

Université de Montréal

**Effet de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandine J₂ sur
l'expression de la Cyclooxygénase-2 dans
les synoviocytes humains**

par

Katherine Farrajota

Département de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire

Juillet, 2005

© Katherine Farrajota, 2005



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

Ce mémoire intitulé :

**Effet de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandine J₂ sur
l'expression de la Cyclooxygénase-2 dans
les synoviocytes humains**

présenté par :

Katherine Farrajota

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

_____ Daniel Lajeunesse _____

Président-rapporteur

_____ Hassan Fahmi _____

Directeur de recherche

_____ Johanne Martel-Pelletier _____

Co-directeur

_____ Florina Moldovan _____

Membre du jury

ABRÉGÉ

L'arthrose est une maladie débilitante qui affecte plus de 4 millions de Canadiens. Elle est caractérisée par la perte et dégradation du cartilage articulaire, le remodelage de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes et l'inflammation de la membrane synoviale. Les traitements pour l'arthrose se focalisent sur la diminution de la douleur, principalement par l'utilisation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), des analgésiques, et plus récemment des inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase-2 (COX-2).

Il a été substantiellement décrit que la 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15d-PGJ₂), un ligand naturel du "peroxisome proliferator-activated receptor γ " (PPAR γ), inhibe l'expression de nombreux gènes inflammatoires dans plusieurs types cellulaires. Cependant, son effet sur la COX-2 est controversé.

Dans cette étude nous examinons les effets de la 15d-PGJ₂ sur l'expression de la COX-2 induite par l'interleukine-1 β (IL-1 β) dans les synoviocytes humains. La 15d-PGJ₂ inhibe l'expression protéique et l'ARNm de la COX-2, ainsi que l'activité promotrice du promoteur de la COX-2. La suppression de l'expression de la COX-2 est atténué par l'antagoniste de PPAR γ , le GW9662, suggérant que cet effet est médié par PPAR γ .

L'induction de la COX-2 est associée avec une hyperacétylation de l'histone H3 et H4 au promoteur de la COX-2. Fait intéressant, la 15d-PGJ₂ inhibe sélectivement l'acétylation de l'histone H3. Il a été démontré que cette réduction

n'est pas corrélée avec le recrutement de l'histone deacétylase (HDAC) au promoteur de la COX-2. Ensuite, le traitement avec un inhibiteur spécifique de HDAC, la trichostatine A, n'atténue pas l'effet suppresseur de la 15d-PGJ₂, confirmant que les HDACs ne sont pas impliqués dans l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂ sur l'expression de la COX-2.

De plus, la 15d-PGJ₂ bloque le recrutement de l'histone acétylase (HAT) p300 induit par IL-1 β au promoteur de la COX-2. Dans le même ordre d'idées la surexpression de la p300, mais non son mutant dépourvu d'activité HAT, atténue l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂ sur l'activité promotrice de la COX-2. Nos résultats suggèrent que la 15d-PGJ₂ peut inhiber l'expression de la COX-2 induite par l'IL-1 β par un mécanisme PPAR γ dépendant, HDAC indépendant, probablement en interférant avec le recrutement de la p300.

Mots clés : arthrite, synoviocytes, COX-2, 15d-PGJ₂, acétylation, histones, HDAC, p300

ABSTRACT

Osteoarthritis is a debilitating disease, affecting more than 4 million Canadians. This disease is characterised by the degradation and loss of articular cartilage accompanied by subchondral bone remodelling, osteophyte formation, and synovial membrane inflammation. Pharmacological interventions have focused on treating pain, primarily using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), analgesics, and more recently, specific cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors.

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15d-PGJ₂), a natural ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), has been reported to inhibit the expression of a number of inflammatory genes in several cell types. However, its effects on COX-2 remain controversial.

In this study, we investigated the effects of 15d-PGJ₂ on interleukin-1 β (IL-1 β)-induced COX-2 expression in human synovial fibroblasts (HSFs). 15d-PGJ₂ inhibited IL-1 β -induced COX-2 protein and mRNA expression, as well as COX-2 gene promoter activation. The suppression of COX-2 protein expression was abrogated by the PPAR γ antagonist, GW9662, suggesting that this effect is mediated by PPAR γ .

The induction of COX-2 by IL-1 β is associated with hyperacetylation of histone H3 and H4 at the COX-2 promoter. Interestingly, 15d-PGJ₂ selectively blocked IL-1 β -induced histone H3 acetylation. This reduction was demonstrated to not correlate with the recruitment of histone deacetylase (HDAC) to the COX-2

promoter. Also, treatment with the specific HDAC inhibitor, trichostatin A, did not relieve the suppressive effect of 15d-PGJ₂, indicating that HDACs are not involved in the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 expression.

Furthermore, 15d-PGJ₂ blocked IL-1 β -induced recruitment of the histone acetylase (HAT) p300 to the COX-2 promoter, which may be the mechanism for decreased histone H3 acetylation and COX-2 expression. In line with this, overexpression of p300, but not of a mutant p300 lacking HAT activity, relieved the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 promoter activation. Our data suggest that 15d-PGJ₂ can inhibit IL-1 β -induced COX-2 expression in a PPAR γ -dependent, HDAC-independent mechanism, likely by interfering with the HAT p300.

Key words: osteoarthritis, synoviocytes, COX-2, 15d-PGJ₂, acetylation, histones, HDAC, p300

Table des Matières

ABRÉGÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv
INTRODUCTION.....	1
1. L'ARTHROSE.....	1
1.1 Pathophysiologie.....	2
1.2 Facteurs de risque.....	4
1.2.1 L'âge.....	4
1.2.2 L'obésité.....	4
1.2.3 L'hérédité.....	5
1.2.4 L'activité sportive.....	5
1.3 L'articulation.....	6
1.3.1 Principaux composants d'une articulation	6
1.3.2 Cartilage.....	8
1.3.2.1 Structure.....	8
1.3.2.2 Composition.....	8
1.3.3 Membrane synoviale.....	9
1.3.3.1 Structure.....	10
1.3.3.1.1 Couche intimale.....	10
1.3.3.1.2 Couche sous-intimale.....	11
1.3.3.2 Composition	12
1.3.3.2.1 Couche intimale	12
1.3.3.2.1.1 Synoviocyte de Type A.....	12
1.3.3.2.1.2 Synoviocyte de Type B.....	12

1.3.3.2.2	Couche sous-intimale.....	13
1.3.3.3	Rôle de la membrane synoviale dans l'arthrose	13
1.4	Interleukine-1 β	14
1.4.1	Structure.....	14
1.4.2	l'IL-1 β dans les tissus articulaires	15
1.4.3	Action de l'IL-1 β	16
2.	PROSTAGLANDINES	17
2.1	Biosynthèse des prostaglandines.....	18
2.2	Effets biologiques	19
2.3	Cyclooxygénases.....	22
2.3.1	COX-1	23
2.3.2	COX-2.....	25
2.3.3	Régulation de l'expression de la COX-2	27
2.3.3.1	Voie MAPK	27
2.3.3.2	Facteurs de transcription	27
2.3.3.2.1	AP-1	28
2.3.3.2.2	C/EBP	28
2.3.3.2.3	NF- κ B	29
2.3.3.3	CBP/p300.....	29
3.	PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR γ	30
3.1	Ligands de PPARs	31
3.1.1	Ligands naturels	31
3.1.2	Ligands synthétiques.....	31
3.2	PPAR γ dans les tissus articulaires	31
3.2.1	Cartilage.....	31
3.2.2	Membrane synoviale.....	33
3.2.3	L'os	33
3.2.4	PPAR γ dans les modèles animaux d'arthrite.....	33
3.3	Propriétés anti-inflammatoires des ligands de PPAR γ	34
	dans d'autres types cellulaires	

3.4 Mécanisme d'action des PPARs	35
3.5 Mécanisme d'action du ligand naturel 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂	36
3.5.1 Mécanisme dépendant de PPAR γ	36
3.5.2 Mécanisme indépendant de PPAR γ	37
3.5.2.1 NF- κ B	37
3.6 Effet de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂ sur l'expression de la COX-2.....	39
4. CHROMATINE.....	40
4.1. Structure.....	40
4.1.1 Nucléosome.....	40
4.1.2 Histones.....	41
4.2 Modifications de la chromatine	43
4.2.1 Remodelage de la chromatine ATP-dépendant.....	43
4.2.2 Modifications covalentes des histones.....	44
4.3 Acétylation des histones	45
4.3.1 Familles HAT.....	46
4.4 Déacétylation des histones	47
4.4.1 Classes HDAC	48
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	50
MÉTHODES	51-A
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	51-F
ACCORD DES CO-AUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR	52
MANUSCRIT :.....	54
Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J ₂ through a histone deacetylase-independent mechanism.	
DISCUSSION	92
PERSPECTIVES	98
CONCLUSION	102

BIBLIOGRAPHIE.....103
ANNEXE.....119

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des COX-1 et -2.....	24
Tableau II : Affinité des ligands naturels pour les différentes isoformes de PPAR.....	32
Tableau III : Affinité des ligands synthétiques pour les différentes isoformes de PPAR.....	32

Liste des figures

Figure 1 : Caractéristiques morphologiques des sites articulaires modifiés	7
Figure 2 : Principaux composants de l'articulation du genou.....	7
Figure 3 : Représentation schématique de la membrane synoviale	11
Figure 4 : Rôles pivot de l'IL-1 β	17
Figure 5 : Voie de biosynthèse des prostaglandines	20
Figure 6 : Fonction des prostaglandines	22
Figure 7 : Eléments régulateurs dans le promoteur humain de la COX-1 et la COX-2.....	26
Figure 8 : Mécanisme d'action de la 15d-PGJ ₂ dans la synthèse des prostaglandines	38
Figure 9 : Structure de la chromatine par électron micrographe.....	42
Figure 10 : Modèle solénoïde de la fibre de chromatine.....	42
Figure 11 : Structure du nucléosome	43
Figure 12 : Acétylation des histones.....	47

Manuscrit

Figure 1 : 15d-PGJ ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 expression at the transcriptional level.....	86
Figure 2 : 15d-PGJ ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 expression via PPAR γ - dependent and -independent pathways.....	87
Figure 3 : 15d-PGJ ₂ inhibits IL-1 β -induced acetylation of histone H3 at the COX-2 Promoter	88
Figure 4 : Effect of 15d-PGJ ₂ on HDAC1, HDAC2 and HDAC3 association with the COX-2 promoter	89
Figure 5 : Effect of TSA on the inhibitory effect of 15d-PGJ ₂ on IL-1 β -induced COX-2 expression, MMP-1 and IL-6 production	90
Figure 6 : Role of the HAT p300 in 15d-PGJ ₂ -mediated COX-2 supression	91

Liste des abréviations

AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
COX	Cyclooxygénase
COXIBS	Inhibiteurs sélectifs de COX-2
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone déacétylase
IL-1	Interleukine-1
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leucotriène B ₄
MMP	Métalloprotéases matricielles
NF- κ B	Facteur de transcription nucléaire κ -B
OA	Arthrose
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGHS	Prostaglandine endopéroxyde H synthase
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PLA ₂	Prostaglandine A ₂
PMA	Phorbol myristate acétate

PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
TNF- α	Facteur nécrosant des tumeurs α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol acetate
TXA ₂	Thromboxane A ₂

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Hassan Fahmi, pour m'avoir permis d'entreprendre ma maîtrise dans son laboratoire. Pour sa disponibilité et pour les milliers de corrections minutieuses de textes et d'affiches au cours de ma maîtrise.

Je remercie tout le personnel de l'Unité de recherche en arthrose avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Un grand merci à Esokia pour son aide dans la correction de ce mémoire. Merci à Johanne Martel-Pelletier, ma co-directrice, pour ses conseils pour ce mémoire.

Je tiens à remercier Xinfang pour son support, Afif et Chang-Shan pour leurs nombreux astuces qui m'ont permis de réussir avec succès certaines de mes expériences. J'aimerais également remercier mes amis, sans qui la vie au laboratoire aurait été bien différente; merci à Alex pour son humour et ses conseils, merci à Sara pour son encouragement et soutien mais surtout pour son amitié.

Merci à ma famille, qui par son amour et son appui m'a permis d'entreprendre et de poursuivre mes études graduées. Merci à Julien pour sa présence nuit et jour, sa rigueur scientifique, son amour et son appui inconditionnel.

Finalement, je remercie le programme MENTOR de m'avoir accordé une bourse me permettant de réaliser cette maîtrise.

INTRODUCTION

1. L'arthrose

L'arthrose (OA) est l'une des maladies chroniques les plus fréquentes au monde. Au Canada, 4 millions d'individus souffrent d'arthrose. Malheureusement, ce chiffre continuera à augmenter au cours des prochaines années, en raison du vieillissement de la population (Felson DT et al., 1998 ; Yelin EH et Felts WR, 1990).

L'arthrose est caractérisée par une dégradation du cartilage, l'inflammation de la membrane synoviale, et une sclérose de l'os sous-chondral (Yuan XY et al., 2004; Sharma L, 2003). L'ensemble de ces processus conduit à une diminution ou perte de mobilité. L'arthrose touche toute les articulations synoviales, mais elle semble privilégier les membres inférieurs tels que les genoux et les hanches (Mollenhauer JA et Erdmann S, 2002 ; Shieh AC et Athanasiou KA, 2002). L'arthrose est une maladie qui progresse lentement et dans certains cas de manière asymptomatique. En effet, Hogue et Mersfelder (Hogue JM et Mersfelder TL, 2002) ont déterminé que la moitié des patients qui présentaient des caractéristiques radiographiques évidentes de l'OA ne manifestaient aucun symptôme de douleur. La principale raison de consultation chez les patients souffrant d'arthrose est la douleur. Cette douleur provient de l'inflammation de la membrane synoviale.

Cependant, lorsque l'inflammation est présente, elle constitue une composante considérable de la progression de la maladie.

L'arthrose est un problème médical débilitant, le plus fréquemment observé chez les personnes d'âge moyen ou avancé. Dans la plupart des cas, l'OA survient après l'âge de 45 ans, mais peut se manifester à n'importe quel âge. L'arthrose a des répercussions très importantes sur la vie quotidienne parce qu'elle entraîne la douleur et la limitation progressive de la mobilité des articulations. Une étude a montré que 53 % des patients souffrant d'arthrose se considéraient handicapés, que 55 % avaient besoin d'aide pour réaliser des gestes quotidiens et que 42 % avaient dû modifier leur milieu de vie. Les conséquences de l'OA pour le patient sont donc très importantes tant socialement qu'économiquement. En outre, il peut exister une gêne esthétique, notamment dans le cadre des arthroses digitales où les déformations parfois très importantes ont un impact psychologique et socioculturel majeur (Dougados M, 1995).

1.1 Pathophysiologie

L'arthrose se caractérise par la détérioration progressive du cartilage articulaire, le tissu qui recouvre l'os qui sert à amortir les chocs. La destruction du cartilage articulaire est le résultat d'un déséquilibre entre les processus de dégradation et de synthèse des différentes composantes de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire, de la membrane synoviale et de l'os sous-chondral (Cole AA et Kuettner KE, 2002 ; Chevalier X, 1998). Il s'agit d'un phénomène

multifactoriel où s'intriquent facteurs mécaniques et cellulaires. Dans l'OA, le cartilage s'amincit et disparaît à certains endroits. Il en résulte une friction os contre os, ce qui peut entraîner de la douleur (Cole AA et Kuettner KE, 2002; Chevalier X, 1998). La perte du cartilage articulaire amène au développement de fibrillations, à l'apparition d'ulcération et d'un épaissement de l'extrémité osseuse (Martel-Pelletier J, 1999). Ces phénomènes amènent la perte de la fonction mécanique du cartilage, qui consiste à assurer le mouvement de l'articulation sans friction et sans douleur (Lohmander L, 2000).

Bien que l'OA soit surtout associée à la détérioration du cartilage, la plupart, sinon tous les tissus articulaires sont affectés (voir figure 1). Donc, parallèlement à la dégradation du cartilage, il y a également un remodelage de l'os sous-chondral. En effet, une croissance d'os nouveau apparaît dans la région sous-chondrale, conduisant à l'épaississement accru de l'os sous-chondral. Il pourrait aussi se présenter une nouvelle formation d'os aux marges de l'articulation, avec formation d'excroissances appelées ostéophytes. Ceci s'observe en clinique sous la forme d'un agrandissement osseux de l'articulation, ce qui pourrait susciter une réduction mécanique de l'amplitude potentielle des mouvements de l'articulation (Sandell LJ et Aigner T, 2001; Mollenhauer JA et Erdmann S, 2002).

Dans l'OA, il y a inflammation de la membrane synoviale. Les principaux médiateurs de l'inflammation de la membrane synoviale incluent les cytokines, interleukine-1 β (IL-1 β) et le " tumor necrosis factor alpha " (TNF- α), les prostanoïdes et l'oxyde nitrique (NO) (Pelletier JP et al., 1995). L'inflammation de la membrane synoviale est tout aussi importante car elle accélère le processus de

dégradation du cartilage articulaire (Hedbom E et Häuselmann HJ, 2002; Pelletier J et al., 2001). Ainsi, l'inflammation de la membrane synoviale est essentielle à la progression de l'arthrose.

1.2 Facteurs de risque

La cause de l'OA n'est pas connue, cependant il a été montré que plusieurs facteurs augmentent le risque de développer cette maladie. Ces facteurs inclus entre autre, l'âge, l'hérédité, l'obésité ainsi que certaines activités sportives (Felson DT, 2004).

La prévalence de l'OA dans toutes les articulations augmente avec l'âge, qui est d'ailleurs le facteur de risque le plus important associé au développement de la pathologie. Bien que l'arthrose se manifeste surtout chez les personnes âgées, l'âge lui-même ne cause pas la maladie. C'est plutôt dû à la vulnérabilité de l'articulation se manifestant normalement au cours du vieillissement. La faiblesse musculaire ainsi que l'amincissement du cartilage sont quelques changements qui augmentent la vulnérabilité de l'articulation.

L'obésité est un autre facteur de risque important pour le développement de l'OA (Hunter DJ et al., 2002). Une masse corporelle excessive augmente la charge que doivent porter les articulations, surtout celles du genou. Ainsi, les personnes obèses sont plus susceptibles de développer l'OA du genou. L'association de l'obésité avec l'OA du genou est plus élevée dans le cas de pathologies bilatérales

qu'unilatérales. Elle est également plus prononcée chez la femme que l'homme (Sowers M, 2001). Pendant plusieurs années, il y a eu confusion à savoir si l'obésité était la raison ou la conséquence de l'OA, à cause de l'invalidité engendrée par la maladie. Des études récentes ont démontré que l'obésité précède le développement de la maladie (Felson DT, 2000). Nouvelle encourageante, d'autant plus qu'une étude de Framingham a démontré que des femmes ayant perdu aussi peu que 11 livres ont diminué leur risque de développer l'OA du genou de 50 % (Felson DT, 1992). Ainsi, la perte de poids des personnes obèses atteintes d'OA peut réduire l'évolution de la maladie.

Il est suggéré que l'OA est fortement déterminée génétiquement. Dans certains cas, la tendance aux anomalies du cartilage est transmise génétiquement; dans d'autres cas, ce sont des anomalies de la structure des articulations qui sont transmises. Celles-ci peuvent se manifester seulement vers la quarantaine, voire encore plus tard. La prédisposition génétique de l'OA n'est pas la même pour toutes les articulations. En fait, pour les mains et les hanches, 50 % des cas sont transmis génétiquement, tandis qu'un faible pourcentage des cas est relié à l'arthrose du genou (Spector TD, 1996). De plus, la prédisposition génétique à l'OA semble être plus élevée chez les femmes que chez les hommes pour toutes les articulations (Felson DT, 1998).

Des études épidémiologiques ont démontré que la participation dans certains sports compétitifs augmente le risque de développer l'OA (Buckwalter JA, 1997 ;

Kujala UM, 1995). Les sports qui exigent une intensité aiguë et un impact direct des articulations avec d'autres participants ou équipements semblent augmenter le risque de l'OA. Les sports les plus souvent impliqués sont les sports violents comme le rugby, le football, le ski de piste ainsi que tous les sports de combat. Il est également important de noter que certaines professions sont particulièrement exposées, notamment celles en rapport avec des vibrations importantes (marteau-piqueur) ou des gestes répétitifs violents (tailleurs de pierre, métallurgistes, danseurs...). (Felson DT, 2000).

1.3 L'articulation

1.3.1 Principaux composants d'une articulation

Une articulation normale comprend entre autre des extrémités osseuses, le cartilage, la membrane synoviale et le liquide synovial (Figure 2). Les extrémités osseuses sont formées de tissus osseux spongieux métaboliquement actifs car très vascularisés, et sont séparées du cartilage articulaire par une mince lame d'os sous-chondral. Les surfaces des os sont enfermées dans une cavité close appelée capsule articulaire, qui est remplie de liquide synovial.

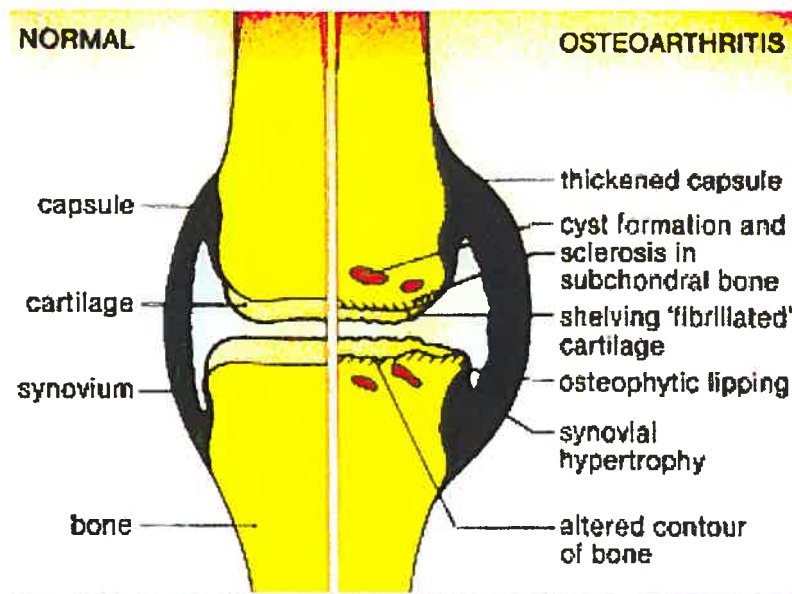


Figure 1 : Caractéristiques morphologiques des sites articulaires modifiés.

Tiré du site : www.arthritiscenter/osteoarthritis/

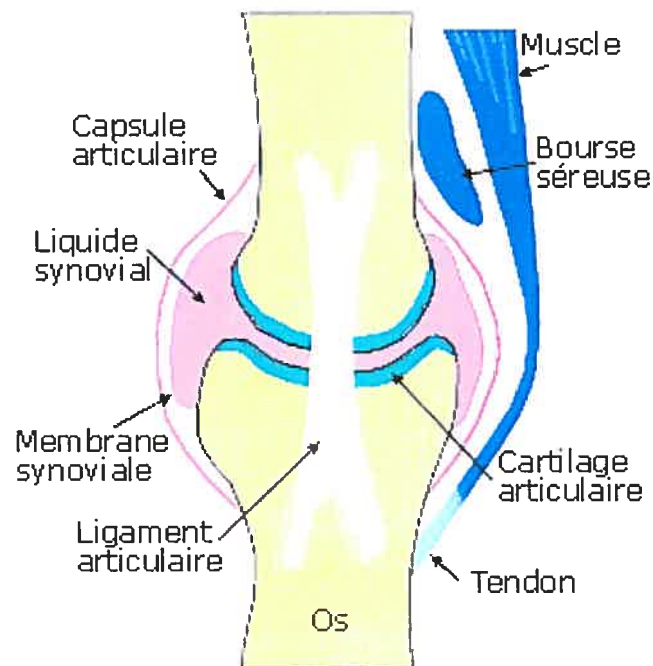


Figure 2 : Principaux composants de l'articulation du genou

On peut aussi retrouver au niveau du genou la présence de ligaments articulaires et de bourses séreuses. Ceux-ci permettent respectivement de renforcer la capsule articulaire et de diminuer le frottement entre les os.

1.3.2 Cartilage

Le cartilage articulaire est un tissu acellulaire, très résistant et résilient. Celui-ci constitue la principale surface de contact sur laquelle repose le poids que doit supporter l'articulation. Le cartilage joue deux rôles essentiels au sein de l'articulation : il assure un mouvement presque sans friction de l'articulation et permet de bien distribuer les forces aux structures sous-jacentes dans l'articulation (Cremer MA et al., 1998; Muldrew K, 2002 ; Clot J, 1989).

Les composants moléculaires du cartilage forment une structure hautement organisée qui se modifie en fonction de la profondeur. Par conséquent, le cartilage a été classifié en quatre zones distinctes de la surface du cartilage vers l'os sous-chondral : la zone superficielle, la zone de transition, la zone radiale et la zone calcifiée (Buckwalter JA et al., 1988).

Le cartilage est constitué d'une matrice extracellulaire dans laquelle on retrouve les chondrocytes. La matrice représente 90 % du poids sec du cartilage (Hardingham TE et Fosang AJ, 1992). Celle-ci est composée majoritairement d'eau, de collagène et de protéoglycanes ou aggrécanes.

Le collagène représente environ 50% à 60 % du poids sec du cartilage (Muir H, 1995). Le collagène de type II est le type de collagène le plus abondant ; il représente 90 à 98 % du collagène total présent dans le cartilage (Buckwalter JA et Mankin HJ, 1998).

Les protéoglycanes, qui représentent 5 à 10% du poids sec du cartilage, sont les deuxièmes composants majoritaires de la matrice. La distribution, l'architecture et l'organisation des protéoglycanes servent à maintenir une haute concentration de charges négatives au sein du cartilage. Ils conditionnent la pénétration de solutés à travers la matrice, lui conférant ainsi sa rigidité et son élasticité (Rosenberg L et al., 1989).

Finalement, l'eau est aussi une composante importante du cartilage, constituant 60 à 80 % de celui-ci. (Buckwalter JA et Mankin HJ, 1998). L'eau permet d'assurer la dureté du cartilage ainsi que sa lubrification et sa nutrition durant le mouvement (Johnston SA, 1997).

1.3.3 Membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu vascularisé et innervé. Grâce à l'innervation de la membrane synoviale, l'articulation a une sensibilité proprioceptive, c'est-à-dire qu'elle possède l'aptitude à sentir le mouvement du genou et la douleur (Clot J, 1989). La membrane synoviale possède trois fonctions importantes : la production du liquide synovial qui remplit la capsule articulaire et assure la lubrification de l'articulation ainsi que la nutrition du cartilage

(Vaillancourt G, 1990, Ghadially F, 1983) ; l'élimination des débris cellulaires et les particules de l'espace articulaire ; et la réparation des dommages causés à l'articulation (Edwards JC, 1994).

1.3.3.1 Structure

La membrane synoviale est caractérisée par une matrice extracellulaire dans laquelle se trouvent les cellules synoviales (Simkin PA, 1994). Celles-ci ne sont pas reliées par des jonctions intercellulaires serrées. De plus, les cellules de la membrane synoviale sont généralement séparées par un espace de 1 à 2 mm (Dupuis M et Leclaire R, 1986). Ainsi, bien que la membrane synoviale forme une couche compacte, elle n'est pas continue (Dijkgraaf LC et al., 1996). La membrane synoviale tapisse la capsule articulaire sans toutefois recouvrir le cartilage et les ménisques (Simkin, 1994). Près de l'os, la membrane se sépare de la capsule et s'étale sur le périoste (Dupuis M et Leclaire R, 1986). La membrane synoviale est capable de bien suivre les différents mouvements de l'articulation, car elle possède des microvillosités qui permettent son extension durant le mouvement articulaire ou en réponse à un changement de pression intra-articulaire (Fox RI et Kang H, 1993).

La membrane synoviale est composée de deux couches : la couche intimale et la couche sous-intimale ou subsynovium (Figure 3). Celles-ci sont séparées physiquement par une membrane basale (Garnero P et al., 2000). La couche intimale se retrouve entre la capsule articulaire et la couche sous-intimale. Elle est composée de deux à trois couches de synoviocytes, soit environ 50 μM d'épaisseur,

éparpillées dans la matrice extracellulaire. Les deux types prédominants de synoviocytes présents sont les synoviocytes de types A et B (Garnero et al., 2000). La couche intimale a pour fonction de réguler l'homéostasie hydrique et le transport des protéines plasmatiques dans le liquide synovial (Culty et al., 1992).

La couche sous-intimale est la couche la plus profonde qui fait face à la capsule articulaire. Il s'agit d'une couche de tissu méenchymanteux hétérogène, d'épaisseurs variables, qui sépare la couche intimale de la capsule articulaire (Sledge CB, 2001). Étant constituée essentiellement de matrice extracellulaire, elle possède bien moins de cellules que la couche intimale (Dupuis M et Leclaire R, 1986).

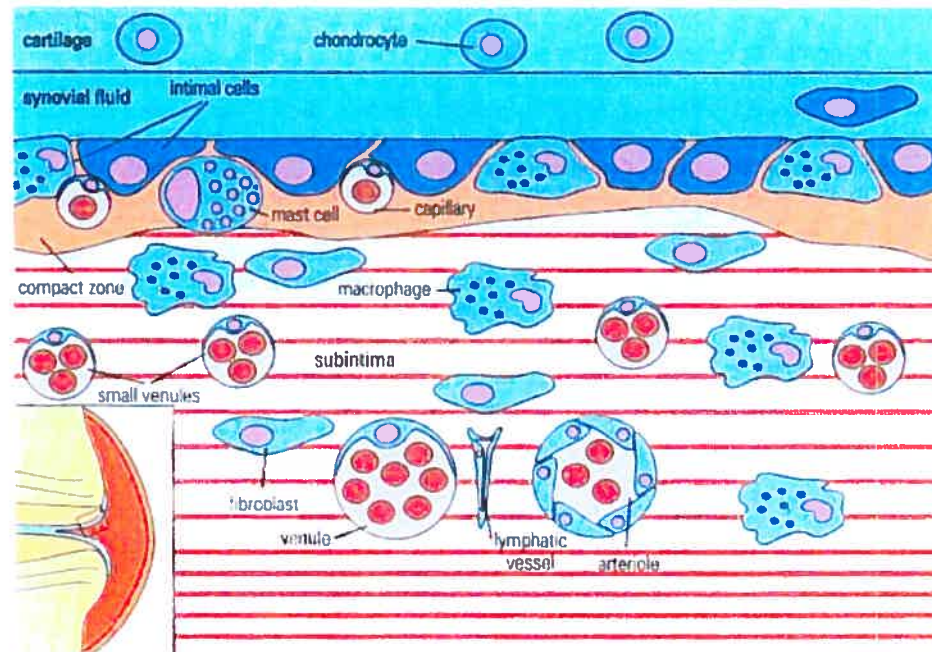


Figure 3 : Représentation schématique de la membrane synoviale (modifiée de

Simkin PA et al.,1994)

1.3.3.2 Composition

La membrane synoviale est un tissu multicellulaire complexe ; il est donc important de faire lumière sur sa composition cellulaire. Tel qu'indiqué précédemment, la couche intimale est constituée de synoviocytes de type A et de type B.

Les synoviocytes de type A sont des cellules macrophagiques non fixées, dérivées des monocytes de la moelle osseuse (Wilkinson LS et al., 1992). Ce sont des cellules d'apparence plutôt ronde, qui se retrouvent à la surface de la membrane synoviale (Nozawa-Inoue K et al., 2003). Celles-ci constituent environ 20 à 30 % des cellules de la couche intimale (Iwanaga T et al., 2000). Structurellement, elle sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules, vacuoles, lysosomes et filopodes (Nozawa-Inoue K et al., 2003). Ce sont ces caractéristiques morphologiques qui confèrent la propriété macrophagique de cette cellule. En effet, les synoviocytes de type A sont responsables de la propreté de la capsule articulaire, en phagocytant et dégradant les débris cellulaires de la cavité articulaire (Allan DA et al., 1998).

Les synoviocytes de type B sont des synoviocytes apparentés aux fibroblastes ; ils constituent environ 70 à 80% des cellules de la couche intimale (Hermanns W et al., 1982 ; Gadially FN et al., 1978). Ce type de synoviocytes peut sécréter des prostaglandines, de la collagénase, de l'acide hyaluronique et d'autres constituants du liquide articulaire (Barland P et al., 1998). Structurellement, elles

sont caractérisées par la présence d'un réticulum endoplasmique rugueux et d'un appareil de Golgi bien développé ainsi que la présence de granules de sécrétion (Nozawa-Inoue K et al., 2003). Les synoviocytes de type B possèdent plusieurs fonctions. Ils assurent la nutrition de la membrane synoviale et la synthèse de la matrice extracellulaire de la membrane synoviale. Ils sont également responsables de la réparation des dommages à la membrane. Ce type de synoviocytes produit et sécrète une grande quantité de collagène de type I et III, de fibronectine ainsi que des glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique joue un rôle essentiel dans la lubrification de l'articulation (Nozawa-Inoue K et al., 2003).

La couche sous-intimale contient de nombreux vaisseaux, du tissu fibreux, des adipocytes, fibroblastes, lymphocytes, mastocytes ainsi que des macrophages. (Hermanns W et al., 1982).

1.3.3.3 Rôle de la membrane synoviale dans l'arthrose

Tel que mentionné ci-dessus, l'OA est associée à l'inflammation de la membrane synoviale. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de cette réaction ne sont pas bien compris. Cependant, de nombreux travaux suggèrent que les produits de dégradation du cartilage seraient à l'origine de ce processus. En effet, lorsque la dégradation du cartilage débute, les produits de dégradation sont libérés dans le liquide synovial et phagocytés par des synoviocytes de type A. Par la suite, la membrane synoviale devient hypertrophique et

hyperplasique (Lindblad S et al., 1987; Myers SL et al., 1990). La dégradation du cartilage induit également une réaction inflammatoire. Celle-ci est caractérisée par une infiltration de cellules mononuclées, telles que les monocytes, les lymphocytes B et T activés (Kreen V et al., 1999, Nakamura H et al., 1999).

Tel que mentionné, la membrane synoviale joue donc un rôle important dans la pathophysiologie de l'OA. C'est un tissu très important, car c'est à travers celle-ci que plusieurs cytokines et autres produits de dégradation traverse, ce qui favorise la progression de la maladie.

1.4 Interleukine-1 β

Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inflammation de la synoviale ne soient pas complètement élucidés, il est admis qu'une surproduction locale de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , y joue un rôle crucial (Van de Loo FA et al., 1995). En effet, l'IL-1 β n'est pas exprimée dans le cartilage normal ; elle est exprimée et produite en grande quantité localement par les chondrocytes et les synoviocytes au cours de l'arthrose (Pelletier JP et al., 2001).

L'IL-1 β est initialement synthétisée comme un précurseur de 31 kDa qui ne possède pas de peptide signal ; elle est ensuite relâchée sous sa forme active de 17 kDa. Une protéase, " IL-1 β -converting enzyme " (ICE) ou caspase 1, est responsable de la forme active de cette cytokine (Mostey B et al., 1987; Siders WM et al., 1993).

L'IL-1 β induit ses effets en interagissant spécifiquement avec son récepteur à la surface cellulaire. Deux récepteurs distincts ont été identifiés, le type I et le type II (Slack J et al., 1993). Le récepteur de type I a une plus grande affinité pour l'IL-1 β que pour l'IL-1 α . Dans les synoviocytes et chondrocytes, le récepteur de type I est responsable de la transduction du signal (Arend WP et al., 1993; Martel-Pelletier J et al., 1992; Sadouk MP et al., 1995), tandis que le récepteur de type II lie l'IL-1 β mais ne transmet aucun signal (Colotta F et al., 1993).

Dans les tissus articulaires arthrosiques, l'IL-1 β est présente au sein de la membrane synoviale et dans le cartilage articulaire, principalement dans les zones superficielles où il existe également une surexpression de son récepteur fonctionnel de type 1 (Pelletier JP et al., 2001; Sadouk MP et al., 1995). Plus le cartilage est atteint, plus l'IL-1 β est présente en grande quantité, suggérant ainsi que la présence de cette cytokine est directement corrélée avec l'intensité des dommages tissulaires. Ainsi, la production d'IL-1 β au niveau articulaire résulte à la fois d'une production par les chondrocytes, les synoviocytes et les macrophages de la membrane synoviale enflammée (Martel-Pelletier J et al., 1992). Les modèles animaux d'arthrose confirment également le rôle primordial de l'IL-1 β , qui est détectée de façon très précoce au cours du processus pathologique (Pelletier JP et al., 2001). Il a été montré qu'une administration intra-articulaire de l'antagoniste du récepteur à l'interleukine-1 (IL-1ra) recombinante humaine chez le chien pouvait ralentir la progression et l'étendue des dommages au cartilage. En effet, cette étude démontre

une diminution significative du nombre d'ostéophytes et des lésions histologiques du cartilage dans les groupes traités (Caron JP et al., 1996).

In vitro, un des effets majeurs de l'IL-1 β sur le chondrocyte est sa capacité à inhiber la synthèse des composants matriciels tels que le collagène de type II et les protéoglycanes (Chevalier X, 1997). L'IL-1 β inhibe l'expression des gènes des agrécanes ainsi que les glycosaminoglycanes. Elle module également la production de certains petits protéoglycanes et des protéines de l'adhésion cellulaire (ICAM). L'IL-1 β induit aussi la dégradation des composants matriciels en augmentant l'expression de certaines enzymes, notamment les métalloprotéinases (MMP) (Oehler S et al. 2002). D'autre part, l'IL-1 β régule sa propre expression et celle d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-6 et le TNF- α chez les chondrocytes et les synoviocytes (Dayer JM et al., 1986 ; Wood Dd et al., 1985).

L'induction du monoxyde d'azote (NO) est un autre mécanisme par lequel l'IL-1 β contribue à la dégradation tissulaire (Figure 4). En effet, ce dernier peut augmenter l'expression des MMP (Evans CH et al. 1996, Taskiran d et al, 1994). Le NO va également diminuer la synthèse des inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP), ce qui facilite l'action de ces enzymes (Pelletier JP et al., 1991).

Un autre volet de l'action de l'IL-1 β est d'induire la production de prostaglandines pro-inflammatoires, telle que la prostaglandine E₂, via l'expression des enzymes intervenant dans la dégradation des phospholipides membranaires, comme la phospholipase A₂ (PLA₂) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Pelletier JP et

al., 2001). La PGE₂ pourrait aussi servir de relais à l'action de l'IL-1 β , notamment sur la production d'enzymes comme la MMP-3 (stromélysine). Enfin, l'IL-1 β joue un rôle crucial dans la douleur, en induisant la production de la PGE₂ qui sensibilise les nocicepteurs périphériques et centraux (Dayer JM et al., 1985 ; Schnyder J et al., 1987).

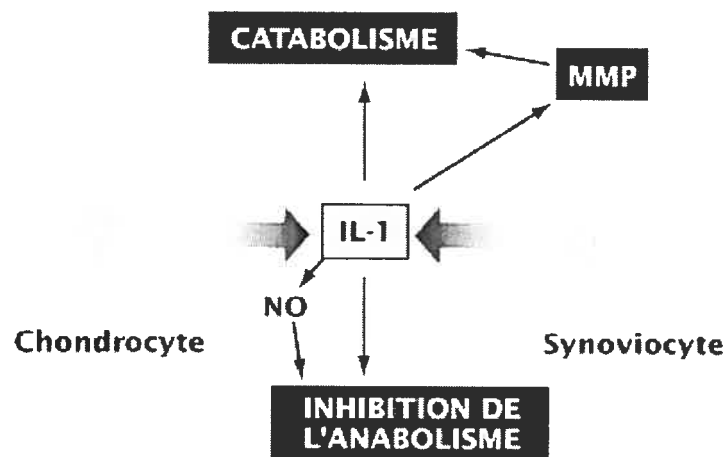


Figure 4 : Rôle pivot de l'IL-1 β

2. Prostaglandines

Les prostaglandines ont été isolées pour la première fois à partir du liquide séminal en 1930 par Ulf Von Euler (Blaschko HK, 1983). On pensait à l'origine qu'elles étaient synthétisées au niveau de la prostate, d'où le nom de prostaglandine. Des études ont par la suite démontré qu'elles étaient synthétisées par presque tous les types cellulaires. Ce sont des médiateurs lipidiques, qui

peuvent agir de manière paracrine ou autocrine. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la vasodilatation, la vasoconstriction, la douleur, la fièvre et la régulation des réponses inflammatoires et immunitaires (Herschman HR et al 1996).

2.1 Biosynthèse des prostaglandines

La biosynthèse des prostaglandines s'effectue à partir d'un précurseur commun, l'acide arachidonique (AA). Elle est initiée par la libération de l'AA à partir des phospholipides membranaires. L'enzyme responsable de cette libération est la phospholipase A₂ (PLA₂). La PLA₂ est activée par des stimuli spécifiques tel que l'IL-1 β (Lands WE et Samuelsson B, 1968 ; Nugteren DH et al., 1966). L'AA est ensuite métabolisé par la COX. Cette réaction mène à la formation d'un intermédiaire instable, la PGG₂; celle-ci est par la suite rapidement isomérisée en PGH₂. La COX possède deux activités enzymatiques. Elle a tout d'abord, une activité COX capable de catalyser l'addition de deux molécules d'oxygène et un groupe hydroxypéroxyde à l'AA pour former la PGG₂; elle possède ensuite une activité peroxydase réduisant cette forme instable en PGH₂ (Berg JM et al., 2002). La PGH₂ est le précurseur immédiat de toutes les prostaglandines de la série 2, des prostacyclines et des thromboxanes. Finalement, la PGH₂ est convertie en produits biologiques actifs, soient les PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, TXA₂ et PGI₂. La conversion de la PGH₂ en ces prostaglandines spécifiques dépend de la présence et de l'activité spécifique d'enzymes, telles que la prostaglandine E synthase (mPGEs), la prostacycline synthase (PGIS), la prostaglandine D synthase (PGDS), et la

thromboxane synthase (TXS). La présence ou l'absence de synthases et d'isomérase spécifiques dans un tissu donné orientera le métabolisme de l'AA (Herschman HR et al 1996)(voir figure 5).

2.2 Effets biologiques

Les prostaglandines jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques. La PGE₂ et PGI₂ jouent un rôle inhibiteur dans le contrôle du tonus vasculaire en induisant une vasodilatation artérielle. La TXA₂ et PGF₂, quant à elles, jouent un rôle de vasoconstricteur (Bunling S et al., 1987 ; Bhagwat SS et al., 1985). La PGD₂ est un agent vasodilatateur, anti-agrégatoire et broncho constricteur (Urade Y, 1989 ; Murakami M et al., 1995). La PGF₂ stimule la prolifération d'hépatocytes et participe à l'inhibition de la différenciation des adipocytes (Dajani O et al., 1996). Dans la voie reproductive, la PGF₂ est impliquée dans la lutéolyse durant la contraction du myomètre (Senior J, 1993 ; Sugimoto Y et al., 1997). En ce qui concerne la TXA₂, c'est un puissant stimulateur de l'agrégation des plaquettes, et elle induit les contractions musculaire, respiratoire et vasculaire (Shen RF et al., 1998).

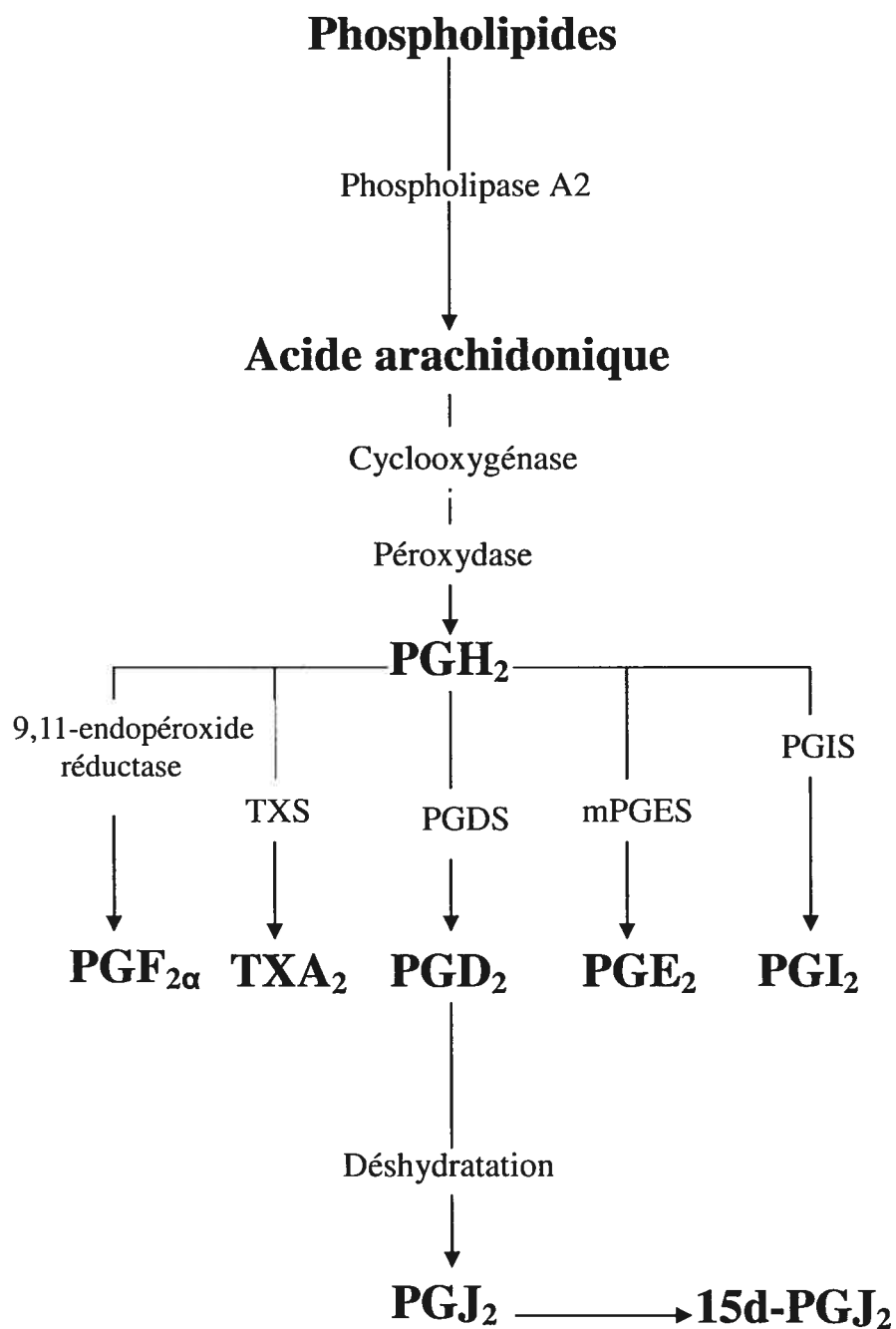


Figure 5 : Voie de biosynthèse des prostaglandines

Parmi ces prostaglandines, la PGE₂ est la principale prostaglandine produite dans les tissus articulaires. Elle est libérée des synoviocytes et chondrocytes en réponse à la stimulation de plusieurs cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et le TNF- α (Geng Y et al 1995 ; Hulkower KI et al 1994).

La PGE₂ joue un rôle important dans la physiopathologie de l'OA. Une production excessive de cette prostaglandine a été détectée dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrite. La PGE₂ contribue également à la dégradation des tissus articulaires en favorisant la production de MMP, la résorption osseuse, et l'angiogénèse. Le rôle critique de la PGE₂ dans la pathologie de l'arthrite a été supporté dans un modèle animal arthritique dont les récepteurs pour la PGE₂ ont été supprimés (Myers LK et al., 2000 ; McCoy JM et al., 2002). En effet, dans l'étude de McCoy, les animaux qui n'ont pas le récepteur EP4, démontrent une réduction de l'inflammation ainsi qu'une diminution dans la résorption osseuse, la perte de protéoglycanes et la dégradation du cartilage. Ceci indique effectivement que la PGE₂ joue un rôle important dans la progression de l'arthrite.

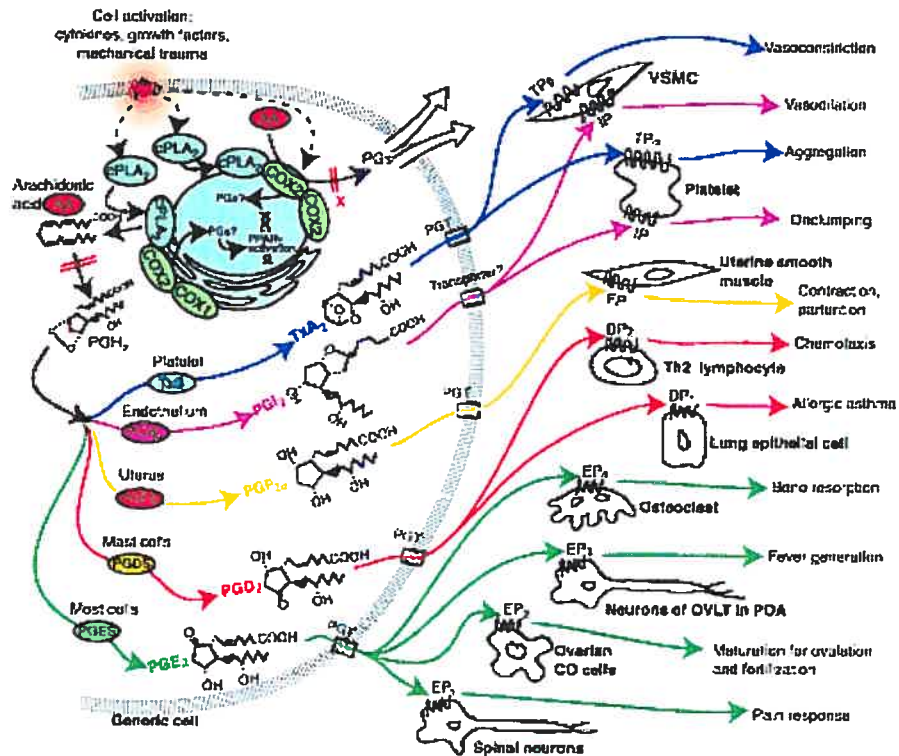


Figure 6 : Fonction des prostaglandines. L'AA est converti en PGH₂ grâce aux COXs. La PGH₂ est ensuite transformée par les différentes isomérases présentes dans les cellules, menant à la formation de prostaglandines, de thromboxanes et de prostacycline. Ces différents produits vont, par la suite, médier les différentes fonctions des COXs dans les tissus cibles en se liant à leurs récepteurs spécifiques. (Modifiée de Funk, 2001).

2.3. Cyclooxygénases

Les COX, aussi connues en tant que prostaglandines H synthases, sont des enzymes clés dans la biosynthèse des prostaglandines. Il existe deux isoformes de la COX, dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau I. L'une est l'isoforme constitutive de 67 kDa (COX-1), tandis que l'autre est l'isoforme inductible de 72 kDa (COX-2) (Fletcher BS et al., 1992; Garavito RM, 1996). Les

COX-1 et COX-2 partagent environ 60-65 % d'identité dans leurs séquences en acides aminés.

Récemment, une autre isoforme de la COX a été identifiée, la COX-3. Il n'existe pas encore de preuves concrètes de l'existence de cette isoforme, mais il est proposé qu'elle serait exprimée chez le chien dans le cortex cérébral et le cœur. Cette isoforme posséderait les mêmes propriétés structurales et catalytiques des COX-1 et COX-2, mais aurait une sensibilité plus grande à l'acétaminophène (Chandrasekharan NV et al., 2002; Simmons DL et al., 1999).

2.3.1 Cyclooxygénase-1

La COX-1 est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus de l'organisme (O'Bannon B et al., 1991); cependant, la COX-1 peut être induite dans certains tissus, telles que les astrocytes (Taniura S et al., 2002), les cellules endothéliales (Doroudi R, 2000) et les lignées cellulaires promotiques (Smith CJ et al., 1997). Elle est nécessaire dans plusieurs processus physiologiques, notamment la cytoprotection de la muqueuse digestive et la régulation de l'hémodynamique rénale (Arakawa T et al., 1998). Son promoteur contient plusieurs éléments régulateurs de la transcription, tels que deux motifs Sp1, deux sites AP-2, un motif NF-IL6 et un GATA. Cependant, la région 5' ne contient pas de boîte TATA, ce qui concorde avec l'expression constitutive de la COX-1 (Figure 7A) (Inoue H et al., 1995).

Tableau 1 : Caractéristiques des COX-1 et -2

Caractéristiques	COX-1	COX-2
Locus	9q32-q33.3 ¹	1q25.2-q25.3 ²
Longueur du gène	22 kb ¹	8.3 kb ²
Nombre exons	11 ¹	10 ²
Taille ARNm	2.8 kb	2.8 kb, 4.0 kb, 4.6 kb
Stabilité ARNm	Stable	Instable
Taille de l'enzyme	576 aa ¹	604 aa ²
Expression de l'enzyme	Constitutive	Inductible
Localisation cellulaire	Presque toutes les cellules	Les cellules stimulées : Cellules des tissus articulaires (Voir Morita et al, 2002) - Cellules du système reproducteur féminin - Cellules endothéliales et épithéliales - Plusieurs cellules tumorales
Localisation intracellulaire	Membrane nucléaire et RE	Surtout membrane nucléaire
Principales fonctions biologiques	Aggrégation plaquettaire Balance hydrique rénale Cytoprotection gastrique	Inflammation Vasodilatation Résorption osseuse Désagrégation plaquettaire

(Modifié de Morita, 2002; 1 Funk CD et al., 1991; 2 Inoue H et al., 1995)

2.3.2 Cyclooxygénase-2

L'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) est induite suite à différents stimuli, tels que les stimuli inflammatoire; IL-1 β , TNF- α , LPS, les hormones et les agents mitogènes (Dubois RN et al., 1998; Smith WL et al., 2000). Elle est exprimée que dans certains types cellulaires, dont les chondrocytes et synoviocytes (Siegle I et al., 1998; Amin AR et al., 1997). Plusieurs éléments cis dans la région 5' régulent la transcription du gène de la COX-2. Cependant, seulement les éléments CRE, NF-16, NF- κ B et E-box sont impliqués dans la régulation de l'expression de la COX-2 (Figure 7B).

La surexpression de la COX-2 joue un rôle dans plusieurs états pathophysiologiques incluant l'inflammation, le cancer, la maladie d'Alzheimer et l'arthrite. En effet, la surexpression de la COX-2 dans les tissus articulaires est associée avec l'augmentation de la production de la PGE₂.

Lorsqu'un inhibiteur spécifique de la COX-2, le SC-58125, est utilisé celui-ci diminue l'expression de la COX-2 et la production de la PGE₂ de même que l'inflammation (Fahmi H et al., 2002). Ceci suggère qu'une inhibition sélective de la COX-2 résulte dans l'amélioration de l'inflammation et ainsi des maladies arthritiques (Martel-Pelletier J et al., 2003).

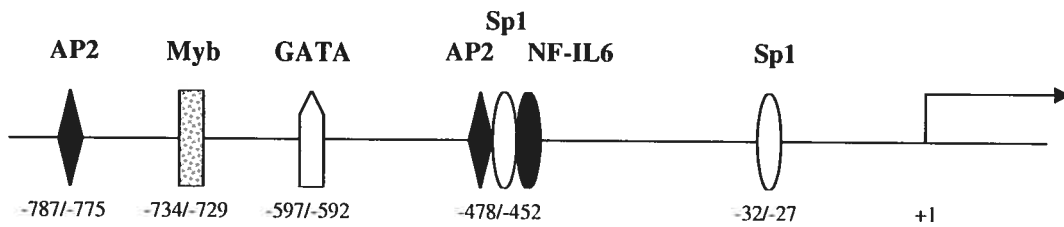
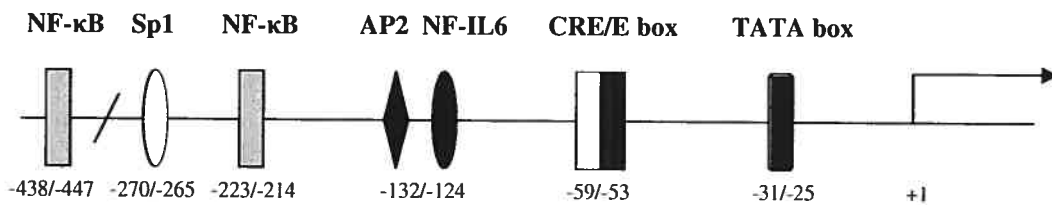
A**B**

Figure 7 : Éléments régulateurs dans A) le promoteur humain de la COX-1 B) le promoteur humain de la COX-2 (Inoue H et al., 1995).

2.3.3 Régulation de l'expression de la COX-2

2.3.3.1 Voie MAPK

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la COX-2 : la voie adénylate cyclase, protéine kinase C et protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK). L'implication de ces voies de signalisation est spécifique à un type cellulaire et dépendent du stimulus. Parmi celles-ci, la voie MAPK est la plus impliquée dans l'expression de la COX-2 (Kujub M, 1991; Nelson, 1992).

La famille de MAPK consiste en trois différents sous-groupes composés des kinases ERK1/2, JNK/SAPK et p38. Ces kinases contribuent indépendamment ou ensemble à l'induction de l'expression COX-2 (Su B et al., 1996). Plusieurs cytokines pro-inflammatoires activent la voie de JNK/SAPK et p38, tels que l'IL-1 β et le TNF- α . La voie ERK est activée préférentiellement par des facteurs de croissance (Su B et al., 1996; Kyriakis et al., 1996). Lorsque activées, les MAPK peuvent phosphoryler et activer des facteurs de transcription qui régulent l'expression de la COX-2 (Guan Z et al., 1998). Il a été démontré que l'activation des voies JNK/SAPK et p38 sont nécessaires pour l'expression de la COX-2 lorsque celle-ci est induite par l'IL-1 β (Guan Z et al., 1998).

2.3.3.2 Facteurs de transcription

Plusieurs éléments régulateurs sont présents dans le promoteur de la COX-2. Premièrement, l'ATF (CRE) est un des éléments régulateurs essentiels dans le

promoteur de la COX-2. Les homo et hétéro-dimères de c-fos et c-jun, les familles ATF et l'AMPc response element binding protein (CREB) peuvent lier cet élément et activer la transcription de la COX-2 (Du W et al., 1993; Nakabeppu Y et al., 1988; Rauscher III FJ et al., 1988). En effet, il a été démontré que la mutation de cet élément diminue l'expression de la COX-2, démontrant ainsi la nécessité de ATF/CRE pour l'expression de la COX-2 (Inoue H et al., 1995).

De plus, le motif NF-IL6, présent à la position -132/-124 bp dans le promoteur humain de la COX-2, est aussi requis pour l'expression de la COX-2 (Figure 7B) (Wadleigh DJ et al 2000). Ce motif est adjacent à un site AP-2 qui joue un rôle dans l'induction de la COX-2 par la TPA et LPS (Inoue H et al 1995). L'activation de l'élément NF-IL6 est associée aux facteurs de transcription C/EBP (Wedel A et al., 1995). Les trois principaux membres de la famille des C/EBP sont C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ . Ceux-ci reconnaissent la même séquence d'ADN et possèdent une structure de gène commune. Ces facteurs de transcription permettent de réduire ou d'activer l'expression de la COX-2 dépendamment du type cellulaire (Chandrasekaran C et al., 1993; O'Rourke J et al., 1997). Ces facteurs de transcription sont régulés de façon post-traductionnelle et par phosphorylation de résidus sérines et tyrosines spécifiques par les MAPKs (Gallois C et al., 1998). Les MAPKs augmentent l'activité de ces facteurs de transcription. En effet, dans les cellules NIH 3T3, le facteur C/EBP β est activé lorsque celui-ci est phosphorylé par ERK sur un résidu thréonine (Nakajima T et al., 1993).

Dans la région du promoteur de la COX-2, deux sites de liaison de NF- κ B sont présents (Figure 7B). Le NF- κ B est particulièrement important dans l'induction de l'expression de la COX-2 dans plusieurs types cellulaires incluant les macrophages murins (D'acquisto F et al., 1997) et les synoviocytes (Roshak AK et al., 1996). Plusieurs agents qui activent les MAPKs activent aussi le NF- κ B, suggérant un possible « cross-talk » entre ces deux voies de signalisation. L'activation du NF- κ B est modulée par la MAPK/ERK kinase kinase 1 (MEKK1) ainsi que par la p38 (Schwenger P et al., 1998). Des études ont démontré que des inhibiteurs spécifiques de ERK et p38 inhibaient aussi l'activité du NF- κ B (Vanden Berghe W et al., 1998). Des cibles possibles de ces voies incluent la sous-unité p65, le coactivateur CPB/p300 et les sous-unités de l'ARN polymérase II.

2.3.3.3 CBP/p300

Les homologues « CREB binding protein » (CBP) et p300 sont présents dans plusieurs organismes multicellulaires. Ce sont des co-activateurs transcriptionnels, des protéines servant de pont entre les facteurs de transcription et les protéines de la machinerie transcriptionnelle de base, tels que les facteurs TBP, TFIIB et l'ARN polymérase II. Le co-activateur p300 possède aussi une activité histone acétylase (HAT). Cette activité permet d'acétyler des lysines spécifiques sur les extrémités N-terminales des histones et d'activer l'expression des gènes.

Il a été démontré que le co-activateur p300 est impliqué dans la transcription du gène de la COX-2. Il joue aussi un rôle essentiel dans l'activation du promoteur

de la COX-2 par des stimuli pro-inflammatoires, tels que la TPA, l'IL-1 β et le LPS (Deng WG et al., 2004). Plusieurs études indiquent que ce co-activateur a un rôle particulièrement important dans l'expression de la COX-2. En effet, la surexpression de la p300 augmente l'activité du promoteur et de ce fait, l'expression protéique de la COX-2 (Deng WG et al., 2003; Subbaramaiah K et al., 2002). De plus, lorsque la p300 est séquestrée par la protéine adénovirale E1A, l'expression de la COX-2 est inhibée (Deng WG et al., 2003).

3. "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma" (PPAR γ)

Les Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) sont des facteurs de transcription et des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Mangelsdorf D.J., 1995). La famille des PPARs comprend 3 isoformes codés par 3 gènes différents et désignés PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . Ils ont une distribution tissulaire spécifique et des activateurs distincts (Qi C., 2000). Le PPAR α est exprimé essentiellement dans les tissus impliqués dans le catabolisme lipidique : foie, coeur, reins et muscle. Le PPAR β a une distribution ubiquitaire. Finalement, le PPAR γ est exprimé essentiellement dans le tissu adipeux, la rate et le colon (Issemann I., 1992 ; Braissant O., 1996). Initialement, PPAR γ a été identifié comme un facteur intervenant dans la régulation du métabolisme des lipides et des glucides. Récemment de nombreux travaux ont démontré que PPAR γ est aussi impliqué dans d'autres processus biologiques comme la prolifération cellulaire, l'apoptose et la régulation des réponses inflammatoires et immunitaires (Ricote M., 1999 ; Escher P., 2000 ; Corton J.C., 2000).

3.1 Ligands de PPARs

Les PPARs peuvent être activés par une panoplie de composés qui peuvent être classés en deux familles : les ligands naturels et les ligands synthétiques (Tableaux II et III). Les thiazolidinédiones (antidiabétiques oraux) comme le troglitazone et le BRL 49653 ainsi que certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) sont quelques exemples de ligands synthétiques de PPAR γ (Forman BM., 1995 ; Lehmann JM., 1995). En revanche, la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂), un dérivé de la PGD₂, et certains métabolites de la 12/15 lipoxigénase (12/15LO) comme l'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque (13-HODE) et l'acide 15-hydroxyéicosatétraénoïque (15-HETE) sont des activateurs naturels de PPAR γ (Forman BM., 1995).

3.2 PPAR γ dans les tissus articulaires

Des travaux réalisés dans notre laboratoire et ailleurs ont démontré que PPAR γ est exprimé par certaines cellules des tissus articulaires tels que le cartilage, l'os sous-chondral et la membrane synoviale (Fahmi H., 2001).

Dans les chondrocytes, les ligands de PPAR γ , 15d-PGJ₂ et BRL49653 inhibent l'induction par l'IL-1 β , du NO et la MMP-13. Cet effet ne semble pas spécifique à l'IL-1 β puisque la capacité de l'IL-17 et du TNF- α à induire le NO et la MMP-13 est également réduite suite à l'activation de PPAR γ (Fahmi H., 2001).

Tableau 2 : Affinité des ligands naturels pour les différentes isoformes de PPAR

LIGANDS NATURELS DE PPAR				
Classes	Ligands	PPAR		
		α	β	γ
Acide gras	Acide arachidonique	+	+	+
	Acide Linoléique	++	+	-
	Eicosapentaenoïque	++	+/-	++
	Docosahexaenoïque	++	+/-	++
	9-HODE	ND	ND	++
	13-HODE	ND	ND	++
	Eicosanoïdes	PGA1	+	++
PGJ2		+	+	++
15d-PG2		+	+/-	+++
8(s)-HETE		+++	-	-
12-HETE		++	ND	ND
15-HETE		ND	ND	+
<i>LTB</i>		+/-	ND	ND

Légende : + : Faible affinité ; ++ : Affinité moyenne ; +++ : Forte affinité (Fahmi et al. 2002. review)

Tableau 3 : Affinité des ligands synthétiques pour les différentes isoformes de PPAR

LIGANDS SYNTHÉTIQUES DE PPAR				
Classes	Ligands	PPAR		
		α	β	γ
Droque	Wy 14643	+++	+	+
Hypolipidémique	Clofibrate	++	+/-	+
	Ciprofibrate	++	-	+
	Gemfibrozil	++	-	+
Thiazolidinédiones	BRL 49653	-	-	+++
	Pioglitazone	-	-	++
	Troglitazone	-	-	++
AINS	Indomethacin	+	-	+++
	Ibuprofen	+	-	+
	<i>Fenoprofen</i>	++	-	+

Légende : + : Faible affinité ; ++ : Affinité moyenne ; +++ : Forte affinité (Fahmi et al. 2002. review)

De leur côté, Bordji et al (Bordji K et al., 2000) ont montré que le troglitazone, un ligand synthétique de PPAR γ , prévient la dégradation des protéoglycanes induite par les cytokines pro-inflammatoires. Dans une autre étude, Curtis et al (Curtis CL., 2000) ont montré que deux acides gras, EPA et DHA, reconnus pour leur capacité à activer PPAR γ , inhibaient l'expression de l'aggrécanase.

Dans les synoviocytes, l'activation de PPAR γ inhibe l'induction de la MMP-1, la mPGES-1 (Fahmi H., 2002 ; Cheng S., 2004), le TNF- α , l'IL-1 β (Ji JD., 2001), la COX-2, la phospholipase A₂ cytosolique (PLA₂) et finalement la production de la PGE₂ (Tsubouchi Y., 2001).

Finalement, Mbalaviele et al ont montré que les ostéoclastes exprimaient aussi PPAR γ . En inhibant la voie NF- κ B, les ligands de PPAR γ inhibent la différenciation des ostéoclastes (Mbalaviele G., 2000).

Le rôle anti-inflammatoire de PPAR γ a été concrétisé en utilisant plusieurs modèles animaux d'arthrite. Dans un modèle murin, les ligands de PPAR γ inhibent la production de la nitrosyne, l'expression de la COX-2, iNOS et ICAM-1 (Shiojiri T., 2002). Fujiwara et al ont démontré qu'un traitement au troglitazone prévient la résorption osseuse dans un modèle d'arthrite rhumatoïde chez le rat (Fujiwara T., 2000). De leur côté, Kawahito et al ont utilisé le même modèle animal et ont démontré qu'un prétraitement par les ligands de PPAR γ , le troglitazone et la 15d-PGJ₂, réduit la sévérité de la maladie en inhibant la formation du panus synovial et l'infiltration de cellules mononuclées (Kawahito Y., 2000). Puisque la délétion de PPAR γ est létale, Setoguchi et al ont généré des souris haplodéficientes pour

PPAR γ et ont démontré que l'arthrite est beaucoup plus exacerbée chez ces souris que chez leurs homologues sauvages (Setoguchi K., 2001). Finalement, dans un modèle expérimental d'OA chez le cochon d'Inde, le pioglitazone réduit la progression de l'arthrose en inhibant la production et l'expression de l'IL-1 β et de la MMP-13 (Kobayashi T., 2005).

L'ensemble de ces données indique que les ligands de PPAR γ inhibent de nombreuses réponses inflammatoires et cataboliques, ce qui suggère que cette voie pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'arthrose.

3.3 Propriétés anti-inflammatoires des ligands de PPAR γ dans d'autres types cellulaires

En plus de leur rôle anti-inflammatoire dans les tissus articulaires, de nombreux travaux ont montré récemment que les ligands de PPAR γ modulent la réponse inflammatoire et immunitaire dans la plupart des types cellulaires impliqués dans la pathogenèse des maladies arthritiques.

Dans les cellules de la lignée monocyte/macrophages, les ligands de PPAR γ inhibent la production du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de la MMP-9 (Jiang C., 1998; Ricote M., 1998). Dans les lymphocytes Th, les ligands de PPAR γ inhibent l'induction de la production de l'IL-2 par la phytohématagglutinine et l'anti-CD3 (Clark RB., 2000). L'activation de PPAR γ conduit aussi à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B, à la production de nombreuses chémokines par les cellules endothéliales et à la production de H₂O₂ par les neutrophiles (Vaidya S., 1999).

3.4 Mécanisme d'action des PPARs

Après fixation de leurs ligands, les PPARs s'hétérodimérisent avec les récepteurs X de l'acide rétinoïque (RXR) et induisent l'expression des gènes en se fixant à des éléments de réponse PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) situés en aval des gènes cibles (Tugwood JD., 1992).

Au repos, les PPARs sont associés avec des chaperons dans le cytoplasme (Bishop-Bailey D et al. 1999). Lorsque les PPARs sont activés en présence de leurs ligands, il y a dissociation des chaperons dans le cytoplasme, ce qui résulte en la translocation de PPAR dans le noyau ce qui permet l'interaction avec des co-activateurs et facteur de transcription (Zhu Y et al., 1997). Il s'ensuit une activation ou répression d'une variété de gènes qui possèdent un site PPRE dans leur promoteur. Le mécanisme d'activation de ce récepteur nucléaire implique le recrutement de complexes de coactivateurs au niveau du promoteur. D'un autre côté, la répression des gènes par PPAR s'effectue par la régulation négative de l'activité de facteurs de transcription spécifiques. Lorsque les récepteurs nucléaires sont activés dans le noyau, ils peuvent faire des interactions protéines-protéines avec plusieurs facteurs de transcriptions, tels que AP-1 et NF- κ B (Ricote M et al., 1998; Li M et al., 2000). Cette interaction interfère avec la liaison à l'ADN et l'activation transcriptionnelle de ces facteurs de transcription. D'un même ordre d'idée, les PPARs peuvent aussi compétitionner pour des quantités limitées de complexe co-activateur, ce qui résulte en l'activation et répression de certains gènes (Kamei Y et al. 1996). En effet, Zhang et Young démontrent que lorsque PPAR γ

est activé par la 15d-PGJ₂, il compétitionne pour la p300/CBP, inhibant ainsi l'activité du promoteur INF- δ (Zhang X et al., 2004).

3.5 Mécanisme d'action du ligand naturel de PPAR γ : 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂

La prostaglandine 15d-PGJ₂ a reçu beaucoup d'attention, car celle-ci a été identifiée en 1995 comme étant un ligand de haute affinité pour le PPAR γ (Forman BM et al 1995; Kliewe SA et al 1995).

Il a été substantiellement décrit que la 15d-PGJ₂ possède des effets anti-inflammatoires. Tel que souligné ci-dessus, de nombreuses études ont démontrées que cette prostaglandine inhibe l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire ainsi que dans l'inflammation (Ricote M et al., 1998; Jiang C et al., 1998).

La 15d-PGJ₂ régule ces effets inhibiteurs par des mécanismes dépendants et indépendants de PPAR γ (Figure 8).

3.5.1 Mécanisme dépendant de PPAR γ

Ricote et al. (Ricote M et al. 1998) ont démontré que l'activité des promoteurs de iNOS et MMP-9 dans les macrophages est fortement inhibée par la 15d-PGJ₂. De plus, d'autres études ont démontré que la 15d-PGJ₂ inhibe l'activation transcriptionnelle induite par les LPS, NF- κ B et AP-1 seulement en présence de PPAR γ (Ricote M et al. 1998). Finalement, il a été montré que des mutations qui

interfèrent avec l'activation ligand-dépendante de PPAR γ interfèrent aussi avec la répression du promoteur de iNOS (Li M et al. 2000).

3.5.2 Mécanisme PPAR γ indépendant

D'un autre côté, d'autres études ont démontré que la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression des gènes par un mécanisme PPAR γ indépendant. En effet, il a été observé que la 15d-PGJ₂ inhibe l'activité promotrice du gène iNOS dans des cellules qui n'expriment pas PPAR γ (Chawla A et al. 2001). De plus, le ligand synthétique de PPAR γ , BRL49653, est moins actif que la 15d-PGJ₂ pour réprimer l'activité promotrice des gènes. Étant donné que les ligands synthétiques et la 15d-PGJ₂ lient PPAR γ avec des affinités similaires, ces données indiquent l'existence d'un mécanisme de répression indépendant de PPAR γ (Ricote M et al. 1998).

Le NF- κ B est une cible majeure des mécanismes indépendants de PPAR γ . Ce facteur de transcription joue un rôle clé dans l'activation et la répression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Tel que mentionné auparavant, au repos, NF- κ B est lié à son inhibiteur I κ B dans le cytoplasme. Lors de l'activation par une cytokine inflammatoire, I κ B est phosphorylé par la kinase I κ B (IKK) et dégradé par le protéosome. Ceci résulte en la libération et la translocation de NF- κ B dans le noyau (Ghosh S et al. 1998).

Dans les macrophages et les cellules Jurkat T, la 15d-PGJ₂ se lie de façon covalente à IKK, ce qui l'empêche d'être activée par les cytokines. Ceci prévient la dégradation de I κ B et par conséquent l'entrée dans le noyau de NF- κ B (Rossi A et

al. 2000). D'autre part, dans les cellules HeLa-S, la 15d-PGJ₂ inhibe directement la liaison de NF-κB à sa cible sur l'ADN via l'alkylation d'une cystéine conservée dans le domaine de liaison à l'ADN de NF-κB (Strauss D.S et al 2000).

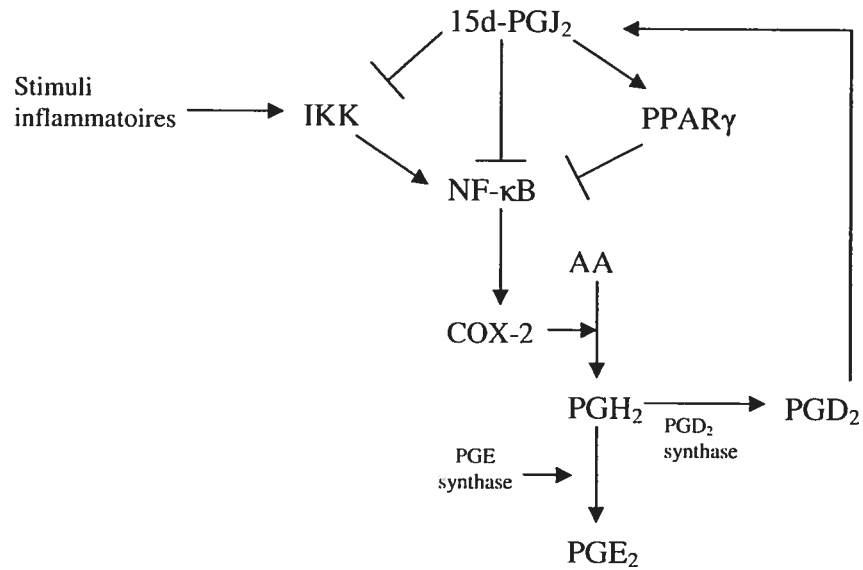


Figure 8 : Mécanisme d'action de la 15d-PGJ₂ dans la synthèse des prostaglandines

3.6 Effet de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ sur l'expression de la COX-2

Tel qu'est indiqué plus haut, la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'OA, tels que la MMP-1, la MMP-13 et le NO dans les chondrocytes et la MMP-1 dans les synoviocytes. Étant donné ces caractéristiques, il est envisageable que la 15d-PGJ₂ soit un bon agent thérapeutique pour le traitement de l'arthrite.

Cependant, l'effet de la 15d-PGJ₂ sur l'expression de la COX-2, enzyme importante dans la production de la PGE₂, est controversé car cet effet est spécifique pour une cellule donnée. En effet, cette prostaglandine inhibe l'expression de la COX-2 induite par le phorbol myristate acétate (PMA) et la LPS dans les cellules épithéliales et les macrophages respectivement (Subbaramaiah K et al 2001). D'un autre côté, la 15d-PGJ₂ augmente l'expression de la COX-2 induite par IL-1 β dans les muscles lisses des voies aériennes (Pang L et al. 2003) et astrocytes, mais elle n'a aucun effet sur l'expression de ce gène dans la migroglie (Janabi N et al 2002). Finalement, il a été observé que la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de la COX-2 induite par IL-1 β chez les chondrocytes mais induit l'expression de ce gène en l'absence de IL-1 β (Fahmi H et al. 2002).

4. Chromatine

On sait depuis de nombreuses années que l'ADN des organismes eucaryotes est fortement condensé dans le noyau sous forme de chromatine. Cependant, ce n'est que récemment que l'on a réalisé que la chromatine est largement impliquée dans la régulation de l'expression génique. D'énormes efforts sont maintenant déployés afin de mieux comprendre comment la structure de la chromatine est modifiée afin de contrôler la transcription des gènes. Il n'est pas surprenant de constater la vigueur du domaine de recherche sur les modifications de la chromatine puisque l'élucidation des mécanismes de la régulation génique est essentielle à la compréhension de nombreux phénomènes comme le développement embryonnaire, le cancer et l'arthrite.

4.1 Structure

La chromatine ressemble à un collier dont les perles sont les nucléosomes et le fil intercalaire est l'ADN (Figure 9). Le nucléosome est constitué d'un cœur protéique d'histones autour duquel 146 pb d'ADN font 1.7 tour (Van Holde K, 1998). La formation de la fibre de chromatine permet le premier degré de compaction de l'ADN et le second degré de compaction est obtenu par l'enroulement de cette fibre de chromatine sur elle-même. La structure solénoïdale ainsi formée a un diamètre de 30 nm et on compte environ 6 nucléosomes par tour de solénoïde (Figure 10) (Workman JL et Kingston RE, 1998).

Le cœur protéique du nucléosome est composé de deux copies de chaque histone, H2A, H2B, H3 et H4, et d'une copie de l'histone H1 liant l'ADN (Figure 11) (Kornberg RD et al., 1999). Les histones sont des protéines basiques dont les séquences en acides aminés sont très bien conservées à travers l'évolution. Les extrémités N-terminales des histones sont riches en résidus chargés positivement, Arg et Lys, ce qui favorise les liaisons de type ionique avec les groupements phosphates de l'ADN chargés négativement (Workman JL et Kingston RE, 1998).

Au cours des dernières années, il a été clairement démontré que la chromatine joue un rôle dynamique dans la régulation de la transcription des gènes (Fyodorov et Kadonaga, 2001). Il a été observé par Emil Heitz (Heitz E, 1928) que la chromatine des eucaryotes peut exister sous deux conformations, l'hétérochromatine et l'euchromatine. D'une part, l'hétérochromatine, la région de la chromatine la plus condensée, est généralement associée avec la région inactive du génome. Celle-ci contient peu de gènes actifs et est répliquée tardivement dans la phase S (Holmquist GP, 1987). D'autre part, l'euchromatine est la forme la plus décondensée et riche en gènes actifs. En effet, cette conformation facilite l'accès de la machinerie transcriptionnelle de base et les facteurs de transcription, ce qui permet la transcription des gènes.

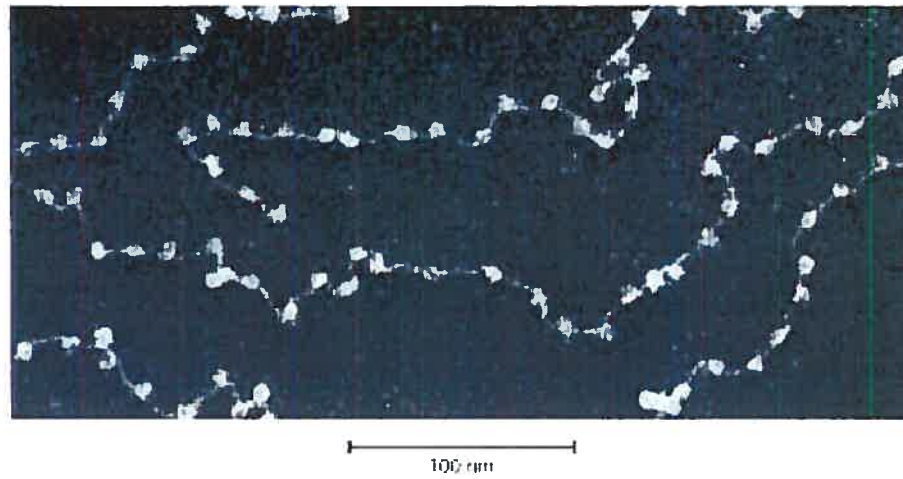


Figure 9 : Structure de la chromatine par microscopie électronique
 (Avec la permission de Dr. Ada Olins et Dr. Donald Olins, Bowdoin College (annexe)
 Retrouvé dans Berg, Jeremy et al., *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Co, 2002,)

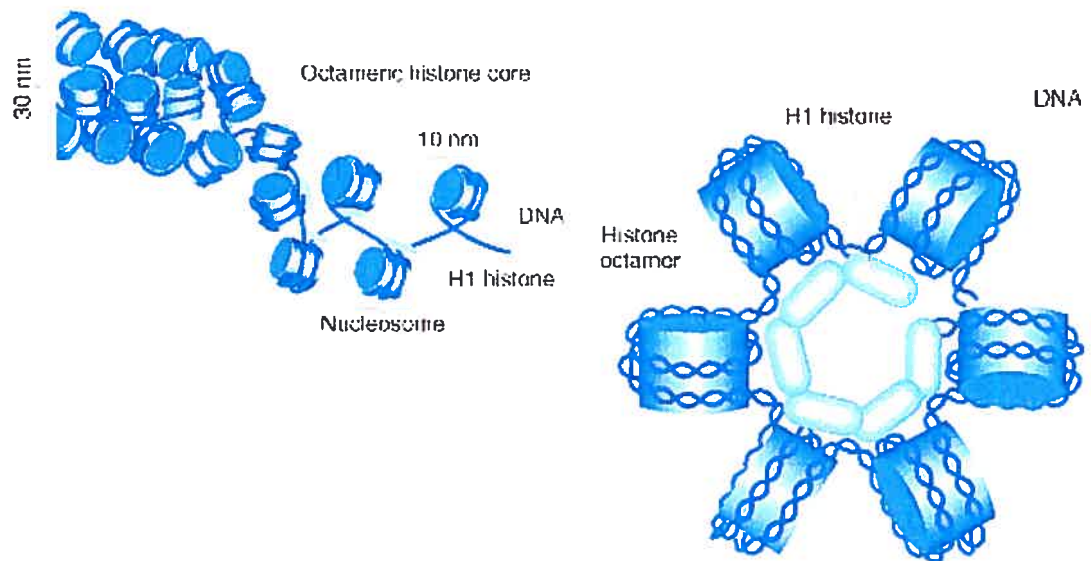


Figure 10 : Modèle solénoïde de la fibre de chromatine
 (Lodish H, *Molecular Cell Biology* 4th ed, 2000)

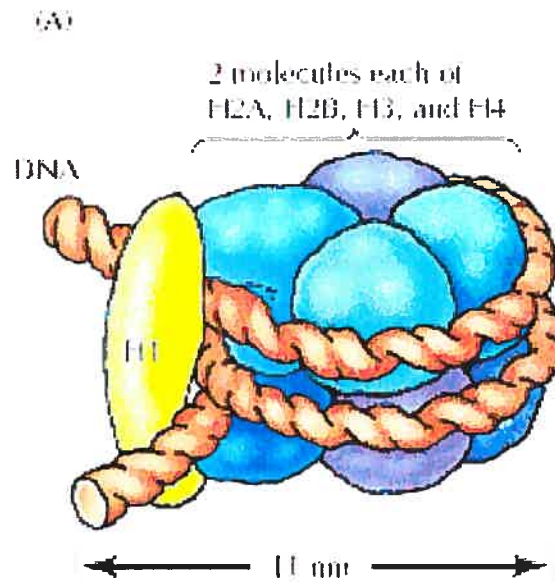


Figure 11 : Structure du nucléosome. Le cœur protéique du nucléosome est composé de deux copies de chaque histone, H2A, H2B, H3 et H4, et d'une copie de l'histone H1 liant l'ADN. (Lodish H, *Molecular Cell Biology* 4th ed, 2000)

4.2 Modifications de la chromatine

Les modifications de la chromatine jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transcription. Ces modifications régulent le recrutement des facteurs de transcription et de la machinerie transcriptionnelle au niveau des promoteurs. Ces modifications sont regroupées en deux classes : premièrement, les modifications impliquant un remodelage de la chromatine ATP-dépendant, et deuxièmement, les modifications covalente des histones.

Le remodelage de la chromatine requiert de l'énergie sous forme d'ATP, et est médié par des complexes multiprotéiques de haut poids moléculaire appelés

complexes de remodelage de la chromatine (Vignali M et al., 2000). Le mécanisme du remodelage effectué par ces complexes est encore mal compris. Toutefois, on sait que le recrutement de ces complexes au niveau d'un promoteur modifie la conformation de la chromatine en favorisant le déplacement des octamères d'histones, ce qui augmente l'accessibilité de l'ADN et active la transcription (Côté J et al., 1998). Les complexes de remodelage ATP-dépendante ont été classés en trois groupes principaux, selon la nature de leurs sous-unité ATPase : le groupe SWI2/SNF2, le groupe SWI (ISWI) et le groupe Mi2/NuRD.

Les histones sont l'objet de modifications post-traductionnelles qui influencent directement la structure de la chromatine et affectent ainsi la régulation de la transcription génique. Les extrémités N-terminales des histones sont beaucoup moins structurées dans le nucléosome et sont projetées à l'extérieur du cœur du nucléosome. Ces extrémités N-terminales sont susceptibles de subir plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination, l'ADP-ribosylation et l'acétylation sur des résidus spécifiques (Arg, His, Lys, Ser, Thr) (Jenewein T et al., 2001; Turner DM et al., 2002). Il a été proposé que les modifications post-traductionnelles des histones créent des sites de liaison pour des protéines spécifiques qui sont impliquées dans l'activation ou la répression de la transcription. Il a aussi été proposé que ces modifications post-traductionnelles peuvent s'influencer et que leurs différentes combinaisons constituent un code générant une information dite épigénétique, car l'information est transmissible à travers les générations mais n'est pas présente dans la séquence

d'ADN (Jenuwein et Allis 2001; Turner BM et al., 2002). La compréhension de cette information est cruciale pour éclaircir les mécanismes de régulation de la transcription des gènes.

4.3 Acétylation des histones

L'acétylation des histones est une des modifications post-traductionnelles de la chromatine les mieux étudiées. En 1966 l'équipe de Allfrey et al (Allfrey et al., 1966) a proposé pour la première fois que l'acétylation des histones étaient reliée à l'activation transcriptionnelle chez les eucaryotes. Aujourd'hui, plusieurs études démontrent l'implication de l'acétylation des histones dans la régulation de l'expression génique (Pazin et Kadonaga, 1997, Mizzen et al., 1998). Plus particulièrement, il a été démontré que l'acétylation des histones H3 et H4 est impliquée dans la régulation de la transcription. (Davie JR, 1998) L'acétylation des histones se produit sur les résidus lysines situés dans les extrémités N-terminales des histones, soit les lys 9 et lys 14 de l'histone H3 et les lys5, lys8, lys12, lys16 de l'histone H4. Cette réaction est catalysée par des enzymes appelées histones acétyltransférases (HATs) (Davie JR, 1998). Ces enzymes utilisent l'acétyl CoA pour transférer un groupement acétyle sur le groupement ϵ -amino des lysines. Lorsque les histones sont acétylées, la charge positive sur la lysine est neutralisée, ce qui permet de réduire son interaction avec le groupement phosphate de l'ADN. Cet évènement augmente l'accessibilité de la région promotrice à la machinerie transcriptionnelle et ainsi l'initiation de la transcription (Figure 12).

Les HATs peuvent être classées en 5 familles basées sur l'homologie. Premièrement, il y a la famille Gcn5, celle-ci comprend le PCAF, le Hat1 et le "elongator component Elp3". Deuxièmement, il y a la famille MYST (Carrozza MJ et al., 2003), cette famille de HAT possède des fonctions diverses dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Par la suite, il y a la famille p300 (Ogryzko VV et al., 1996). Cette famille inclut entre autre, la p300 et le "CREB-binding protein" (CBP), deux adaptateurs transcriptionnels homologues intégrant les signaux de plusieurs activateurs tels que CREB, Jun, Myb, Fos et MyoD (Ogryzki VV et al., 1996). De plus, il y a la famille des facteurs généraux de transcription, tel que TFIID, TAF250 (Mizzen CA et al., 1996) et TFIIC et finalement, la famille des co-facteurs de récepteurs nucléaires, tel que ACTR et SRC1. La découverte que plusieurs acteurs importants de l'activation de la transcription possèdent une activité HAT suggère que cette activité est fondamentale à la régulation de l'expression génique chez les eucaryotes.

L'acétylation des histones est contrôlée par l'action coopérative des complexes protéiques histones acétyltransférases (HATs) et histones déacétylases (HDACs). Les HATs et HDACs sont généralement associées avec des complexes multiprotéiques dont les sous-unités accomplissent des fonctions essentielles, telles que l'interaction avec des facteurs de transcription liés à l'ADN (Narlikar GJ et al., 2002; Ogryzki VV et al., 2001; Roth SY et al., 2001).

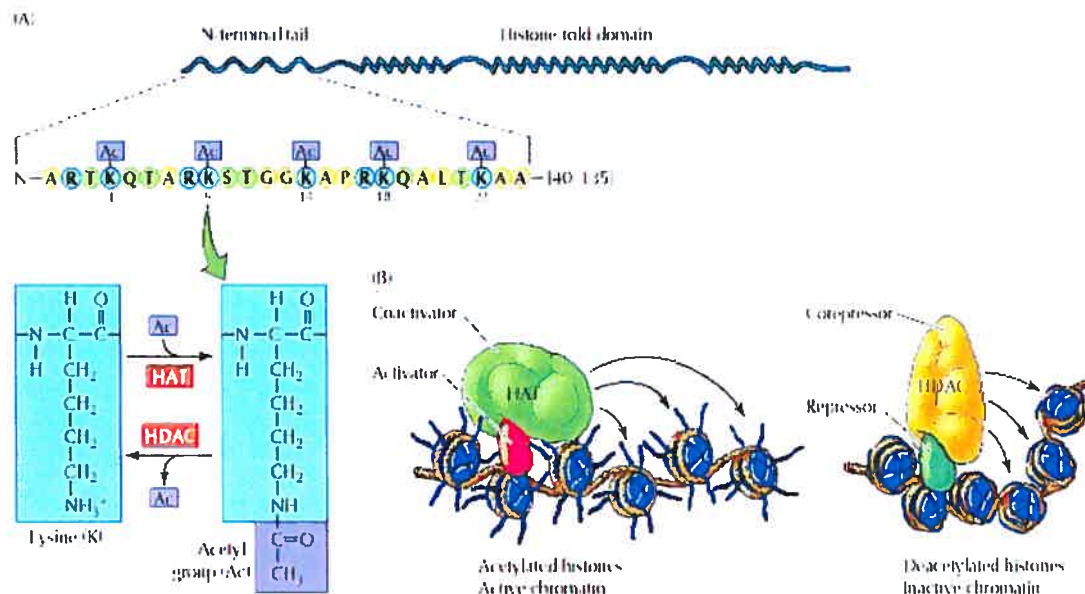


Figure 12 : Acétylation des histones. A) Les extrémités N-T des histones sont modifiées par l'ajout de groupes acétyles (Ac) sur des résidus lysines spécifiques. B) Les activateurs et répresseurs transcriptionnels sont associés avec des co-activateurs et co-répresseurs qui possèdent des activités HAT et HDAC respectivement. (Cooper GM, *The Cell-A Molecular Approach* 2nd ed, 2000)

4.4 Déacétylation des histones

L'acétylation est une réaction réversible et celle-ci est catalysée par des histones déacétylases (HDACs). Les HDACs enlèvent les groupements acétyles qui ont été rajoutés aux lysines spécifiques de l'extrémité N-terminale des histones par des HATs. Lorsque les HDACs inversent la réaction d'acétylation, la charge positive des lysines est restaurée. Cet évènement augmente la condensation de la chromatine et diminue l'accessibilité des facteurs de transcription à la région promotrice de l'ADN, favorisant ainsi la répression des gènes.

Plusieurs HDACs ont été caractérisées et ont généralement été associées à la répression de la transcription. En effet, il a été démontré que des agents anti-inflammatoires tels que la théophylline, la dexaméthasone ainsi que la cytokine immunosuppressive TGF- β , recrutent les HDACs au promoteur de gènes spécifiques pour médier leur effet inhibiteur. La théophylline induit une augmentation de l'activité des HDACs dans les macrophages alvéolaires humains et cette augmentation est corrélée à l'inhibition de la production de l'IL-8 (Ito K PNS 2002). Ces études indiquent que l'inhibition de l'acétylation des histones contribue au contrôle de certaines réponses inflammatoires.

Les HDAC peuvent être groupés en 3 classes. Premièrement, il y a les HDAC de la classe I, possédant un certain degré d'homologie avec les gènes RPD3 de la levure. Cette classe contient les HDAC 1, 2, 3 et 8. Ces HDACs sont généralement localisés dans le noyau et exprimés ubiquitairement dans plusieurs cellules et tissus humains (Yang WM et al., 1997; Hu E et al., 2000). Les HDACs de la classe I forment des complexes multiprotéiques répresseurs avec les protéines SMRT, CoREST, Sin3 et Mi-2/Nurd (Kao HY et al., 1998; Verdel A et al., 2000; Cress WD et al., 2000). Les HDACs de la classe II incluent HDAC 4, 5, 6, 7, 9,10. Ceux-ci sont exprimés dans certains tissus seulement avec le plus haut niveau d'expression retrouvé dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques (Grozingier Cm et al., 1999; Fischle W et al., 1999). Ils s'associent dans des complexes répresseurs qui contiennent entre autre N-CoR et SMRT (Grozingier Cm et al., 1999). Finalement, la troisième famille des HDACs est la famille sirtuin. Ces protéines sont

homologues au gène Sir2 de la levure et sont impliquées dans le vieillissement, le métabolisme cellulaire et la condensation de la chromatine (Guarente L et al., 2000).

Hypothèse de recherche

L'arthrose est une maladie invalidante, caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire, l'inflammation de la membrane synoviale ainsi qu'une altération de l'os sous-chondral. Plusieurs médicaments sont présents actuellement sur le marché pour le traitement de cette maladie, cependant ceux-ci se limitent à contrôler la douleur afin de maintenir ou d'améliorer la fonction des articulations et la qualité de vie des patients. Les nouveaux médicaments ciblent la cyclooxygénase-2 (COX-2), une enzyme clé dans la biosynthèse des prostaglandines, telle que la PGE₂.

Récemment, un ligand naturel du « peroxisome-proliférateur activé récepteur gamma » (PPAR γ) a attiré beaucoup d'attention car il possède plusieurs effets anti-inflammatoires. En effet, il a été démontré que la 15d-PGJ₂, ligand naturel du PPAR γ , inhibe l'expression de plusieurs gènes inflammatoires (Fahmi H et al 2001; Fahmi H et al 2002). Par contre, l'effet de l'activation de PPAR γ sur l'expression de la COX-2 est plus complexe. En fait, la 15d-PGJ₂ induit l'expression de la COX-2 dans les cellules articulaires. D'un autre côté, la 15d-PGJ₂ inhibe l'induction de la COX-2 par l'IL-1 β . Ceci indique que l'effet de l'activation de PPAR γ sur l'expression de la COX-2 dépend du microenvironnement cellulaire et des facteurs présents.

Il y a de plus en plus d'évidence que la chromatine joue un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes. (Fyodorov et Kadonaga 2001). En effet, l'activation de plusieurs gènes inflammatoires, comme la COX-2, est associée

à l'acétylation des histones H3 et H4, tandis que la répression de ce gène est associée avec la déacétylation des histones. Plusieurs agents anti-inflammatoires, tels que la théophylline et la dexaméthasone recrutent des histones déacétylases pour inhiber l'expression des gènes. On ignore si la 15d-PGJ₂ régule cet effet inhibiteur par un mécanisme semblable.

Ainsi, les objectifs de la présente étude étaient d'une part de déterminer l'effet de la 15d-PGJ₂ sur l'expression de la COX-2 induite par IL-1 β dans les synoviocytes humains et d'autre part de déterminer si l'acétylation des histones joue un rôle dans la régulation de la cyclooxygénase-2.

Les informations recueillies de cette étude contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de la COX-2 par la 15d-PGJ₂ ainsi qu'à l'identification des nouvelles stratégies pour modifier la pathophysiologie de l'arthrose.

MÉTHODES

Sélection des spécimens et culture cellulaire. Les membranes synoviales ont été obtenues de patients arthrosiques subissant une opération de pose de prothèse de genou total (n=25; moyenne \pm SEM âge : 66 \pm 11 années). Tous les patients souffrant d'OA ont été diagnostiqués selon les critères établis par le comité du Collège Américain de Rhumatologie. Au moment de l'opération, les patients souffraient d'OA symptomatique et nécessitaient l'administration de AINS ou d'inhibiteurs de COX-2. Les patients ayant reçu une administration intra-articulaire de stéroïdes ont été exclus. Le protocole d'étude et l'utilisation de tissu humain ont été approuvés par le comité d'éthique clinique du Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM). Les synoviocytes humains ont été isolés comme décrit précédemment (Fahmi H et al., 2002).

Viabilité cellulaire et analyse d'immunobuvardage. La viabilité cellulaire a été déterminée en mesurant la capacité des synoviocytes humains à réduire la 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium (MTT). Une concentration de cinq mg/ml de MTT a été ajoutée à chaque puits pour obtenir une concentration finale de 0.5 mg/ml. Les cellules furent ensuite incubées pendant 4 heures. Par la suite, le milieu a été enlevé, et 100 μ l d'une solution de solubilisation (0.04 HCL-isopropanol) fut ajouté pour dissoudre le sel insoluble. La quantification de la viabilité cellulaire fut effectuée avec un lecteur de mesure à ELISA à 590 nm. Les résultats ont été exprimés en unités de densité optique (D.O.) par 10^4 cellules adhérentes. Le protocole d'immunobuvardage a été effectué comme décrit précédemment (Fahmi H et al., 2002). Les incubations avec les anticorps étaient effectuées dans une solution TBS 5% lait écrémé et 0.1 % tween-20. Les dilutions d'anticorps utilisées étaient les suivantes: anti-COX-1 : 1/1000, anti-COX-2 : 1/500. La détection a été effectuée avec la trousse SuperSignal West Substrate (Pierce).

Transfections transitoires. Le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de la région 1.8 kb du promoteur du gène humain COX-2 a été généreusement fourni par le Dr. Stephen Prescott (Université de Utah, Salt Lake City). Les plasmides CMV-p300-CHA-WT et CMV-p300-CHA-WY ont été fournis par le Dr. Richard Eckner (University of Zurich, Zurich, Switzerland). Les expériences de transfections transitoires ont été effectuées en utilisant du FuGene-6 (1 µg d'ADN : 3 µl FuGene 6) (Roche Applied Science) selon le protocole recommandé du manufacturier. Brièvement, les synoviocytes humains sont cultivés à 50-60% confluence. Par la suite, les cellules sont transfectées avec 1 µg du promoteur humain de la COX-2 (COX-2-Luc) et 0.5 µg du contrôle interne pSV40-β-galactosidase. Dans les expériences de co-transfections avec les plasmides CMV-p300-CHA-WT et CMV-p300-CHA-WY, la quantité de l'ADN transfecté a été gardée constante par l'utilisation du vecteur vide correspondant. Six heures plus tard, le milieu fut remplacé par du milieu DMEM contenant 1 % FCS. Le lendemain, les cellules sont traitées pour 8 heures avec ou sans IL-1β en absence ou présence de la 15d-PGJ₂. Après la lyse des cellules, l'activité luciférase fut déterminée et normalisée avec l'activité β-galactosidase.

Extraction de l'ARN total et synthèse d'ADN complémentaire. L'ARN total a été isolé de synoviocytes humains avec le réactif TRIzol (Invitrogen) et dissous dans 20 µl d'eau diethylpyrocarbonate (DEPC). Un µg d'ARN total fut rétrotranscrit avec l'enzyme reverse transcriptase Moloney Murine Leukeumia Virus (Fermentas, Burlington, ON, Canada) selon le protocole recommandé du manufacturier. Un cinquième de la réaction de rétrotranscription fut analysé par PCR en temps réel. Les amorces suivantes ont été utilisées : COX-2: sens 5'-TGTGTTGACATCCAGATCAC-3' et l'antisens 5'-ACATCATGTTTGAGCCCTGG3'; GAPDH: sens 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' et l'antisens 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3'.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Les expériences de ChIP ont été réalisées selon le protocole de ChIP fourni par Upstate Biotechnology Inc. Brièvement, après traitements spécifiques les histones sont fixées à l'ADN par un traitement avec la formaldéhyde (1 % final). La réaction est arrêtée en ajoutant de la glycine (125 mM final). Les cellules sont ensuite lysées et soniqués de manière à obtenir des fragments d'ADN de 100-1000 pb. Une partie du surnegeant (1/10) servira de contrôle dans les analyses PCR. L'autre partie est incubée d'abord (1 heure, 4°C) avec la protéine A-agarose traitée avec l'ADN de sperme de saumon, et ensuite en présence d'anticorps anti-acétyl-histone, anti-HDAC, anti-p300 ou anti-ARN polymérase II (18 heures, 4°C). Les complexes immuns sont ensuite immunoprécipités avec la protéine A-agarose. Par la suite, le complexe ADN-histones est élué et dissocié (65°C, 4 heures). L'ADN est extrait, précipité et amplifié par PCR. Les séquences des amorces utilisées sont : oligonucléotide sens du promoteur proximal de COX-2 : 5'-AGAAAAGACATCTGGCGGAAAC-3' et l'antisens 5'-TATGACAATTGGTTCGCTAACCG-3'; oligonucléotide sens du promoteur distal de la COX-2 5'-GGAGCTGAGGGGGAGTTTTC-3' et l'antisens 5'-TGATCTGGCATGTCAGGGAG-3'; produisant des produits de 278 et 382 paires de bases en longueur, respectivement.

PCR en temps réel. Les analyses de PCR quantitative ont été réalisées dans un volume total de 50 µl contenant la matrice d'ADN, 200 nM des amorces sens et antisens et 25 µl de SYBR[®]Green master mix (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada). L'incorporation du colorant SYBR[®]Green dans les produits de PCR a été mesuré en temps réel en utilisant le détecteur Gene Amp 5700 (Applied Biosystems) permettant de déterminer la valeur "threshold cycle" (C_T) à laquelle l'amplification exponentielle des produits PCR commence. Après activation de l'enzyme "AmpliTaQ Gold " par une incubation à 95°C pendant 10 minutes, les mélanges réactionnels sont soumis à 40 cycles d'amplification (15 secondes à 95°C pour la dénaturation et 1 minute pour l'hybridation et l'élongation à 60°C). Après la réaction de PCR, les courbes de dissociation ont été générées avec une seule courbe, indiquant la spécificité de l'amplification. Une valeur "threshold cycle"

(C_T) a été obtenu à partir de chaque courbe d'amplification en utilisant le logiciel fourni par le manufacturier (Applied Biosystems). Les résultats ont été exprimés en enrichissement relativement à la condition contrôle (cellules non stimulées) en utilisant la méthode du $\Delta\Delta C_T$ décrit dans le guide du manufacturier (Applied Biosystems). Brièvement, une valeur ΔC_T a été d'abord calculé en soustrayant la valeur C_T pour le gène GAPDH servant de contrôle interne de la valeur C_T obtenue pour chaque échantillon (analyse RT-PCR), ou la valeur C_T de l'input d'ADN de la valeur C_T pour l'échantillon immunoprécipité (analyse ChIP). Une valeur $\Delta\Delta C_T$ a été ensuite calculée en soustrayant la valeur ΔC_T du contrôle de la valeur ΔC_T de chaque traitement. Les enrichissements comparés à la condition contrôle (cellules non stimulées) ont été déterminés en augmentant à la puissance 2 la valeur $\Delta\Delta C_T$. Chaque réaction PCR a généré uniquement l'amplicon spécifiquement attendu comme démontré par le profil de la courbe de dénaturation du produit PCR final et par électrophorèse sur gel des réactions PCR. Chaque réaction PCR a été réalisée en triplicata à partir d'au moins trois expériences indépendantes réalisées à des moments différents.

Mesures des niveaux protéiques de IL-6 et MMP-1. Les niveaux de MMP-1 et IL-6 ont été mesurés par "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) selon les protocoles fournis par le manufacturier (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN). Tous les essais ont été réalisés en duplicata.

Analyse statistique. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM d'expériences indépendantes. Les statistiques ont été analysées en utilisant le test t de Student et le test "Student 2-tailed". Les valeurs de p inférieures à 0.05 ont été considérées comme étant significatives.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Katherine Farrajota : J'ai effectué les expériences de dose réponse par immunoburvardage pour la protéine COX-2 ainsi qu'effectué la mesure de ses niveaux d'ARNm par RT-PCR quantitative présentes sur les figures 1 et 2. Ensuite j'ai effectué les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pour les protéines HDACs ainsi que participer à celles des histones H3, H4 et la protéine p300 présentes dans les figures 3 et 4. Finalement, j'ai participé à la correction de cet article.

Saranette Cheng : A participé aux immunoburvardages de la protéine COX-1, ainsi qu'effectuer les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine des histones H3, H4 et l'ARN polymérase II. Finalement, a participé à la correction de cet article.

Xinfang Li : A effectué les expériences de transfections transitoire, et les mesures des niveaux des protéines MMP-1 et IL-6 présente à la figure 1 et 5. De plus, elle a effectué la compilation des résultats de ces expériences.

Hassan Afif : A Effectué les immunoburvardages pour la présence des protéines HDACs de la classe I, de la protéine COX-1 ainsi que le montage des figures de cet article.

Johanne Martel-Pelletier : Collaboratrice et conseillère dans l'écriture de cet article.

Jean-Pierre Pelletier : Collaborateur et médecin nous permettant de recevoir les spécimens requis pour effectuer les expériences.

Pierre Ranger : Médecin nous permettant de recevoir les spécimens requis pour effectuer les expériences.

Hassan Fahmi : Directeur scientifique du laboratoire

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Farrajota, Katherine

2-466-1-0 M.Sc. Programme de biologie moléculaire

2. Description de l'article

Farrajota K, Cheng S, Martel-Pelletier J, Afif H, Pelletier JP, Li X, Ranger P, Fahmi H. Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum.* 2005 Jan;52(1):94-104.

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katherine Farrajota inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Effet de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandine J₂ sur l'expression de la Cyclooxygénase-2 dans les synoviocytes humains.

Cheng, Saranette
Coauteur

[Redacted Signature]

8 juillet 2005
Date

Martel-Pelletier, Johanne
Coauteur

[Redacted Signature]

8/7/05
Date

Afif, Hassan
Coauteur

[Redacted Signature]

14/07/05
Date

Pelletier, Jean-Pierre
Coauteur

[Redacted Signature]

07/08/05
Date

Li, Xinfang
Coauteur

[Redacted Signature]

July 8, 2005
Date

Ranger, Pierre
Coauteur

Signature

Date

Fahmi, Hassan
Coauteur

[Redacted Signature]

8/07/05
Date

Signature

Date

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Farrajota, Katherine
2-466-1-0 M.Sc. Programme de biologie moléculaire

2. Description de l'article

Farrajota K, Cheng S, Martel-Pelletier J, Afif H, Pelletier JP, Li X, Ranger P, Fahmi H. Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ through a histone deacetylase-independent mechanism. Arthritis Rheum. 2005 Jan;52(1):94-104.

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katherine Farrajota inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Effet de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandine J₂ sur l'expression de la Cyclooxygénase-2 dans les synoviocytes humains.

Cheng, Sarenette
Coauteur

[Signature]

8 juillet 2005
Date

Martel-Pelletier, Johanne
Coauteur

[Signature]

8/7/05
Date

Afif, Hassan
Coauteur

[Signature]

14/07/05
Date

Pelletier, Jean-Pierre
Coauteur

[Signature]

07/08/05
Date

Li, Xinfang
Coauteur

[Signature]

July 8, 2005
Date

Ranger, Pierre
Coauteur

[Signature]

12/7/05
Date

Fahmi, Hassan
Coauteur

[Signature]

8/07/05
Date

B) Permission de l'éditeur d'une revue ou d'un livre

1. Identification de la revue ou du livre

Arthritis & Rheumatism
John Wiley & Sons, Inc.
111 River Street
Hoboken, NJ 07030

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Jane Diamond

3. Identification de l'article

L'étudiant Katherine Farrajota est autorisé à inclure l'article ci-dessus sans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Effet de la 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandine J₂ sur l'expression de la Cyclooxygénase-2 dans les synoviocytes humains.

Jane Diamond, Managing Editor

Editeur

[Redacted Signature]

Signature

5/5/05

Date

3. Identification de l'article

L'étudiant Katherine Farrajota est autorisé à inclure l'article ci-dessus sans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Effet de la 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandine J₂ sur l'expression de la Cyclooxygénase-2 dans les synoviocytes humains.

Jane Diamond, Managing Editor

Editeur

[Redacted Signature]

Signature

5/5/05

Date

Inhibition of Interleukin-1 β -Induced Cyclooxygenase 2 Expression in Human Synovial Fibroblasts by 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ Through a Histone Deacetylase-Independent Mechanism¹

Katherine Farrajota¹, Saranette Cheng, Xinfang Li¹, Johanne Martel-Pelletier¹, Jean-Pierre Pelletier¹, Hassan Afif¹, Pierre Ranger², and Hassan Fahmi¹.

1. Katherine Farrajota, MSc, Xinfang Li, MSc, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Jean-Pierre Pelletier, MD, Hassan Afif, PhD, and Hassan Fahmi, PhD : Osteoarthritis Research Unit, Département de Médecine et Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. 2. Pierre Ranger, MD : Hopital Sacré-Cœur, Montréal, Québec, Canada.

Address correspondence and reprint requests to: Hassan Fahmi, Ph.D, Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke Street East, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1. Tel: 514 890 8000 Ext 28910, Fax 514 412 7583, [REDACTED]

Running Title : Regulation of COX-2 gene transcription by 15d-PGJ₂

ABSTRACT

Objective. The cyclooxygenase (COX) metabolite, 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15d-PGJ₂) has been reported to inhibit the expression of a number of genes involved in the pathogenesis of arthritis. However, its effects on cyclooxygenase-2 (COX-2) remains controversial. Here, we investigated the effects of 15d-PGJ₂ on interleukin-1 β (IL-1 β)-induced COX-2 expression in human synovial fibroblasts (HSFs).

Methods. HSFs were cultured with IL-1 β in the absence or presence of 15d-PGJ₂ and the level of COX-2 protein and mRNA expression were evaluated using Western blotting and real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, respectively. The COX-2 promoter activity was analyzed in transient transfection experiments. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed to evaluate the level of histone acetylation and the recruitment of histone deacetylase (HDAC)1, 2, 3 and histone acetylase (HAT) p300 to the COX-2 promoter.

Results. IL-1 β -induced COX-2 protein and mRNA expression, as well as COX-2 promoter activation, were inhibited by 15d-PGJ₂. Troglitazone, a selective PPAR γ ligand, enhanced COX-2 expression, while GW9662, a specific PPAR γ antagonist, relieved the suppressive effect of 15d-PGJ₂. 15d-PGJ₂ selectively blocked IL-1 β -induced histone H3 acetylation. The reduction of histone H3 acetylation did not correlate with the recruitment of HDAC to the COX-2 promoter. Also, treatment with the specific HDAC inhibitor, trichostatin A, did not relieve the suppressive effect of 15d-PGJ₂, indicating that HDACs are not involved in the inhibitory effect of 15d-PGJ₂. Furthermore, 15d-PGJ₂ blocked IL-1 β -induced recruitment of p300 to

the COX-2 promoter, which may be the mechanism for decreased histone H3 acetylation and COX-2 expression. In line with this, overexpression of p300, but not of a mutant p300 lacking HAT activity, relieved the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 promoter activation.

Conclusion. These data suggest that 15d-PGJ₂ can inhibit IL-1 β -induced COX-2 in a HDAC-independent mechanism, probably by interfering with the HAT p300.

INTRODUCTION

There is increasing evidence suggesting a role of cyclooxygenase-2 COX-2 in the pathogenesis of chronic arthritic diseases such as rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). COX-2 expression and enzymatic activity are increased in articular tissues and cells of RA and OA patients (1, 2). Furthermore, genetic ablation of COX-2 reduced the incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice (3). Similar findings were reported in rats with adjuvant-induced arthritis that were treated with COX-2 antisense oligonucleotides (4). Most interestingly, various clinical studies have confirmed that the efficacy of selective COX-2 inhibitors for RA and OA is similar to that of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), that inhibit both COX isoforms (5).

In the past few years, the COX metabolite, 15d-PGJ₂, has generated considerable interest in the regulation of inflammatory and catabolic genes. 15d-PGJ₂ is a downstream metabolite of PGD₂ and a natural ligand of a nuclear receptor, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Several studies have demonstrated that 15d-PGJ₂ has anti-inflammatory effects. For example, 15d-PGJ₂ prevents the expression of IL-1, IL-6, and TNF- α in activated monocytes/macrophages, as well as the expression of IL-2 in activated T lymphocytes (6-8). Similarly, we have demonstrated that 15d-PGJ₂ prevented IL-1 β -induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), metalloproteinase (MMP)-13, and MMP-1 in human chondrocytes and synovial fibroblasts (9, 10), suggesting that 15d-PGJ₂ may constitute a potential therapeutic compound for treatment of inflammatory arthritis. However, the effect of 15d-PGJ₂ on COX-2

expression is controversial. Earlier studies reported that 15d-PGJ₂ inhibited phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)- and LPS-induced COX-2 expression in epithelial cells and macrophages, respectively (11, 12). Whereas, other studies showed that 15d-PGJ₂ enhanced IL-1 β -induced COX-2 expression in human airway smooth muscle cells (13), and astrocytes (14), but had no effect on COX-2 expression in human microglia (14). Finally, we have previously reported that 15d-PGJ₂ had a dual effect on COX-2 expression in chondrocytes: it suppressed IL-1 β -induced COX-2 expression, but induced COX-2 expression in the absence of IL-1 β (15).

Recent studies have provided abundant evidence that acetylation of nucleosomal histones is of fundamental importance in gene regulation (16). Acetylation of histone proteins, particularly H3 and H4, loosens the structure of the target gene promoter and results in increased accessibility for transcription factors and RNA polymerase II, thus initiating transcription (16). Conversely, deacetylation of histone proteins promotes formation of a compact chromatin structure and repression of transcription (16). Indeed, transcriptional activation of a number of inflammatory genes, including COX-2 is associated with increased histone H3 and H4 acetylation (17-22), whereas repression is associated with histone deacetylation (23-25). Acetylation reactions are catalyzed by coactivators with histone acetyltransferase (HAT) activities, such as p300, CBP/p300, PCAF and GCN5. The role of p300 in the regulation of COX-2 transcription has been studied in many systems. Pro-inflammatory stimuli up-regulate the level of p300 at the COX-2 promoter (26, 27) and overexpression of p300 up-regulates the COX-2 promoter activity (28) and protein expression (27). Moreover, sequestration of p300 by the

adenoviral protein E1A, prevents the induction of COX-2 expression by pro-inflammatory stimuli (27). These results highlight a predominant role of p300 in the transcriptional activation of COX-2. Deacetylation of histone proteins is mediated by histone deacetylases (HDACs). Several anti-inflammatory drugs, as well as the immunosuppressive cytokine, TGF- β 1, were demonstrated to induce the recruitment of HDACs to specific gene promoters for silencing gene expression (23-25). For example, dexamethasone and theophylline were shown to inhibit IL-1 β -induced GM-CSF and IL-8 expression, by inducing the recruitment of HDACs to these gene promoters (23, 24). Whether 15d-PGJ₂-mediated transcriptional repression involves recruitment of HDACs is not yet known.

In the present study, we investigated the effect of 15d-PGJ₂ on IL-1 β -induced COX-2 expression in human synovial fibroblasts (HSFs). We showed that 15d-PGJ₂ inhibited IL-1 β -induced COX-2 expression at the transcriptional level. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, we found that 15d-PGJ₂ selectively inhibited IL-1 β -induced histone H3 acetylation at the proximal region of the COX-2. Furthermore, we provide evidence that 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 transcription in an HDAC-independent manner, likely by interfering with the HAT p300.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies. Human recombinant IL-1 β was obtained from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN). 15d-PGJ₂ was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Trichostatin A, aprotinin, leupeptin, pepstatin, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), and formaldehyde were from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin and streptomycin, fetal calf serum (FCS), and Trizol reagent were supplied by Invitrogen Inc. (Burlington, ON, Canada). All other chemicals were purchased from either Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada) or Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). FuGene 6 transfection reagent was from Roche Applied Science (Laval, QC, Canada). The dual-luciferase reporter assay system was from Promega (Madison, WI). Anti-human COX-1 and COX-2 antibodies were from Cayman Chemical. Antibodies against p300, and RNA polymerase II were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), whereas anti-acetylated histone H3, anti-acetylated H4, anti-HDAC1, anti-HDAC2, and anti-HDAC3 were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Polyclonal rabbit anti-mouse IgG coupled with HRP and polyclonal goat anti-rabbit IgG with HRP were from Pierce (Rockford, IL).

Specimen selection and cell culture. Synovial membranes were obtained from patients with OA at the time of total joint replacement surgery (n=25 ; mean \pm SEM age: 66 \pm 11 years). All OA patients were diagnosed based on criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA (29). At

the time of surgery, the patients had symptomatic disease requiring medical treatment in the form of NSAIDs or selective COX-2 inhibitors. Patients who had received intraarticular injections of steroids were excluded. The Clinical Research Ethics Committee of the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM) approved the study protocol and the use of human tissues. Synovial fibroblasts were isolated as described previously (10, 30). Only cells between passages 3 and 7 were used.

Cell viability and Western blot analysis. Cell viability was measured by assessing the ability of HSFs to reduce 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium (MTT). Five mg/ml MTT was added to each well to give a final concentration of 0.5 mg/ml, and cells were incubated for 4h. The medium was removed, and 100 μ l solubilization solution (0.04 HCl-isopropanol) was added to dissolve the water insoluble formazan salt. Quantitation was performed with an ELISA reader at 590 nm. Results were expressed as OD units per 10^4 adherent cells. Western blot analysis was performed as previously described (30).

Plasmids and transient transfection. The human 1.8-kb COX-2 firefly luciferase reporter construct in pGL2 vector was kindly provided by Dr. Stephen Prescott (University of Utah, Salt Lake City). The CMV-p300-CHA-WT and CMV-p300-CHA-WY (amino acids 1466 and 1467 replaced by alanine and serine) were provided by Dr. Richard Eckner (University of Zurich, Zurich, Switzerland) (31). Transient transfection experiments were performed using FuGene-6 (1 μ g DNA: 3 μ l FuGene 6) (Roche Applied Science) according to the manufacturer's

recommended protocol. Briefly, HSFs were seeded and grown to 50-60% confluence. The cells were transfected with 1 μ g of the human COX-2 promoter (COX-2-Luc) and 0.5 μ g of the internal control pSV40- β -galactosidase. In cotransfection experiments with CMV-p300-CHA-WT and CMV-p300CHA-WY, the amount of transfected DNA was kept constant by using the corresponding empty vector. Six hours later, the medium was replaced with DMEM containing 1% FCS. The next day, the cells were treated for another 8 hours with or without IL-1 β in the absence or presence of 15d-PGJ₂. After harvesting, luciferase activity was determined and normalized to β -galactosidase activity (9, 30).

RNA extraction and cDNA synthesis. Total RNA was isolated from treated and untreated HSFs using the TRIzol reagent (Invitrogen), and dissolved in 20 μ l of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated-H₂O. One μ g of total RNA was treated with RNase-free DNase and reverse-transcribed using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, ON, Canada) as detailed in the manufacturer's guidelines. One fiftieth of the reverse transcriptase reaction was analyzed by real real-time PCR as described below. The following primers were used: COX-2: sense 5'-TGTGTTGACATCCAGATCAC-3' and antisense 5'-ACATCATGTTTGAGCCCTGG3'; GAPDH: sense 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' and antisense 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG -3'.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. The ChIP experiments were performed according to the ChIP protocol provided by Upstate Biotechnology, Inc. and previously published protocols (17, 18). The primer sequences used were: proximal COX-2 promoter sense 5'-AGAAAAGACATCTGGCGGAAAC-3' and antisense 5'-TATGACAATTGGTCGCTAACCG-3'; distal COX-2 promoter sense 5'-GGAGCTGAGGGGGAGTTTTTC-3' and antisense 5'-TGATCTGGCATGTCAGGGAG-3'; producing products of 278 and 382 base pairs in length, respectively.

Real-time quantitative PCR. Quantitative PCR analysis was performed in a total volume of 50 μ l containing template DNA, 200 nM of sense and antisense primers and 25 μ l of SYBR[®] Green master mix (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada). Incorporation of SYBR[®] Green dye into PCR products was monitored in real-time using a Gene Amp 5700 sequence detector (Applied Biosystems) allowing determination of the threshold cycle (C_T), at which exponential amplification of PCR products begins. After incubation at 95°C for 10 min to activate the AmpliTaq Gold enzyme, the mixtures were subjected to 40 amplification cycles (15 s at 95°C for denaturation and 1 min for annealing and extension at 60°C). After PCR, dissociation curves were generated with one peak, indicating the specificity of the amplification. A threshold cycle (C_T value) was obtained from each amplification curve using the software provided by the manufacturer (Applied Biosystems). Data were expressed as -fold changes relative to control conditions (unstimulated cells) using the $\Delta\Delta C_T$ method as detailed in the manufacturer's guidelines (Applied

Biosystems). A ΔC_T value was first calculated by subtracting the C_T value for the GAPDH housekeeping gene from the C_T value for each sample (RT-PCR analysis), or the C_T value for the input DNA from the C_T value for the immunoprecipitated sample (ChIP analysis). A $\Delta\Delta C_T$ value was then calculated by subtracting the ΔC_T value of the control from the ΔC_T value of each treatment. Fold changes compared with the control (unstimulated cells) were then determined by raising 2 to the $\Delta\Delta C_T$ power. Each PCR reaction generated only the expected specific amplicon as shown by the melting-temperature profiles of the final product and by gel electrophoresis of test PCR reactions. Each PCR was performed in triplicate on two separate occasions from at least three independent experiments.

IL-6 and MMP-1 assays. MMP-1 and IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using protocols supplied by the manufacturer (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN). All assays were performed in duplicate.

Statistical analysis. All results were calculated as the mean \pm SEM of independent experiments. Statistics were analyzed using Student's 2-tailed t-test. p values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Inhibition of IL-1 β -induced COX-2 transcription in HSFs by 15d-PGJ₂. We have recently shown that 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced PGE₂ release by HSFs (30). To determine the effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 expression, quiescent HSFs were stimulated with IL-1 β in the absence or presence of increasing concentrations of 15d-PGJ₂, and COX-2 protein expression was analyzed by Western blotting. As illustrated in Fig. 1A, treatment with IL-1 β led to a strong induction of COX-2 (72 kDa). Treatment with 15d-PGJ₂ inhibited IL-1 β -induced COX-2 expression in a concentration-dependent manner with complete inhibition at 20 μ M. COX-1 (70 kDa) was constitutively expressed in HSFs and its expression was not significantly altered by these treatments. The concentrations of 15d-PGJ₂ that inhibited IL-1 β -induced COX-2 expression are similar to those used in other systems and had no effect on cell viability as determined by the MTT assay (Fig. 1B).

To determine whether the decrease in COX-2 protein expression was regulated at the level of transcription, real-time RT-PCR was used to measure the steady-state level of COX-2 mRNA. The relative expression level of COX-2 mRNA was plotted as -fold change compared with control untreated cells. GAPDH gene expression was used for normalization. As expected, treatment with IL-1 β for 3 h markedly induced (~4.8-fold) the expression COX-2 mRNA (Fig. 1C). In agreement with the data in Fig. 1A, pretreatment with 15d-PGJ₂ for 30 min dose-dependently suppressed IL-1 β -induced COX-2 mRNA expression. To further elucidate the inhibitory mechanism of 15d-PGJ₂ on COX-2 expression, we carried

out transient transfection assays with a human COX-2 promoter fragment consisting of 1840 bp immediately 5' of the translational start site. As shown in Fig. 1D, IL-1 β activates the COX-2 promoter in HSFs and this activation was decreased in a dose-dependent manner by 15d-PGJ₂, which is consistent with the inhibition of COX-2 protein and mRNA expression. (Fig. 1, A and C). These data suggest that 15d-PGJ₂ attenuated IL-1 β -induced COX-2 expression at the transcriptional level.

Inhibition of IL-1 β -induced COX-2 expression by 15d-PGJ₂, via PPAR γ -dependent and -independent pathways. To evaluate the role of PPAR γ in the suppressive effect of 15d-PGJ₂ on IL-1 β -induced COX-2 expression, we examined the action of GW9662, a selective and irreversible PPAR γ antagonist. HSFs were preincubated with increasing concentrations of GW9662 for 30 min, prior to the addition of 15d-PGJ₂, and were subsequently stimulated with IL-1 β for 18 h. Western blot analysis revealed that GW9662 dose-dependently abrogated the suppressive effect of 15d-PGJ₂ on IL-1 β -induced COX-2 protein expression (Fig. 2A). Treatment of HSFs with GW9662 alone had no effect on COX-2 expression (Fig. 2A, *last three lanes*). We also assessed the effect of troglitazone (TRO), a selective PPAR γ agonist, on IL-1 β -induced COX-2 protein expression. Surprisingly, we found that TRO enhanced IL-1 β -induced COX-2 expression (Fig. 2B). Similar results were obtained with ciglitazone, another selective PPAR γ ligand (data not shown). These results suggest that the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on IL-1 β -induced COX-2 is mediated by PPAR γ -independent and -dependent mechanisms.

Reduction of IL-1 β -induced histone H3 acetylation at the COX-2 promoter by 15d-PGJ₂. It was recently demonstrated that transcriptional induction of COX-2 correlates with histone hyperacetylation (19-22). Thus, we examined the effect of 15d-PGJ₂ on IL-1 β -induced histone acetylation at the COX-2 promoter using ChIP assays. HSFs were stimulated with IL-1 β in the absence or presence of 15d-PGJ₂, and formaldehyde-cross-linked DNA-protein were immunoprecipitated using antibodies to acetylated histone H3 or H4. Control Ig and no Ab were used as controls. DNA isolated from the immunoprecipitates was analyzed by real-time PCR. Two regions of the COX-2 promoter were analyzed. The proximal region (bp -266 to +12, relative to the COX-2 transcriptional start site) overlaps the transcription start (or CAP) site and several transcription factors' binding sites reported previously to regulate COX-2 expression (CRE, NF- κ B, C/EBP). The distal region (bp -3851 to -3472) is known to not be critical for COX-2 regulation. Consistent with previous reports (19-22), treatment with IL-1 β for 3 h resulted in a large increase in acetylation level of histone H3 (4.2-fold compared to untreated cells) and H4 (5.6-fold over control) at the proximal region of the COX-2 promoter (Fig. 3, A and B). Interestingly, pretreatment with 15d-PGJ₂ for 30 min, a condition leading to maximal inhibition of IL-1 β -induced COX-2 mRNA expression (Fig. 1C), reduced IL-1 β -induced histone H3 acetylation to near baseline, but had no effect on the level of histone H4 acetylation. This suggests that 15d-PGJ₂ may inhibit COX-2 transcription in HSFs by targeting histone H3 acetylation. ChIP analyses using the same DNA templates indicate that the level of

histone acetylation at the distal region was not significantly affected by these treatments, suggesting the specificity of our CHIP assays (Fig. 3, A and B). Moreover, no immunoprecipitable COX-2 promoter DNA was detected with the control Ig and with no Ab controls (data not shown). These data provide the first evidence that 15d-PGJ₂ selectively modulates the level of histone acetylation at a target gene promoter and suggest that it is the pattern of histone H3, rather than H4, acetylation that mirrors the changes in COX-2 transcription.

Effect of 15d-PGJ₂ on the recruitment of HDAC1, HDAC2, and HDAC3 to the COX-2 promoter. Since the repression of COX-2 by 15d-PGJ₂ correlates with reduced histone H3 acetylation, we hypothesized that 15d-PGJ₂ may mediate this effect by inducing the recruitment of HDACs to the COX-2 promoter. To test this hypothesis, we first examined whether HSFs express HDAC1, 2, and 3 proteins. Western blot analyses with nuclear extracts from three different HSF populations indicated the presence of the three HDACs in all the cell populations tested (Fig. 4A). Next, we performed CHIP assays and the immunoprecipitated DNA was quantified by real-time PCR. The results demonstrated that the three HDACs were readily detected at the proximal region of the COX-2 promoter (Fig. 4, B-C). Treatment with IL-1 β reduced the level of HDAC1 at the COX-2 promoter, but had no effect on that of HDAC2 and HDAC3. Unexpectedly, 15d-PGJ₂ induced no significant change in the amount of either HDAC associated with the COX-2 promoter, despite the fact that 15d-PGJ₂ decreased the level of histone H3 acetylation. These results indicate that the reduction of histone H3 acetylation by 15d-PGJ₂ does not correlate with HDAC recruitment to the COX-2 promoter.

While further studies are needed to establish the precise timing of HDAC recruitment to the COX-2 promoter, these data suggest that the inhibition of COX-2 transcription by 15d-PGJ₂ does not involve recruitment of HDACs.

Failure of HDAC inhibitor TSA to relieve 15d-PGJ₂-mediated COX-2 repression. To further assess whether HDACs contribute to the inhibition of COX-2 expression by 15d-PGJ₂, we used trichostatin A (TSA), a specific inhibitor of HDACs. HSFs were treated with IL-1 β and 15d-PGJ₂ in the absence or the presence of TSA (50 ng/ml). As shown in Fig. 5A, TSA treatment had no effect on 15d-PGJ₂-mediated COX-2 repression. Similar results were obtained at all TSA concentrations and time-points tested (data not shown). These results strongly suggest that repression of COX-2 by 15d-PGJ₂ acts through an HDAC-independent mechanism.

To evaluate the role of HDACs in the repressing effect of 15d-PGJ₂ on other genes, we investigated the effect of TSA on 15d-PGJ₂-mediated suppression of IL-6 and MMP-1 production by HSFs. As shown in Fig. 5, B and C, 15d-PGJ₂ dose-dependently inhibited IL-1 β -induced production of IL-6 and MMP-1. Treatment with TSA had no effect on the ability of 15d-PGJ₂ to suppress the production of both factors. These results suggest that 15d-PGJ₂ can suppress the expression of many genes through an HDAC-independent mechanism.

Inhibition of IL-1 β -induced recruitment of p300 and RNA Pol II to the COX-2 promoter by 15d-PGJ₂. The inhibition of histone H3 acetylation can be achieved either by enhancing the recruitment of HDACs or by reducing the recruitment of HAT to the COX-2 promoter. Given that inhibition of histone H3 acetylation could not be ascribed to HDACs recruitment, we considered the possibility that 15d-PGJ₂ interferes with the recruitment of HAT. Several recent studies have shown that upregulation of the level of the HAT p300 at the COX-2 promoter plays a critical role in IL-1 β -induced COX-2 transcription (26, 27, 32). Thus, we investigated the effect of 15d-PGJ₂ on IL-1 β -induced recruitment of p300 to the COX-2 promoter in HSFs. As illustrated in Fig. 6A, IL-1 β stimulation of HSFs increased the level of p300 (~3.2-fold) at the proximal region of COX-2 promoter. Interestingly, 15d-PGJ₂ reduced the binding of p300 to a level not different from that of the control. The association between p300 recruitment and COX-2 transcription was demonstrated by evaluating the level of RNA Pol II at the COX-2 promoter. The level of RNA Pol II was increased upon stimulation with IL-1 β (6.4-fold), an effect that was decreased by 15d-PGJ₂ (Fig. 6B). These modifications were specific to the proximal region of the promoter, as no significant binding of these factors was detected in the distal region of the COX-2 promoter (data not shown). These findings suggest that 15d-PGJ₂ may modulate histone H3 acetylation and COX-2 expression by interfering with the recruitment of the HAT p300.

Overexpression of p300 overcomes the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 promoter activation. Next, we examined the effect of p300 on the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on the COX-2 promoter activation. As shown in Fig. 6C, overexpression of p300 dose-dependently attenuated the suppressive effect of 15d-PGJ₂ on the COX-2 promoter activation, which lends support to our earlier finding that 15d-PGJ₂ interferes with the recruitment of p300 to the COX-2 promoter. To determine whether the effects of p300 were mediated through its HAT activity, we tested a mutant of p300 that lacks HAT activity (p300-WY). A substitution of two conserved residues in the p300 HAT domain resulted in complete loss of HAT activity (31). As shown in Fig. 6C, the HAT-deficient p300 mutant failed to alleviate the suppressive effect of 15d-PGJ₂. These results indicate that HAT activity is needed in order for p300 to alleviate the suppressive effect of 15d-PGJ₂.

DISCUSSION

The COX metabolite, 15d-PGJ₂ is a natural PPAR γ ligand and is considered a potent negative regulator of inflammatory and immune responses. However, the effect of 15d-PGJ₂ on the expression of COX-2 remains controversial. Several studies have demonstrated that 15d-PGJ₂ suppressed IL-1 β -, PMA-, or LPS-induced COX-2 expression (11, 12, 14). Whereas other studies showed that 15d-PGJ₂ either enhanced or had no effect on IL-1 β -induced COX-2 expression (13, 14).

In this study, we demonstrate that 15d-PGJ₂ dose-dependently inhibited IL-1 β -induced COX-2 expression in HSFs. This inhibition occurred at the transcriptional level, as determined by real-time RT-PCR analysis and transient transfection assays. This is in agreement with previous studies showing that 15d-PGJ₂ prevents the induction of COX-2 expression by LPS in rat (33) and by IL-1 β in human RA (34) synoviocytes. Several studies have demonstrated that 15d-PGJ₂ can act through PPAR γ -dependent and -independent pathways (35). This appears to be the case in our system as well. We showed that GW9662, a PPAR γ specific antagonist, relieves the inhibitory effect of 15d-PGJ₂, suggesting that this effect of 15d-PGJ₂ is mediated by PPAR γ . Paradoxically, TRO, a selective PPAR γ ligand, enhanced IL-1 β -induced COX-2 expression, clearly demonstrating that the repression of COX-2 expression by 15d-PGJ₂ involves PPAR γ -independent pathways. Both mechanisms (PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent) are not mutually exclusive and might operate in conjunction to inhibit COX-2 expression.

The concentrations (5-20 μM) of 15d-PGJ₂ used in this study exceed the endogenous concentrations (0.1-1 nM) detected in synovial fluids (36, 37), which raises the physiological significance of this agent at high concentrations. However, and importantly, it should be noted that 15d-PGJ₂ attenuates inflammatory responses and ameliorates tissue damage in adjuvant-induced arthritis (38). Moreover, retrovirally mediated-ectopic expression of PGD synthase (PGDS), a key enzyme in the generation of 15d-PGJ₂, reduces the expression of many inflammatory mediators and cellular infiltration in an animal model of acute gouty arthritis (39). Further studies, are clearly required to precisely define the specific role of 15d-PGJ₂ in the in vivo modulation of inflammatory responses.

Recent studies have demonstrated that histone acetylation is implicated in the induction of COX-2 transcription (19-22). Similarly, we found in the present study that IL-1 β increased histone H3 and H4 acetylation at the proximal, but not the distal, region of the COX-2 promoter. Interestingly, 15d-PGJ₂ reduced IL-1 β -induced histone H3 acetylation, but had no significant effect on the level of histone H4 acetylation. To our knowledge, this is the first report showing that 15d-PGJ₂ selectively modulates the level of histone acetylation at a target promoter. These results also suggest that the pattern of histone H3, but not H4, acetylation at the proximal region of the COX-2 promoter may be more indicative of the changes in COX-2 transcription.

What are the molecular mechanism(s) responsible for the inhibition of histone H3 acetylation by 15d-PGJ₂? We initially hypothesized that 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced histone acetylation by inducing recruitment of HDACs to the COX-2

promoter. Such a regulatory mechanism has been demonstrated for the anti-inflammatory drugs dexamethasone (23) and theophylline (24), and the immunosuppressive cytokine TGF- β (25). However, our ChIP analysis did not reveal any relevant increase in HDAC levels at the COX-2 promoter that may explain the reduction of histone H3 acetylation by 15d-PGJ₂. Furthermore, TSA, a specific HDAC inhibitor, failed to overcome the repressive effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 expression. Although not exhaustive, these results strongly suggest that the effect of 15d-PGJ₂ on IL-1 β -induced COX-2 expression is mainly mediated by an HDAC-independent mechanism. This mode of action of 15d-PGJ₂ is not specific to COX-2, since inhibition of IL-1 β -induced IL-6 and MMP-1 production by 15d-PGJ₂ in HSFs were also not alleviated by TSA.

A second possibility is that 15d-PGJ₂ inhibits histone H3 acetylation at the COX-2 promoter by interfering with the recruitment of HATs. Indeed, it has been suggested that repression of gene transcription by 15d-PGJ₂ may involve interference with coactivators with HAT activity such as p300, possibly due to competition (squelching) for limiting amounts of p300 (40, 41). However, there is no direct evidence that 15d-PGJ₂ actually interferes with the recruitment of p300 to target promoters in vivo. Based on our findings in the present study, we report for the first time that 15d-PGJ₂ inhibits the recruitment of p300 to the COX-2 promoter. Importantly, 15d-PGJ₂ also inhibits the recruitment of RNA Pol II to the COX-2 promoter. The inhibition of p300 binding to the COX-2 promoter by 15d-PGJ₂ and the concomitant inhibition of histone H3 acetylation correlate well with the inhibition of COX-2 transcription. These results suggest that the mechanism of

15d-PGJ₂ mediated COX-2 suppression involved decreased histone acetylation, possibly through negative interference with the recruitment of p300 to the COX-2 promoter. This is supported by our findings that overexpression of p300, but not the mutant lacking HAT activity, attenuated the suppressive effect of 15d-PGJ₂ on the activation of the COX-2 promoter. Taken together, these observations suggest that 15d-PGJ₂ inhibits histone acetylation and COX-2 transcription by interfering with the recruitment of p300 to the COX-2 promoter, rather than inducing or enhancing the level of HDACs at the COX-2 promoter.

The transcriptional coactivator p300 interacts with other proteins that also contain HAT activity (42). Therefore, we cannot exclude the possibility that 15d-PGJ₂ may prevent histone acetylation by interfering with other p300-associated proteins containing HAT activity, such as CBP, P/CAF or GCN5. This could be the case with P/CAF, which has been shown to bind to the COX-2 promoter (27). The HAT activity of p300 can acetylate the NF- κ B p50 subunit and C/EBP- β increasing their binding to the COX-2 promoter and transcriptional activation (26, 32). Therefore, it is tempting to speculate that inhibition of p300-mediated p50 and C/EBP- β acetylation may be an additional mechanism by which 15d-PGJ₂ prevents COX-2 expression.

One of the questions remaining is how 15d-PGJ₂ reduces p300 recruitment to the COX-2 promoter. Previous studies showed that transcriptional responses elicited by 15d-PGJ₂/PPAR γ were absolutely dependent on the interaction between PPAR γ and p300 (43, 44). Similarly, p300 also functions as an essential transcriptional coactivator for COX-2 transcription (26, 27, 32). Since the level of

p300 is limited within the nucleus, its sequestration by activated PPAR γ would reduce its availability for interaction with the COX-2 promoter, resulting in reduced histone acetylation and suppression of COX-2 transcription.

In summary, we have demonstrated that 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 expression in HSFs. This inhibition correlates with reduced histone H3 acetylation at the COX-2 promoter, a process that may contribute to the repression of COX-2. We also provide evidence that the suppressive effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 transcription occurs in an HDAC-independent manner, likely by interfering with the recruitment of the HAT p300. A better understanding of the mechanisms involved in 15d-PGJ₂-mediated COX-2 repression may help to provide new strategies to modify the pathophysiology of inflammatory arthritis and other diseases caused by COX-2 overexpression.

Acknowledgements : We thank S. M. Prescott for the COX-2 promoter, R. Eckner for expression vectors for p300, and G. Tardif and F. Mineau for helpful suggestions. We are also grateful to F. C. Jolicoeur and C. S. Geng for their technical assistance.

REFERENCES

1. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, et al: Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994;93:1095-1101.
2. Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, et al: Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest* 1997;99:1231-1237.
3. Myers LK, Kang AH, Postlethwaite AE, Rosloniec EF, Morham SG, Shlopov BV, et al: The genetic ablation of cyclooxygenase 2 prevents the development of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2687-2693.
4. Yamada R, Sano H, Hla T, Hashiramoto A, Kawahito Y, Mukai S, et al: Selective inhibition of cyclooxygenase-2 with antisense oligodeoxynucleotide restricts induction of rat adjuvant-induced arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:415-421.
5. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H: Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:155-167.
6. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391: 79-82.
7. Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-86.
8. Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, et al: Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 2000;275: 4541-4544.
9. Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001;44:595-607.
10. Fahmi H, Pelletier JP, Di Battista JA, Cheung HS, Fernandes J, Martel-Pelletier J: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts by reducing the activity of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10: 100-108.

11. Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 2001;276: 12440-12448.
12. Inoue H, Tanabe T, Umesono K: Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000;275:28028-28032.
13. Pang L, Nie M, Corbett L, Knox AJ: Cyclooxygenase-2 expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human airway smooth muscle cells: role of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Immunol* 2003;170:1043-1051.
14. Janabi N: Selective inhibition of cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-prostaglandin J(2) in activated human astrocytes, but not in human brain macrophages. *J Immunol* 2002;168: 4747-4755.
15. Fahmi H, Pelletier JP, Mineau F, Martel-Pelletier J: 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:845-848.
16. Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-1080.
17. Saccani S, Pantano S, Natoli G: Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med* 2001;193:1351-1359.
18. Hiroi M, Ohmori Y: The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *J Biol Chem* 2003;278:651-660.
19. Soloff MS, Cook DL Jr, Jeng YJ, Anderson GD: In situ analysis of interleukin-1-induced transcription of COX-2 and IL-8 in cultured human myometrial cells. *Endocrinology* 2004;145:1248-1254.
20. Nie M, Pang L, Inoue H, Knox AJ: Transcriptional regulation of cyclooxygenase 2 by bradykinin and interleukin-1beta in human airway smooth muscle cells: involvement of different promoter elements, transcription factors, and histone h4 acetylation. *Mol Cell Biol* 2003;23:9233-9244.
21. Park GY, Joo M, Pedchenko T, Blackwell TS, Christman JW: Regulation of macrophage cyclooxygenase-2 gene expression by modifications of histone H3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L956-962.
22. Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, Natarajan R: In Vivo Chromatin Remodeling Events Leading to Inflammatory Gene Transcription under Diabetic Conditions. *J Biol Chem* 2004;279:18091-18097.

23. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM: Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000;20:6891-6903.
24. Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, et al: A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8921-8926.
25. Bai S, Cao X: A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 2002;277:4176-4182.
26. Deng WG, Zhu Y, Wu KK: Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 promoter activation. *J Biol Chem* 2003;278:4770-4777.
27. Deng WG, Zhu Y, Wu KK: Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood* 2003;103:2135-2142.
28. Subbaramaiah K, Cole PA, Dannenberg AJ: Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res* 2002;62:2522-2530.
29. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-1049.
30. Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, et al: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem* 2004;279:22057-22065.
31. Bordoli L, Husser S, Luthi U, Netsch M, Osmani H, Eckner R: Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity. *Nucleic Acids Res* 2001;29:4462-4471.
32. Joo M, Park GY, Wright JG, Blackwell TS, Atchison ML, Christman JW: Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in macrophages by PU.1. *J Biol Chem* 2004;279:6658-6665.
33. Simonin MA, Bordji K, Boyault S, Bianchi A, Gouze E, Becuwe P, et al: PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial

fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C125-133.

34. Tsubouchi Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue K, Hla T, Sano H: Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J₂. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283: 750-755.
35. Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses on arthritis. An overview. *J Rheumatol* 2002;29: 3-14.
36. Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA: Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ₂ and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest* 2003;112:945-955.
37. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Nishioka K: A potential role of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J Biol Chem* 2004;
38. Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, et al: 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ₂ induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 2000;106:189-197.
39. Murakami Y, Akahoshi T, Hayashi I, Endo H, Hashimoto A, Kono S, et al: Inhibition of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation by retrovirally transfected prostaglandin D synthase. *Arthritis Rheum* 2003;48:2931-2941.
40. Li M, Pascual G, Glass CK: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000;20:4699-4707.
41. Wang C, Fu M, D'Amico M, Albanese C, Zhou JN, Brownlee M, et al: Inhibition of cellular proliferation through IkappaB kinase-independent and peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2001;21:3057-3070.
42. Cho H, Orphanides G, Sun X, Yang XJ, Ogryzko V, Lees E, et al: A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* 1998;18:5355-5363.
43. Kodera Y, Takeyama K, Murayama A, Suzawa M, Masuhiro Y, Kato S: Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J Biol Chem* 2000;275:33201-33204.
44. Takahashi N, Kawada T, Yamamoto T, Goto T, Taimatsu A, Aoki N, et al: Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators

CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2002;277:16906-16912.

FIGURE LEGENDS

Fig 1. 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 expression at the transcriptional level. **A**, 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 protein expression. HSFs were treated with increasing concentrations of 15d-PGJ₂ for 30 min, before incubation in the presence of IL-1 β for 18 h. Cell lysates were prepared and analyzed for COX-2 and COX-1 protein by Western blotting. These blots are representative of similar results obtained from 5 independent experiments. **B**, 15d-PGJ₂ is not toxic to HSFs. HSFs were treated as above, then the MTT assay was performed. Results are mean \pm SEM of 3 independent experiment, each of which was done in triplicate. **C**, 15d-PGJ₂ suppresses IL-1 β -induced COX-2 mRNA expression. HSFs were treated with increasing concentrations of 15d-PGJ₂ for 30 min before incubation with IL-1 β for 3 h. COX-2 and GAPDH mRNAs were quantified by real-time RT-PCR. **D**, 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 promoter activation. HSFs were cotransfected with 1 μ g/well of a human COX-2 promoter and 0.5 μ g/well of the internal control pSV40- β -gal. Transfected cells were incubated with increasing concentrations of 15d-PGJ₂ in the absence or presence of IL-1 β for 8 h. Results (**C** and **D**) are expressed as -fold changes, considering 1 as the value of unstimulated samples and represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. *, $p < 0.05$; compared with cells treated with IL-1 β alone.

Fig. 2. 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced COX-2 expression via PPAR γ -dependent and -independent pathways. **A**, PPAR γ antagonist (GW9662) alleviates the suppressive effect of 15d-PGJ₂. HSFs were pretreated with increasing concentrations of GW9662 for 30 min. Then, the cells were treated with or without IL-1 β for 18 h in the absence or presence of 15d-PGJ₂. **B**, Troglitazone enhances IL-1 β -induced COX-2 expression. HSFs were treated with increasing concentrations of troglitazone for 30 min, before incubation in the presence of IL-1 β for 18 h. Cell lysates were prepared and analyzed for COX-2 and COX-1 proteins by Western blotting. In the lower panel, the blots were stripped and reprobbed with a specific anti-COX-1 antibody. These blots are representative of similar results obtained from 5 independent experiments.

Fig. 3. 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced acetylation of histone H3 at the COX-2 promoter. Confluent HSFs were treated with 15d-PGJ₂ (10 and 20 μ M) before incubation with 100 pg/ml IL-1 β for 3 h. ChIP assays, coupled with real-time PCR, were performed using antibodies specific to acetylated histone H3 (**A**) and H4 (**B**). The level of histone acetylation at the proximal and distal COX-2 promoter are expressed as -fold induction over untreated cells and represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. For each ChIP assay, the immunoprecipitated DNA was quantitated in triplicate on two separate occasions. *, $p < 0.05$; compared with cells treated with IL-1 β alone.

Fig. 4. Effect of 15d-PGJ₂ on HDAC1, HDAC2 and HDAC3 association with the COX-2 promoter. **A**, nuclear extracts (20 µg) from 3 different HSF preparations, were subjected to Western blot analysis and hybridized to anti-HDAC1, anti-HDAC2 and anti-HDAC3-specific antibodies. **B-D**, HSFs were treated with 15d-PGJ₂ before incubation with 100 pg/ml IL-1β for 3 h. ChIP assays coupled with real-time PCR were performed using antibodies specific to HDAC1 (**B**), HDAC2 (**C**) and HDAC3 (**D**). The results are expressed as -fold change of binding over untreated cells and represent the mean ± SEM of 4 independent experiments. For each ChIP assay, the immunoprecipitated DNA was quantitated in triplicate on two separate occasions.

Fig. 5. Effect of TSA on the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on IL-1β-induced COX-2 expression, MMP-1 and IL-6 production. HSFs were treated with increasing concentrations of 15d-PGJ₂ for 30 min before incubation in the presence of 100 pg/ml IL-1β for 18 h. TSA (50 ng/ml) was added 45 min before IL-1β stimulation. **A**, Cell lysates were prepared and analyzed for COX-2 protein by Western blotting. The blots are representative of similar results obtained from 4 independent experiments. The supernatants were collected and the levels of IL-6 (**B**) and MMP-1 (**C**) were determined. Data are expressed as the percentage of control, which was assigned a value of 100, and represent the mean ± SEM from 4 independent experiments. *, p<0.05; compared with cells treated with IL-1β alone.

Fig. 6. Role of the HAT p300 in 15d-PGJ₂-mediated COX-2 suppression. 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced recruitment of p300 (A), and RNA pol II (B) to the proximal region of the COX-2 promoter. HSFs were treated with 15d-PGJ₂ (10 and 20 μ M) before incubation with 100 pg/ml IL-1 β for 3 h. ChIP assays coupled with real-time PCR were performed using antibodies specific to p300, and RNA Pol II. C, Overexpression of p300 relieves the suppressive effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 promoter activation. HSFs were cotransfected with the COX-2 promoter, pSV40- β -gal and increasing concentrations (0.1, 0.5, and 1 μ g/well) of an expression vector for p300-CHA-WT or p300-CHA-WY (p300 Δ HAT). Transfected cells were treated with or without 15d-PGJ₂ in the absence or presence of IL-1 β for 8 h. Results are expressed as -fold induction, considering 1 as the value of unstimulated samples and represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. *, p<0.05; compared with cells treated with IL-1 β alone.

Figure 1 Farrajota et al.

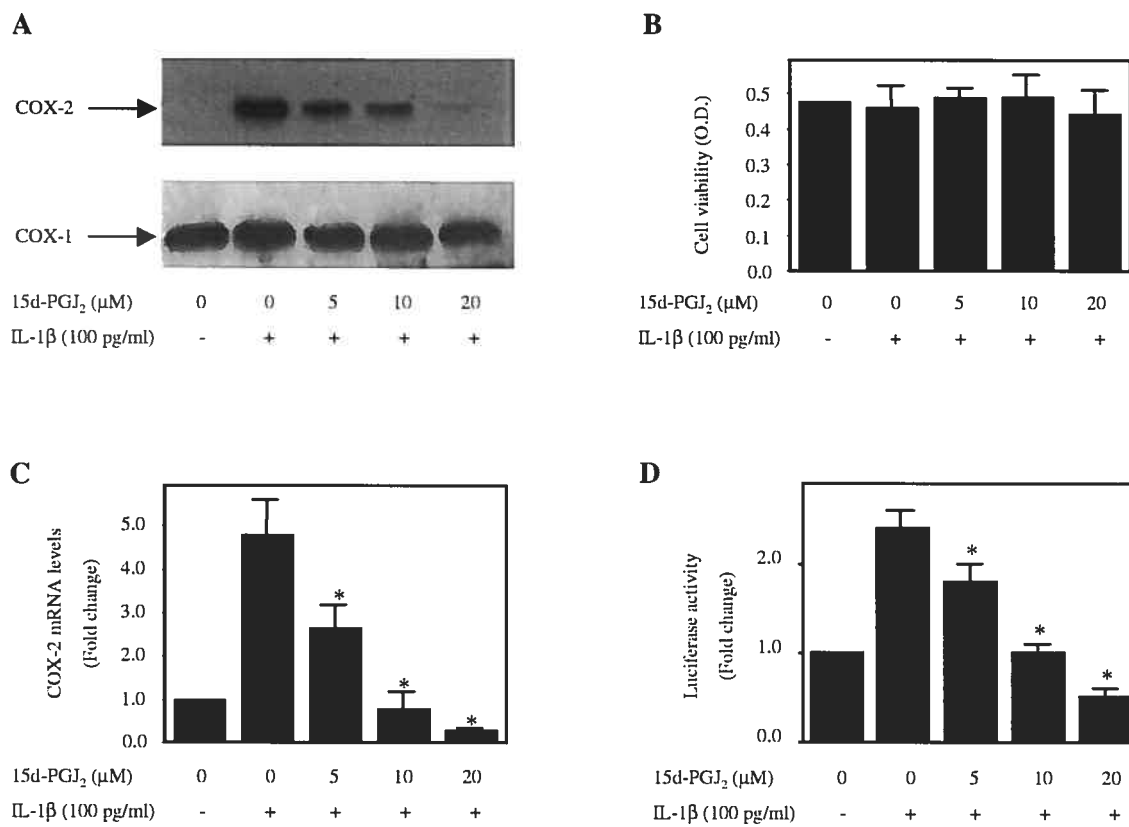
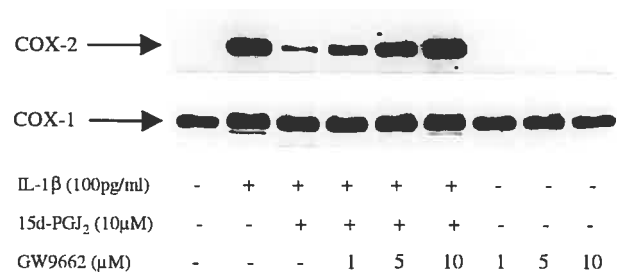


Figure 2 Farrajota et al.

A



B

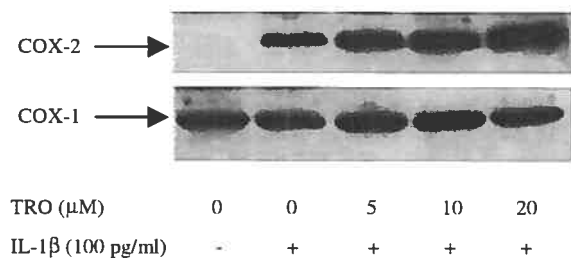


Figure 3 Farrajota et al.

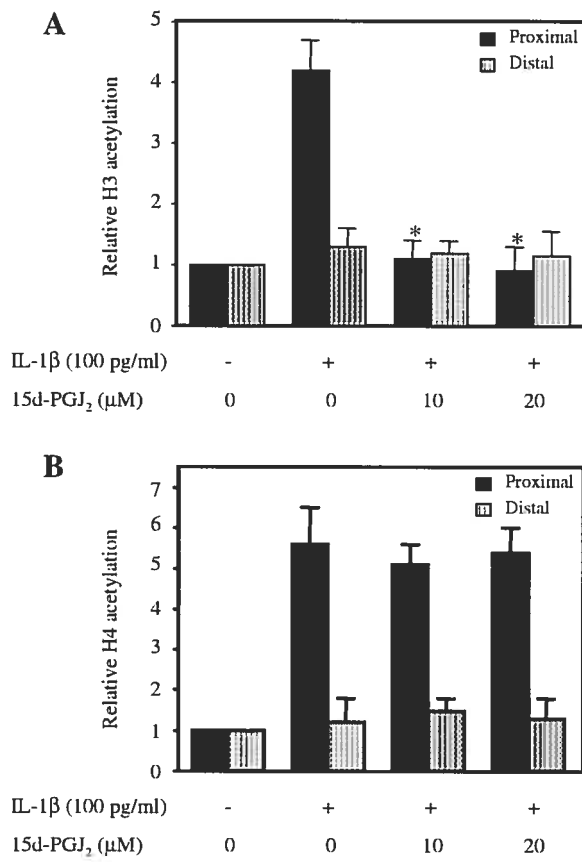


Figure 4 Farrajota et al.

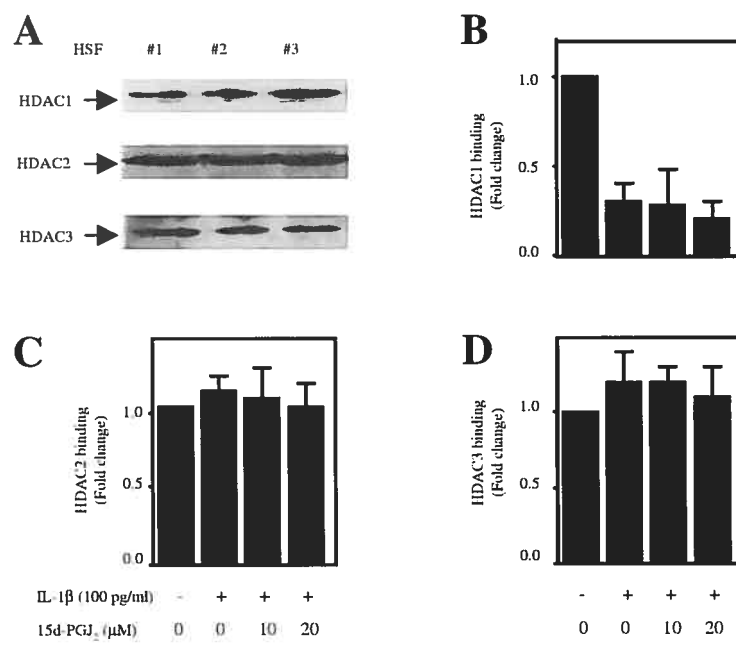


Figure 5 Farrajota et al.

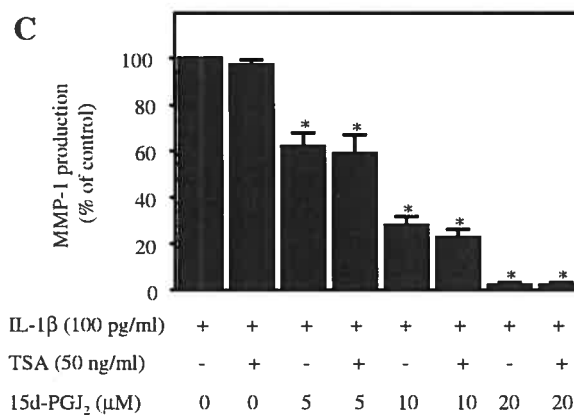
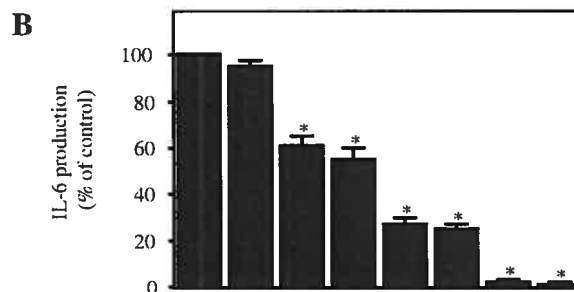
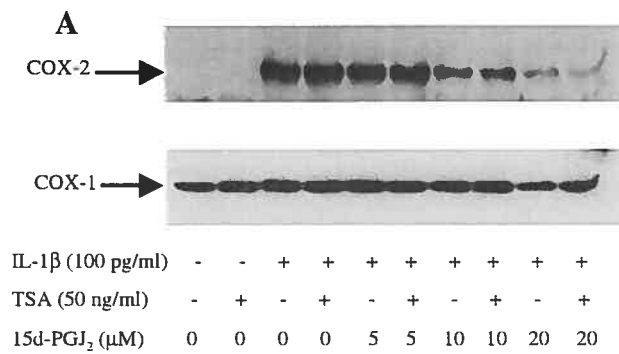
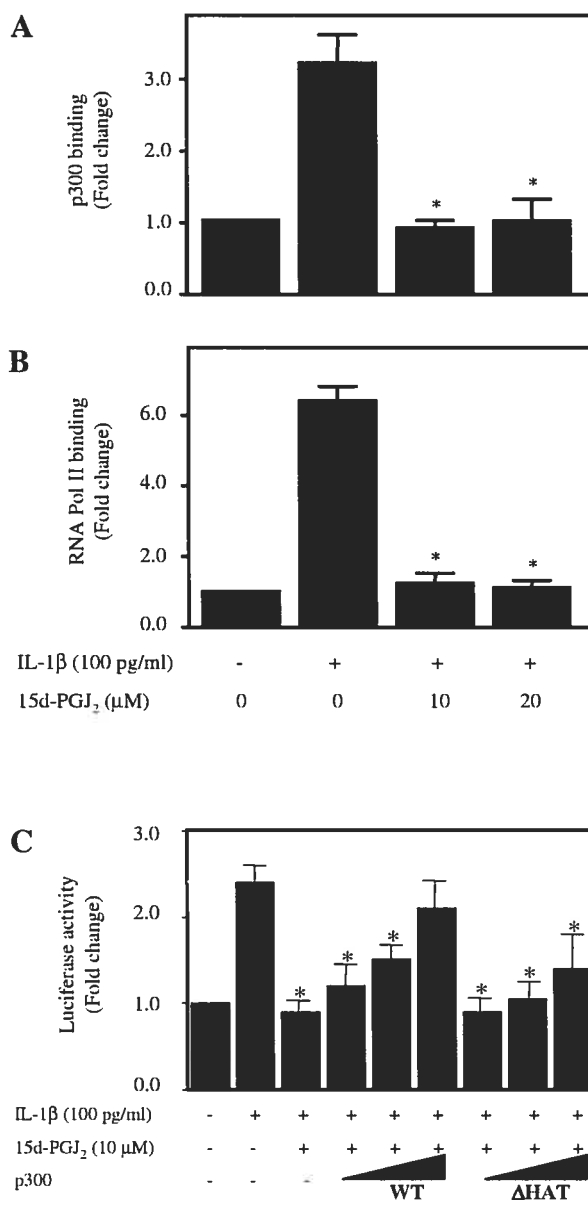


Figure 6 Farrajota et al.



DISCUSSION

L'arthrose, une des maladies les plus fréquentes et les plus invalidantes en occident, est caractérisée par une inflammation et une dégradation progressive des structures articulaires. La surexpression de la PGE₂ joue un rôle central dans la pathologie de cette maladie. D'énormes progrès ont été accomplis dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la synthèse de la PGE₂. L'identification des cyclooxygénases comme étant des enzymes clés dans la synthèse de la PGE₂ a introduit sur le marché les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINSs). Ces médicaments sont les plus prescrits et les plus consommés au monde, avec l'OA comme principale indication. Bien qu'il soit généralement accepté que les AINSs agissent en inhibant l'activité des cyclooxygénases, de nombreux travaux indiquent que les AINSs peuvent induire leurs effets bénéfiques en liant et en activant un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires : le "Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma" (PPAR γ).

La 15d-PGJ₂, un activateur naturel de PPAR γ , a reçu beaucoup d'intérêt durant les récentes années, en raison de sa capacité à moduler les réponses inflammatoires, cataboliques et immunitaires (Ricote M et al., 1998 ; Yang XY et al., 2000). En effet, de nombreux travaux ont montré que la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de nombreux gènes inflammatoires et cataboliques tels que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6, iNOS, MMP-1 et MMP-13 (Pour revue voir Fahmi H et al.,

2002). Cependant, l'effet de la 15d-PGJ₂ sur l'expression de la COX-2 est controversé. D'une part, il a été rapporté que la 15d-PGJ₂ inhibe l'induction de l'expression de la COX-2 par le phorbol myristate acétate (PMA) et les lipopolysaccharides (LPS) (Subbaramaiah K et al., 2001 ; Inoue H et al., 2000). D'autre part, il a été montré que la 15d-PGJ₂ diminue l'induction de l'expression de la COX-2 par l'IL-1 β (Fahmi H et al., 2002).

Dans ce mémoire, nous avons utilisé les synoviocytes humains comme modèle cellulaire étant donné l'importance de la membrane synoviale dans l'OA. Dans cette étude, nous avons caractérisé les mécanismes par lesquels la 15d-PGJ₂ module l'induction de l'expression de la COX-2 par l'IL-1 β dans les synoviocytes humains.

Nous avons montré que l'IL-1 β induit l'expression de la COX-2 et que la 15d-PGJ₂ inhibe de manière dose-dépendante cet effet. L'inhibition de l'expression de la COX-2 a lieu au niveau transcriptionnel, puisque la 15d-PGJ₂ inhibe l'induction de l'ARNm de la COX-2 ainsi que l'activation du promoteur de la COX-2.

Bien qu'il soit établi que la 15d-PGJ₂ induit ses effets via PPAR γ , d'autres travaux suggèrent que la 15d-PGJ₂ peut agir indépendamment de PPAR γ . Pour vérifier l'implication de PPAR γ dans l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂ sur la COX-2, nous avons fait appel à deux approches expérimentales distinctes : utilisation d'un antagoniste de PPAR γ (GW9662) et d'agonistes sélectifs de PPAR γ

(troglitazone et ciglitazone). Nous avons montré que le GW9662 prévient l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂, indiquant que PPAR γ est impliqué dans l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂. Paradoxalement, le ciglitazone et le troglitazone augmentent l'expression de la COX-2, ce qui nous laisse croire que la 15d-PGJ₂ inhibe aussi la COX-2 dans les synoviocytes par un mécanisme PPAR γ indépendant. Ces résultats montrent que l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂ implique à la fois des mécanismes PPAR γ -dépendant et PPAR γ -indépendant. Ces données ne sont pas surprenantes, puisqu'il a été montré que la 15d-PGJ₂ module souvent l'expression des gènes pro-inflammatoires par des mécanismes PPAR γ -dépendant et PPAR γ -indépendant. En effet, des travaux réalisés dans notre laboratoire et ailleurs ont montré que l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂ est souvent potentialisé suite à la surexpression de PPAR γ (Ricote M et al., 1998 ; Fahmi H et al., 2001). La meilleure approche permettant d'évaluer le rôle de PPAR γ est de générer des souris invalidées pour le gène PPAR γ ; malheureusement, ces animaux ne sont pas viables. Pour pallier à cette difficulté, Chawla et al (Chawla A et al., 2001) ont généré des macrophages déficients pour PPAR γ à partir des MEF. Ces auteurs ont examiné l'effet de la 15d-PGJ₂ sur l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires, y compris la COX-2, et ont démontré que PPAR γ n'est pas indispensable à l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂ (Chawla A et al., 2001). Un mécanisme possible serait l'inhibition de la fixation ou de l'activité d'un (ou des) facteurs de transcription au niveau du promoteur de la COX-2. En effet, NF- κ B joue un rôle très important dans la transcription de la COX-2. Or, il a été démontré que la 15d-PGJ₂ inhibe NF- κ B en inhibant l'activité d'I κ B kinase kinase (IKK) en

modifiant des résidus cystéine au niveau de IKK β ou au niveau du domaine de fixation de l'ADN de la sous-unité p65 de NF- κ B. Il serait très intéressant de vérifier si un mécanisme similaire est opérationnel dans notre système d'étude. L'identification et la caractérisation des mécanismes PPAR γ -indépendant contribueront largement à notre compréhension du mode d'action de cette molécule.

Récemment, de nombreux travaux ont démontré que l'acétylation/déacétylation des histones nucléaires joue un rôle crucial dans la régulation de la transcription. Il est généralement accepté que l'acétylation des histones soit associée à l'activation de la transcription, alors que la déacétylation est associée à la répression de la transcription. Afin d'évaluer le rôle de l'acétylation des histones dans l'effet répresseur de la 15d-PGJ₂, nous avons d'abord examiné l'effet de l'IL-1 β sur le niveau d'acétylation des histones au niveau du promoteur de la COX-2. Nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et nous avons analysé deux régions du promoteur de la COX-2. La région proximale, reconnue pour son importance dans l'induction de la COX-2, comporte la boîte TATA et les sites de liaison de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'activation transcriptionnelle de la COX-2 (C/CEBP, NF- κ B et AP-1). La région distale ne semble pas jouer un rôle important dans l'activation de la transcription. Nos résultats démontrent que l'IL-1 β induit une augmentation du niveau d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau de la région proximale, mais aucun n'a d'effet sur

l'acétylation de ces histones au niveau de la région distale. Le prétraitement avec la 15d-PGJ₂ induit une diminution de l'effet de l'IL-1 β sur l'acétylation de l'histone H3, mais n'a aucun effet sur celui de l'acétylation de H4. Ceci concorde avec l'inhibition de l'expression de la COX-2 par cette prostaglandine. En effet, lorsqu'il y a moins de lysines acétylés sur les extrémités N-terminale des histones H3, le promoteur est moins accessible aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle de base, ce qui entraîne l'inhibition de la transcription. Ces résultats suggèrent que les modifications du niveau d'acétylation de H3, plutôt que H4, peuvent servir d'indicateurs sur l'état d'activation du gène de la COX-2. Des travaux supplémentaires sont requis pour vérifier cette suggestion.

Puisque l'acétylation des histones est sous le contrôle des HAT et des HDAC, nous avons postulé que deux mécanismes majeurs peuvent expliquer l'effet de la 15d-PGJ₂ sur l'acétylation de l'histone H3. Premièrement, que la 15d-PGJ₂ inhibe l'acétylation de H3 en augmentant le niveau des HDACs. Deuxièmement, que la 15d-PGJ₂ inhibe l'acétylation de H3 en diminuant le niveau des HATs.

Pour vérifier la 1^{ère} hypothèse, nous avons fait appel à la technique de ChIP. Nous avons analysé l'effet de l'IL-1 β , en présence et en absence de 15d-PGJ₂, sur le recrutement des HDAC1, 2 et 3 au niveau de la région proximale du promoteur de la COX-2. Les résultats obtenus indiquent que le recrutement des trois HDAC analysées n'est vraisemblablement pas impliqué dans l'effet inhibiteur de la 15d-

PGJ₂ sur l'acétylation des histones H3. Afin de confirmer l'absence du rôle des HDACs dans l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂, nous avons examiné la capacité d'un inhibiteur des HDAC, la trichostatine A (TSA), à prévenir l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂ sur l'expression de la COX-2. Nos résultats montrent qu'un prétraitement avec la TSA ne restaure pas l'expression de la COX-2. Cet effet ne semble pas spécifique à l'expression de la COX-2, puisque, à son tour, l'inhibition de l'expression de l'IL-6 et MMP-1 n'est pas affectée.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la 15d-PGJ₂ induit ses effets inhibiteurs par un (des) mécanisme indépendant des HDACs. Cependant, ces résultats n'excluent pas que les HDACs analysées dans cette étude soient impliquées dans la déacétylation des histones, mais au niveau d'autres régions du promoteur de la COX-2. Nous ne pouvons pas non plus exclure l'implication d'autres HDACs dans l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂.

Le second mécanisme par lequel la 15d-PGJ₂ pourrait réduire l'acétylation des histones H3 au niveau du promoteur de la COX-2, impliquerait une diminution du recrutement des HATs. En effet, les HATs notamment la p300, jouent un rôle important dans l'activation de la transcription de la COX-2 (Deng et al., 2003). En utilisant la technique ChIP, nous avons démontré que l'IL-1 β induit une augmentation du niveau de la p300 au niveau de la région proximale du promoteur de la COX-2 et que cet effet est inhibé en présence de 15d-PGJ₂. L'effet de la 15d-PGJ₂ sur le niveau de la p300 est corrélé à une diminution du niveau de l'ARN pol II et de l'acétylation des histones H3. Ces résultats suggèrent

que la 15d-PGJ₂ inhibe la transcription de la COX-2 en interférant avec le recrutement de la p300. Ceci est corroboré par nos résultats obtenus dans des expériences de transfection transitoires. Nous avons montré que l'inhibition de l'activation du promoteur de la COX-2 par la 15d-PGJ₂ est levée en présence d'un vecteur d'expression pour la p300. En revanche, la forme délétée de la p300, dépourvue d'activité HAT, n'a aucun effet. L'ensemble de ces données indique que la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de la COX-2 et l'acétylation des histones H3 en interférant avec le recrutement de la HAT p300 plutôt qu'en augmentant le niveau des HDACs.

Perspectives

Les mécanismes via lesquels la 15d-PGJ₂ réduit le niveau de la p300 au niveau du promoteur de la COX-2 restent encore ambigus. Toutefois, il a été rapporté dans d'autres systèmes cellulaires que les effets médiés par la 15d-PGJ₂/PPAR γ requièrent la protéine p300. Il est donc possible qu'après traitement par la 15d-PGJ₂, PPAR γ activé forme un complexe avec la p300 et réduise la disponibilité de cette dernière, ce qui conduit à une diminution de l'acétylation des histones au niveau du promoteur de la COX-2 et une diminution de la transcription de ce gène. Pour s'assurer qu'un mécanisme semblable se produise dans la régulation de la COX-2 chez les synoviocytes, il serait premièrement nécessaire de démontrer l'interaction directe entre PPAR γ et la p300 par co-immunoprécipitation. Par la suite, des expériences supplémentaires faisant appel à

la technique ChIP et analysant un gène activé par la 15d-PGJ₂/PPAR γ sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

La technique d'ARN interférence est de plus en plus utilisée et c'est une méthode importante pour l'analyse des fonctions des gènes eucaryotes. L'ARN interférence est un processus post-transcriptionnel, initié par l'introduction d'ARN double-brin. Ceci permet le silencement spécifique d'un gène cible. La méthode d'ARNsi s'effectue en deux étapes. Premièrement, de long ARN double-brin sont clivés en fragments de 21-23 nucléotides, appelés ARNsi, par l'enzyme Dicer. Par la suite, les ARNsi sont recrutés à un complexe ribonucléase (RISC) qui en retour contrôle le clivage de l'ARNm ciblé. Ainsi, l'utilisation de cette méthode contre le gène de PPAR γ pourrait être très intéressante. Elle permettrait de déterminer si PPAR γ possède un rôle dans ce mécanisme. En fait, l'ensemble des résultats de co-immunoprecipitation et ARN interférence nous permettrons de déterminer avec certitude si PPAR γ est impliqué dans l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ₂.

Par la suite, l'identification de l'implication de modifications épigénétiques supplémentaires dans l'inhibition de l'expression de la COX-2 pourrait être une autre perspective intéressante. Les modifications des histones, et donc de la structure de la chromatine, tels que l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation, sont associées à la régulation de la transcription génique. Ce thème a été abordé fréquemment au cours des dernières années. Tel que démontré dans notre étude, l'acétylation des histones joue un rôle important dans l'expression de la COX-2. En effet, l'inhibition de l'acétylation des histones diminue l'expression

de la COX-2. Cependant, l'acétylation des histones n'est pas la seule modification post-traductionnelle régulant l'expression des gènes. Ainsi, il serait intéressant d'observer si la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de la COX-2 par la modulation d'autres modifications épigénétiques.

Comme indiqué, la phosphorylation et la méthylation sont aussi impliquées dans le remodelage de la chromatine et ainsi dans l'expression des gènes. Les modifications des histones génèrent des sites spécifiques de liaison pour des protéines qui régulent le remodelage de la chromatine et la transcription, tels que les co-activateurs possédant des activités HAT.

Il a été démontré que la phosphorylation de l'histone H3 contribue à l'expression de la COX-2 dans les macrophages (Young ParK G et al., 2004). La phosphorylation de l'histone H3 est régulée par plusieurs voies MAPKs en fonction du stimulus. Il a récemment été démontré que IKK- α possède une activité H3 kinase, lui permettant d'activer NF- κ B ainsi que de phosphoryler directement la sérine 10 sur l'histone H3 (Anest V et al., 2003 ; Yamamoto Y et al., 2003). Étant donné que la 15d-PGJ₂ est capable d'inhiber l'expression des gènes en inhibant IKK- α , il est envisageable que cette prostaglandine inhibe aussi la phosphorylation de l'histone H3 par l'intermédiaire de l'inhibition de IKK- α .

Finalement, la méthylation des histones peut être une autre modification épigénétique intéressante à étudier. L'effet de la méthylation est variable selon la lysine impliquée. Ainsi, elle est inactivatrice lorsque la Lys9 de H3 est méthylée,

tandis qu'elle est activatrice lorsque la Lys4 est méthylée. La possibilité que la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de la COX-2 en augmentant la méthylation des lysines inactivatrices sur les histones est une voie intéressante à exploiter.

Conclusion

Plusieurs inhibiteurs des COX, enzymes clés dans la synthèse de la PGE₂, sont présents sur le marché aujourd'hui. Cependant, leurs effets secondaires mettent en évidence l'importance de trouver de meilleurs candidats pour l'inhibition des cyclooxygénases pour le traitement de maladies inflammatoires. La 15d-PGJ₂ inhibe plusieurs gènes inflammatoires, mais son effet sur la COX-2 restait à définir. Les travaux présentés dans ce mémoire démontrent que la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de la COX-2 dans les synoviocytes humains. Cette inhibition a lieu au niveau transcriptionnel et est associée à une diminution du niveau d'acétylation des histones H3 au niveau de la région proximale du promoteur de la COX-2. De plus, il a été établi dans cette étude que des mécanismes dépendants et indépendants de PPAR γ sont impliqués dans l'effet suppresseur de cette prostaglandine. Enfin, nous avons présenté des arguments expérimentaux indiquant que l'inhibition de l'acétylation des histones H3 par la 15d-PGJ₂ semble être due à une diminution du recrutement de la p300 plutôt qu'à une augmentation des niveaux des HDACs.

Ces résultats auront un impact très positif sur notre compréhension du mode d'action de la 15d-PGJ₂, ainsi que les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de la COX-2.

Bibliographie

A

Allan DA (1998). Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries. *Clin Orthop Relat Res.* Jun;(351):32-8. Review.

Allfrey VG (1966). Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Can Cancer Conf.* 6:313-35. Review. No abstract available.

Arakawa T, Higuchi K, Fukuda T, Fujiwara Y, Kobayashi K, Kuroki T (1998). Prostaglandins in the stomach: an update. *J Clin Gastroenterol.* 27 Suppl 1:S1-11. Review.

Arend WP (1993). Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 54:167-227. Review.

B

Barland P and Novikoff AB (1998). Electron microscopy of the human synovial membrane. *J. Cell Biol.* 14: 207-214

Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; and Stryer, Lubert. (2002). *Biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Co.

Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S, Fitzpatrick FA (1985). Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature.* Jun 6-12;315(6019):511-3.

Bishop-Bailey D, Hla T (1999). Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta¹², 14-prostaglandin J₂. *J Biol Chem.* Jun 11;274(24):17042-8.

Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauca M, Netter P, Terlain B (2000). Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem.* Apr 21;275(16):12243-50.

Blaschko HK (1983). Ulf Svante von Euler: 7 February 1905-10 March. *Biogr Mem Fellows R Soc.* 1985;31:143-70.

Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. Jan;137(1):354-66.

Buckwalter JA, Lane NE (1997). Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med*. Nov-Dec;25(6):873-81. Review

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*.47:477-86. Review.

Bunting S, Buchanan LV, Holzgreffe HH, Fitzpatrick FA (1987). Pharmacology of synthetic thromboxane A2. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 17A:192-8.

C

Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, Pelletier JP (1996). Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum*. Sep;39(9):1535-44.

Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet*. Jun;19(6):321-9. Review.

Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM (2001). PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*. Jan;7(1):48-52.

Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, Lavigne M, Fahmi H (2004). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem*. May 21;279(21):22057-65. Epub 2004 Mar 15

Chevalier X (1998). Physiopathogenesis of arthrosis. Therapeutic perspectives *Presse Med*. Jan 17;27(2):88-92. Review. French

Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ (2000). The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol*. Feb 1;164(3):1364-71.

Cole AA, Kuettner KE (2002). Molecular basis for differences between human joints. *Cell Mol Life Sci*. Jan;59(1):19-26. Review.

Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*. Jul 23;261(5120):472-5.

Cote J, Peterson CL, Workman JL (1998). Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 28;95(9):4947-52.

Corton JC, Anderson SP, Stauber A (2000). Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 40:491-518. Review.

Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH (1998). The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med*. Mar;76(3-4):275-88. Review.

Cress WD, Seto E (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol*. Jul;184(1):1-16. Review

Culty M, Nguyen HA, Underhill CB (1992). The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol*. Feb;116(4):1055-62

Curtis CL, Hughes CE, Flannery CR, Little CB, Harwood JL, Caterson B (2000). n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J Biol Chem*. Jan 14;275(2):721-4.

D

Dajani OF, Rottingen JA, Sandnes D, Horn RS, Refsnes M, Thoresen GH, Iversen JG, Christoffersen T (1996). Growth-promoting effects of Ca(2+)-mobilizing agents in hepatocytes: lack of correlation between the acute activation of phosphoinositide-specific phospholipase C and the stimulation of DNA synthesis by angiotensin II, vasopressin, norepinephrine, and prostaglandin F2 alpha. *J Cell Physiol*. Sep;168(3):608-17.

Davie JR, Chadee DN (1998). Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl*. 30-31:203-13. Review

Dayer JM, Beutler B, Cerami A (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*. Dec 1;162(6):2163-8.

Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA (1986). Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest.* Feb;77(2):645-8

Deng WG, Zhu Y, Wu KK (2004). Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood.* Mar 15;103(6):2135-42. Epub 2003 Nov 20.

Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS (1996). Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* Mar;54(3):332-8. Review.

Dougados M, Gueguen A, Nguyen M, Berdah L, Lequesne M, Mazieres B, Vignon E (1996). Radiological progression of hip osteoarthritis: definition, risk factors and correlations with clinical status. *Ann Rheum Dis.* Jun;55(6):356-62.

Dupuis M, Leclaire R. *Pahtologie de l'appareil locomoteur*, St-Hyancinthe, Edisem, 1986, 999p.

E

Edwards JCW (1994). The nature and origins of synovium : experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *J. Anat.* (Pt 3) : 493-501

Escher P, Wahli W (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res.* Mar 17;448(2):121-38. Review.

Evans CH, Watkins SC, Stefanovic-Racic M (1996) Nitric oxide and cartilage metabolism. *Methods Enzymol.* 269:75-88. Review.

F

Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* Mar;44(3):595-607.

Fahmi H, Pelletier JP, Di Battista JA, Cheung HS, Fernandes JC, Martel-Pelletier J (2002) . Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage.* Feb;10(2):100-8.

Fahmi H, Pelletier JP, Mineau F, Martel-Pelletier J (2002) . 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* Nov;10(11):845-8.

Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J (2002) . PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses in arthritis. An overview. *J Rheumatol.* Jan;29(1):3-14. Review.

Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ (1992). Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* Apr 1;116(7):535-9

Felson DT, Nevitt MC (1998). The effects of estrogen on osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* May;10(3):269-72. Review.

Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector TD, Poole AR, Yanovski SZ, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter JA, Brandt KD, Fries JF (2000). Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* Oct 17;133(8):635-46. Review

Felson DT, Lawrence RC, Hochberg MC, McAlindon T, Dieppe PA, Minor MA, Blair SN, Berman BM, Fries JF, Weinberger M, Lorig KR, Jacobs JJ, Goldberg V. (2000). Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches. *Ann Intern Med.* Nov 7;133(9):726-37. Review.

Felson DT (2004). Risk factors for osteoarthritis: understanding joint vulnerability. *Clin Orthop Relat Res.* Oct;(427 Suppl):S16-21. Review.

Fischle W, Emiliani S, Hendzel MJ, Nagase T, Nomura N, Voelter W, Verdin E (1999). A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem.* Apr 23;274(17):11713-20.

Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR (1992). Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem.* Mar 5;267(7):4338-44.

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* Dec 1;83(5):803-12.

Fox RI, Kang H. Structure and function of synoviocytes. *Dans Arthritis and allied conditions; twelfth edition vol. 1*, Malvern, Lea & febiger, 1993, p.263-78

Fujiwara T, Horikoshi H (2000). Troglitazone and related compounds: therapeutic potential beyond diabetes. *Life Sci.* Oct 6;67(20):2405-16. Review

Fyodorov DV, Kadonaga JT (2001). The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell.* Sep 7;106(5):523-5. Review.

G

Gadially FN (1978). Fine structure of joints. In the joints and synovial fluid. Sokoloff L, ed (new york: Academic Press), p 110-120.

Garavito RM (1996). The cyclooxygenase-2 structure: new drugs for an old target? Nat Struct Biol. Nov;3(11):897-901.

Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD (2000). Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. Arthritis Rheum. May;43(5):953-68. Review. No abstract available.

Geng Y, Blanco FJ, Cornelisson M, Lotz M (1995). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. J Immunol. Jul 15;155(2):796-801.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 16:225-60. Review.

Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 27;96(9):4868-73.

Guarente L (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. Genes Dev. May 1;14(9):1021-6. Review.]

H

Hardingham TE, Fosang AJ (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. FASEB J. Feb 1;6(3):861-70. Review.

Hedbom E, Hauselmann HJ (2002). Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. Cell Mol Life Sci. Jan;59(1):45-53. Review.

Heitz E. (1928). Das Heterochromatin der Moose, 1. (The heterochromatin in moss) Jahrb Wiss Botanik 69: 762-818

Hermanns W, Schulz LC (1982). Enzyme histochemical studies of the homogeneity of the mononuclear phagocyte system with special reference to the synovium. Agents Actions Suppl. 11:117-29

Herschman HR (1996). Prostaglandin synthase 2. Biochim Biophys Acta. Jan 5;1299(1):125-40. Review.

Hogue JM et Mersfelder TL. (2002). Pathophysiology and first-line treatment of osteoarthritis. *Ann Pharmacother.* Apr;36(4):679-86.

Holmquist GP (1987). Role of replication time in the control of tissue-specific gene expression. *Am J Hum Genet.* Feb;40(2):151-73. Review.

Hulkower KI, Wertheimer SJ, Levin W, Coffey JW, Anderson CM, Chen T, DeWitt DL, Crowl RM, Hope WC, Morgan DW (1994). Interleukin-1 beta induces cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. Evidence for their roles in the production of prostaglandin E2. *Arthritis Rheum.* May;37(5):653-61.

Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Sung CM, Liu R, Winkler J (2000). Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem.* May 19;275(20):15254-64

Hunter DJ, March L, Sambrook PN (2002). Knee osteoarthritis: the influence of environmental factors. *Clin Exp Rheumatol.* Jan-Feb;20(1):93-100. Review.

I

Inoue H, Tanabe T, Umesono K (2000). Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem.* Sep 8;275(36):28028-32.

Issemann I, Prince R, Tugwood J, Green S (1992). A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation *Biochem Soc Trans.* Nov;20(4):824-7. Review.

Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, Barnes PJ (2002). A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 25;99(13):8921-6.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol.* Mar;63(1):17-31. Review.

J

Janabi N (2002). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-prostaglandin J(2) in activated human astrocytes, but not in human brain macrophages. *J Immunol.* May 1;168(9):4747-55.

Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science.* Aug 10;293(5532):1074-80. Review.

Jiang C, Ting AT, Seed B (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. Jan 1;391(6662):82-6.

Johnston SA (1997) Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Jul;27(4):699-723. Review

K

Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*. May 3;85(3):403-14.

Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev*. Aug 1;12(15):2269-77.

Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H (2000). 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest*. Jul;106(2):189-97.

Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. Dec 1;83(5):813-9.

Kobayashi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2005). Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum*. Feb;52(2):479-87.

Kornberg RD, Lorch Y (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. Aug 6;98(3):285-94. Review.

Kreen V et al. (1999). Molecular IgV(h) analysis demonstrates highly somatic mutated B cells in synovialitis of osteoarthritis: a degenerative disease is associated with a specific, not locally generated immune response, *Lab Invest*, 79: 1377-84

Kujala UM, Kettunen J, Paananen H, Aalto T, Battie MC, Impivaara O, Videman T, Sarna S (1995). Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum*. Apr;38(4):539-46

L

Lands WE, Samuelsson B (1968). Phospholipid precursors of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta.* Oct 22;164(2):426-9

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* Jun 2;270(22):12953-6.

Li M, Pascal G, Glass CK (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol.* Jul;20(13):4699-707.

Lindblad S et al. (1987). Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 30: 1081-8

Lohmander L Stephan (2000). What can we do about osteoarthritis? *Arthritis Res.* 2(2):95-100. Review

M

Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, Sarfati M, Pelletier JP (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.* May;35(5):530-40.

Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* Dec 15;83(6):841-50. Review.

Martel-Pelletier J (1999). Proinflammatory mediators and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* May;7(3):315-6.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H (2003). Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum.* Dec;33(3):155-67. Review.

Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, Jaiswal R, Beck S, Pittenger MF, Thiede MA, Marshak DR (2000). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem.* May 12;275(19):14388-93.

McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP (2002). The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* Sep;110(5):651-8.

Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell.* Dec 27;87(7):1261-70.

Mizzen CA, Allis CD (1998). Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci.* Jan;54(1):6-20. Review

Mollenhauer JA, Erdmann S (2002). Introduction: molecular and biomechanical basis of osteoarthritis. *Cell Mol Life Sci.* Jan;59(1):3-4.

Morita I (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* Aug;68-69:165-75. Review.

Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK (1987). The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem.* Mar 5;262(7):2941-4.

Muir H (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays.* Dec;17(12):1039-48. Review.

Muldrew K (2002). Osteoarthritis as an inevitable consequence of the structure of articular cartilage. *Med Hypotheses.* Oct;59(4):389-97. Review.

Murakami M, Matsumoto R, Urade Y, Austen KF, Arm JP (1995). c-kit ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A2, prostaglandin endoperoxide synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D2 synthase and increased IgE-dependent prostaglandin D2 generation in immature mouse mast cells. *J Biol Chem.* Feb 17;270(7):3239-46.

Myers SL et al (1990). Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 17: 1662-9

Myers LK, Kang AH, Postlethwaite AE, Rosloniec EF, Morham SG, Shlopov BV, Goorha S, Ballou LR (2000). The genetic ablation of cyclooxygenase 2 prevents the development of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* Dec;43(12):2687-93.

N

Nakamura et al. (1999). T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage* , 7:401-2 Ghadially FN, Lalonde JM, Wedge JH. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat.* 1983 Jun;136 (Pt 4):773-91.

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell.* Feb 22;108(4):475-87. Review.

Nencioni A, Wesselborg S, Brossart P (2003). Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the control of immune responses. *Crit Rev Immunol.* 23(1-2):1-13. Review.

Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Ikeda N, Suzuki A, Kawano Y, Maeda T (2003). Synovial membrane in the temporomandibular joint--its morphology, function and development. *Arch Histol Cytol.* Oct;66(4):289-306. Review.

Nugteren DH, Van Dorp DA, Bergstrom S, Hamberg M, Samuelsson B. (1966). Absolute configuration of the prostaglandins. *Nature.* Oct 1;212(57):38-9.

O

Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T (2002) Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol.* Sep-Oct;20(5):633-40

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell.* Nov 29;87(5):953-9.

Ogryzko VV. Mammalian histone acetyltransferases and their complexes (2001). *Cell Mol Life Sci.* May;58(5-6):683-92. Review.

O'Neill LA (1995). Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin 1. *Biochim Biophys Acta.* Apr 6;1266(1):31-44. Review.

P

Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1995). Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *J Rheumatol Suppl.* Feb;43:109-14.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* Jun;44(6):1237-47. Review.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB (2001) Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* Jun;44(6):1237-47. Review.

Pelletier JP, Roughley PJ, DiBattista JA, McCollum R, Martel-Pelletier J (1991). Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin Arthritis Rheum.* Jun;20(6 Suppl 2):12-25. Review.

Pang L, Nie M, Corbett L, Knox AJ (2003). Cyclooxygenase-2 expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human airway smooth muscle cells: role of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Immunol.* Jan 15;170(2):1043-51.

Pazin MJ, Kadonaga JT (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell.* May 2;89(3):325-8. Review.

Q

Qi C, Zhu Y, Reddy JK (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell Biochem Biophys.* ;32 Spring:187-204. Review.

R

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1 Jan 1;391(6662):79-82.

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK (1999). The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol.* Nov;66(5):733-9. Review

Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature.* Jan 6;403(6765):103-8.

Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 70:81-120. Review.

S

Sadouk MB, Pelletier JP, Tardif G, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1995). Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Lab Invest.* Sep;73(3):347-55

Sandell LJ, Aigner T (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* ;3(2):107-13. Review.

Schnyder J, Payne T, Dinarello CA (1987). Human monocyte or recombinant interleukin 1's are specific for the secretion of a metalloproteinase from chondrocytes. *J Immunol.* Jan 15;138(2):496-503.

Senior J, Marshall K, Sangha R, Clayton JK (1993). In vitro characterization of prostanoid receptors on human myometrium at term pregnancy. *Br J Pharmacol.* Feb;108(2):501-6.

Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, Yamauchi T, Kawahata K, Kadowaki T, Yamamoto K (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest.* Dec;108(11):1667-75.

Sharma L (2003). Examination of exercise effects on knee osteoarthritis outcomes: why should the local mechanical environment be considered? *Arthritis Rheum.* Apr 15;49(2):255-60. Review

Shen RF, Tai HH (1998). Thromboxanes: synthase and receptors. *J Biomed Sci.* ;5(3):153-72. Review.

Shieh AC, Athanasiou KA (2002). Biomechanics of single chondrocytes and osteoarthritis. *Crit Rev Biomed Eng.* ;30(4-6):307-43. Review.

Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y (2002). PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol.* Jul 19;448(2-3):231-8.

Siders WM, Klimovitz JC, Mizel SB (1993). Characterization of the structural requirements and cell type specificity of IL-1 alpha and IL-1 beta secretion. *J Biol Chem.* Oct 15;268(29):22170-4.

Simkin PA. Synovial physiology. Dans *Arthritis and allied conditions; twelfth edition vol. 1*, Malvern, Lea & Febiger, 1993, p.199-212

Slack J, McMahan CJ, Waugh S, Schooley K, Spriggs MK, Sims JE, Dower SK (1993). Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors. *J Biol Chem.* Feb 5;268(4):2513-24.

Sledge CB, Reddi AH, Walsh DA, Blake DR. Biology of the normal joint. Dans *Kelley's textbook of rheumatology; sixth edition vol.1*, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001, p.1-26

Sontheimer EJ (2005). Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb;6(2):127-38. Review.

Sowers M (2001). Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. *Curr Opin Rheumatol.* Sep;13(5):447-51. Review.

Spector T.D et MacGregor, A.J. (2004). Risk factors for osteoarthritis : genetics. *Osteoarthritis cartilage* 12 (Suppl.A) S39-44

Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 25;97(9):4844-9.

Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem.* Apr 13;276(15):12440-8

Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S (1997). Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science.* Aug 1;277(5326):681-3.

T

Takahashi N, Kawada T, Yamamoto T, Goto T, Taimatsu A, Aoki N, Kawasaki H, Taira K, Yokoyama KK, Kamei Y, Fushiki T (2002). Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2002 May 10;277(19):16906-12.

Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C (1994). Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 15;200(1):142-8.

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* Feb;11(2):433-9.

Turner BM (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell.* Nov 1;111(3):285-91. Review.

Tsubouchi Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue K, Hla T, Sano H (2001). Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun.* May 18;283(4):750-5.

U

Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Ikai K, Hayaishi O (1989). The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J Immunol.* Nov 1;143(9):2982-9.

V

van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ, van den Berg WB (1995). 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.* Feb;38(2):164-72

Van Holden K (1998). *Chromatin.* New-York: Springer Verlag

Vaidya S, Somers EP, Wright SD, Detmers PA, Bansal VS (1999). 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits the beta2 integrin-dependent oxidative burst: involvement of a mechanism distinct from peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligation. *J Immunol.* Dec 1;163(11):6187-92.

Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemerrier C, Yoshida M, Khochbin S (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol.* Jun 15;10(12):747-9.

Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar;20(6):1899-910. Review.

W

Wood DD, Ihrle EJ, Hamerman D (1985). Release of interleukin-1 from human synovial tissue in vitro. *Arthritis Rheum.* Aug;28(8):853-62.

Workman JL, Kingston RE (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem.* 167:545-79. Review.

Wilkinson LS, Pitsillides AA, Worrall JG, Edwards JC (1992). Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum.* Oct;35(10):1179-84

Y

Yang WM, Yao YL, Sun JM, Davie JR, Seto E (1997). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem.* Oct 31;272(44):28001-7.

Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL (2000). Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem.* Feb 18;275(7):4541-4.

Yelin EH, Felts WR (1990). A summary of the impact of musculoskeletal conditions in the United States. *Arthritis Rheum.* May;33(5):750-5

Z

Zhang X, Rodriguez-Galan MC, Subleski JJ, Ortaldo JR, Hodge DL, Wang JM, Shimozato O, Reynolds DA, Young HA (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its ligands attenuate biologic functions of human natural killer cells. *Blood.* Nov 15;104(10):3276-84. Epub 2004 Jul 20.

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK (1997). Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* Oct 10;272(41):25500-6.

ANNEXE

katherine

C

Subject: Re: Picture authorization

You certainly have our permission. Good luck with your thesis.

Don & Ada Olins

Donald E. Olins, Ph.D.
Visiting Scholar
Bowdoin College
Biology Department
6500 College Station
Brunswick, ME 04011

Tel. 207 725 3113 (lab)
Fax. 207 725 3405
<http://academic.bowdoin.edu/faculty/D/dolins/index.shtml>

Dear Dr. Olins

I'm a master student at the university of Montreal and I am currently writting my thesis. I have chossen to include in my thesis introduction one of your figure (see attachment). This figure is present in the book Biochesmistry 2002. To include this picture i need your authorization. Id be grateful if you could grant me this request.

Thank you very much

Katherine Farrajota

10/9/2005

