently stimulates the activation of mitogen-activated protein kinases

Previous work has shown that both IL-1 and MMPs are increased in arthritic tissues and synovial fluid (see Section 1). In preliminary experiments we ascertained that the primary or first-passage human femoral head chondrocytes from different OA patients responded to 24 h stimulation with IL-1 (10 ng/ml) by potently inducing MMP-3 and MMP-13 RNA and protein expression.

To investigate the mechanisms of IL-1 signal transduction leading to increased MMP gene expression, primary human femoral head chondrocytes were exposed to IL-1 for 0–60 min and the cell extracts analyzed for the activation of MAP kinases by Western blotting with phosphorylation-state-specific and total antibodies. As depicted in Fig. 1, IL-1 time-dependently stimulated the phosphorylation of ERK, p38 and JNK (or SAPK; stress-activated protein kinase) MAPKs in these cells within 5 min. The ERK phosphorylation was sustained up to 60 min but p38 and JNK activation levels started declining by 20 min reaching basal levels at 60 min. The levels of the respective total MAPKs remained constant. Thus, activation of the three MAPK pathways is an earlier event in the IL-1 signal transduction.

3.2. Inhibitors of ERK-MAPK pathway decrease induction of MMP expression by IL-1

To examine if the MAPKs are involved in the IL-1-stimulated MMP expression, human or bovine chondro-

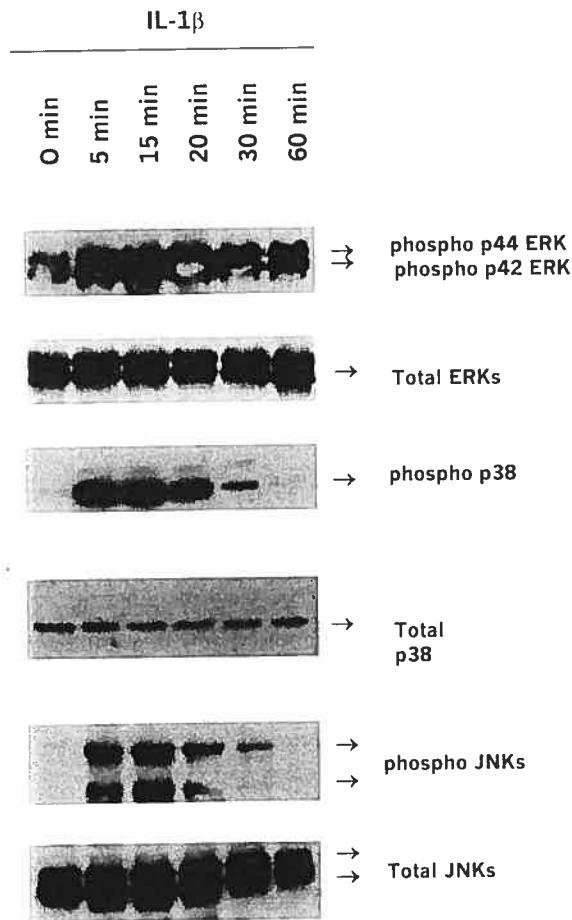


Fig. 1. Time course of ERK, p38 and JNK MAP kinases phosphorylation in human chondrocytes in response to IL-1. Confluent cultures of chondrocytes were maintained in serum-free medium for 24 h and exposed to IL-1 (10 ng/ml) for indicated time periods. The total protein extracts were subjected to PAGE and sequential Western immunoblot analysis with phosphorylation-state-specific antibodies against phospho-ERK, p38 and JNK followed by incubation with anti-rabbit secondary antibody and revelation by chemiluminescence. Following stripping, the same membranes were reacted with the respective total antibodies. The positions of 42 and 44 kilodalton (kDa), phospho-ERK1/2, 38-kDa protein kinase and 54 and 46 kDa JNK1/2 proteins are shown by arrows.

cytes were pretreated with a specific inhibitor of ERK pathway, PD98059 (Dudley et al., 1995) alone or 30 min before additional IL-1 treatment for 24 h. Analysis of the RNA by Northern blotting and conditioned medium from these cells by Western blotting with MMP antibodies revealed that IL-1 increased MMP-3 and MMP-13 RNA and protein expression that was partially reduced in PD98059-treated cells. The inhibition for MMP-3 and MMP-13 RNA by 15–30 μ M doses was 46–53% and 59–66%, respectively (Fig. 2a). This agent similarly inhibited MMP-3 (47–52%) and MMP-13 (69–73%) RNA induction in bovine chondrocytes (Fig. 2b). Similar experiments with a more recent and potent ERK pathway inhibitor, U0126 (Favata et al., 1998), revealed analogous dose-dependent inhibition of MMP-

3 (37–77%) and MMP-13 (43–73%) RNA (and protein) induction in human chondrocytes (Fig. 3a). A dose-dependent down-regulation of MMP-3 (77–100%) and MMP-13 (96–100%) RNA expression by U0126 was also observed in bovine chondrocytes (Fig. 3b). These results suggest that ERK pathway is implicated in the IL-1-induced MMP gene expression.

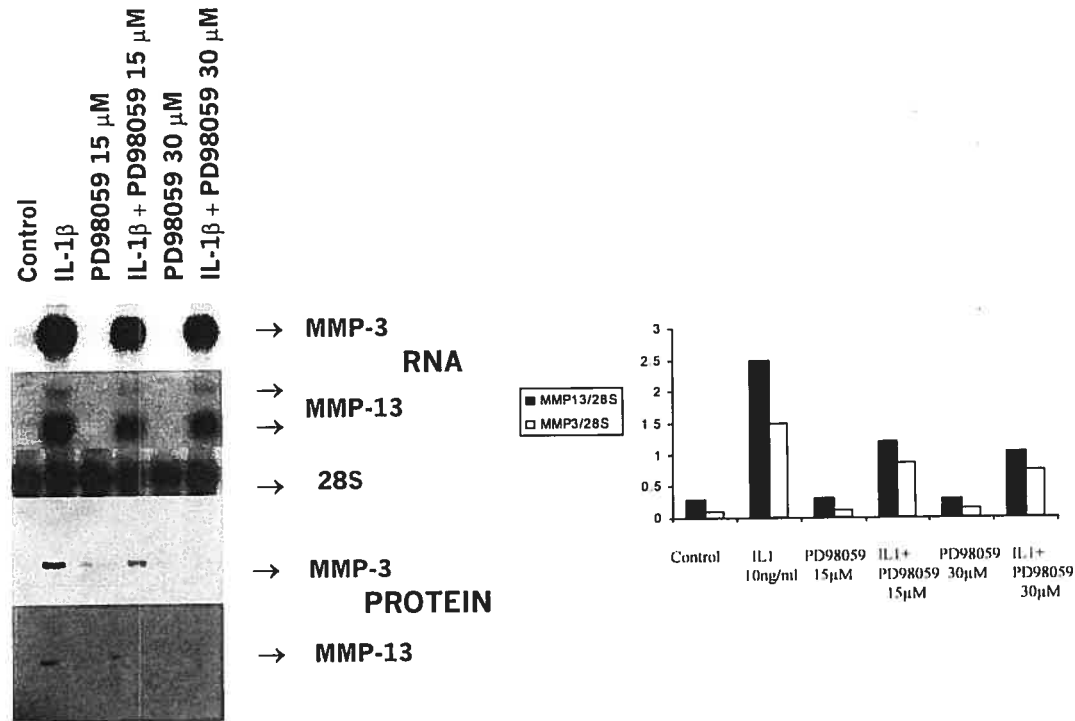
3.3. Protein 38 and JNK inhibitor suppresses IL-1 induction of MMP gene expression

To explore the implication of p38 and JNK pathways in the induction of MMP-3 and MMP-13, human or bovine chondrocytes were treated for 24 h with an inhibitor, SB203580, which at 10–20 μ M concentrations can inhibit both p38 and JNK pathways (Han et al., 1999). Northern blot analysis demonstrated that this inhibitor repressed MMP-3 (11–35%) and MMP-13 (12–37%) increase by IL-1 in human chondrocytes (Fig. 4a). A similar inhibition of the respective proteins levels was observed in Western blot of proteins from the conditioned medium. In bovine chondrocytes, repression of MMP-3 and MMP-13 was 36–46% and 60–88%, respectively (Fig. 4b). These results suggest the involvement of p38 and JNK cascade activation in the IL-1 induction of MMP-13.

3.4. Curcumin inhibits IL-1-induced MMP-3 and MMP-13 gene expression

Since MMP-3 and MMP-13 promoters contain AP-1 transcription factor binding sites (Buttice et al., 1991; Pendas et al., 1997) and activation of MAPK pathways results in downstream activation of c-fos (ERK) and c-jun (JNK), we investigated the role of JNK/SAPK pathway and AP-1 transcription factors in the regulation of MMP-3 and MMP-13 genes expression with the help of an inhibitor of this cascade (Chen and Tan, 1998; Huang et al., 1991) and an antiinflammatory agent, curcumin, originating from the roots of *Curcuma longa*. Pretreatment of chondrocytes with 5–15 μ M of curcumin followed by IL-1 stimulation resulted in significant suppression of MMP-3 (48–99%) and MMP-13 (45–97%) RNA (and MMP-3 protein) at the dose of 15 μ M in human chondrocytes (Fig. 5a). In bovine chondrocytes, curcumin partially (5 μ M) or completely (15 μ M) blocked MMP-3 (8–100%) and MMP-13 (32–100%) RNA enhancement (Fig. 5b). Thus JNK pathway and its downstream target, AP-1, are implicated in the induction of MMP-3 and MMP-13 by IL-1. As elucidated in the Section 4, this inhibition may also be due to the previously demonstrated ability of curcumin to

(a) HUMAN CHONDROCYTES



(b) BOVINE CHONDROCYTES

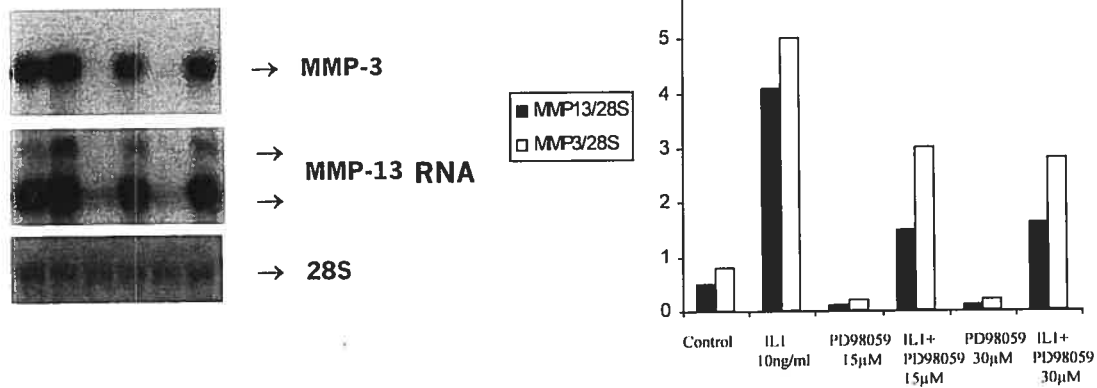


Fig. 2. Down-regulation of IL-1-induced MMP-3 and MMP-13 RNA and protein expression by ERK-MAP kinase inhibitor, PD98059. First-passage human (a) or bovine (b) chondrocytes were made quiescent by maintaining them in serum-free medium and pretreated with IL-1 or inhibitor vehicles (DMSO, PBS-0.1% BSA, control), the indicated doses of the MAPKK inhibitor, PD98059 for 30 min followed by additional incubation with recombinant human IL-1 (10 ng/ml) for 24 h. The RNA blots were sequentially hybridized with the MMP-3, MMP-13 and 28S RNA probes. The resulting autoradiograms with positions of different transcripts (arrows) are shown. The media from human chondrocytes were analyzed by Western blot analysis for MMP-3 and MMP-13 levels. Mean densitometric values of MMP-3 and MMP-13 RNA from 3 (human) or 5 bovine) different experiments are depicted as bar graphs.

block NF-κB pathway (Singh and Aggarwal, 1995; Jobin et al., 1999).

3.5. Pyrrolidine dithiocarbamate suppresses IL-1-enhanced MMP-3 and MMP-13 gene expression.

To further investigate the role of NF-κB transcription factors, first-passage human or bovine chondrocytes were pre-exposed to a more specific inhibitor of this

factor, PDTC (Meyer et al., 1993), prior to induction with IL-1. PDTC dose-dependently inhibited the induction of MMP-3 (83–84%) and MMP-13 (38–55%) RNA by IL-1 without affecting the levels of 28S ribosomal RNA in human chondrocytes (Fig. 6a). In bovine chondrocytes, inhibition for MMP-3 and MMP-13 RNA was 54–64% and 74–93%, respectively (Fig. 6b). Thus NF-κB transcription factor appears to be important in mediating the induction of MMPs by IL-1.

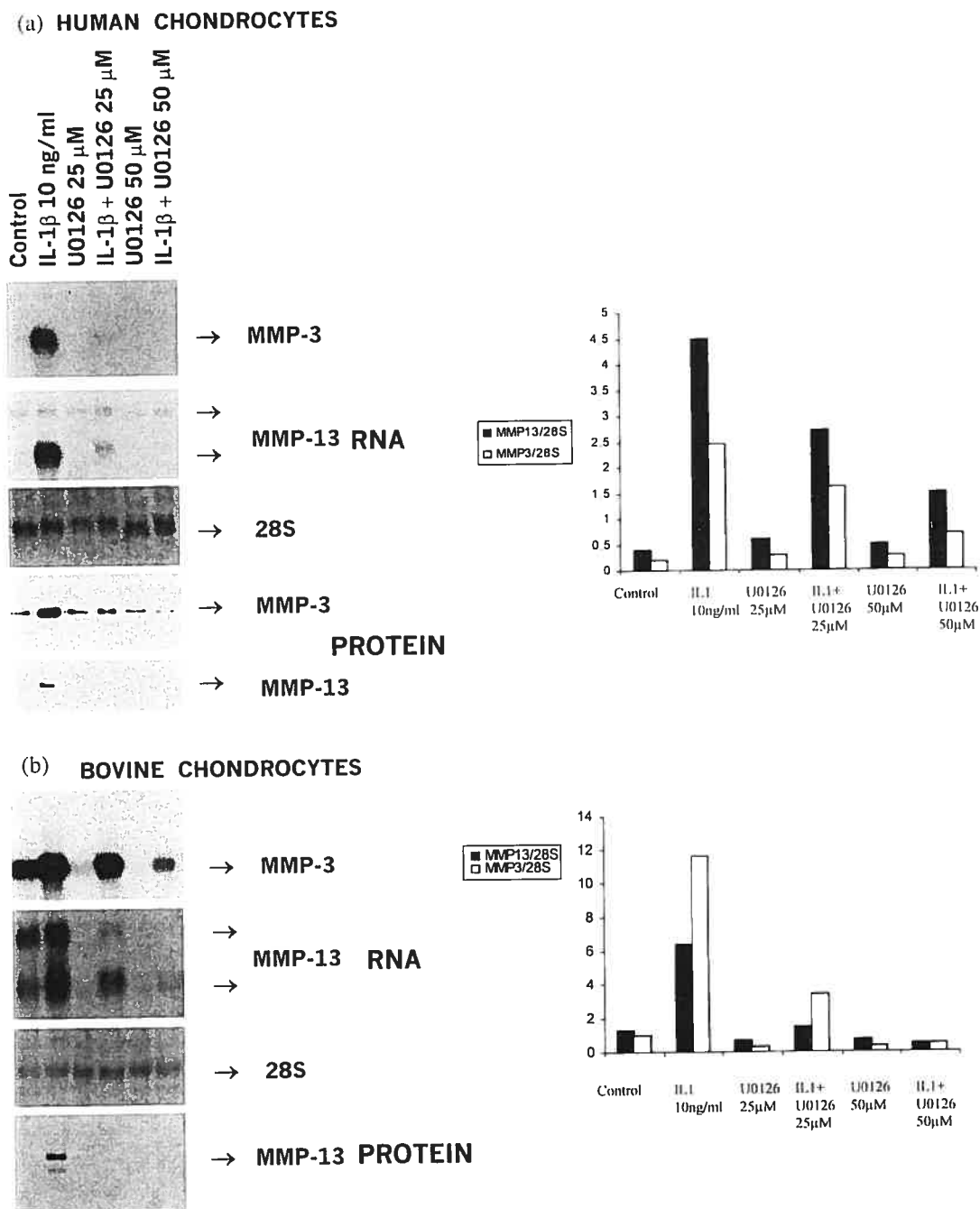


Fig. 3. Suppression of IL-1-induced MMP-3 and MMP-13 RNA/protein expression by MAPKK inhibitor, U0126. First-passage human (a) or bovine (b) chondrocytes were pretreated with the indicated dose of U0126 for 30 min followed by treatment with IL-1 for 24 h. The concentrated media were analyzed by Western blot for the levels of MMP-3 and MMP-13 proteins. The RNA blots were sequentially hybridized with the MMP-3, MMP-13 and 28S RNA probes. The resulting autoradiograms are shown. Mean densitometric values of MMP-3 and MMP-13 RNA from 4 (human) or 3 (bovine) different experiments are also depicted as bar graphs.

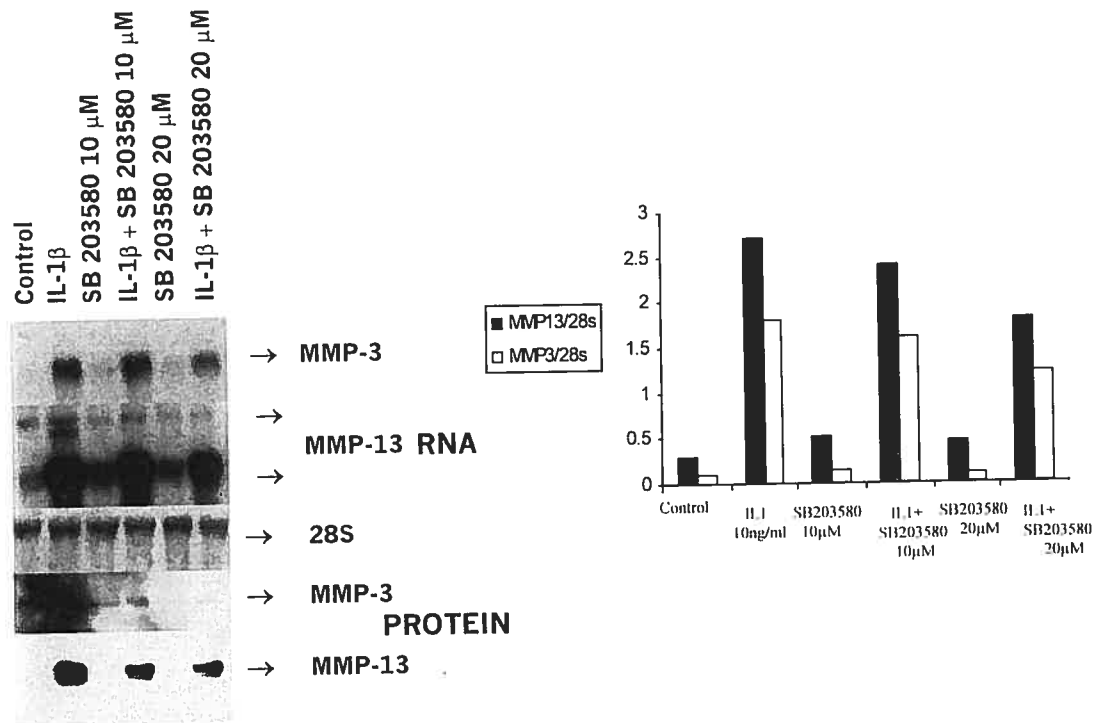
4. Discussion

IL-1 is the most important proinflammatory cytokine involved in triggering the catabolism of cartilage in arthritis by MMPs. We have shown here that IL-1 induces MMP-3, MMP-13 and MAPKs in chondrocytes. Inhibition of MMP gene expression by PD98059, U0126, SB203580, curcumin and PDTC suggests that

ERK-, p38- and JNK-MAPK pathways as well as AP-1 and NF- κ B transcription factors are mediators of MMP induction by IL-1.

Induction of MMP-3 and MMP-13 gene expression in human femoral head chondrocytes demonstrates that these cells are responsive to IL-1, and MMP genes are its targets. MMP-3 and MMP-13 may promote degeneration of arthritic hip joints, a common condition in

(a) HUMAN CHONDROCYTES



(b) BOVINE CHONDROCYTES

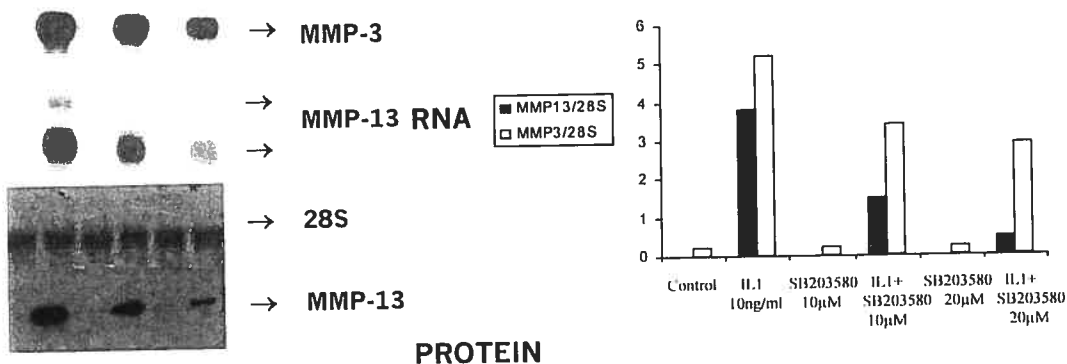


Fig. 4. Inhibition of IL-1-increased MMP-3 and MMP-13 protein expression by p38 and JNK inhibitor, SB203580. Human (a) or bovine (b) chondrocytes kept in serum-free medium were exposed to DMSO (SB203580 vehicle, Control) or pretreated with SB203580 for 30 min and followed by stimulation with IL-1 for 24 h. The MMP-3 and MMP-13 RNA and protein levels (in medium) were measured by Northern or Western blot analysis. The resulting autoradiograms indicating the respective products are shown. MMP-3 and MMP-13 RNA values from two (human and bovine) experiments are plotted as bar graphs.

obese and elderly patients that ultimately requires hip replacement surgery. This induction is in agreement with other studies in rabbit and human knee chondrocytes where IL-1 was shown to induce MMP RNAs (Hutchinson et al., 1992; Nguyen et al., 1992; Chubinskaya et al., 1999; Mitchell et al., 1996; Reboul et al., 1996; Borden et al., 1996). Thus femoral head chondrocytes constitute an appropriate model system for studying the IL-1 signal transduction pathways.

Significant basal levels of phosphorylated ERK-MAPKs in human femoral chondrocytes suggest that

they may also be involved in normal growth and survival of chondrocytes (Li et al., 2000). Rapid activation of ERK, p38 and JNK MAPKs in these cells within 5 min suggests that these are very early events during the induction of MMPs. This is in agreement with studies in chondrocytes from other joints where IL-1 induced the activation of MAPKs in human and rabbit knee chondrocytes and chondrosarcoma cells (Geng et al., 1996; Scherle et al., 1997; Mengshol et al., 2000). Interestingly, these kinases have been found in active form in rheumatoid synovial tissues and are phospho-

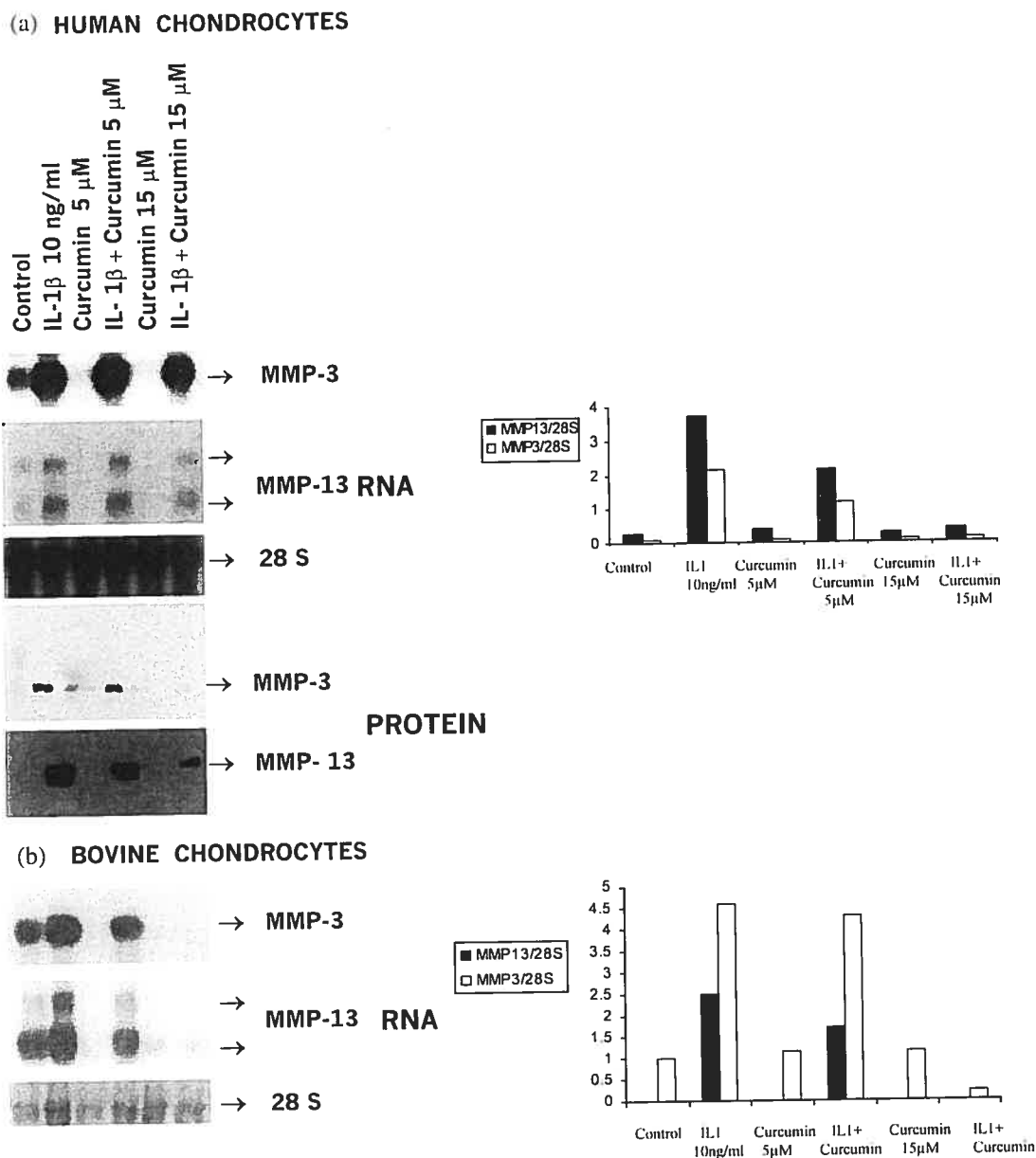


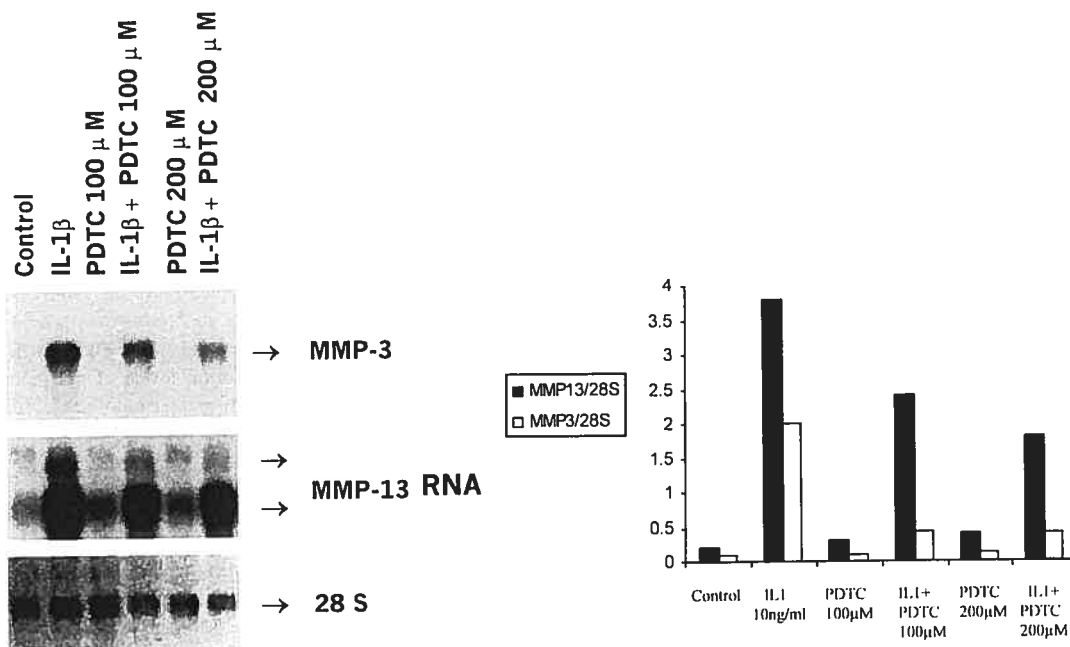
Fig. 5. Reduction in IL-1-stimulated MMP-3 and MMP-13 expression by curcumin. Human OA (a) or bovine (b) chondrocytes were exposed to different concentrations of curcumin for 30 min and then treated with IL-1 for an additional 24 h. MMP-3, MMP-13 and 28S RNA (in cells) and protein levels (in conditioned medium) measured by Northern hybridization or Western blotting are shown. Mean densitometric values of MMP-3 and MMP-13 RNA from four (human) or three (bovine) different experiments are depicted as bar graphs.

rylated in response to IL-1 in RA synovial fibroblasts (Schett et al., 2000). Thus, all three MAPK pathways could mediate the IL-1-stimulated catabolism of joint tissues.

Suppression of the MMP-3 and MMP-13 gene expression by the two separate and specific inhibitors of ERK-MAPK pathway suggest that this cascade is partly involved in the IL-1 induction of MMPs in human femoral head chondrocytes. Furthermore, inhibition of MMP-3 and MMP-13 expression by the p38/JNK inhib-

itor also suggests the implication of these pathways. In an earlier study, regulation of rat collagenase gene by IL-1 was shown to require Ras-ERK pathway (Grumbles et al., 1997). Inhibition of MMP-1 and MMP-3 induction by IL-1 with SB203580 and implication of p38 MAPK was also observed in human dermal fibroblasts and bovine cartilage (Ridley et al., 1997). Similarly, the p38 inhibitor also suppressed MMP-13 expression in rabbit chondrocytes and SW1353 cells (Mengshol et al., 2000). However, contrary to our results, the latter study did not

A. HUMAN CHONDROCYTES



B. BOVINE CHONDROCYTES

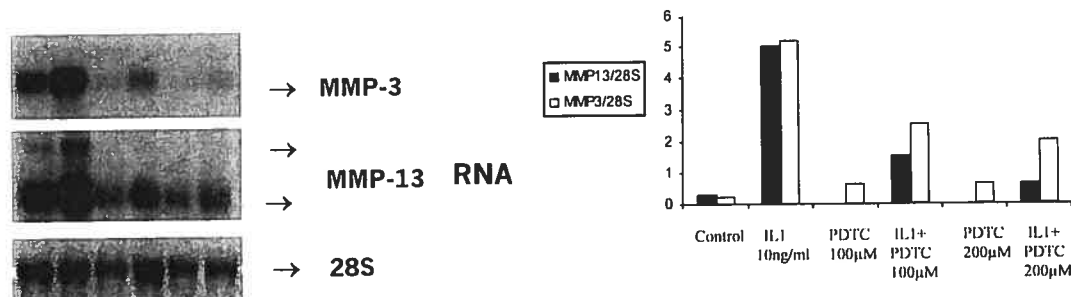


Fig. 6. Repression of IL-1-inducible MMP-3 and MMP-13 RNA expression by the NF- κ B inhibitor, PDTC. Quiescent human osteoarthritic (a) or bovine (b) first-passage chondrocytes were pretreated with the indicated concentrations of PDTC for 30 min followed by additional treatment with IL-1 for 24 h. The MMP-3, MMP-13 and 28S RNA levels were measured by Northern hybridization. The resulting autoradiograms indicating the respective gene products are shown. MMP-3 and MMP-13 RNA values from four (human and bovine) experiments are plotted as bar graphs.

observe down-regulation of MMP-13 by PD98059 possibly due to differences in cell-type or species. At higher concentrations (10 to 25 μ M), SB203580 also inhibits JNK pathway (Han et al., 1999). Decrease in the IL-1-stimulated MMP-1 levels by the JNK2 inhibitory concentrations of SB203580 was also observed in rheumatoid fibroblasts (Han et al., 1999). This agent inhibited symptoms of collagen-induced arthritis in mouse (Badger et al., 1996).

Inhibition of MMP-3 and MMP-13 expression by curcumin suggests the implication of JNK, AP-1 and NF- κ B pathways in MMP gene expression as this anti-inflammatory agent from the rhizome of *Curcuma longa*

can suppress JNK phosphorylation and activities of transcription factors AP-1 and NF- κ B (Chen and Tan, 1998; Huang et al., 1991; Singh and Aggarwal, 1995; Jobin et al., 1999). Such multiple activities of curcumin make it an interesting prototype for new anti-arthritis drugs. The implication of AP-1 and NF- κ B transcription factors in the regulation of MMP-1 and MMP-13 genes in chondrosarcoma cells was also demonstrated (Mengshol et al., 2000). NF- κ B involvement is further supported by down-regulation of MMP RNA expression by another inhibitor of this transcription factor, PDTC (Meyer et al., 1993). While the role of AP-1 in the regulation of MMP-3 and MMP-13 genes is well known,

(Buttice et al., 1991; Pendas et al., 1997; Tardif et al., 1997), implication of NF- κ B (whose sites are not found in their promoters) in the MMP induction is supported by the recent evidence. Indeed, blocking NF- κ B activity by overexpression of its inhibitor, I κ B α , reduced inflammation and tissue destruction by MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid synovial tissue and dermal fibroblasts (Bondeson et al., 1999; Bond et al., 1999). One possibility is that MMP genes may be regulated by the cross-talk of AP-1 and NF- κ B in nucleus, and interference with any component of this interaction (Ahmad et al., 1998) could inhibit or impair the expression of their target genes such as MMPs.

To conclude, we have demonstrated that up-regulation of MMP-3 and MMP-13 by IL-1 involves multiple mechanisms such as activation of ERK, p38 and JNK MAPK pathways as well as AP-1 and NF- κ B transcription factors. Inhibition of these specific targets results in down-regulation of MMP gene expression. This knowledge may be useful for developing novel therapies for blocking IL-1-stimulated cartilage breakdown in arthritis where IL-1 and several MMPs are expressed simultaneously in the upper fibrillated zone (Tetlow et al., 2001). In view of the partial suppression by individual inhibitors, any therapeutic application in arthritis may require usage of multiple inhibitors to effectively block different pathways and their target MMPs.

Acknowledgments

This work was supported by The Arthritis Society and in part by the Canadian Arthritis Network (CAN) and Canadian Institutes of Health Research. We thank Drs Faramaze Dehnade, Julio Fernandes and Nicolas Duval for human cartilage and Ms Anna Chelchowska for preparing the figures.

References

- Ahmad, M., Theofanidis, P., Medford, R.M., 1998. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 273, 4616–4621.
- Arend, W.P., Dayer, J.M., 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 151–160.
- Badger, A.M., Bradbeer, J.N., Votta, B., Lee, J.C., Adams, J.L., Griswold, D.E., 1996. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 1453–1461.
- Billinghurst, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., et al., 1997. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J. Clin. Invest.* 99, 1534–1545.
- Bond, M., Baker, A.H., Newby, A.C., 1999. Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 561–567.
- Bondeson, J., Foxwell, B., Brennan, F., Feldmann, M., 1999. Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5668–5673.
- Borden, P., Solymar, D., Sucharczuk, A., Lindman, B., Cannon, P., Heller, R.A., 1996. Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 23577–23581.
- Buttice, G., Quinones, S., Kurkinen, M., 1991. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 3723–3731.
- Chen, Y.R., Tan, T.H., 1998. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 17, 173–178.
- Cheung, N.T., Dawes, P.T., Poulton, K.V., Ollier, W.E., Taylor, D.J., Mathey, D.L., 2000. High serum levels of pro-matrix metalloproteinase-3 are associated with greater radiographic damage and the presence of the shared epitope in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 27, 882–887.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Chubinskaya, S., Kuettner, K.E., Cole, A.A., 1999. Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab. Invest.* 79, 1669–1677.
- Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., Saltiel, A.R., 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7686–7689.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., et al., 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 18623–18632.
- Fosang, A.J., Last, K., Maciewicz, R.A., 1996. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J. Clin. Invest.* 98, 2292–2299.
- Geng, Y., Valbracht, J., Lotz, M., 1996. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH₂ terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J. Clin. Invest.* 98, 2425–2430.
- Goldring, M.B., Birkhead, J.R., Suen, L.F., et al., 1994. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J. Clin. Invest.* 94, 2307–2316.
- Grumbles, R.M., Shao, L., Jeffrey, J.J., Howell, D.S., 1997. Regulation of the rat interstitial collagenase promoter by IL-1 beta, c-Jun, and Ras-dependent signaling in growth plate chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 67, 92–102.
- Han, Z., Boyle, D.L., Aupperle, K.R., Bennett, B., Manning, A.M., Firestein, G.S., 1999. Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 124–130.
- Hellio Le Graverand, M.P., Eggerer, J., Sciore, P., Reno, C., Vignon, E., Otterness, I., Hart, D.A., 2000. Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury. *Matrix Biol.* 19, 431–441.
- Huang, T.S., Lee, S.C., Lin, J.K., 1991. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5292–5296.
- Hutchinson, N.I., Lark, M.W., MacNaul, K.L., et al., 1992. In vivo expression of stromelysin in synovium and cartilage of rabbits injected intraarticularly with interleukin-1 beta. *Arthritis Rheum.* 35, 1227–1233.
- Ismail, S., Atkins, R.M., Pearse, M.F., Dieppe, P.A., Elson, C.J., 1992. Susceptibility of normal and arthritic human articular cartilage to degradative stimuli. *Br. J. Rheumatol.* 31, 369–373.

- Jobin, C., Bradham, C.A., Russo, M.P., et al., 1999. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J. Immunol.* 163, 3474–3483.
- Joosten, L.A., Helsen, M.M., Saxne, T., van De Loo, F.A., Heinegard, D., van Den Berg, W.B., 1999. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J. Immunol.* 163, 5049–5055.
- Li, W.Q., Dehnade, F., Zafarullah, M., 2000. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 789–794.
- Lindy, O., Kontinen, Y.T., Sorsa, T., Ding, Y., Santavirta, S., Ceponis, A., Lopez-Otin, C., 1997. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 40, 1391–1399.
- Margerie, D., Flechtenmacher, J., Buttner, F.H., et al., 1997. Complexity of IL-1 beta induced gene expression pattern in human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 5, 129–138.
- Martel-Pelletier, J., McCollum, R., DiBattista, J., et al., 1992. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum.* 35, 530–540.
- Mehraban, F., Kasturi, S., 1998. Gene transfer of type I interleukin-1 receptor extracellular-domain complementary DNA into rabbit synovial cell line HIG-82 results in cellular blockade of interleukin-1 signal transduction. *Arthritis Rheum.* 41, 515–524.
- Mengshol, J.A., Vincenti, M.P., Coon, C.I., Barchowsky, A., Brinckerhoff, C.E., 2000. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 43, 801–811.
- Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P.A., 1993. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12, 2005–2015.
- Mitchell, P.G., Magna, H.A., Reeves, L.M., et al., 1996. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* 97, 761–768.
- Mort, J.S., Dodge, G.R., Roughley, P.J., et al., 1993. Direct evidence for active metalloproteinases mediating matrix degradation in interleukin 1-stimulated human articular cartilage. *Matrix* 13, 95–102.
- Nagase, H., Woessner, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491–21494.
- Neidhart, M., Gay, R.E., Gay, S., 2000. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 43, 1719–1728.
- Nguyen, Q., Mort, J.S., Roughley, P.J., 1992. Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage. *J. Clin. Invest.* 89, 1189–1197.
- Okada, Y., Shinmei, M., Tanaka, O., et al., 1992. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab. Invest.* 66, 680–690.
- Oligino, T., Ghivizzani, S., Wolfe, D., et al., 1999. Intra-articular delivery of a herpes simplex virus IL-1Ra gene vector reduces inflammation in a rabbit model of arthritis. *Gene Ther.* 6, 1713–1720.
- Pap, T., van der Laan, W.H., Aupperle, K.R., et al., 2000. Modulation of fibroblast-mediated cartilage degradation by articular chondrocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 2531–2536.
- Pendas, A.M., Balbin, M., Llano, E., Jimenez, M.G., Lopez-Otin, C., 1997. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics* 40, 222–233.
- Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M., Martel-Pelletier, J., 1996. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* 97, 2011–2019.
- Ribbens, C., Andre, B., Jaspas, J.M., et al., 2000. Matrix metalloproteinase-3 serum levels are correlated with disease activity and predict clinical response in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 27, 888–893.
- Ridley, S.H., Sarsfield, S.J., Lee, J.C., et al., 1997. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J. Immunol.* 158, 3165–3173.
- Saha, N., Moldovan, F., Tardif, G., Pelletier, J.P., Cloutier, J.M., Martel-Pelletier, J., 1999. Interleukin-1-beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis Rheum.* 42, 1577–1587.
- Scherle, P.A., Pratta, M.A., Feeser, W.S., Tancula, E.J., Arner, E.C., 1997. The effects of IL-1 on mitogen-activated protein kinases in rabbit articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 573–577.
- Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Smolen, J.S., et al., 2000. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, 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.* 43, 2501–2512.
- Shlopov, B.V., Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S., Hasty, K.A., 1997. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 40, 2065–2074.
- Singh, S., Aggarwal, B.B., 1995. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* 270, 24995–25000.
- Tardif, G., Pelletier, J.P., Dupuis, M., Hambor, J.E., Martel-Pelletier, J., 1997. Cloning, sequencing and characterization of the 5'-flanking region of the human collagenase-3 gene. *Biochem. J.* 323, 13–16.
- Tetlow, L.C., Adlam, D.J., Woolley, D.E., 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44, 585–594.
- van Den Berg, W.B., 2000. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59, I81–I84.
- Walakovits, L.A., Moore, V.L., Bhardwaj, N., Gallick, G.S., Lark, M.W., 1992. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum.* 35, 35–42.
- Westacott, C.I., Sharif, M., 1996. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin. Arthritis Rheum.* 25, 254–272.
- Westhoff, C.S., Freudiger, D., Petrow, P., et al., 1999. Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42, 1517–1527.

Yamanaka, H., Matsuda, Y., Tanaka, M., et al., 2000. Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 852–858.

Yoshihara, Y., Nakamura, H., Obata, K., et al., 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial

fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 455–461.

Zafarullah, M., Pelletier, J.P., Cloutier, J.M., Martel-Pelletier, J., 1993. Elevated metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA in human osteoarthritic synovia. *J. Rheumatol.* 20, 693–697.

2. Article 2

Abdelhamid Liacini, Judith Sylvester, Wen Qing Li, Wensheng Huang, Faramaze Dehnade, Mushtaq Ahmad and Muhammad Zafarullah. 2003. **Induction of matrix MMP-13 gene expression by TNF- α is mediated by MAP Kinase, AP1 and NF κ B transcription factors in articular chondrocytes.** *Experimental Cell Research* 288: 208-217.

CONTRIBUTION :

J'ai préparé les chondrocytes humains à partir du cartilage, la culture cellulaire pour la ligné SW1355. J'ai effectué la moitié du travail pour les mesures de l'ARN de la MMP-13 et le 28S par Northern blot durant la première version de l'article. J'ai effectué tous les Northern blot et les western blots pour la révélation de la MMP-13 durant la révision de ce travail.

Judith Sylvester a préparé les chondrocytes humains à partir du cartilage, la culture cellulaire et la moitié des mesures de la MMP-13 et 28S par Northern blot durant la première version de l'article.

Wen Qing Li a cloné le cDNA pour la MMP-13 dans le vecteur pGEM-4Z.

Wensheng Huang a visualisé l'ARN de la MMP-13 par RT-PCR dans le cartilage des patients.

Faramaze Dehnade a approvisionné notre laboratoire avec des tissus humains (têtes fémorales) provenant des patients opérés dans le service d'Orthopédie du CHUM.

Mushtaq Ahmad a contribué à la discussion des résultats pour les interactions des facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. IL nous a suggéré l'utilisation des inhibiteurs (NDGA et curcumin)

Muhammad Zafarullah a élaboré et planifié cette recherche. Le travail a été réalisé sous sa direction à partir de la conception, l'acquisition des résultats, l'analyse et l'interprétation des résultats jusqu'à la préparation du manuscrit et la soumission pour publication.



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Experimental Cell Research 288 (2003) 208–217

74

Experimental
Cell Research

www.elsevier.com/locate/yexcr

Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF- α is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF- κ B transcription factors in articular chondrocytes

Abdelhamid Liacini,^a Judith Sylvester,^a Wen Qing Li,^a Wensheng Huang,^a
Faramaze Dehnade,^b Mushtaq Ahmad,^c and Muhammad Zafarullah^{a,*}

^a Department of Medicine and Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Canada

^b Chirurgie Orthopédique, Hôpital Notre-Dame du CHUM, 1560 Sherbrooke est Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

^c Division of Cardiology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, USA

Received 14 October 2002, revised version received 7 March 2003

Abstract

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), a major proinflammatory cytokine, induces arthritic joint inflammation and resorption of cartilage by matrix metalloproteinase-13 (MMP-13). RNA for MMP-13 is increased in human arthritic femoral cartilage. Mechanisms of this induction were investigated by pretreating primary human osteoarthritic (OA) femoral head chondrocytes or chondrosarcoma cells with the potential inhibitors of TNF- α signal transduction and downstream target transcription factors followed by stimulation with TNF- α and analysis of MMP-13 RNA/protein. TNF- α rapidly activated phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs), p38, and c-jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein (MAP) kinases in human chondrocytes. Inhibitors of ERK (U0126, PD98059, and ERK1/2 antisense phosphorothioate oligonucleotide), JNK (SB203580, SP600125, and curcumin), and p38 (SB203580 and SB202190) pathways down-regulated the TNF-stimulated expression of MMP-13. Inhibitors of the transcription factors AP-1 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) and NF- κ B (curcumin, proteasome inhibitors, and Bay-11-7085) suppressed TNF- α -induced MMP-13 expression in primary chondrocytes and SW1353 cells. These results suggest that induction of the MMP-13 gene by TNF- α is mediated by ERK, p38, and JNK MAP kinases as well as AP-1 and NF- κ B transcription factors. Blockade of TNF- α signaling and its target transcription factors by the approaches tested here may be beneficial for reducing cartilage breakdown by MMP-13 in arthritis.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Arthritis; Cartilage; Chondrocyte; Tumor necrosis factor- α ; Matrix metalloproteinases; Signal transduction; Mitogen-activated protein kinases; Activating protein-1; Nuclear factor κ B, inhibitors

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and systemic autoimmune disease triggered by acute events (such as exposure to pathogens and certain autoantigens) in which a severe inflammation of multiple joints, synovial hyperplasia, and deformation are common occurrences. Osteoarthritis (OA) is a group of joint degenerative diseases initiated by joint injuries, obesity,

gene mutations, and aging [1]. Together, the two diseases constitute most cases of arthritis. A common feature of RA and OA is breakdown of articular cartilage. OA patients also display failure of attempted cartilage repair processes. Arthritic joints display an altered metabolism and an imbalance between anabolic growth factors and proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF- α), and interleukin-1 (IL-1) produced by inflammatory cells, synovial fibroblasts, and chondrocytes [2]. Cartilage extracellular matrix (ECM) is maintained by chondrocytes, which synthesize aggrecan and collagen, providing mechanical strength and flexibility to joints. Chondrocytes are targets of TNF- α and IL-1, which inhibit their anabolic activities (ECM synthesis) and trigger catabolic pathways [2].

* Corresponding author. K-5255 Mailloux, CHUM, Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Fax: +1-514-412-7612.

These cytokines induce matrix metalloproteinase (MMP) expression which after removal of the prodomain and activation, cleave different components of the cartilage ECM.

MMPs include matrilysin, stromelysins, gelatinases, interstitial and neutrophil collagenases, collagenase-3 (MMP-13), and membrane-type MMPs [3]. Stromelysin-1 (MMP-3) cleaves proteoglycans, collagens, gelatins, and link protein of aggrecan. An imbalance between active MMPs and their natural inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), in OA cartilage contributes to its breakdown. Besides MMPs, recently characterized aggrecanases also damage cartilage, which cleave aggrecan at distinct sites [4]. MMP-13, a major enzyme produced by chondrocytes and RA synovial fibroblasts [5], preferentially enhances the cleavage and denaturation of type II collagen [6,7] and aggrecan in OA. Its expression is increased in arthritic synovium, and IL-1 and TNF- α induce it via mediation of c-fos in chondrocytes [8]. Like other MMPs, the secreted inactive pro-MMP-13 is activated extracellularly by gelatinase A and MT1-MMP [3].

TNF- α is a major proinflammatory cytokine whose levels are increased in the synovial fluid of patients with arthritis [9]. Many of the novel arthritis therapies are based on the inhibition of such proinflammatory signals. Inhibition of TNF- α actions by antibodies to TNF- α is beneficial for reducing the symptoms of arthritis. Introduction of IL-1 and TNF- α receptor genes in rabbit knees had anti-arthritic effects [10]. Osteoarthritis of hip is a major health problem in booming elderly populations in the industrialized world and is likely to involve inflammatory cytokines and MMPs. Chondrocytes which synthesize and maintain cartilage extracellular matrix are a distinct cell type that are the prime targets of proinflammatory cytokines during the pathogenesis of arthritis. The mechanisms through which TNF- α (a distinct cytokine) increases the expression of MMP-13 in chondrocytes have not been fully deciphered. A better understanding of TNF- α signaling and regulatory mechanisms in this cell type may lead to blocking its catabolic actions in cartilage. By using primary human hip OA chondrocytes and chondrosarcoma cells, we show that ERK, JNK, and p38 MAP kinases as well as AP-1 and NF- κ B are important mediators of TNF- α signal transduction in these cells, and their inhibition leads to down-regulation of TNF-induced MMP-13 gene expression.

Materials and methods

Cartilage RNA extraction and reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR)

For direct RNA extraction, fresh human femoral head cartilage was frozen in guanidinium isothiocyanate (solution D) [11] at -80°C , ground sequentially with a homogenizer (Kinetica, Switzerland) and pestle/mortar. The homogenates were extracted once with equal volumes of

water-saturated phenol, precipitated with ethanol and nucleic acids dissolved in 450 μl of solution D. Subsequent purifications were with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON) according to the manufacturer's protocols, which eliminate the interfering cartilage proteoglycans [12], whose analogues are also found in plants. RNA was quantified and its integrity verified by agarose-formaldehyde gel electrophoresis.

For RT–PCR, 2 μg of RNA was heated for 5 min at 65°C and reverse transcribed in a mixture consisting of 12- to 18-mer oligo(dT), dNTPs, RNase inhibitor (Pharmacia), and acetylated BSA (Promega) with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT) (GIBCO/BRL) according to the protocols of Clontech Laboratories Inc. (Paolo Alto, CA). Aliquots of 5 μl from the 30- μl RT reaction were subjected to PCR with MMP-13- [13] or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-specific primers (Maxime Biotech. Inc., South San Francisco, CA). The sequences of MMP-13 forward and reverse primers were 5'GAC TTC ACG ATG GCA TTG CTG 3' and 5'GCA TCA ACC TGC TGA GGA TGC 3', respectively. The amplification profile was 1 cycle at 94°C for 1 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, hybridization at 60°C for 2 min, and extension at 72°C for 3 min, followed by 1 extension cycle of 7 min at 72°C . The PCR was performed in the Gene E cyclor (Techne, Princeton, NJ) in a 50- μl reaction with 1.25 mM dNTPs, *Taq* DNA polymerase (Pharmacia), and the respective primers and overlaid with mineral oil. Aliquots of 10 μl from the 50- μl PCR reaction were analyzed on 1.4 % agarose gels to detect MMP-13 and GAPDH cDNA amplification products of 491 and 226 bp, respectively. Negative controls included either all the RT–PCR reagents except cDNA or additionally, RT was omitted before PCR. None of these controls gave any bands. The MMP-13 cDNA was cloned in pGEM-4Z and its identity confirmed by DNA sequence analysis.

Primary cultures of human chondrocytes, SW1353 cells, and treatments

Cartilage was obtained from the femoral heads of OA patients who underwent hip replacement surgery at the Notre Dame Hospital. Chondrocytes were released by 90 min of pronase and collagenase (Sigma type IA) digestion for 9 h in DMEM. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and grown in DMEM with 10% FCS as high-density primary monolayer cultures to confluent growth. Primary and first-passage chondrocytes maintained their differentiated phenotype by expressing type II collagen [14]. Cells were distributed in 6-well plates, grown to confluence, washed with PBS, and kept in serum-free DMEM for 24 h, and different inhibitors were added at the indicated concentrations 30 min before treatment with TNF- α (20 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 24 h. A human chondrosarcoma cell line, SW1353, was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and

treated as described for primary chondrocytes. U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene), PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone), SB202190, or 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole, SB203580, or 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole, and SP600125 (anthra [1,9-cd] pyrazol-6(2H)-one) or 1,9-pyrazoloanthrone as well as proteasome inhibitors and (E)3-[(4-t-butylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile (BAY-11-7085) were from Calbiochem (La Jolla, CA) and were dissolved in DMSO. ERK antisense and scrambled oligonucleotides were also from Calbiochem. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and curcumin (diferuloylmethane) from Sigma-Aldrich (St. Louis MO) were dissolved in ethanol and used at the indicated concentrations along with vehicles (DMSO, ethanol, or water) as controls.

Northern hybridization analysis

Total RNA was extracted by the guanidinium procedure [11] and aliquots of 3–5 μg were analyzed by electrophoretic fractionation in 1.2% formaldehyde-agarose gels. The integrity and quantity of RNA were verified by ethidium bromide staining of the 28S and 18S ribosomal RNA bands. The RNA was transferred onto Zeta-probe nylon membrane with a Bio-Rad Transblot in the presence of 0.5 \times TAE (tris acetate EDTA) buffer at a current of 500 mA for 12 h. Northern blots were hybridized with a human collagenase-3, 491 bp, RT-PCR-generated, and cloned cDNA (see above) in the plasmid pGEM-4Z (Promega Biotech, Madison, WI). This vector was linearized with *EcoRI*. The human 28S ribosomal RNA plasmid (ATCC) was digested with *XbaI*. Both antisense RNA probes were synthesized with T7 polymerase according to the protocols of Promega Biotech and labeled to high specific activity (1×10^8 cpm/ μg) with [α - ^{32}P]CTP (3000 Ci/mmol; Dupont Canada Inc., Mississauga, ON).

Western immunoblot analysis

Total secreted proteins from 2 to 3 ml of conditioned medium of the human chondrocytes or SW1353 cells were concentrated by precipitation with trichloroacetic acid (TCA) and quantified by the Bio-Rad protein assay system, and 10- to 20- μg aliquots adjusted to 30 μl with 4 \times SDS reducing sample buffer comprising of 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, and 0.5% bromophenol blue). Along with the prestained broad-range molecular weight standards (Bio-Rad), samples were fractionated by a 4% stacking and 10% SDS-PAGE mini gel (Bio-Rad System, Mississauga, ON) and transferred to nitrocellulose membrane by electroblotting in a buffer comprising 25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, and 20% ethanol at 200 mA. The membranes were rinsed with distilled water, incubated for 1 h in TBS, pH 7.4, with 5% nonfat milk (Carnation, Nestlé Canada, North York, ON) to block nonspecific interactions, and washed five times (twice for 5

min, once for 15 min, and twice for 5 min) with TBS–0.1% Tween. They were then reacted overnight sequentially in the same buffer at 4°C with 1–2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MMP-13 antibody (anti-MMP-13 hinge region from Sigma-Aldrich). Subsequently, membranes were washed five times with TBS–0.1% Tween at room temperature, incubated with the anti-rabbit secondary peroxidase-conjugated IgG (300 mu/ml), and washed seven times with TBS–0.1% Tween. For revelation of MMP-13 bands, membranes were incubated with 10 μl of solution A and 990 μl of solution B of the chemiluminescence detection system of Roche Biochemicals (Laval, Qc) and exposed to film for 2–15 min.

For Western blots of MAP kinases, human chondrocytes were treated with TNF- α for 20 min, and total cellular protein extracts (20 μg) in lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 50 mM DTT, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue) were resolved on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting, and incubated overnight at 4°C with primary phosphorylation state-specific antibodies for p-ERK, p-p38, and p-JNK (from Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA) at 1:1000 dilution in 5% BSA, 1 \times TBS, and 0.1% Tween. Proteins were detected by the Enhanced Chemiluminescence system of Pharmacia-Amersham. Subsequently the membranes were stripped with a buffer containing 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, and 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) at 55°C for 30 min and reprobbed with the antibodies detecting total ERK, p38, and JNK.

Transient transfection

Cells were grown to 80% confluence, washed two times with serum-free medium, and incubated with 1 ml of serum-free medium containing 0.5 μM ERK1/2 antisense or scrambled phosphorothioate oligonucleotides (Calbiochem) and 4 μg of Lipofectamine (2 mg/ml, Invitrogen Life Technologies) at 37°C for 6 h. Control cells were treated with 1 ml of medium with 100 μl of Lipofectamine reagent only. After 6 h of transfection, cells were washed three times with medium, allowed to recover for 24 h, maintained in serum-free medium for another 24 h, and stimulated with TNF- α . The conditioned medium was concentrated with TCA precipitation and an equal amount of protein (10 μg) subjected to Western blotting with MMP-13 as in the previous section. All the experiments were performed at least two (primary chondrocytes) to three (SW1353) times and the results were reproducible.

Results

MMP-13 RNA expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage

To examine the role of MMP-13 expression in human hip OA cartilage degradation, directly extracted RNA from the cartilage of three nonarthritic fracture patients and seven

hip OA patients was subjected to RT-PCR with MMP-13- and GAPDH-specific primers. As depicted in Fig. 1 neither of the control patients expressed MMP-13 RNA, while seven of eight (87%) OA patients and the only available RA patient did. The control GAPDH RNA levels remained mostly constant. The increased expression of the MMP-13 gene suggests its role in the degradation of arthritic femoral head human cartilage.

TNF- α induces mitogen-activated protein kinases in human chondrocytes

To decipher the earlier mechanisms of the observed increased MMP-13 gene expression, quiescent primary human femoral head chondrocytes were exposed to TNF- α for 20 min and protein extracts analyzed for the activation of MAPKs by immunoblotting with the respective phosphorylation state-specific antibodies. As shown in Fig. 2, TNF- α stimulated the activation of ERKs, p38, and JNKs, the three subclasses of MAPKs, as early events in the transduction of this signal without affecting their total levels. Similar results were obtained for primary bovine chondrocytes and SW1353 chondrosarcoma cells of chondrocytic origin (not shown).

MAP kinase inhibitors down-regulate MMP-13 gene expression

To further investigate the role of MAPKs in TNF- α -induced MMP-13 gene expression, human chondrocytes were preexposed to the specific and potent inhibitor of ERK U0126, which inhibits the inactive and active MEK1/2 [15]. Analysis of RNA by Northern hybridization revealed that TNF- α induced MMP-13 gene expression in femoral chon-

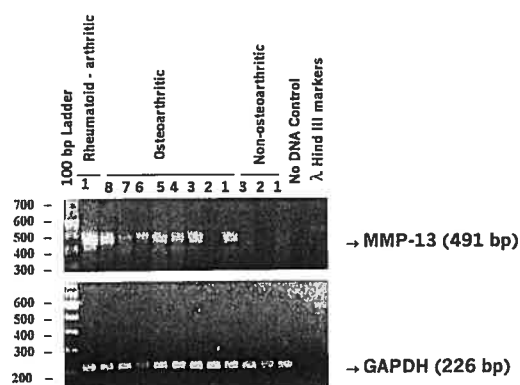


Fig. 1. Expression of MMP-13 mRNA in human nonarthritic and OA femoral head cartilage. Total RNA extracted directly from nonarthritic (femoral head fractures), femoral head OA, and rheumatoid arthritis cartilage was reverse transcribed into cDNA, amplified with the MMP-13- or GAPDH-specific primers for 35 cycles, and analyzed by agarose gel electrophoresis. No DNA control indicates the PCR reaction without any added cDNA. The specific amplification products of 0.491 kb (MMP-13, top panel) and 0.226 kb (GAPDH, bottom panel) along with the λ HindIII markers and a 100-bp ladder are depicted.

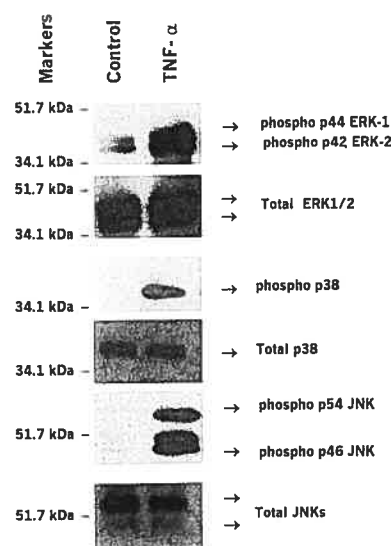


Fig. 2. Activation of the ERK, p38, and JNK MAP kinases in chondrocytes in response to TNF- α . Confluent cultures of human OA chondrocytes were maintained in serum-free medium for 24 h and exposed to cytokine vehicle control (PBS–0.1% BSA) or TNF- α (20 ng/ml) for 20 min. The total protein extracts were subjected to PAGE and Western immunoblot analysis with phosphorylation state-specific antibodies against phospho-ERK, p38, and JNK followed by incubation with antirabbit secondary antibody and revelation by enhanced chemiluminescence. After stripping, the blots were reprobbed with the respective antibodies against total protein. The positions of 42- and 44-kDa phospho-ERK1/2, 38-kDa protein kinase, and 54- and 46-kDa JNK1/2 proteins are shown by arrows. The respective total proteins are depicted under these blots. The closest protein molecular weight markers are also shown.

drocytes. The two MMP-13 RNA bands are due to differential utilization of multiple polyadenylation sites found in the 3' untranslated region of the MMP-13 gene [16]. U0126 completely blocked MMP-13 RNA and protein induction. Expression of MMP-13 RNA and protein was also suppressed by U0126 in SW1353 cells (Figs. 3A and B). Depletion of ERK1 and ERK2 by transient transfection of cells with an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide (ODN) [17] resulted in a drastic decline in MMP-13 protein induction by TNF in primary chondrocytes and SW1353 cells, while ODN with scrambled sequence did not alter MMP-13 induction (Figs. 4A and B). A less effective ERK pathway inhibitor (inactive MEK1), PD98059 [18], and protein 38 MAPK inhibitors (SB202190 and SB203580) at low doses partially inhibited MMP-13 RNA induction in primary human chondrocytes (Fig. 5A). P38 MAPK (SB202190 and SB203580 at 1 μ M) and JNK (SB203580 at 25 μ M) inhibitors dose-dependently down-regulated MMP-13 RNA and protein in SW1353 cells (Fig. 5B, top panels). The dose-dependent suppression of its RNA by the two inhibitors was also observed at much lower doses (Fig. 5B, bottom panels). The levels of 28S rRNA used as loading controls remained constant. A recent and more specific inhibitor of JNK, SP600125 [19], also down-regulated MMP-13 RNA and protein induction by TNF in both chondrocytic cells at 10–30 μ M doses (Figs. 6A and

A. Primary human chondrocytes

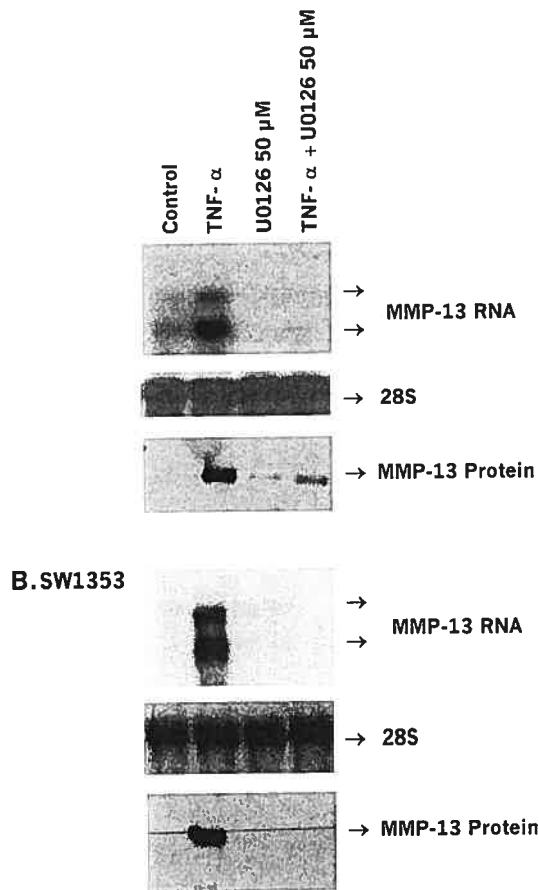


Fig. 3. Suppression of TNF- α -induced MMP-13 RNA/protein expression by the MAPKK inhibitor U0126. Primary human chondrocytes (A) or human chondrosarcoma SW1353 cells (B) were pretreated with the indicated dose of U0126 for 30 min followed by treatment with TNF- α for 24 h. The RNA blots were sequentially hybridized with the MMP-13 and 28S RNA probes. The concentrated media from primary chondrocytes were analyzed by Western blot for the level of MMP-13 protein. The resulting autoradiograms are shown.

B), though there was only a weak dose-dependent response, possibly due to saturation at 10 μ M. These results support the essential role of MAPKs in the induction of MMP-13 by TNF.

Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits TNF- α -induced MMP-13 gene expression

Since the MMP-13 promoter contains AP-1 transcription factor binding sites [20] and activation of MAPK pathways results in downstream activation of c-fos (ERK) and c-jun (JNK), we investigated the role of AP-1 in the regulation of MMP-13 gene expression. NDGA inhibits lipoxygenase, which in turn blocks arachidonic acid metabolites and thus suppresses expression of the c-fos component of AP-1 [21]. Pretreatment of quiescent primary chondrocytes with this AP-1 inhibitor abrogated MMP-13 RNA and protein induc-

tion by TNF- α (Fig. 7A). NDGA also blocked MMP-13 RNA and protein induction in SW1353 cells (Fig. 7B). These results suggest that the lipoxygenase pathway and the c-fos component of the AP-1 transcription factors mediate the induction of MMP-13 by TNF- α .

AP-1/NF- κ B inhibitors, curcumin, Bay-11-7085, and proteasome inhibitors suppress MMP-13 gene expression

The role of JNK (and thereby c-Jun) and NF- κ B transcription factor in the induction of MMP-13 by TNF- α was explored by pretreating human chondrocytes or SW1353 chondrocytic cells with curcumin (diferuloylmethane), a dietary pigment from *Curcuma longa* that inhibits JNK, c-Jun, and NF- κ B activation by PMA or TNF- α treatment and has strong antiinflammatory and antioxidant properties [22–24]. Curcumin down-regulated TNF- α -stimulated MMP-13 RNA and protein expression in primary human chondrocytes (Fig. 8A) and in SW1353 cells (Fig. 8B). Bay-11-7085, a highly specific inhibitor of TNF- α -inducible I κ B α phosphorylation (and therefore NF- κ B transcription factor) [25] also dose-dependently suppressed MMP-13 gene expression in primary human chondrocytes and SW1353 cells (Figs. 9A and B). Other interceptors of the NF- κ B pathway, such as proteasome inhibitors, including MG132 and proteasome inhibitor I, also suppressed MMP-13 RNA and protein increase in human chondrocytes (Fig. 10A) and SW1353 cells (Fig. 10B). These results suggest that JNK, its target c-Jun, and NF- κ B mediate the induction response of MMP-13 by TNF- α .

A. Primary human chondrocytes

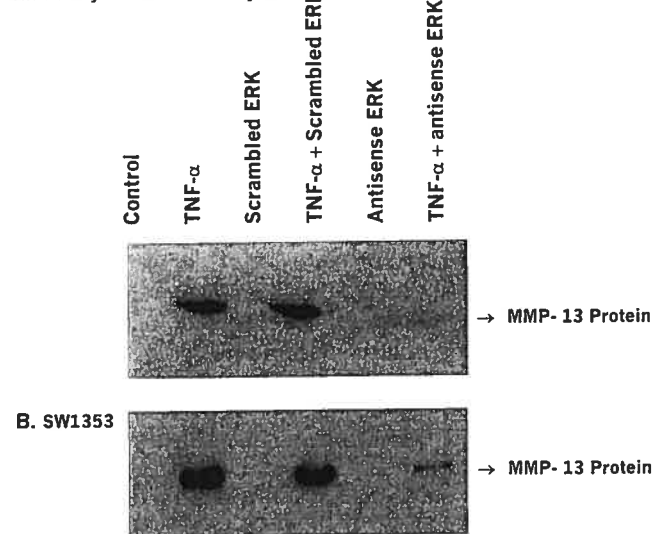


Fig. 4. Inhibition of TNF- α -induced MMP-13 protein expression by an antisense ERK oligonucleotide. Primary human chondrocytes (A) or human chondrosarcoma SW1353 cells (B) were transfected with 0.5 μ M scrambled or antisense phosphorothioate oligonucleotides for 6 h, followed by 24 h recovery and treatment with TNF- α for 24 h. The conditioned media were concentrated and 10 μ g of protein was analyzed for MMP-13 levels by Western blotting as indicated.

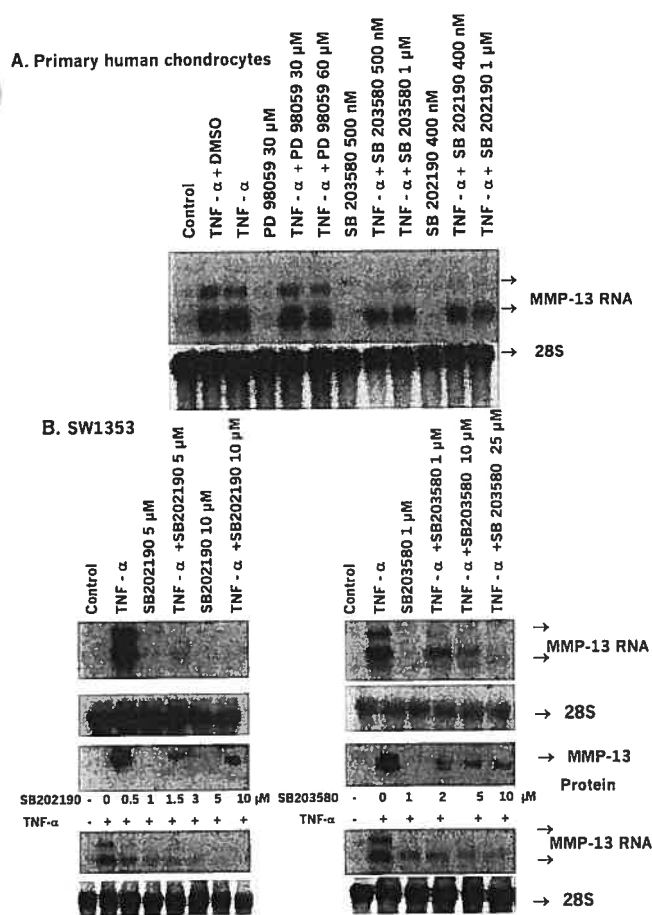


Fig. 5. Down-regulation of TNF- α -induced MMP-13 RNA expression by MAP kinase inhibitors. Primary human chondrocytes (A) or human chondrosarcoma cells (B) were pretreated with inhibitor vehicle (DMSO or control), the indicated doses of the MAPKK inhibitor PD98059, p38 kinase inhibitors, SB202190, or the p38/JNK inhibitor SB203580 for 30 min followed by additional incubation with TNF- α (20 ng/ml) for 24 h. The RNA blots were sequentially hybridized with the MMP-13 and 28S RNA probes. The resulting autoradiograms with positions of different transcripts (arrows) are shown. In the top panel of B, MMP-13 levels measured by Western blotting are shown. In the bottom panel of B, MMP-13 RNA dose-responses with lower doses of inhibitors are also displayed.

Discussion

We have demonstrated for the first time an enhanced MMP-13 expression in arthritic hip femoral head cartilage and investigated the molecular mechanisms implicated in this increase. In primary chondrocytes from this tissue, TNF- α stimulated activation of ERK, p38, and JNK MAPKs prior to MMP-13 induction. Inhibition of MAPKs with their specific inhibitors partially or completely suppressed MMP-13 augmentation, demonstrating a direct role of these kinases as mediators of MMP-13 induction. Additionally, specific inhibitors of AP-1 and NF- κ B were shown to down-regulate MMP-13 gene expression in chondrocytes, highlighting the important roles of these transcription factors in the regulation of collagenase-3 gene.

Previously uncharacterized detection of MMP-13 RNA

in the cartilage of nearly all patients with arthritis compared to undetectable expression in nonarthritic tissues suggests a direct role for this enzyme in the degeneration of arthritic hip cartilage. Because of its dual ability to cleave collagen and aggrecan, MMP-13 is considered the major enzyme responsible for the resorption of knee cartilage as well [6,13,26]. These results and detection of aggrecanases in cartilage [4] suggest that collagens and aggrecan of this tissue are cleaved by the concerted action of multiple enzyme families, including MMP-13.

Our demonstration of rapid activation of all three MAPKs in human hip femoral chondrocytes differs from that in rabbit knee chondrocytes, where TNF- α activated only JNK [27]. Although our results are similar to those of studies in human knee chondrocytes where TNF- α induced

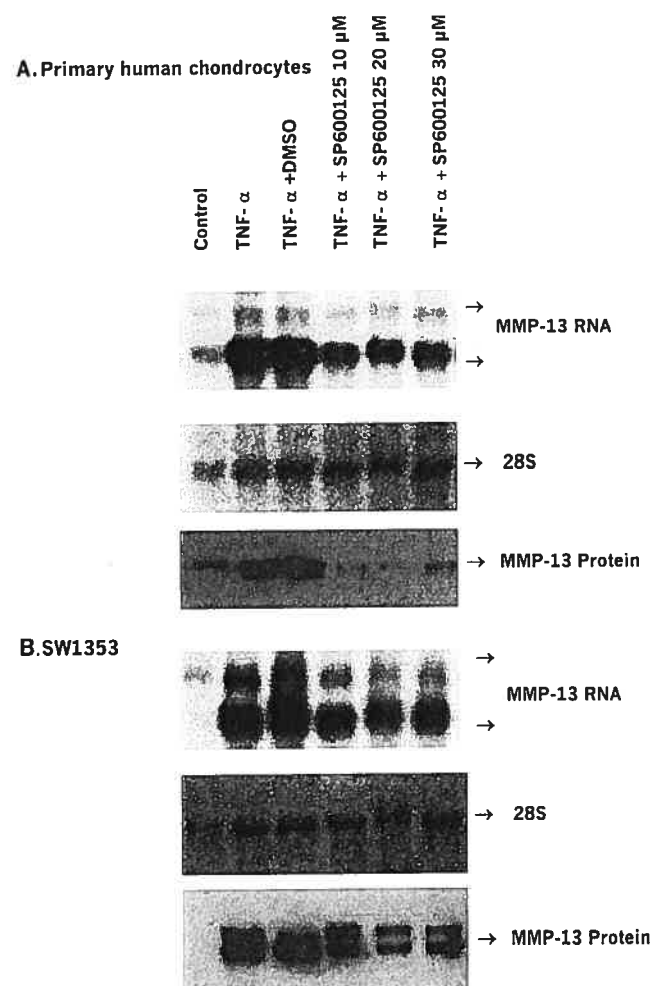


Fig. 6. Down-regulation of TNF- α -induced MMP-13 gene expression by the JNK inhibitor SP600125. Primary human chondrocytes (A) or human chondrosarcoma cells (B) were pretreated with inhibitor vehicle (DMSO or control), the indicated doses of the JNK inhibitor for 30 min, followed by additional incubation with TNF- α (20 ng/ml) for 24 h. The RNA blots were sequentially hybridized with the MMP-13 and 28S RNA probes. The resulting autoradiograms with positions of different transcripts (arrows) are shown. MMP-13 protein levels measured by Western blotting are also shown.

A. Primary human chondrocytes

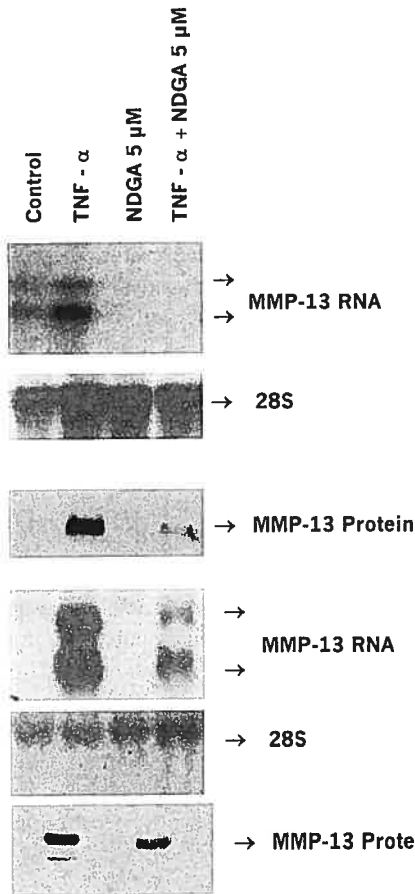


Fig. 7. Impact of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on TNF- α -increased MMP-13 gene expression. Primary human chondrocytes (A) or human chondrosarcoma cells (B) kept in serum-free medium were exposed to ethanol (NDGA vehicle, control) or pretreated with NDGA for 30 min and followed by stimulation with TNF- α for 24 h. The MMP-13 RNA and protein levels (in medium) were measured by Northern hybridization and Western blot analysis, respectively. The resulting autoradiograms indicating the respective gene products are shown.

ERK, p38, and JNK activation, no correlation with their target genes (such as MMP-13) was established [28]. These phosphorylated MAPKs were also localized at the distinct sites of rheumatoid but not in OA synovial tissues. Additionally, MAPK induction by TNF- α in synovial fibroblasts was shown [29], further implicating them in inflammation and cartilage degradation.

The role of the ERK pathway in MMP-13 induction has not been established. Partial inhibition of MMP-13 RNA induction by PD98059 and more potent suppression by U0126 suggests that the ERK–MAPK pathway is an important mediator of this TNF- α signaling response. Our results support the observed superiority of U0126 inhibitor over PD98059 for blocking the ERK–MAPK pathway [15]. These results are further upheld by the strong genetic approach of antisense ERK ODN-driven inhibition of MMP-13. Activation of p38 by TNF- α and inhibition of MMP-13 expression by SB203580 (which inhibits p38 α and - β) and

SB202190 (which preferentially inhibits p38 α but also inhibits p38 β) at low concentrations inhibitory to p38 isoforms suggests that this pathway also mediated the induction of MMP-13. These agents may not be effective in inhibiting the other forms of p38, such as p38 γ and p38 δ , whose role in MMP-13 regulation is not known. SAPK2 or p38 δ has been detected in activated synovial fibroblasts [30]. These inhibitors were also shown to block MMP-3-mediated bovine cartilage degradation [31]. Partial inhibition of MMP-13 expression by individual inhibitors suggests that multiple mechanisms are involved. Finally, inhibition of MMP-13 expression by a new JNK pathway-specific inhibitor, SP600125, curcumin, and SB203580 (which inhibits JNK at 25 μ M) also supports the role of this pathway in MMP-13 gene regulation. Inhibition of IL-1-stimulated MMP-1 and MMP-13 by JNK2 inhibitory concentrations of SB203580 and SP600125 was also observed in inflammation-associated rheumatoid fibroblasts, a cell type very different from chondrocytes [19,32]. The involvement of three MAPK pathways in MMP-13 induction by

A. Primary human chondrocytes

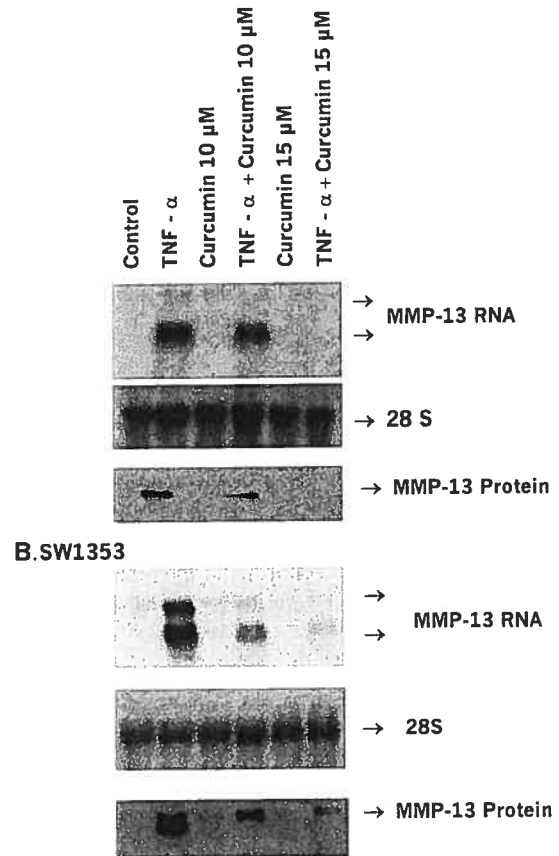


Fig. 8. Reduction in TNF- α -stimulated MMP-13 expression by curcumin. Primary human chondrocytes (A) or SW1353 cells (B) were exposed to ethanol (control) or different concentrations of curcumin for 30 min and then treated with TNF- α for an additional 24 h. MMP-13 and 28S RNA (in cells) and protein levels (in conditioned medium) measured by Northern hybridization or Western blotting are shown.

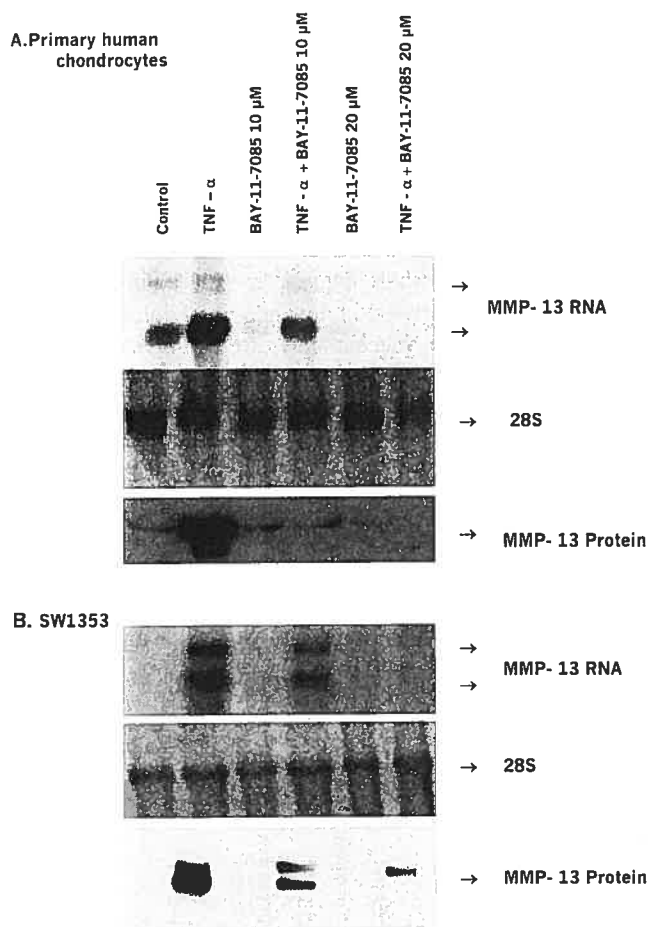


Fig. 9. Decrease in TNF- α -stimulated MMP-13 RNA expression by the NF- κ B inhibitor Bay-11-7085. Quiescent primary human chondrocytes (A) or chondrosarcoma cells (B) were preexposed to DMSO vehicle (control) or different concentrations of Bay-11-7085 for 30 min and then treated with TNF- α for an additional 24 h. MMP-13 and 28S RNA and MMP-13 protein levels measured by Northern hybridization and Western blotting are shown.

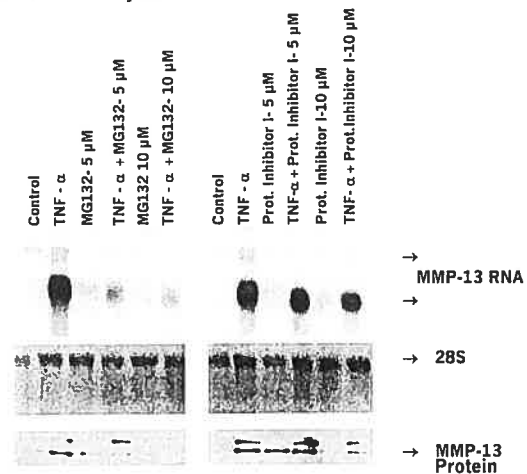
TNF- α is also conserved in human chondrosarcoma cells. Overall, coordinate inhibition of these pathways may block induction of MMP-13 by TNF- α and possibly degradation of cartilage. Indeed, SB203580 and SP600125, respectively inhibited collagen-induced arthritis in mouse and adjuvant-induced arthritis in rat, possibly via MMP-13 inhibition [19,33].

While the role of the AP-1 transcription factor in MMP-13 gene regulation is well documented in other systems [20], a potent decrease in its expression by NDGA is unprecedented. Coordinate suppression of MMP-13 RNA and protein suggests inhibition at the pretranscriptional level. The mechanism of action may involve blockade of lipoxygenase activity and subsequent inhibition of arachidonic acid metabolites, such as 5-HPETE, that is known to induce c-fos [21]. Thus, inhibition of c-fos by either the blockers of the lipoxygenase pathway or the ERK cascade inhibits the MMP-13 gene, supporting a critical role for this component of AP-1 factors in MMP-13 gene regulation.

Interestingly, mouse cells deficient in the c-fos gene cannot be induced with TNF- α to express MMPs [8]. NDGA inhibits TNF- α -induced expression of vascular cell adhesion molecules, an important inflammatory mediator in endothelial cells, via inhibition of AP-1 [34]. This agent also prevents the formation of fos-jun-DNA complex formation and reduces AP-1 activity [35,36]. Since invasion of cartilage by rheumatoid synovium occurs via MMPs [37], NDGA may be useful to block this process. Indeed the role of leukotriene B₄, a metabolite of lipoxygenase pathway, was demonstrated in collagen-induced arthritis [38]. Inhibition of the AP-1 transcription factor by antisense c-fos oligonucleotides or by the introduction of AP-1 binding decoy sequences in arthritic mouse joints inhibits, respectively, rheumatoid synovial fibroblast proliferation and joint destruction [39,40]. Thus blocking AP-1 activity by inhibition of the ERK and lipoxygenase pathways and c-fos expression may be useful approaches for inhibiting the degradation of cartilage by MMP-13.

Curcumin is an interesting antiinflammatory agent from the rhizome of *C. longa*. The demonstrated inhibition of MMP-13 gene expression by curcumin may be by inhibition of the JNK pathway [22] and transcription factor NF- κ B activities [23]. The former mechanism is also supported by

A. Primary human chondrocytes



B. SW1353

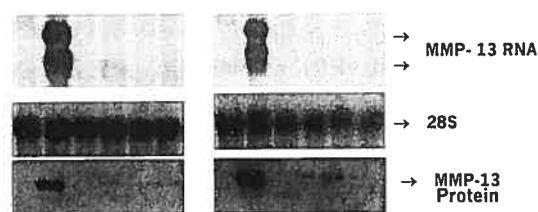


Fig. 10. Suppression of TNF- α -induced MMP-13 RNA expression by proteasome inhibitors. Quiescent primary human chondrocytes (A) or SW1353 cells (B) were preexposed to the indicated concentrations of MG132 or proteasome inhibitor 1 for 30 min and then treated with TNF- α for an additional 24 h. MMP-13, 28S RNA, and MMP-13 protein measured by Northern hybridization or Western blotting are shown.

suppression with the newer and specific SP600125 inhibitor. Similarly, the NF- κ B mechanism is further supported by decreased MMP-13 induction in chondrocytes by other NF- κ B inhibitors, such as Bay-11-7085 (which prevents phosphorylation of the NF- κ B inhibitor I κ B) [25], and inhibitors of the ubiquitin–proteasome pathway (which prevent the ubiquitin-dependent degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B). The requirement of JNK, p38, and NF- κ B was also demonstrated for IL-1-induced MMP-13 in rabbit chondrocytes and chondrosarcoma cells [41]. NF- κ B/p50 was shown to activate the rabbit MMP-1 gene [42]. Furthermore, blocking NF- κ B by overexpression of I κ B α reduced inflammation and tissue destruction in rheumatoid synovial tissue [43]. Curcumin and NDGA also have antioxidant properties [44], and AP-1 and NF- κ B are redox-sensitive transcription factors [45]. Since there are no known binding sites for NF- κ B in the promoter of the human MMP-13 gene, the inhibition of previously demonstrated AP-1/NF- κ B protein–protein interaction in the nucleus could reduce AP-1 activity [34] and subsequent MMP-13 induction. Together these results suggest that inhibition of NF- κ B by curcumin, Bay-11-7085, or proteasome inhibitors may be useful for blocking cartilage destruction. Since NF- κ B also has cell survival promoting activities [46], the possible undesirable side effects of such inhibition need to be studied prior to their use.

In summary, we have demonstrated the previously unknown role of ERK, p38, and JNK MAPKs as well as the transcription factors AP-1 and NF- κ B as pivotal mediators of TNF- α signaling leading to induction of MMP-13 in human femoral chondrocytes. These multiple inhibitors need to be evaluated further as a basis for developing potentially new therapeutic agents for protecting cartilage integrity.

Acknowledgments

This work was supported by the Arthritis Society, the Canadian Arthritis Network (CAN), and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). We thank Drs. Julio Fernandes and Nicolas Duval for human cartilage and Ms. Anna Chelchowska for preparing the figures.

References

- [1] A.R. Poole, An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis, *Front. Biosci.* 4 (1999) D662–D670.
- [2] M.B. Goldring, The role of the chondrocyte in osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 1916–1926.
- [3] H. Nagase, J.F. Woessner, Matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21491–21494.
- [4] M.D. Tortorella, T.C. Burn, M.A. Pratta, I. Abbaszade, J.M. Hollis, R. Liu, S.A. Rosenfeld, R.A. Copeland, C.P. Decicco, R. Wynn, A. Rockwell, F. Yang, J.L. Duke, K. Solomon, H. George, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, D.M. Ellis, H. Ross, B.H. Wiswall, K. Murphy, M.C. Hillman, G.F. Hollis, et al., Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins, *Science* 284 (1999) 1664–1666.
- [5] C.S. Westhoff, D. Freudiger, P. Petrow, C. Seyfert, J. Zacher, J. Kriegsmann, T. Pap, S. Gay, P. Stiehl, E. Gromnica-Ihle, D. Wernicke, Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 42 (1999) 1517–1527.
- [6] P.G. Mitchell, H.A. Magna, L.M. Reeves, L.L. Lopresti-Morrow, S.A. Yocum, P.J. Rosner, K.F. Geoghegan, J.E. Hambor, Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage, *J. Clin. Invest* 97 (1996) 761–768.
- [7] R.C. Billingham, L. Dahlberg, M. Ionescu, A. Reiner, R. Bourne, C. Rorabeck, P. Mitchell, J. Hambor, O. Diekmann, H. Tschesche, J. Chen, H. Van Wart, A.R. Poole, Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage, *J. Clin. Invest* 99 (1997) 1534–1545.
- [8] P. Borden, D. Solymar, A. Sucharczuk, B. Lindman, P. Cannon, R.A. Heller, Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 23577–23581.
- [9] D.H. Manicourt, P. Poilvache, A. Van Egeren, J.P. Devogelaer, M.E. Lenz, E.J. Thonar, Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 281–288.
- [10] S.C. Ghivizzani, E.R. Lechman, R. Kang, C. Tio, J. Kolls, C.H. Evans, P.D. Robbins, Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal antiarthritic effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 4613–4618.
- [11] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [12] L.A. McKenna, A. Gehrsitz, S. Soder, W. Eger, T. Kirchner, T. Aigner, Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage, *Anal. Biochem.* 286 (2000) 80–85.
- [13] B.V. Shlopov, W.R. Lie, C.L. Mainardi, A.A. Cole, S. Chubinskaya, K.A. Hasty, Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 2065–2074.
- [14] V. Lefebvre, C. Peeters-Joris, G. Vaes, Production of collagens, collagenase and collagenase inhibitor during the dedifferentiation of articular chondrocytes by serial subcultures, *Biochim. Biophys. Acta* 1051 (1990) 266–275.
- [15] M.F. Favata, K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. Van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, J.M. Trzaskos, Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18623–18632.
- [16] J.M. Freije, I. Diez-Itza, M. Balbin, L.M. Sanchez, R. Blasco, J. Tolivia, C. Lopez-Otin, Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16766–16773.
- [17] C.J. Robinson, P.H. Scott, A.B. Allan, T. Jess, G.W. Gould, R. Plevin, Treatment of vascular smooth muscle cells with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides directed against p42 and p44 mitogen-activated protein kinases abolishes DNA synthesis in response to platelet-derived growth factor, *Biochem. J.* 320 (Pt. 1) (1996) 123–127.
- [18] D.T. Dudley, L. Pang, S.J. Decker, A.J. Bridges, A.R. Saltiel, A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7686–7689.
- [19] Z. Han, D.L. Boyle, L. Chang, B. Bennett, M. Karin, L. Yang, A.M. Manning, G.S. Firestein, c-Jun N-terminal kinase is required for

- metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis, *J. Clin. Invest* 108 (2001) 73–81.
- [20] A.M. Pendas, M. Balbin, E. Llano, M.G. Jimenez, C. Lopez-Otin, Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13), *Genomics* 40 (1997) 222–233.
- [21] E.M. Haliday, C.S. Ramesha, G. Ringold, TNF induces c-fos via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxygenase metabolite, *EMBO J.* 10 (1991) 109–115.
- [22] Y.R. Chen, T.H. Tan, Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin, *Oncogene* 17 (1998) 173–178.
- [23] S. Singh, B.B. Aggarwal, Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane), *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24995–25000.
- [24] C. Jobin, C.A. Bradham, M.P. Russo, B. Juma, A.S. Narula, D.A. Brenner, R.B. Sartor, Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity, *J. Immunol.* 163 (1999) 3474–3483.
- [25] J.W. Pierce, R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S.A. Moore, T. Collins, M.E. Gerritsen, Novel inhibitors of cytokine-induced I-kappa Balpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21096–21103.
- [26] P. Reboul, J.P. Pelletier, G. Tardif, J.M. Cloutier, J. Martel-Pelletier, The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis, *J. Clin. Invest* 97 (1996) 2011–2019.
- [27] P.A. Scherle, M.A. Pratta, W.S. Feeser, E.J. Tancula, E.C. Arner, The effects of IL-1 on mitogen-activated protein kinases in rabbit articular chondrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230 (1997) 573–577.
- [28] Y. Geng, J. Valbracht, M. Lotz, Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes, *J. Clin. Invest* 98 (1996) 2425–2430.
- [29] G. Schett, M. Tohidast-Akrad, J.S. Smolen, B.J. Schmid, C.W. Steiner, P. Bitzan, P. Zenz, K. Redlich, Q. Xu, G. Steiner, Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, 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.* 43 (2000) 2501–2512.
- [30] M. Neidhart, J. Rethage, S. Kuchen, P. Kunzler, R.M. Crowl, M.E. Billingham, R.E. Gay, S. Gay, Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 2634–2647.
- [31] S.H. Ridley, S.J. Sarsfield, J.C. Lee, H.F. Bigg, T.E. Cawston, D.J. Taylor, D.L. DeWitt, J. Saklatvala, Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels, *J. Immunol.* 158 (1997) 3165–3173.
- [32] Z. Han, D.L. Boyle, K.R. Aupperle, B. Bennett, A.M. Manning, G.S. Firestein, Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291 (1999) 124–130.
- [33] A.M. Badger, J.N. Bradbeer, B. Votta, J.C. Lee, J.L. Adams, D.E. Griswold, Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279 (1996) 1453–1461.
- [34] M. Ahmad, P. Theofanidis, R.M. Medford, Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 4616–4621.
- [35] S. Park, D.K. Lee, C.H. Yang, Inhibition of fos-jun-DNA complex formation by dihydroguaiaretic acid and in vitro cytotoxic effects on cancer cells, *Cancer Lett.* 127 (1998) 23–28.
- [36] G.N. Rao, W.C. Glasgow, T.E. Eling, M.S. Runge, Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27760–27764.
- [37] T. Pap, W.H. van der Laan, K.R. Aupperle, R.E. Gay, J.H. Verheijen, G.S. Firestein, S. Gay, M. Neidhart, Modulation of fibroblast-mediated cartilage degradation by articular chondrocytes in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 2531–2536.
- [38] R.J. Griffiths, E.R. Pettipher, K. Koch, C.A. Farrell, R. Breslow, M.J. Conklyn, M.A. Smith, B.C. Hackman, D.J. Wimberly, A.J. Milici, D.N. Scampoli, J.B. Cheng, J.S. Pillar, C.J. Pazoles, N.S. Doherty, L.S. Melvin, L.A. Reiter, M.S. Biggars, F.C. Falkner, D.Y. Mitchell, T.E. Liston, H.J. Showell, Leukotriene B₄ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 517–521.
- [39] Y. Morita, N. Kashiwara, M. Yamamura, H. Okamoto, S. Harada, M. Kawashima, H. Makino, Antisense oligonucleotides targeting c-fos mRNA inhibit rheumatoid synovial fibroblast proliferation, *Ann. Rheum. Dis.* 57 (1998) 122–124.
- [40] S. Shiozawa, K. Shimizu, K. Tanaka, K. Hino, Studies on the contribution of c-fos/AP-1 to arthritic joint destruction, *J. Clin. Invest* 99 (1997) 1210–1216.
- [41] J.A. Mengshol, M.P. Vincenti, C.I. Coon, A. Barchowsky, C.E. Brinckerhoff, Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 801–811.
- [42] M.P. Vincenti, C.I. Coon, C.E. Brinckerhoff, Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1 beta-stimulated synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum.* 41 (1998) 1987–1994.
- [43] J. Bondeson, B. Foxwell, F. Brennan, M. Feldmann, Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 5668–5673.
- [44] P. Brennan, L.A. O'Neill, Inhibition of nuclear factor kappaB by direct modification in whole cells-mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 965–973.
- [45] N. Li, M. Karin, Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?, *FASEB J.* 13 (1999) 1137–1143.
- [46] M. Karin, A. Lin, NF-kappaB at the crossroads of life and death, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 221–227.

3. Article 3

Abdelhamid Liacini, Judith Sylvester, Wen Qing Li and Muhammad Zafarullah 2004. **Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocyte. Cellular signalling**16: 469-476.

CONTRIBUTION:

J'ai préparé les chondrocytes bovins à partir du cartilage et la culture cellulaire. J'ai effectué la moitié du travail pour les mesures de l'ARN de la MMP-13, la MMP-3, l'aggrecanase-1 et le 28S par Northern blot. J'ai effectué la quantification des bandes de la MMP-13, la MMP-3, l'aggrecanase-1 et de 28S par densitomètre, de même que les colonnes statistiques.

Judith Sylvester a participé à la réalisation de ce travail en effectuant plusieurs manipulations. Elle a préparé les chondrocytes bovins à partir du cartilage, la culture cellulaire et la moitié des mesures de l'ARN de la MMP-13, la MMP-3, l'aggrecanase-1 et le 28S par Northern blot.

Wen Qing Li a cloné le cDNA pour la MMP-13 et l'aggrecanase-1 dans le vecteur pGEM-4Z.

Muhammad Zafarullah a élaboré et planifié cette recherche. Le travail a été réalisé sous sa direction à partir de la conception, l'acquisition des résultats, l'analyse et l'interprétation des résultats jusqu'à la préparation du manuscrit et la soumission pour publication.

Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes

Judith Sylvester¹, Abdelhamid Liacini¹, Wen Qing Li, Muhammad Zafarullah*

Research Center, CHUM Hôpital Notre-Dame, K-5255 Mailloux, 1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

Received 8 November 2002; accepted 16 September 2003

Abstract

Interleukin (IL)-17 promotes cartilage breakdown by inducing matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif, ADAMTS) in arthritic joints. We investigated IL-17 signaling pathways inducing MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 genes in bovine articular chondrocytes. IL-17 stimulated phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), protein 38 (p38) and *c-Jun* N-terminal kinase (JNK). ERK pathway inhibitors, PD98059 and U0126, down-regulated IL-17-induced MMP and ADAM-TS4 gene expression. Protein 38 and JNK pathway inhibitors, SB203580 and SP600125, also reduced induction of these genes. Antioxidants and activating protein-1 transcription factor inhibitors, nordihydroguaiaretic acid and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) suppressed MMP and ADAM-TS4 genes. Similarly, nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathways inhibitors curcumin and Bay-11-7085 also blocked their induction. Thus MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 genes are coordinately up-regulated by IL-17 via MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and NF- κ B mediators, which could be targeted for reducing IL-17-triggered cartilage damage. © 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Arthritis; Chondrocytes; Inhibitors; Interleukin-17; MAP kinases; Matrix metalloproteinases; Signal transduction

1. Introduction

A prominent feature of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) is degeneration of articular cartilage. Matrix metalloproteinases, MMP-3 and MMP-13 [1], as well as aggrecanases or a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif (ADAMTS) [2–4] play a major role in this damage. Levels of these enzymes are considerably elevated in the synovial fluid, synovial membrane and cartilage of patients with arthritis [5–9]. MMPs digest cartilage extracellular matrix proteins such

as collagens and aggrecan [1,2]. Overexpression of active human MMP-13 in transgenic mouse cartilage induces OA-like damage [10]. ADAM-TS4 and -5 have been regarded as major contributors to aggrecan degradation [2,4,11]. MMP-13 and aggrecanases are currently the main targets for developing novel cartilage protective therapies. Excessive proinflammatory cytokines [12] produced by arthritic joints are principal stimuli for inducing the expression of MMPs and ADAMTS in macrophages, fibroblasts and chondrocytes. Inflammatory cytokines enhance cartilage damage by inhibiting the synthesis of its matrix proteins and by stimulating protease production by chondrocytes [13].

Interleukin-17 (IL-17) is a major proinflammatory cytokine originating from T cells that is produced mainly by RA and not by OA synovial membranes [14,15]. IL-17 increased MMP-1 production and collagen destruction in synovial explants and fibroblasts [16]. IL-17 increased proteoglycan loss, decreased its synthesis in mouse cartilage and enhanced bone resorption in *ex vivo* culture systems [17]. Injection of IL-17 in mouse knee resulted in rapid depletion of proteoglycan [18]. IL-17 treatment of

Abbreviations: ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif; IL-17, interleukin-17; MMPs, matrix metalloproteinases; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; JNK, *c-Jun* N-terminal kinase; NF- κ B, nuclear factor kappa B; AP-1, activating protein-1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; RA, rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis.

* Corresponding author. Tel.: +1-514-890-8000-25690; fax: +1-514-412-7612.

¹ These two authors made equal contribution to this paper.

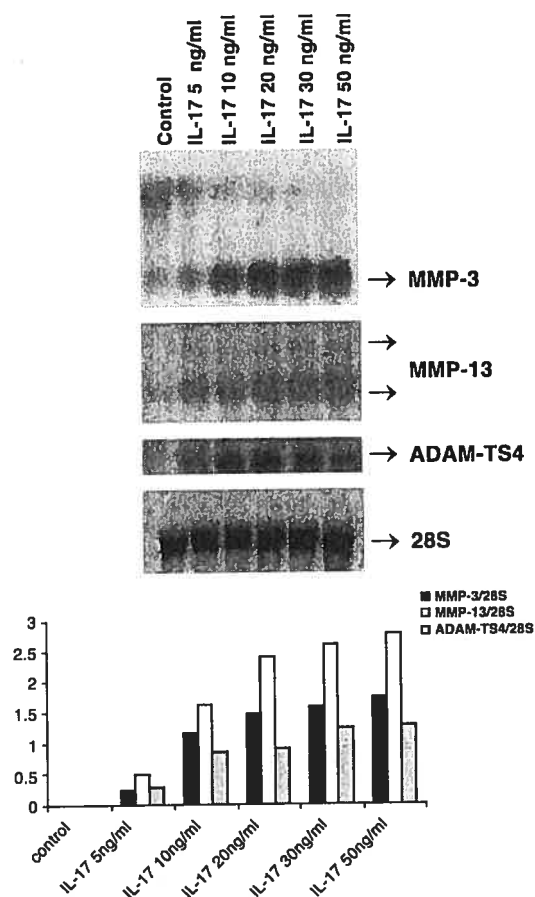


Fig. 1. Induction of MMP-3, -13 and ADAM-TS4 RNA by IL-17 in primary bovine chondrocytes. Cells were treated with IL-17 vehicle (PBS–0.1% BSA, control) or indicated doses of IL-17 for 24 h. The positions of MMP-3, MMP-13, ADAM-TS4 and 28S transcripts are shown. The mean densitometric values (four experiments) of MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels divided by 28S rRNA levels are presented graphically in the bottom panel.

human articular chondrocytes induced several inflammation-associated and cartilage damaging gene products such as cyclooxygenase-2, IL-1 and stromelysin [19]. Blocking the catabolic effects of IL-17 could potentially constitute a useful strategy for reducing cartilage breakdown. This investigation attempted to elucidate IL-17 signal transduction pathways leading to the induction of MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 genes in chondrocytes with the help of specific inhibitors of different signaling pathways.

2. Material and methods

2.1. Bovine chondrocytes and treatments

Normal bovine articular cartilage from the knee and femoral head of adult animals was from a local abattoir. Chondrocytes were released by enzymatic digestion and their monolayers cultured as described before [20]. Cells were kept in serum-free DMEM for 24 h before treating

with inhibitors or their vehicles (DMSO, ethanol or water; control). The inhibitors were added 30 min before treatment with human recombinant IL-17 (20 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 24 h. PD98059 (or 2'-Amino-3'-methoxyflavone; Calbiochem, La Jolla, CA, IC_{50} 2 μ M) that binds to the inactive forms of MEK-1 (MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase) and inhibits the activation of MAPK [21] was dissolved in DMSO (30 mM) and used at the final concentrations of 5–30 μ M. U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene; Promega, IC_{50} 58–72 nM), which inhibits the inactive and active MEK-1/2 [22], was dissolved in DMSO (10 mM) and used

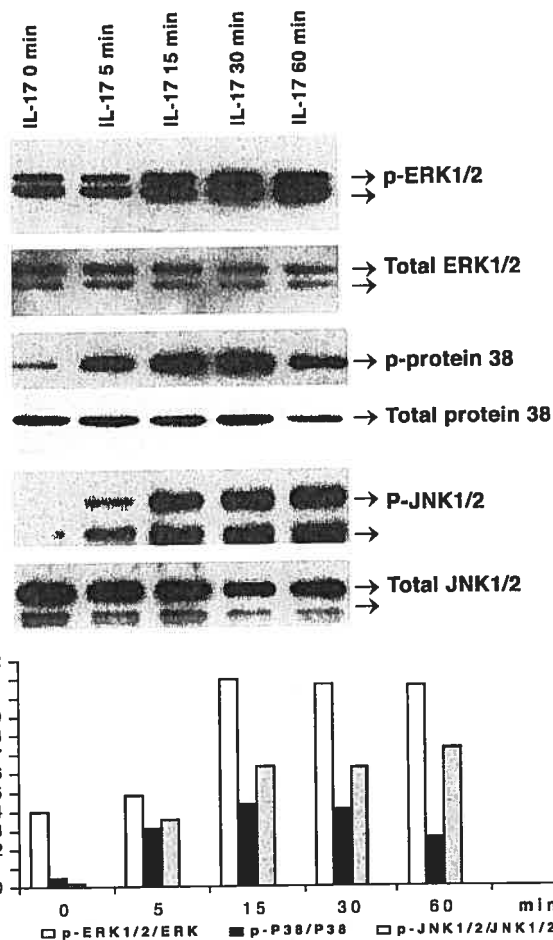


Fig. 2. Time-dependent phosphorylation of ERK, p38 and JNK MAP kinases in bovine chondrocytes after stimulation with IL-17. Confluent chondrocytes maintained in serum-free medium for 24 h were exposed to IL-17 (20 ng/ml) for indicated time periods. The total protein extracts were subjected to PAGE and sequential Western blot analysis with phosphorylation-state-specific antibodies against phospho-ERK, p38 and JNK followed by incubation with anti-rabbit secondary antibody and revelation by chemiluminescence. Following stripping, the same membranes were reacted with the respective total antibodies. The positions of 42 and 44 kilodalton (kDa), phospho-ERK1/2, 38-kDa protein kinase and 54 and 46 kDa JNK1/2 proteins are shown. The mean densitometric values of the phosphoproteins divided by total ERK, p38 and JNK bands from four separate experiments are presented graphically in the bottom panel.

at 5–25 μM final. SB203580 or 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole (Calbiochem, IC_{50} 600 nM), which inhibits p38 kinase at low (1 μM) and *c-Jun* N-terminal kinase (JNK) at higher (25 μM) concentrations [23], was dissolved (2.5 mM) and used at 10–20 μM final. SP600125 (Anthra [1,9-cd] pyrazolo-6(2H)-one) (Calbiochem, IC_{50} 40–90 nM) [24] was used at 1 to 30 μM concentrations. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA), a lipoxygenase and AP-1 inhibitor [25] (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), was dissolved in ethanol and used at the dose range of 1 to 15 μM . Another inhibitor of AP-1 expression, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) [26] from Sigma was dissolved in the serum-free medium, pH adjusted at 7 and used at 10 to 40 mM range. Curcumin or diferuloylmethane (Sigma-Aldrich), an inhibitor of JNK, AP-1 and nuclear factor kappa B (NF- κB) [27–29], was dissolved (1 mM) in ethanol and used at the concentrations of 5–15 μM . Another NF- κB pathway inhibitor, 1,9-pyrazoloanthrone and (E)3-[(4-*t*-Butylphenyl)sulfonyl]-2propenenitrile (BAY-11-7085, IC_{50} 10 μM) [30] from Calbiochem was used at the concentration range of 0.5 to 2.5 μM . The

concentrations used were based on the previously published (cited) studies in different systems where they were shown to inhibit the respective proteins.

2.2. Northern hybridization

RNA was extracted by the guanidinium isothiocyanate procedure [31] and 5 μg aliquots analyzed by Northern hybridization with the human MMP-3, MMP-13 and 28S RNA probes as described previously [20]. ADAM-TS4 cDNA amplification product of 689 bp was generated by RT-PCR with specific primers [32], the cDNA was cloned in the *Sma* I site of pGEM-4Z and its identity and orientation confirmed by DNA sequence analysis. The plasmid was linearized with *Eco*RI enzyme and antisense RNA probe was synthesized with T7 polymerase according to the protocols of Promega Biotech. Northern hybridization with this probe gave a single band of approximately 4.2 kilobases, just under the 28S rRNA band. The figures are representative of four separate and reproducible experiments.

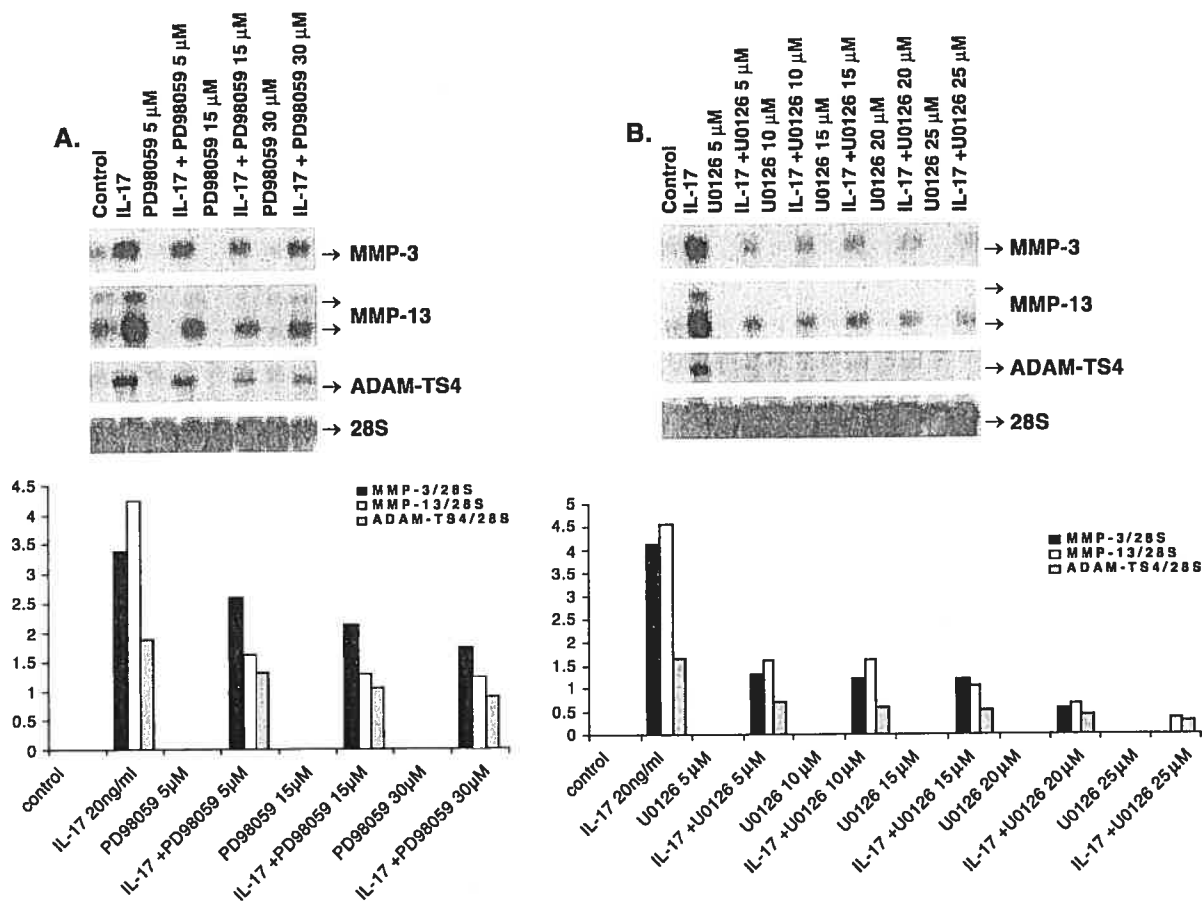


Fig. 3. Down-regulation of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by ERK-MAPK inhibitors, PD98059 (A) and U0126 (B). Quiescent chondrocytes were pretreated in serum-free medium with the IL-17 and inhibitor vehicles (DMSO, PBS–0.1% BSA, Control), the indicated doses of PD98059 or U0126 for 30 min followed by additional incubation with human IL-17 (20 ng/ml) for 24 h. The positions of respective transcripts (arrows) are shown. The mean densitometric values (four experiments) of these transcript levels divided by 28S rRNA levels are presented as graphs in the bottom panel.

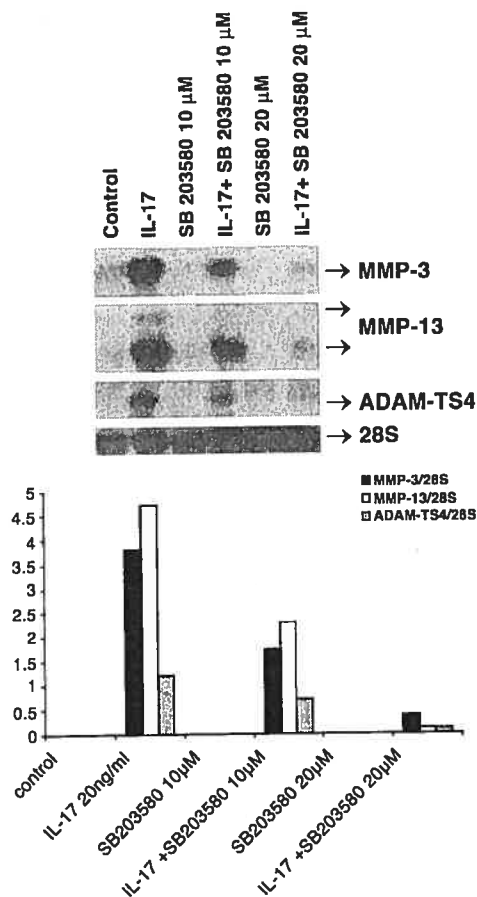


Fig. 4. Reduction of IL-17 increased MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by p38 and JNK inhibitor, SB203580. Bovine chondrocytes in serum-free medium were exposed to DMSO (SB203580 vehicle, control) or pretreated with SB203580 for 30 min and followed by stimulation with IL-17 for 24 h. The MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels were measured by Northern blot analysis. The respective products are shown with arrows. The mean values (four experiments) of these mRNAs divided by 28S rRNA levels are presented as bar graphs in the bottom panel.

2.3. Western blot analysis

For Western blots of MAP kinases, bovine chondrocytes were treated with IL-17 for 20 min, total cellular protein extracts (100 μ l) (20 μ g) in lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 50 mM DTT, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue) were resolved on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with primary phosphorylation-state-specific antibodies for p-ERK, p-p38 and p-JNK (from Cell Signaling Technology, Beverly, MA) at 1:1000 dilution in 5% BSA, 1 \times TBS and 0.1% Tween. Proteins were detected by Enhanced Chemiluminescence system of Pharmacia-Amersham. Subsequently, the membranes were stripped with a buffer containing 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS and 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 at 55 $^{\circ}$ C and reprobed with the antibodies detecting total ERK, p38 and JNK.

The intensity of the respective MMP, ADAM-TS4 and 28S RNA bands from different experiments was measured by densitometry using an Alpha Imager 2000 and software (Alpha Innotech, San Leandro CA), the MMP or ADAM-TS4 values divided by those of control 28S rRNA to get a mean quantitative estimate of inhibition and depicted by bar graphs made with the Microsoft Excel software. Similarly, the values of phosphorylated ERK1/2, p38 and JNK MAP kinases were divided by those of respective total protein bands and the resulting values presented by bar graph.

3. Results

3.1. IL-17 induces MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 gene expression in bovine articular chondrocytes

To examine IL-17 responsiveness of chondrocytes, these cells were treated with 5 to 50 ng/ml of human IL-17 and RNA analyzed by Northern hybridization. IL-17 dose-de-

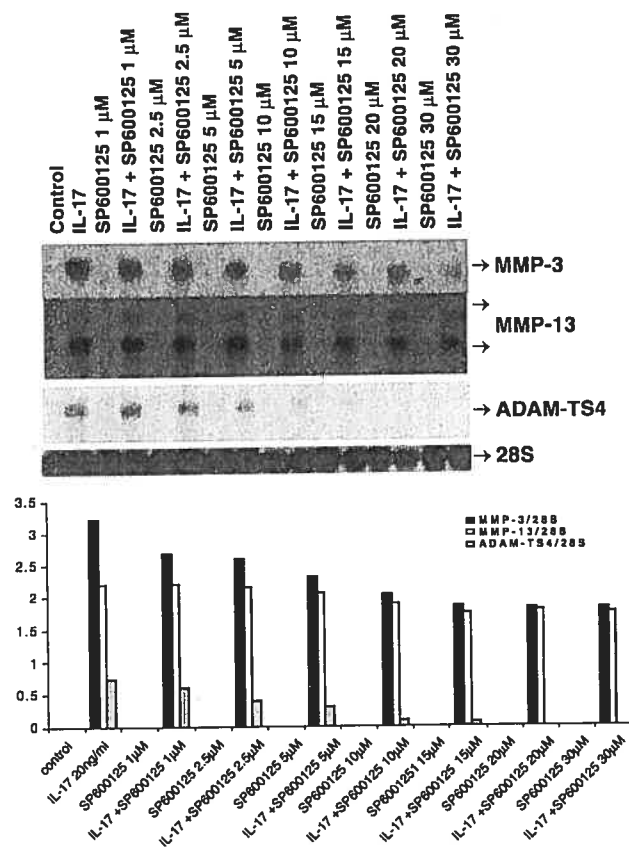


Fig. 5. Down-regulation of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by JNK inhibitor, SP600125. Bovine chondrocytes in serum-free medium were exposed to DMSO (vehicle, control) or pretreated with SP600125 for 30 min and followed by stimulation with IL-17 for 24 h. The MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels measured by Northern blot analysis are shown. The mean values (four experiments) of MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels divided by 28S rRNA levels are presented as bar graphs in the bottom panel.

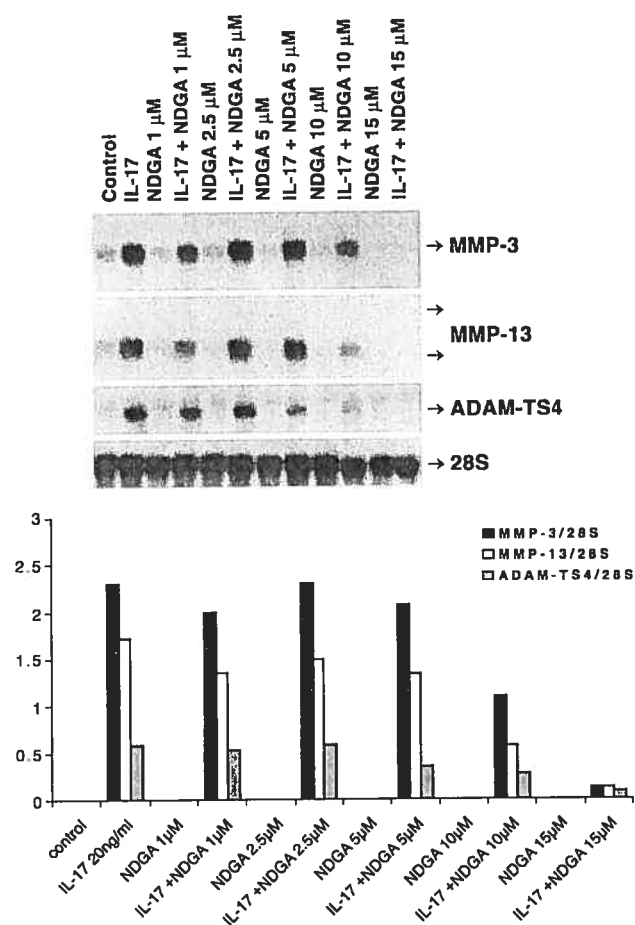


Fig. 6. Down-regulation of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by the AP-1 inhibitor, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Bovine chondrocytes in serum-free medium were pretreated with ethanol (control, NDGA vehicle) or with different doses of NDGA for 30 min followed by stimulation with IL-17 for 24 h. The MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels measured by Northern blot analysis are shown. The mean values (four experiments) of these mRNA levels divided by 28S rRNA levels are presented as bar graphs in the bottom panel.

pendently induced MMP-3 (0.2 to 1.7 fold), MMP-13 (0.4 to 2.8 fold) and aggrecanase-1 (ADAM-TS4) (0.3 to 1.3 fold) RNA expression without affecting the 28S control RNA (Fig. 1). An effective dose of 20 ng/ml was chosen for further experiments.

3.2. IL-17 stimulates phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in chondrocytes

To investigate the earlier molecular mechanisms of IL-17-stimulated up-regulation of MMPs and ADAM-TS4, chondrocytes in serum-free medium were stimulated with IL-17 for 5 to 60 min and protein extracts probed with MAPKs. As shown in Fig. 2, IL-17 increased the phosphorylation of ERK by 15 min (2.8 fold) that remained sustained for 60 min. Protein 38 (p38) phosphorylation peaked by 15 min (9 fold) and declined afterwards. JNK activation started by 5 min (18 fold) and remained elevated

(38 fold) up to 60 min. The levels of total proteins remained generally constant. Thus IL-17 activates ERK, p38 and JNK pathways in chondrocytes.

3.3. ERK-MAPK inhibitors down-regulate MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 gene expression

To investigate the role of ERK pathway in IL-17 signal transduction, chondrocytes were pretreated with the specific inhibitors of this pathway, PD98059 and U0126, either alone or with IL-17. PD98059 down-regulated IL-17-stimulated MMP-3 RNA expression by 23–49%, MMP-13 by 62–71% and ADAM-TS4 by 30–53% (Fig. 3A). U0126 suppressed RNA for MMP-3 by 68–87%, MMP-13 by 65–93% and ADAM-TS4 by 59–85% without affecting the control 28S RNA (Fig. 3B).

3.4. p38 and JNK inhibitors reduce IL-17-induced MMP and ADAM-TS4 gene expression

The role of p38 and JNK in IL-17-induced MMP and ADAM-TS4 expression was investigated by treating chon-

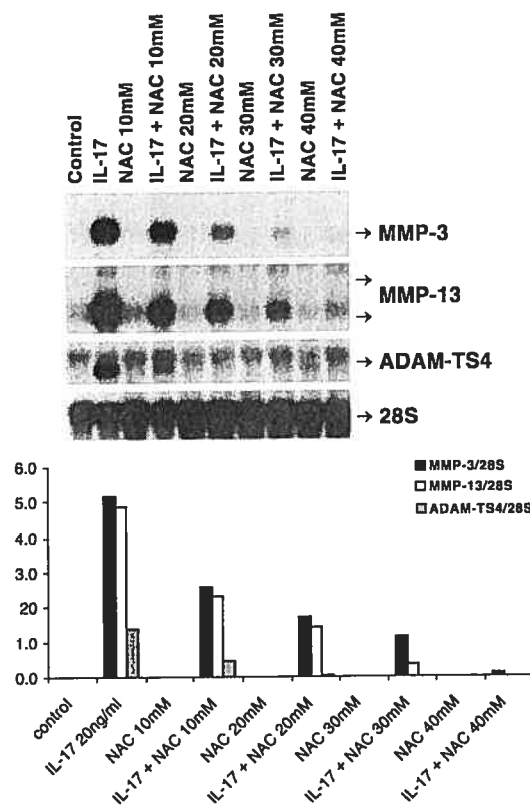


Fig. 7. Suppression of IL-17-induced MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by the AP-1 inhibitor, N-acetyl-L-cysteine (NAC). Bovine chondrocytes in serum-free medium were exposed to NAC for 30 min followed by stimulation with IL-17 for 24 h. The MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels measured by Northern blot analysis are shown. The mean values (four experiments) of MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels divided by 28S rRNA levels are presented as bar graphs in the bottom panel.

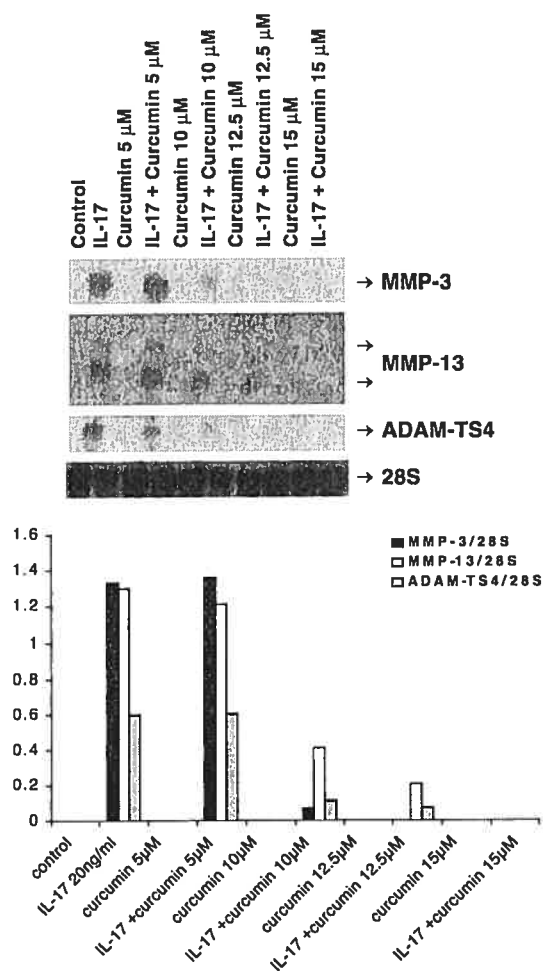


Fig. 8. Suppression of IL-17-stimulated MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 gene expression by curcumin. Bovine chondrocytes were exposed to ethanol (vehicle, control) or different doses of curcumin for 30 min and then treated with IL-17 for 24 h. MMP-3, MMP-13, ADAM-TS4 mRNA and 28S rRNA measured by Northern hybridization are shown. The mean values (four experiments) of MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 mRNA levels divided by 28S rRNA levels are presented as bar graphs in the bottom panel.

drocytes with SB203580. This is an inhibitor of p38 MAPK but at higher concentration also inhibits JNK pathway [23]. SB203580 dose-dependently reduced the induction of MMP-3 (54–90%), MMP-13 (51–97%) and ADAM-TS4 (41–92%) genes without affecting 28S rRNA levels (Fig. 4). A recent and relatively more specific inhibitor of JNK, SP600125 also down-regulated the induction of MMP-3 (17–43%), MMP-13 (14–21%) and ADAM-TS4 (46–100%) genes at 10–30 μ M dose range (Fig. 5).

3.5. Activating protein-1 (AP-1) inhibitors and antioxidants suppress IL-17-induced MMP and ADAM-TS4 genes

Since activation of MAPK pathways results in downstream activation of c-Fos (ERK) and c-Jun (JNK) components of AP-1 transcription factor, we investigated the involvement of AP-1 in IL-17-induced MMP-3, MMP-13

and ADAM-TS4 genes whose promoters contain AP-1 transcription factor binding sites [33–35]. Treatment of chondrocytes with the inhibitors of their expression, NDGA (*c-Fos*) [25] (Fig. 6) and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) (*c-Fos* and *c-Jun*) [26] (Fig. 7) coordinately suppressed induction of the three genes. NDGA suppressed RNA for MMP-3 by 13–95%, MMP-13 by 22–93% and ADAM-TS4 by 39–86%. Similarly, NAC decreased RNA for MMP-3 by 52–94%, MMP-13 by 50–99% and ADAM-TS4 by 67–100%.

3.6. Curcumin and nuclear factor kappa B inhibitor, BAY-11-7085, suppress induction of MMPs and ADAM-TS4 by IL-17

The implication of JNK and NF- κ B pathways in IL-17-stimulated MMP and ADAM-TS4 gene expression was explored by exposing chondrocytes to an inhibitor of these pathways, curcumin [27–29]. This anti-inflammatory agent

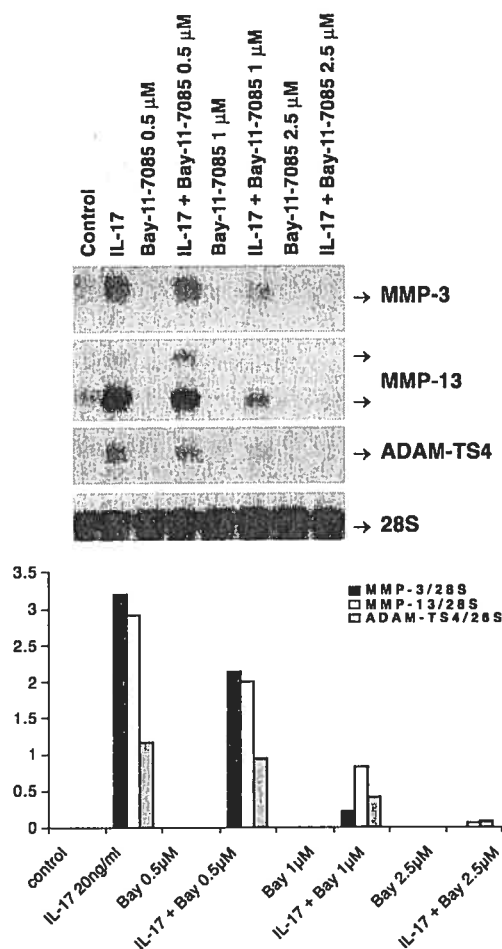


Fig. 9. Repression of IL-17-inducible MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 RNA expression by Bay-11-7085. Quiescent bovine chondrocytes were pretreated with the indicated concentrations of Bay-11-7085 for 30 min followed by IL-17 treatment for 24 h. The MMP-3, MMP-13, ADAM-TS4 mRNA and 28S rRNA levels measured by Northern hybridization are shown. The mean values (four experiments) of these mRNA levels divided by 28S rRNA levels are presented as bar graphs in the bottom panel.

completely (10–15 μ M dose range) blocked induction of MMP-3 (95–100%), MMP-13 (68–94%) and ADAM-TS4 (81–100%) genes by IL-17 (Fig. 8). The involvement of NF- κ B was further investigated by treating chondrocytes with its specific inhibitor, BAY-11-7085. This agent down-regulated the IL-17-induced expression of MMP-3 by 31–98%, MMP-13 by 31–98% and ADAM-TS4 by 19–93% without changing 28S rRNA levels (Fig. 9).

4. Discussion

We have demonstrated that the RA-associated proinflammatory cytokine, IL-17, activates three major MAP kinase pathways and coordinately induces MMP and ADAM-TS4 genes in articular chondrocytes. This induction is mediated in part by ERK, p38, JNK MAP kinases and AP-1 and NF- κ B transcription factors. Coordinate MMP and ADAM-TS4 induction by IL-17 demonstrates that bovine chondrocytes are a useful model for studying its signaling pathways. IL-17 induces MMP-3 in human chondrocytes and MMP-1 in RA synoviocytes; however, MMP-13 induction was not investigated [16,19]. We recently showed that MMP-3 and MMP-13 RNA and protein are induced by IL-17 in human femoral head chondrocytes [20]. Additionally, IL-17 stimulated the release of type II collagen and proteoglycans from bovine cartilage explants [36]. Thus the cartilage and bone resorption in human RA joints and in IL-17-injected mouse may be due to activation of multiple proteases by different cells in joints [17,18].

Activation of the three MAPK pathways by IL-17 is in accord with a previous study [19], although time-course in the two studies is somewhat different possibly due to culture conditions. The basal levels of phosphorylated ERK–MAPKs in bovine chondrocytes may be required for normal cell growth and survival. Further, sustained ERK phosphorylation may result in long-term activation of downstream target genes. Rapid activation of ERK, p38 and JNK MAPKs in these cells suggests that these are early events during the induction of MMPs and ADAM-TS4. Elevated levels of active kinases in rheumatoid tissues [37] may be due to increased IL-17 in joints. Thus, IL-17 signal transduction mechanisms for the catabolism of cartilage may involve all three MAPK pathways.

Coordinate inhibition of these genes by PD98059, U0126, SB203580 and SP600125 suggests that the three MAPK pathways are involved in IL-17-induced protease expression. IL-17 activates these pathways in bovine and human OA human chondrocytes in association with the induced nitric oxide (NO) [19,38]. These pathways may be conserved in different cell types and could induce multiple genes associated with inflammation and cartilage/bone resorption. Inhibition of MMPs and ADAM-TS4 by SB203580 at p38/JNK inhibitory concentrations (10–25 μ M) [23] and by a newer and more specific JNK inhibitor, SP600125 suggests the involvement of these pathways.

Since ERK pathway is implicated in the maintenance of chondrocyte differentiation and survival [39], utility of its inhibitors in arthritis is questionable. Inhibitors of p38 pathway, however, display anti-arthritic activity in animal models [40]. JNK inhibition modestly decreased paw inflammation but almost completely blocked AP-1 and collagenase-3-mediated joint damage in rat adjuvant-induced arthritis [24].

While the role of AP-1 transcription factor in MMP-3 and MMP-13 gene regulation has been partially studied [33,34], its importance in ADAM-TS4 promoter [35] is unknown. Suppression of MMP and ADAM-TS4 genes by the inhibitors of *c-Fos* (NDGA) and that of *c-Fos* and *c-Jun* (NAC) supports critical role of AP-1 in the regulation of these genes. Interestingly, mouse cells deficient in *c-Fos* gene cannot be induced with proinflammatory cytokines to express MMPs [41]. NDGA prevents the formation of Fos–Jun–DNA complex formation and reduces AP-1 activity [42]. Inhibition of AP-1 by antisense *c-Fos* oligonucleotides or by AP-1 binding decoy sequences in arthritic mouse joints inhibits, respectively, rheumatoid synovial fibroblast proliferation and joint destruction [43,44]. Our results support the recent observation where IL-17 activated different members of the AP-1 transcription factors, which bind with the MMP-13 promoter sequences [45]. Thus, blocking AP-1 activity by inhibition of ERK pathways and *c-Fos/c-Jun* expression may be useful for inhibiting cartilage degradation by MMPs and ADAM-TS4.

Curcumin is an anti-inflammatory agent which potently inhibits the JNK, AP-1 and NF- κ B pathways [27–29]. It also inhibits oncostatin M-induced JNK and JAK/STAT pathways in bovine and human chondrocytes [46]. Demonstration of IL-17-induced MMP/ADAM-TS4 suppression in this study and known anti-inflammatory properties of curcumin suggest that this agent may block or reduce cartilage damage in inflammatory arthritis. Interestingly, curcumin, NAC and NDGA also have antioxidant properties [47] and proinflammatory cytokines are known to increase reactive oxygen species (ROS) production as signaling mediators [26].

Down-regulation of MMP-3, MMP-13 and ADAM-TS4 induction by the specific inhibitor of NF- κ B, BAY-11-7085 [30], suggests that this transcription factor also plays an important role in IL-17-stimulated catabolic effects. Indeed, IL-17 increased activity of this factor in human chondrocytes [19]. While the targets of ERK and JNK pathways are the *c-Fos* and *c-Jun* components of AP-1 transcription factor whose binding sites are found in the human MMP-3 and MMP-13 promoters [33,34], the role of NF- κ B is not clear. Recent studies, however, support the indirect role of NF- κ B in the regulation of MMP genes via interaction with other transcription factors, as an inhibitor of this factor, I κ B α , reduced the expression of MMP-1, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 genes in human fibroblasts and chondrosarcoma cells [48].

Human arthritic joints contain multiple proinflammatory cytokines including IL-1, IL-17 and TNF- α , which synergistically augment joint inflammation and cartilage/bone loss [49,50]. Therefore, therapeutic strategies designed to inhibit the actions of multiple cytokines may be advantageous. Interestingly, inhibitors studied here also block MMP induction by IL-1 and TNF- α , suggesting activation of similar signaling pathways by proinflammatory cytokines. To conclude, our results suggest common signaling pathways regulating MMP and ADAM-TS4 genes. The inhibitors of ERK, p38 and JNK MAP kinases as well as AP-1 and NF- κ B transcription factors down-regulate IL-17-induced expression of the two major MMPs and aggrecanase-1 implicated in cartilage catabolism. Identification of these targets may lead to novel strategies for diminishing IL-17-stimulated cartilage damage in arthritis.

Acknowledgements

We acknowledge the grant support of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), The Arthritis Society (Canada) and Canadian Arthritis Network (CAN) and thank Anna Chelchowska for preparing the figures.

References

- [1] Mengshol JA, Mix KS, Brinckerhoff CE. *Arthritis Rheum* 2002;46:13–20.
- [2] Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB. *Matrix Biol* 2000;19:333–44.
- [3] Billingham RC, Wu W, Ionescu M, Reiner A, Dahlberg L, Chen J, et al. *Arthritis Rheum* 2000;43:664–72.
- [4] Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R, et al. *Science* 1999;284:1664–6.
- [5] Yamanaka H, Matsuda Y, Tanaka M, Sendo W, Nakajima H, Taniguchi A, et al. *Arthritis Rheum* 2000;43:852–8.
- [6] Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, et al. *Ann Rheum Dis* 2000;59:455–61.
- [7] Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, Lark MW. *Arthritis Rheum* 1992;35:35–42.
- [8] Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, et al. *J Clin Invest* 1996;97:761–8.
- [9] Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. *J Clin Invest* 1996;97:2011–9.
- [10] Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, et al. *J Clin Invest* 2001;107:35–44.
- [11] Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG, Ilic MZ, Handley CJ, Kelner GS, et al. *Eur J Biochem* 2001;268:1259–68.
- [12] Tetlow LC, Adlam DJ, Wooley DE. *Arthritis Rheum* 2001;44:585–94.
- [13] Goldring MB. *Arthritis Rheum* 2000;43:1916–26.
- [14] Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. *Arthritis Rheum* 1999;42:963–70.
- [15] Honorati MC, Meliconi R, Pulsatelli L, Cane S, Frizziero L, Facchini A. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:522–7.
- [16] Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P. *Cytokine* 2000;12:1092–9.
- [17] Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van den Berg W, Miossec P. *Arthritis Res* 2001;3:168–77.
- [18] Dudler J, Renggli-Zulliger N, Busso N, Lotz M, So A. *Ann Rheum Dis* 2000;59:529–32.
- [19] Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. *J Biol Chem* 1998;273:27467–73.
- [20] Sylvester J, Liacini A, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. *Mol Pharmacol* 2001;59:1196–205.
- [21] Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7686–9.
- [22] Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, et al. *J Biol Chem* 1998;273:18623–32.
- [23] Han Z, Boyle DL, Aupperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:124–301.
- [24] Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, et al. *J Clin Invest* 2001;108:73–81.
- [25] Haliday EM, Ramesha CS, Ringold G. *EMBO J* 1991;10:109–15.
- [26] Lo YY, Conquer JA, Grinstein S, Cruz TF. *J Cell Biochem* 1998;69:19–29.
- [27] Chen YR, Tan TH. *Oncogene* 1998;17:173–8.
- [28] Singh S, Aggarwal BB. *J Biol Chem* 1995;270:24995–5000.
- [29] Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, et al. *J Immunol* 1999;163:3474–83.
- [30] Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, et al. *J Biol Chem* 1997;272:21096–103.
- [31] Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- [32] Curtis CL, Hughes CE, Flannery CR, Little CB, Harwood JL, Caterson B. *J Biol Chem* 2000;275:721–4.
- [33] Buttice G, Quinones S, Kurkinen M. *Nucleic Acids Res* 1991;19:3723–31.
- [34] Pendas AM, Balbin M, Llano E, Jimenez MG, Lopez-Otin C. *Genomics* 1997;40:222–33.
- [35] Mizui Y, Yamazaki K, Kuboi Y, Sagane K, Tanaka I. *Mol Biol Rep* 2000;27:167–73.
- [36] Koshy PJ, Henderson N, Logan C, Life PF, Cawston TE, Rowan AD. *Ann Rheum Dis* 2002;61:704–13.
- [37] Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, et al. *Arthritis Rheum* 2000;43:2501–12.
- [38] Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, Di Battista JA, Pelletier JP. *Arthritis Rheum* 1999;42:2399–409.
- [39] Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, de Souza P, John T, Rahmzadeh M, Rahmzadeh R, et al. *J Biol Chem* 2001;276:13289–94.
- [40] Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, Lee JC, Adams JL, Griswold DE. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:1453–61.
- [41] Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA. *J Biol Chem* 1996;271:23577–81.
- [42] Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM. *J Biol Chem* 1998;273:4616–21.
- [43] Morita Y, Kashihara N, Yamamura M, Okamoto H, Harada S, Kawashima M, et al. *Ann Rheum Dis* 1998;57:122–4.
- [44] Shiozawa S, Shimizu K, Tanaka K, Hino K. *J Clin Invest* 1997;99:1210–6.
- [45] Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P, et al. *J Rheumatol* 2002;29:1262–72.
- [46] Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. *J Immunol* 2001;166:3491–8.
- [47] Brennan P, O'Neill LA. *Biochem Pharmacol* 1998;55:965–73.
- [48] Bondeson J, Brennan F, Foxwell B, Feldmann M. *J Rheumatol* 2000;27:2078–89.
- [49] LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, et al. *Arthritis Rheum* 2001;44:2078–83.
- [50] Chabaud M, Miossec P. *Arthritis Rheum* 2001;44:1293–303.

III. Discussion

L'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 sont des cytokines pro-inflammatoires les plus importantes dans le déclenchement de catabolisme cartilagineux chez les patients OA et RA. Nous avons démontré que ces cytokines pro-inflammatoires exercent leurs effets destructifs via les voies de signalisation MAPKs, en stimulant l'expression des gènes MMP-3, MMP-13 et ADAM-TS4 dans les chondrocytes. L'inhibition de l'expression des gènes MMPs par PD98059, U0126, SB203580, SP600125, curcumin, NDGA, NAC, Bay-11-7085 et le PDTC suggère bien que les voies de signalisation ERK, p38 et JNK-MAPK ainsi que les facteurs de transcriptions AP-1 et NF κ B sont des médiateurs puissants de l'expression des gènes MMPs en réponse à une stimulation par ces cytokines pro-inflammatoires. Cette induction de la MMP-13, de la MMP-3 et d'ADAM-TS4 par les chondrocytes indique que, premièrement ce type cellulaire répond à la stimulation avec l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 et deuxièmement que les gènes MMP13, MMP-3 et ADAM-TS4 constituent une cible pour ces cytokines. La MMP-13, la MMP-3 et ADAM-TS4 sont des enzymes protéolytiques responsables de la dégénérescence tissulaire des articulations (la hanche, le genou, la cheville et l'épaule par exemple) chez les patients RA et OA. Cette induction des gènes MMPs (MMP-13, MMP-3) est en corrélation avec d'autres études effectuées sur des chondrocytes dérivés du cartilage de genou humain et rongeur (lapin) où une surexpression des ARN de MMPs a été démontrée (29,58,61,208,209). Le niveau de phosphorylation basale pour ERK plaide en faveur de son rôle clé dans la croissance et la survie des chondrocytes (210). La phosphorylation rapide de ERK, p38 et JNK MAPK dans les chondrocytes en réponse à une stimulation avec l'IL-1 β , TNF- α et l'IL-17 suggère que le

recrutement de ces voies constitue les événements précoces de l'induction des gènes MMP-13, MMP-3 et ADAM-TS4. Ce résultat est en corrélation avec d'autres études où une activation des MAPKs a été démontrée dans les chondrocytes humains et rongeurs et dans les cellules de chondrosarcome SW1353 (211-213). D'une manière intéressante, ces protéines kinases ont été localisées sous forme active dans la membrane synoviale RA, et elles sont probablement activées par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 dans les fibroblastes synoviaux (174). Ces trois voies de MAPKs seraient responsables de la médiation catabolique d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-17, autrement dit, ces cytokines pro-inflammatoires assurent la dégradation du cartilage via les voies de signalisation MAPKs. La répression de l'expression des gènes MMP-13, MMP-3 et ADAM-TS4 par les inhibiteurs spécifiques d'ERK (U0126, PD98059) montre l'implication de cette voie dans la transduction du signal d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-17, qui aboutit à l'expression des gènes MMPs et ADAM-TS4 dans les chondrocytes. De même, l'inhibition de ces trois gènes MMP-13, MMP-3 et ADAM-TS4 par les inhibiteurs de p38, JNK (SB203580, SB203590, curcumin) plaide en faveur de l'implication de ces voies dans la transcription de ces gènes. Chez le rat, une étude a montré que la régulation de la collagénase interstitielle (MMP-1) par l'IL-1 β se fait par un mécanisme Ras-ERK-dépendant (214). De même, l'inhibition de l'expression de la MMP-1 et de la MMP-3 induite par l'IL-1 β avec le SB203580 a également été obtenue dans les fibroblastes dermiques humains et le cartilage bovin (215). Dès lors, la voie p38 est une cascade clé dans la médiation du signal catabolique de l'IL-1 β . L'inhibiteur de p38, SB203580, réprime l'expression de la MMP-13 induite par l'IL-1 β dans les chondrocytes de lapin et les cellules SW1353 (213). Cependant, cette étude n'a pas démontré un effet de PD98059 sur l'expression de MMP-13, résultat en opposition avec la nôtre, qui serait

probablement due à la différence entre les espèces et les types cellulaires. A une concentration plus forte (10 à 25 μM), SB203580 non seulement inhibe p38, mais aussi inhibe la voie JNK (182). La détection de l'ARNm de la MMP-13 chez presque tous les patients arthritiques, comparé aux tissus non arthritiques suggère un rôle direct de cette enzyme dans la destruction de l'articulation. Vu que la MMP-13 est une enzyme bifonctionnelle, possédant une double activité collagénolytique et aggrecanolytique, elle est considérée comme la principale enzyme responsable de la résorption cartilagineuse (53,58,61). La détection d'autres enzymes de la famille ADAM-TS (ADAM-TS4 et ADAM-TS5) suggère que le collagène et les aggrecans de l'ECM subissent des dégradations en fragments libres par une action de multiples protéases de plusieurs familles incluant la MMP-13, la MMP-3 et ADAM-TS4. Nos résultats pour activation de MAPKs sont en corrélation avec d'autres études qui ont montré une stimulation par phosphorylation rapide de ces cascades par le TNF- α (211). Ces résultats sont fortement soutenus par une inhibition complète de l'expression de la MMP-13 observée en utilisant une technique génétique à base des oligo nucléotides antisenses pour ERK (ODN). Une étude a démontré une chute de l'activité transcriptionnelle d'AP-1 avec le NDGA. Cet agent pourrait agir par un mécanisme nécessitant le blocage de l'activité de la lipooxygénase d'où la répression de la synthèse des métabolites de l'acide arachidonique entre autre le 5HPETE (Hydro-Peroxy Eicosa Tetraenoic acids), connue par son pouvoir d'induire l'expression de c-fos (216). Une autre étude a démontré le rôle d'un autre métabolite de la lipooxygénase dans un modèle animal murin CIA. Il s'agit de LTB₄ qui exerce un chimiotropisme puissant qui se manifeste par une infiltration considérable des neutrophiles dans les tissus articulaires (217). On en conclut que l'inhibition de c-fos via les cascades ERK, JNK MAPKs ou via la voie

de la lipooxygénase aboutit à une répression de l'expression de la MMP-13 induite par le TNF- α . Cependant, la répression de l'expression du gène MMP-13 avec l'utilisation de curcumin montre le rôle clé du facteur de transcription AP-1 dans la régulation de gène MMP13. La neutralisation de l'activité transcriptionnelle d'AP-1 par inhibition de la voie ERK, l'expression de c-fos/c-Jun et la voie de lipooxygénase pourraient être utilisées afin de protéger la texture du cartilage contre toute dégradation par les MMPs. Le curcumin est un agent anti-inflammatoire qui inhibe aussi les voies JNK et NF κ B (218,219). L'inhibition de la MMP-1 et la MMP-13 par SB203580, SP600125 en réponse à une stimulation avec IL-1 β a également été observé dans les fibroblastes RA, un type cellulaire très différent des chondrocytes (182,193). Le rôle de ces voies de transduction du signal MAPKs pour l'induction de la MMP-13 par le TNF- α est aussi observé dans les cellules SW1353 (chondrosarcoma) comme le montre cette étude. L'implication de NF κ B dans la régulation des gènes MMPs pourrait être expliquée par le phénomène de l'activation croisée d'AP-1 et de NF κ B dans le noyau cellulaire. Ceci aura comme conséquence d'abolir ou de réduire l'expression de leurs gènes cibles à l'image de MMPs et ADAM-TS4 (220).

L'IL-17 induit l'expression de la MMP-3 dans les chondrocytes humains, et de la MMP-1 dans les synoviocytes RA. Par contre, l'induction de la MMP-13 n'a pas été investiguée (141,154). Récemment, nous avons mis en évidence que l'IL-17 assure l'expression de l'ARNm MMP-13, MMP-3 et les protéines correspondantes dans les chondrocytes humains (156). L'IL-17 active la libération des fragments du collagène II et des protéoglycanes à partir d'explants de cartilage (221). Une simple incubation pendant 24h de ces explants en présence de l'IL-17 et l'analyse du milieu de culture révèle que cette cytokine augmente considérablement la vitesse à laquelle les macromolécules quittent la matrice extracellulaire

(ECM) sous forme de fragments libres (221). De même, une étude a montré que l'injection intra-articulaire de l'IL-17 chez la souris entraîne une destruction de l'articulation marquée par une inflammation, une dégradation cartilagineuse et une résorption osseuse (150,222). La pathologie destructive RA chez les patients et les modèles animaux expérimentaux CIA et AIA pourrait être expliquée par une synthèse excessive des enzymes protéolytiques MMPs, ADAM-TS4 par les différents types cellulaires de l'articulation (150,222). La destruction du cartilage observée chez les patients RA et OA est la preuve d'une abondance du catabolisme de la matrice extracellulaire (ECM) par les MMPs synthétisées par les chondrocytes et les synoviocytes enflammés en réponse à une stimulation avec les cytokines pro-inflammatoires. Le TNF- α et l'IL-1 β provoquent la dégradation du cartilage *in vitro*. Quand elles sont ajoutées aux explants du cartilage, une libération des fragments de protéoglycanes au bout de 12 à 24h (118) et une chute de la synthèse de macromolécules comme le collagène II, IX et les protéoglycanes sont observées (119). Une étude *in vivo* a démontré une importante synergie entre le TNF- α et l'IL-1 β pour la dégradation du cartilage (223,224). L'injection intra-articulaire d'IL-1 β provoque la pathologie destructive du cartilage alors qu'une injection combinée de TNF- α et IL-1 β augmente considérablement l'agressivité de la pathologie (225). Dans un modèle animal RA, le traitement avec les anticorps anti-TNF- α ou le récepteur soluble de TNF- α (sTNFR), et l'agoniste du récepteur de IL-1, montre une réduction de l'inflammation et de la destruction articulaire. Ceci démontre que l'IL-1 β a un rôle clé dans la persistance de l'inflammation et de la dégénérescence cartilagineuse (86).

Des études ont démontré le rôle anti-arthritique des inhibiteurs de p38 (SB203580) chez la souris (185) et de JNK (SP600125) où une réduction significative de l'inflammation

articulaire et une inhibition complète de l'activité transcriptionnelle d'AP-1 et de MMP-13 ont été observées. AP-1 et MMP-13 étant des médiateurs destructifs de l'articulation chez le rat AIA (193). L'inhibition de l'expression de MMP-3, MMP-13 et ADAM-TS4 induites par l'IL-1 β (MMP-3, MMP-13), le TNF- α (MMP-13) et l'IL-17 (MMP-3, MMP-13, ADAM-TS4) avec le curcumin ou le SP600125 montre bien l'implication des voies JNK, NF κ B ainsi que le facteur de transcription AP-1 dans la transcription des gènes MMPs et ADAM-TS4. Le curcumin, agent connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, réprime la phosphorylation de JNK et les activités transcriptionnelles de facteurs de transcriptions AP-1 et NF κ B (218,219,226). Les activités anti-inflammatoires du curcumin lui confèrent des propriétés très intéressantes pour des médicaments anti-arthritiques. En corrélation avec nos résultats, une étude a démontré l'importance des facteurs de transcription AP-1 et NF κ B dans la transcription et la régulation des gènes MMP-1, MMP-13 dans les cellules SW1353 (213). L'implication de NF κ B dans cette régulation a été prouvée par une répression de l'expression de la MMP-3, MMP-13 et ADAM-TS4 induites par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-17 en utilisant des inhibiteurs de NF κ B : BAY117085, MG132, proteasome inhibitor I et PDTC (227). Ces résultats suggèrent que ce facteur de transcription est un médiateur important pour les effets cataboliques exercés par ces cytokines. De même, l'IL-17 augmente l'activité transcriptionnelle de NF κ B dans les chondrocytes humains (154). Une étude a démontré le rôle indirect de NF κ B dans la régulation de l'expression de MMPs, ceci via l'interaction avec d'autres facteurs de transcription, comme sa liaison avec son inhibiteur cytoplasmique I κ B qui aboutie à une inhibition de l'expression de MMP-1, MMP-3, MMP-9 et MMP-13 dans les fibroblastes humains et les cellules SW1353 (228). L'articulation arthritique contient différents types de

cytokines pro-inflammatoires, incluant l'IL-1 β , TNF- α et l'IL-17, lesquelles agissent en synergie et augmentent par conséquent l'inflammation, la dégradation cartilagineuse et la résorption osseuse (138,144). Une thérapie à action multiple qui a pour cible ces trois cytokines pourrait améliorer l'efficacité des agents utilisés pour le traitement (87). Le rôle du facteur de transcription AP-1 dans la régulation de MMP-3, MMP-13 est largement documenté (229-231). La régulation d'ADAM-TS4 par AP-1 reste à élucider, alors que celle de NF κ B (aucun site n'a été identifié dans les promoteurs de MMPs) dans l'induction de MMPs en réponse à une stimulation avec l'IL-1 β , TNF- α et l'IL-17 est supportée par les études de Mengshol et al., Meyer et al., Jobin et al., et Chen et al. (213,218,226,227). De plus, la neutralisation de l'activité de NF κ B par une surexpression de son inhibiteur cytoplasmique I κ B permet une réduction significative de l'inflammation et de la destruction par MMP-1 et MMP-3 dans le tissu synovial RA et les fibroblastes dermiques (206,232). De même, la répression de l'expression des gènes MMPs et ADAM-TS4 induits par l'IL-17 avec l'utilisation des inhibiteurs de c-Fos (NDGA), de c-Fos et de c-Jun (NAC) montre le rôle crucial de facteur de transcription AP-1 dans la régulation à la fois de gènes MMPs et ADAM-TS4. D'une manière intéressante, les cellules de souris déficientes en c-Fos (c-fos^{-/-}) n'expriment pas les MMPs en réponse à une stimulation par les cytokines pro-inflammatoires (209). Des injections intra-articulaire des oligo antisense ou des cDNA decoy pour AP-1 chez la souris CIA réduit significativement le degré de l'inflammation autrement-dit réduction de la prolifération des synoviocytes RA et la destruction de l'articulation (233,234). Notre résultat confirme une étude récente où l'IL-17 active les membres de facteur de transcription AP-1 et leur liaison avec la séquence régulatrice de promoteur MMP-13 (145). La neutralisation de l'activité d'AP-1 par l'inhibition de la voie

ERK et de l'expression de c-fos/c-Jun pourrait être utilisée afin de protéger la texture de cartilage contre toute dégradation par les MMPs et ADAM-TS4. Le curcumin est un agent anti-inflammatoire qui inhibe les voies JNK et NF κ B ainsi que le facteur AP-1. Il a été démontré que cet agent inhibe aussi les voies JNK et JAK/STAT induites par l'OSM dans les chondrocytes humains et bovins (235). En conclusion nous avons démontré que l'expression de MMP-3, MMP-13 et ADAM-TS4 en réponse à une stimulation avec l'IL-1 β , TNF- α et l'IL-17 implique différents mécanismes à l'image de l'activation des voies de signalisation ERK, p38, et JNK ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. Nous avons démontré le rôle, jusqu'à présent peu connu, des voies de signalisation d'ERK, p38 et de JNK MAPKs, ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B en tant que médiateurs essentiels pour l'expression de la MMP-13, la MMP-3, et ADAM-TS4 induites par le TNF- α , IL-17 et IL-1 β . Ces inhibiteurs devraient être évalués pour améliorer l'efficacité des agents utilisés dans le traitement de l'arthrose ou pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette pathologie. La neutralisation de ces deux protéines majeurs MMPs et l'aggrecanase-1 impliqués dans la dégénérescence cartilagineuse constitue une cible thérapeutique pour contrecarrer au mieux la pathologie dégénérative du cartilage RA et OA (Fig. 10).

IV. Conclusion

La méconnaissance des facteurs étiologiques et la complexité de la pathogénie de l'arthrite et de l'arthrose présentent un déficit pour identifier les cibles thérapeutiques afin de contrecarrer au mieux la maladie. Actuellement, plusieurs traitements sont envisageables afin de diminuer les incapacités fonctionnelles et la douleur reliée à l'arthrose (OA) ou à l'arthrite rhumatoïde (RA). Aux tous premiers stades de la pathologie, il est possible de stopper le processus inflammatoire en utilisant des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs), lesquels abolissent le système COX/PGE2. Cependant, les patients avec des symptômes sévères doivent être traités par des agents à base de DMARDs (methotrexate (MTX), sulfasalazine (SSZ) et hydroxychloroquine (HCQ)) ou des agents anti-TNF α (Infliximab, Etanercept) ou anti-IL-1. Malheureusement ces traitements, ne sont pas suffisants parce que les symptômes persistent ou s'aggravent. Toutefois, la constance de la thérapie sous anti-TNF α , l'efficacité clinique et la surveillance contre les effets secondaires (allergie, infection, tumeurs) restent les enjeux pour le futur. Afin de considérer une nouvelle thérapie comme un véritable traitement de cette maladie invalidante, le traitement doit être focalisé directement sur les molécules impliquées dans la destruction articulaire à l'image de MMPs et ADAM-TS. La transduction de signal est une cible pour développer des interventions thérapeutiques. Une voie de signalisation spécifique ou un facteur de transcription cible pourrait interrompre les perturbations et les mécanismes cataboliques responsables de l'arthrite ou de toute forme de maladie auto-immune chronique. Donc une inhibition d'une voie ou d'un facteur de transcription pourrait rétablir l'homéostasie du cartilage articulaire. Nous avons démontré que l'expression de MMP-3, MMP-13 et ADAM-TS4 en réponse à une stimulation avec l'IL-1, le TNF- α et

l'IL-17 implique différents mécanismes à l'image de l'activation des voies de signalisation ERK, p38, et JNK ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. Nous avons démontré le rôle, jusqu'à présent inconnu, des voies de signalisation d'ERK, p38 et de JNK MAPKs, ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B en tant que médiateurs essentiels pour l'expression de MMP-13, MMP-3, et ADAMTS-4 induites par l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-17. Ces inhibiteurs devraient être évalués pour améliorer l'efficacité des agents utilisés dans le traitement de l'arthrite, l'arthrose ou pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette pathologie.

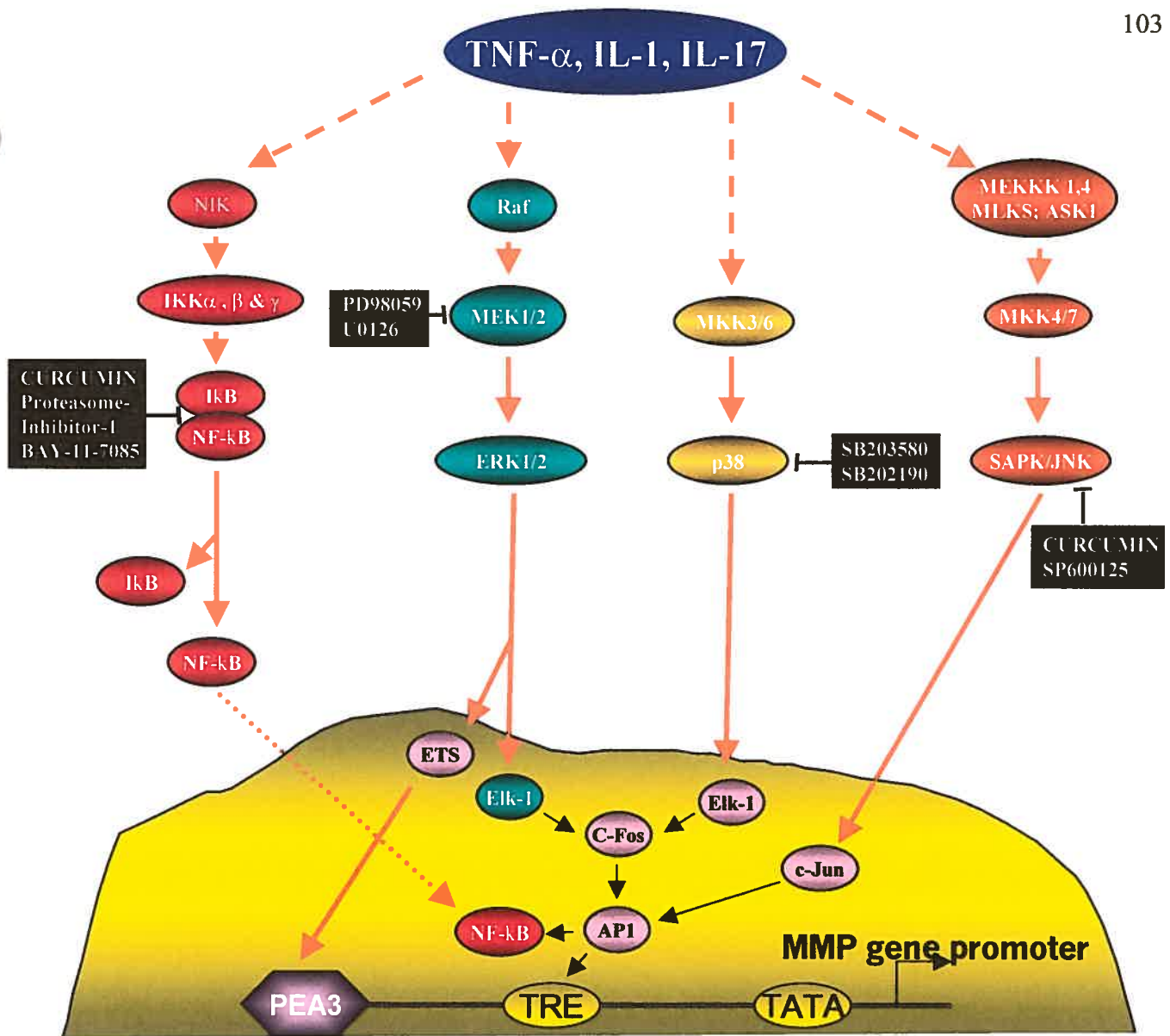


Figure 10: Représentation schématique des effets cataboliques des cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 β , le TNF α , et l'IL-17.

V. Bibliographie

- (1) Health Canada 2003: Arthritis in Canada An ongoing challenge. Santé Canada 2004; Cat. # H34-9/14-2003F.
- (2) Poole RA. Cartilage in health and disease. In: Williams & Wilkins, editor. Arthritis and allied conditions: A text book of rheumatology. 1997: 255-308.
- (3) Poole AR. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. Front Biosci 1999; 4:D662-D670.
- (4) Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheum 2000; 43(9):1916-1926.
- (5) Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays 1995; 17(12):1039-1048.
- (6) Redini F. Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression. Pathol Biol (Paris) 2001; 49(4):364-375.
- (7) Grover J, Roughley PJ. Expression of cell-surface proteoglycan mRNA by human articular chondrocytes. Biochem J 1995; 309 (Pt 3):963-968.
- (8) Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J. The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994; 32(4):249-257.
- (9) Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2003; 42 Suppl 2:ii11-ii16.

- (10) Sinkov V, Cymet T. Osteoarthritis: understanding the pathophysiology, genetics, and treatments. *J Natl Med Assoc* 2003; 95(6):475-482.
- (11) Felson DT, Neogi T. Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis Rheum* 2004; 50(2):341-344.
- (12) Corti MC, Rigon C. Epidemiology of osteoarthritis: prevalence, risk factors and functional impact. *Aging Clin Exp Res* 2003; 15(5):359-363.
- (13) Kean WF, Kean R, Buchanan WW. Osteoarthritis: symptoms, signs and source of pain. *Inflammopharmacology* 2004; 12(1):3-31.
- (14) Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Tobin JD. Bone mineral density and osteoarthritis: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 Suppl A:S45-S48.
- (15) Crepaldi G, Punzi L. Aging and osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res* 2003; 15(5):355-358.
- (16) Felson DT. Obesity and vocational and avocational overload of the joint as risk factors for osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 2004; 70:2-5.
- (17) Huang MH, Chen CH, Chen TW, Weng MC, Wang WT, Wang YL. The effects of weight reduction on the rehabilitation of patients with knee osteoarthritis and obesity. *Arthritis Care Res* 2000; 13(6):398-405.
- (18) Bray GA. Risks of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32(4):787-804, viii.
- (19) Jordan JM, Kraus VB, Hochberg MC. Genetics of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6(1):7-13.
- (20) Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 Suppl A:S39-S44.

- (21) Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1):45-53.
- (22) Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1):5-18.
- (23) Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6):1237-1247.
- (24) Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA et al. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2003; 278(46):45539-45545.
- (25) Cancedda R, Descalzi CF, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 1995; 159:265-358.
- (26) Poole AR, Rizkalla G, Ionescu M, Reiner A, Brooks E, Rorabeck C et al. Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. *Agents Actions Suppl* 1993; 39:3-13.
- (27) Pelletier JP, Faure MP, DiBattista JA, Wilhelm S, Visco D, Martel-Pelletier J. Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1, and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1993; 142(1):95-105.
- (28) Roughley PJ, Nguyen Q, Mort JS, Hughes CE, Caterson B. Proteolytic degradation in human articular cartilage: its relationship to stromelysin. *Agents Actions Suppl* 1993; 39:149-159.
- (29) Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ. Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage. *J Clin Invest* 1992; 89(4):1189-1197.

- (30) Martel-Pelletier J, Faure MP, McCollum R, Mineau F, Cloutier JM, Pelletier JP. Plasmin, plasminogen activators and inhibitor in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol* 1991; 18(12):1863-1871.
- (31) Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *J Orthop Res* 1990; 8(3):336-344.
- (32) Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ. Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem J* 1990; 266(2):569-573.
- (33) Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992; 35(5):530-540.
- (34) Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-21494.
- (35) Pincus T, Sokka T, Wolfe F. Premature mortality in patients with rheumatoid arthritis: evolving concepts. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6):1234-1236.
- (36) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:397-440.
- (37) Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42 Suppl 2:ii3-10.
- (38) Fox DA. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. *Arthritis Rheum* 1997; 40(4):598-609.
- (39) Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996; 39(11):1781-1790.
- (40) Dayer JM, Fenner H. The role of cytokines and their inhibitors in arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1992; 6(2):485-516.

- (41) Miossec P. Cytokine abnormalities in inflammatory arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1992; 6(2):373-392.
- (42) Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 1981; 2(8251):839-842.
- (43) Morales-Ducret J, Wayner E, Elices MJ, Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 1992; 149(4):1424-1431.
- (44) Arner EC, Pratta MA, Trzaskos JM, Decicco CP, Tortorella MD. Generation and characterization of aggrecanase. A soluble, cartilage-derived aggrecan-degrading activity. *J Biol Chem* 1999; 274(10):6594-6601.
- (45) Arner EC. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2(3):322-329.
- (46) Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999; 284(5420):1664-1666.
- (47) Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I et al. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 2000; 275(24):18566-18573.
- (48) Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(6):539-552.
- (49) Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol Ther* 1996; 70(3):163-182.

- (50) Cuvelier A, Kuntz C, Sesboue R, Muir JF, Martin JP. [Metalloproteinases in the extracellular matrix: structure and activity]. *Rev Mal Respir* 1997; 14(1):1-10.
- (51) Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.
- (52) Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8):2145-2154.
- (53) Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 1997; 40(11):2065-2074.
- (54) Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1534-1545.
- (55) Clark IM, Powell LK, Ramsey S, Hazleman BL, Cawston TE. The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36(3):372-379.
- (56) Ishiguro N, Ito T, Ito H, Iwata H, Jugessur H, Ionescu M et al. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(1):129-136.
- (57) Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271(3):1544-1550.
- (58) Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996; 97(9):2011-2019.

- (59) Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001; 44(3):585-594.
- (60) Dahlberg L, Billingham RC, Manner P, Nelson F, Webb G, Ionescu M et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum* 2000; 43(3):673-682.
- (61) Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97(3):761-768.
- (62) Fosang AJ, Last K, Maciewicz RA. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J Clin Invest* 1996; 98(10):2292-2299.
- (63) Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, Lohmander LS. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* 1992; 89(5):1512-1516.
- (64) Fosang AJ, Last K, Knauper V, Neame PJ, Murphy G, Hardingham TE et al. Fibroblast and neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain. *Biochem J* 1993; 295 (Pt 1):273-276.
- (65) Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendas AM, Llano E et al. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Lett* 2000; 478(1-2):52-56.

- (66) Lark MW, Gordy JT, Weidner JR, Ayala J, Kimura JH, Williams HR et al. Cell-mediated catabolism of aggrecan. Evidence that cleavage at the "aggrecanase" site (Glu373-Ala374) is a primary event in proteolysis of the interglobular domain. *J Biol Chem* 1995; 270(6):2550-2556.
- (67) Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* 2000; 19(4):333-344.
- (68) Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15(5):805-829.
- (69) Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36(9):1214-1222.
- (70) Lubberts E, van den Berg WB. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Adv Exp Med Biol* 2003; 520:194-202.
- (71) van den Berg WB, Joosten LA, Lubberts E. Cytokine-directed targeting in chronic arthritis. *Curr Dir Autoimmun* 2000; 2:103-125.
- (72) Joosten LA, Koenders MI, Smeets RL, Heuvelmans-Jacobs M, Helsen MM, Takeda K et al. Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 2003; 171(11):6145-6153.
- (73) Sims JE. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(1):117-122.
- (74) Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 1999; 284(5412):309-313.

- (75) Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M et al. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkkappaB kinase. *Science* 1999; 284(5412):316-320.
- (76) Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 856:1-11.
- (77) Strand V, Kavanaugh AF. The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(Suppl_3):III10-III16.
- (78) Dayer JM. The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2002; 69(2):123-132.
- (79) Stabellini G, De Mattei M, Calastrini C, Gagliano N, Moscheni C, Pasello M et al. Effects of interleukin-1beta on chondroblast viability and extracellular matrix changes in bovine articular cartilage explants. *Biomed Pharmacother* 2003; 57(7):314-319.
- (80) Chowdhury TT, Bader DL, Lee DA. Dynamic compression counteracts IL-1 beta-induced release of nitric oxide and PGE2 by superficial zone chondrocytes cultured in agarose constructs. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11(9):688-696.
- (81) Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2002; 21(3):251-262.
- (82) Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 2003; 288(1):208-217.

- (83) Tortorella M, Pratta M, Liu RQ, Abbaszade I, Ross H, Burn T et al. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25791-25797.
- (84) Pratta MA, Scherle PA, Yang G, Liu RQ, Newton RC. Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis Rheum* 2003; 48(1):119-133.
- (85) Liacini A, Zafarullah M. Induction of ADAMTS-4 by interleukin-1: comment on the article by Pratta et al. *Arthritis Rheum* 2004; 50(6):2038-2039.
- (86) van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van de Loo FA. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 Suppl 1:I40-I48.
- (87) Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 2004; 50(1):277-290.
- (88) Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998; 41(12):2196-2204.
- (89) Kim JM, Jeong JG, Ho SH, Hahn W, Park EJ, Kim S et al. Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist. *Gene Ther* 2003; 10(18):1543-1550.
- (90) Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, Toyama Y, Matsumoto H, Fujikawa K et al. Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice. *J Immunol* 2004; 172(1):577-584.
- (91) Goldring SR, Gravalles EM. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12(3):195-199.

- (92) Arend WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30(5 Suppl 2):1-6.
- (93) Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(20):11008-11013.
- (94) Ma Y, Thornton S, Boivin GP, Hirsh D, Hirsch R, Hirsch E. Altered susceptibility to collagen-induced arthritis in transgenic mice with aberrant expression of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998; 41(10):1798-1805.
- (95) Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191(2):313-320.
- (96) Chikanza IC, Roux-Lombard P, Dayer JM, Panayi GS. Dysregulation of the in vivo production of interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. Pathogenetic implications. *Arthritis Rheum* 1995; 38(5):642-648.
- (97) Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:27-55.
- (98) Dayer JM, Feige U, Edwards CK, III, Burger D. Anti-interleukin-1 therapy in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13(3):170-176.
- (99) Chizzolini C, Chicheportiche R, Burger D, Dayer JM. Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1beta while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur J Immunol* 1997; 27(1):171-177.
- (100) Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 1994; 269(35):22027-22033.

- (101) Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391(6665):344-345.
- (102) Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG et al. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum* 1998; 41(10):1748-1759.
- (103) Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(3-4):185-191.
- (104) Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3:S243-S252.
- (105) Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(3-4):181-184.
- (106) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381):1305-1308.
- (107) Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114(2):181-190.
- (108) Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278(28):25534-25541.
- (109) Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity* 2003; 18(5):655-664.

- (110) Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281(5383):1680-1683.
- (111) Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 2001; 21(16):5299-5305.
- (112) Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:331-367.
- (113) Jobin C, Holt L, Bradham CA, Streetz K, Brenner DA, Sartor RB. TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162(8):4447-4454.
- (114) Tetta C, Camussi G, Modena V, Di Vittorio C, Baglioni C. Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990; 49(9):665-667.
- (115) Cooper WO, Fava RA, Gates CA, Cremer MA, Townes AS. Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clin Exp Immunol* 1992; 89(2):244-250.
- (116) Plows D, Kontogeorgos G, Kollias G. Mice lacking mature T and B lymphocytes develop arthritic lesions after immunization with type II collagen. *J Immunol* 1999; 162(2):1018-1023.
- (117) Douni E, Akassoglou K, Alexopoulou L, Georgopoulos S, Haralambous S, Hill S et al. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 1995; 47(1-2):27-38.
- (118) Arner EC, Hughes CE, Decicco CP, Caterson B, Tortorella MD. Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6(3):214-228.

- (119) van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ, van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38(2):164-172.
- (120) 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(2):151-160.
- (121) 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(9):1125-1132.
- (122) Muller-Ladner U, Gay S. The SCID mouse--a novel experimental model for gene therapy in human rheumatoid arthritis. *Drugs Today (Barc)* 1999; 35(4-5):379-388.
- (123) Jorgensen C, Couret I, Canovas F, Bologna C, Brochier J, Reme T et al. Mononuclear cell retention in rheumatoid synovial tissue engrafted in severe combined immunodeficient (SCID) mice is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and mediated through intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Clin Exp Immunol* 1996; 106(1):20-25.
- (124) Deleuran BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Mitchell T, Feldmann M et al. Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1992; 35(10):1170-1178.
- (125) Lubberts E. The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4(5):572-577.
- (126) Lubberts E, van den Berg WB. Potential of modulatory cytokines in the rheumatoid arthritis process. *Drug News Perspect* 2001; 14(9):517-522.
- (127) Lubberts E, van den BL, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis

through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003; 170(5):2655-2662.

- (128) Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, Schwarzenberger P, Kolls J, van den Berg WB. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res* 2002; 51(2):102-104.
- (129) Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995; 155(12):5483-5486.
- (130) Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den BL, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK et al. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2001; 167(2):1004-1013.
- (131) Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol* 2002; 169(2):642-646.
- (132) Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999; 103(9):1345-1352.
- (133) Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183(6):2593-2603.
- (134) Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(2):155-174.
- (135) Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(3):430-438.

- (136) Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002; 71(1):1-8.
- (137) Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 1998; 161(1):409-414.
- (138) Chabaud M, Page G, Miossec P. Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* 2001; 167(10):6015-6020.
- (139) Antonyamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol* 1999; 162(1):577-584.
- (140) Page G, Lebecque S, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium. *J Immunol* 2002; 168(10):5333-5341.
- (141) Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000; 12(7):1092-1099.
- (142) Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 1997; 40(6):1050-1053.
- (143) Cai L, Yin JP, Starovasnik MA, Hogue DA, Hillan KJ, Mort JS et al. Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Cytokine* 2001; 16(1):10-21.
- (144) LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-

regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum* 2001; 44(9):2078-2083.

- (145) Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P et al. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1beta. *J Rheumatol* 2002; 29(6):1262-1272.
- (146) Rifas L, Avioli LV. A novel T cell cytokine stimulates interleukin-6 in human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7):1096-1103.
- (147) Van Bezooijen RL, Papapoulos SE, Lowik CW. Effect of interleukin-17 on nitric oxide production and osteoclastic bone resorption: is there dependency on nuclear factor-kappaB and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK)/RANK ligand signaling? *Bone* 2001; 28(4):378-386.
- (148) Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275(3):768-775.
- (149) Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002; 30(2):340-346.
- (150) Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van Den BW, Miossec P. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2001; 3(3):168-177.
- (151) Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, van den Gersselaar LA, van den Berg WB. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum* 2000; 43(6):1300-1306.

- (152) Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den BL, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004; 50(2):650-659.
- (153) Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998; 160(7):3513-3521.
- (154) Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 1998; 273(42):27467-27473.
- (155) Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, Di Battista JA, Pelletier JP. Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis Rheum* 1999; 42(11):2399-2409.
- (156) Sylvester J, Liacini A, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. *Tripterygium wilfordii* Hook F extract suppresses proinflammatory cytokine-induced expression of matrix metalloproteinase genes in articular chondrocytes by inhibiting activating protein-1 and nuclear factor-kappaB activities. *Mol Pharmacol* 2001; 59(5):1196-1205.
- (157) Sylvester J, Liacini A, Li WQ, Zafarullah M. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes. *Cell Signal* 2004; 16(4):469-476.
- (158) Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410(6824):37-40.
- (159) Faour WH, Mancini A, He QW, Di Battista JA. T-cell-derived interleukin-17 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through

restricted activation of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade: role of distal sequences in the 3'-untranslated region of COX-2 mRNA. *J Biol Chem* 2003; 278(29):26897-26907.

- (160) Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115(1):81-87.
- (161) Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162(9):5337-5344.
- (162) Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med* 2000; 191(7):1233-1240.
- (163) Subramaniam SV, Cooper RS, Adunyah SE. Evidence for the involvement of JAK/STAT pathway in the signaling mechanism of interleukin-17. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262(1):14-19.
- (164) Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81(2):807-869.
- (165) Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B et al. MAP kinases. *Chem Rev* 2001; 101(8):2449-2476.
- (166) Sweeney SE, Firestein GS. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16(3):231-237.
- (167) Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999; 19(4):2435-2444.

- (168) Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 2002; 25(6):511-518.
- (169) Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 1999; 286(5443):1374-1377.
- (170) Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N et al. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 2003; 4(10):964-968.
- (171) Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N et al. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 2003; 8(11):847-856.
- (172) Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(22):12759-12764.
- (173) Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L et al. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 1999; 9(7):369-372.
- (174) Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P et al. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, 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(11):2501-2512.
- (175) Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(10):1230-1254.

- (176) Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 2003; 63(7):1684-1695.
- (177) Deschesnes RG, Huot J, Valerie K, Landry J. Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation. *Mol Biol Cell* 2001; 12(6):1569-1582.
- (178) Fijen JW, Zijlstra JG, De Boer P, Spanjersberg R, Tervaert JW, Van Der Werf TS et al. Suppression of the clinical and cytokine response to endotoxin by RWJ-67657, a p38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor, in healthy human volunteers. *Clin Exp Immunol* 2001; 124(1):16-20.
- (179) Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* 2000; 6(1):109-116.
- (180) Tamura K, Sudo T, Senfleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 2000; 102(2):221-231.
- (181) Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD et al. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* 1999; 1(2):94-97.
- (182) 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(1):124-130.
- (183) Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 1998; 273(3):1741-1748.

- (184) Chabaud-Riou M, Firestein GS. Expression and activation of mitogen-activated protein kinase kinases-3 and -6 in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 2004; 164(1):177-184.
- (185) Badger AM, Griswold DE, Kapadia R, Blake S, Swift BA, Hoffman SJ et al. Disease-modifying activity of SB 242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):175-183.
- (186) Pargellis C, Regan J. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4(5):566-571.
- (187) Nishikawa M, Myoui A, Tomita T, Takahi K, Nampei A, Yoshikawa H. Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis Rheum* 2003; 48(9):2670-2681.
- (188) Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 1999; 89(1-2):115-124.
- (189) Dong C, Yang DD, Tournier C, Whitmarsh AJ, Xu J, Davis RJ et al. JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 2000; 405(6782):91-94.
- (190) Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, Schreiber M, David JP, Jochum W et al. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol* 1999; 9(3):116-125.
- (191) Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 1998; 282(5396):2092-2095.
- (192) Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincon M et al. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 1998; 9(4):575-585.

- (193) Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L et al. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108(1):73-81.
- (194) Han Z, Chang L, Yamanishi Y, Karin M, Firestein GS. Joint damage and inflammation in c-Jun N-terminal kinase 2 knockout mice with passive murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(3):818-823.
- (195) Sundarajan M, Boyle DL, Chabaud-Riou M, Hammaker D, Firestein GS. Expression of the MAPK kinases MKK-4 and MKK-7 in rheumatoid arthritis and their role as key regulators of JNK. *Arthritis Rheum* 2003; 48(9):2450-2460.
- (196) Hammaker DR, Boyle DL, Chabaud-Riou M, Firestein GS. Regulation of c-Jun N-terminal kinase by MEKK-2 and mitogen-activated protein kinase kinases in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2004; 172(3):1612-1618.
- (197) Roshak AK, Callahan JF, Blake SM. Small-molecule inhibitors of NF-kappaB for the treatment of inflammatory joint disease. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2(3):316-321.
- (198) Karin M, Ben Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621-663.
- (199) Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3(3):221-227.
- (200) Asahara H, Asanuma M, Ogawa N, Nishibayashi S, Inoue H. High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 37(5):827-832.
- (201) Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsbury JR, Cogswell JP, Stimpson SA et al. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(23):13859-13864.

- (202) Vincenti MP, Coon CI, Brinckerhoff CE. Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1998; 41(11):1987-1994.
- (203) Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett* 1998; 435(1):29-34.
- (204) Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49):6853-6866.
- (205) Li P, Sanz I, O'Keefe RJ, Schwarz EM. NF-kappa B regulates VCAM-1 expression on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2000; 164(11):5990-5997.
- (206) Bondeson J, Foxwell B, Brennan F, Feldmann M. Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10):5668-5673.
- (207) Makarov SS, Johnston WN, Olsen JC, Watson JM, Mondal K, Rinehart C et al. NF-kappa B as a target for anti-inflammatory gene therapy: suppression of inflammatory responses in monocytic and stromal cells by stable gene transfer of I kappa B alpha cDNA. *Gene Ther* 1997; 4(8):846-852.
- (208) Hutchinson NI, Lark MW, MacNaul KL, Harper C, Hoerrner LA, McDonnell J et al. In vivo expression of stromelysin in synovium and cartilage of rabbits injected intraarticularly with interleukin-1 beta. *Arthritis Rheum* 1992; 35(10):1227-1233.
- (209) Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA. Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *J Biol Chem* 1996; 271(38):23577-23581.
- (210) Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275(3):789-794.

- (211) Geng Y, Valbracht J, Lotz M. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J Clin Invest* 1996; 98(10):2425-2430.
- (212) Scherle PA, Pratta MA, Feeser WS, Tancula EJ, Arner EC. The effects of IL-1 on mitogen-activated protein kinases in rabbit articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230(3):573-577.
- (213) Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000; 43(4):801-811.
- (214) Grumbles RM, Shao L, Jeffrey JJ, Howell DS. Regulation of the rat interstitial collagenase promoter by IL-1 beta, c-Jun, and Ras-dependent signaling in growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 1997; 67(1):92-102.
- (215) Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ et al. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997; 158(7):3165-3173.
- (216) Haliday EM, Ramesha CS, Ringold G. TNF induces c-fos via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxygenase metabolite. *EMBO J* 1991; 10(1):109-115.
- (217) Griffiths RJ, Pettipher ER, Koch K, Farrell CA, Breslow R, Conklyn MJ et al. Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(2):517-521.
- (218) Chen YR, Tan TH. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998; 17(2):173-178.

- (219) Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem* 1995; 270(42):24995-25000.
- (220) Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 1998; 273(8):4616-4621.
- (221) Koshy PJ, Henderson N, Logan C, Life PF, Cawston TE, Rowan AD. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(8):704-713.
- (222) Dudler J, Renggli-Zulliger N, Busso N, Lotz M, So A. Effect of interleukin 17 on proteoglycan degradation in murine knee joints. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(7):529-532.
- (223) van de Loo AA, van den Berg WB. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 1990; 49(4):238-245.
- (224) Henderson B, Pettipher ER. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. *Clin Exp Immunol* 1989; 75(2):306-310.
- (225) Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 1999; 40(1):1-11.
- (226) Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol* 1999; 163(6):3474-3483.
- (227) Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993; 12(5):2005-2015.

- (228) Bondeson J, Brennan F, Foxwell B, Feldmann M. Effective adenoviral transfer of IkappaBalpha into human fibroblasts and chondrosarcoma cells reveals that the induction of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines is nuclear factor-kappaB dependent. *J Rheumatol* 2000; 27(9):2078-2089.
- (229) Buttice G, Quinones S, Kurkinen M. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(13):3723-3731.
- (230) Pendas AM, Balbin M, Llano E, Jimenez MG, Lopez-Otin C. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics* 1997; 40(2):222-233.
- (231) Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Hambor JE, Martel-Pelletier J. Cloning, sequencing and characterization of the 5'-flanking region of the human collagenase-3 gene. *Biochem J* 1997; 323 (Pt 1):13-16.
- (232) Bond M, Baker AH, Newby AC. Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264(2):561-567.
- (233) Morita Y, Kashihara N, Yamamura M, Okamoto H, Harada S, Kawashima M et al. Antisense oligonucleotides targeting c-fos mRNA inhibit rheumatoid synovial fibroblast proliferation. *Ann Rheum Dis* 1998; 57(2):122-124.
- (234) Shiozawa S, Shimizu K, Tanaka K, Hino K. Studies on the contribution of c-fos/AP-1 to arthritic joint destruction. *J Clin Invest* 1997; 99(6):1210-1216.
- (235) Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol* 2001; 166(5):3491-3498.

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'EDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. **Identification de l'étudiant et du programme :** Abdelhamid LIACINI, Code permanent LIAA03097109. étudiant de Ph.D. en Sciences Biomédicales option Biologie moléculaire et cellulaire au CHUM.

2. Description de l'article

- ❖ **Abdelhamid Liacini, Judith Sylvester, Wen Qing Li, Faramase Dehnade and Muhammad Zafarullah. 2002. Inhibition of IL-1 stimulated MAP kinase, AP1 and NFκB transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene in human articular chondrocytes. Matrix Biol. 21: 251-262.**

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

A titre de coauteur identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Abdelhamid LIACINI** incluse cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : **Inhibition de l'expression des métallo-protéinases matricielles par interception de la transduction de signal des cytokines pro-inflammatoire dans les chondrocytes articulaire.**

Judith Sylvester
Coauteur

25 février 2004
Date

Wen Qing Li
Coauteur

06/16/2004
Date

Faramase Dehnade
Coauteur

27/Fev/2004
Date

Muhammad Zafarulla
Coauteur

25 février 2004
Date

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'EDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme : Abdelhamid LIACINI, Code permanent LIAA03097109, étudiant de Ph.D. en Sciences Biomédicales option Biologie moléculaire et cellulaire au CHUM.

2. Description de l'article

- ✧ Abdelhamid Liacini, Judith Sylvester, Wen Qing Li, Wensheng Huang, Faramaze Dehnade, Mushtaq Ahmad and Muhammad Zafarullah. 2003. Induction of matrix MMP-13 genes by TNF- α is mediated by MAP Kinase, AP1 and NF κ B transcription factors in articular chondrocytes. *Experimental Cell Research* 288 : 208-217.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

A titre de coauteur identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Abdelhamid LIACINI incluse cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Inhibition de l'expression des métallo-protéinases matricielles par interception de la transduction de signal des cytokines pro-inflammatoire dans les chondrocytes articulaire.

Judith Sylvester
Coauteur

Wen Qing Li
Coauteur

Wensheng Huang
Coauteur

Faramaze Dehnade
Coauteur

Mushtaq Ahmad
Coauteur

Muhammad Zafarullah
Coauteur

25 février 2004
Date

06/16/2004

Date

27, 2004.

Date

27/feb. 2004
Date

6/25, 2004

Date

25 février 2004

Date

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'EDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. **Identification de l'étudiant et du programme :** Abdelhamid LIACINI, Code permanent LIAA03097109, étudiant de Ph.D. en Sciences Biomédicales option Biologie moléculaire et cellulaire au CHUM.

2. Description de l'article

❖ **Abdelhamid Liacini, Judith Sylvester, Wen Qing Li, and Muhammad Zafarullah 2004. Interleukin-17- signal transduction mechanisms leading to induction of matrix metalloproteinase-3 and matrix metalloproteinase- 13 gene expression in articular chondrocyte. Cellular signalling16: 469-476.**

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

A titre de coauteur identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Abdelhamid LIACINI** incluse cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : **Inhibition de l'expression des métallo-protéinases matricielles par interception de la transduction de signal des cytokines pro-inflammatoire dans les chondrocytes articulaire.**

Judith Sylvester
Coauteur

le 25 février 2004

Date

Wen Qing Li
Coauteur

06/16/2004

Date

Muhammad Zafarullah
Coauteur

25 février 2004

Date