

Université de Montréal

**Rôle de l'acétylation/déacétylation des histones dans la
régulation de l'expression des gènes de la COX-2, iNOS
et mPGES-1 dans les tissus articulaires**

par
Nadir Chabane

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de *Philosophae Doctor* (Ph.D.)
en Pharmacologie

Juin 2012

© Nadir Chabane, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôle de l'acétylation/déacétylation des histones dans la régulation de l'expression des gènes de la COX-2, iNOS et mPGES-1 dans les tissus articulaires

Présentée par :
Nadir Chabane

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr René Cardinal, président-rapporteur
Dr Hassan Fahmi, directeur de recherche
Dr Mohamed Benderdour, co-directeur
Dr Muhammad Zafarullah, membre du jury
Dr Sylvain Bourgoïn, examinateur externe
Dre Johanne Martel-Pelletier, représentante du doyen de la FES

Résumé

L'arthrose ou ostéoarthrose (OA) est l'affection rhumatologique la plus fréquente au monde. Elle est caractérisée principalement par une perte du cartilage articulaire et l'inflammation de la membrane synoviale. L'interleukine (IL)-1 β , une cytokine pro-inflammatoire, joue un rôle très important dans la pathogenèse de l'OA. Elle exerce son action en induisant l'expression des enzymes cyclo-oxygénase 2 (COX-2), prostaglandine E synthétase microsomale 1 (mPGES-1) et l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) ainsi que la production de la prostaglandine E₂ (PGE₂) et de l'oxyde nitrique (NO). Ces derniers (PGE₂ et NO) contribuent à la synovite et la destruction du cartilage articulaire par leurs effets pro-inflammatoires, pro-cataboliques, anti-anaboliques, pro-angiogéniques et pro-apoptotiques.

Les modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, et l'acétylation et la méthylation des histones, jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes. Parmi ces modifications, l'acétylation des histones est la plus documentée. Ce processus est contrôlé par deux types d'enzymes : les histones acétyltransférases (HAT) qui favorisent la transcription et les histones déacétylases (HDAC) qui l'inhibent.

L'objectif de ce travail est d'examiner le rôle des enzymes HDAC dans la régulation de l'expression de la COX-2, mPGES-1 et iNOS.

Nous avons montré qu'au niveau des chondrocytes, les inhibiteurs des HDAC (iHDAC), trichostatine A (TSA) et butyrate de sodium (NaBu), suppriment l'expression de la COX-2 et iNOS au niveau de l'ARNm et protéique, ainsi que la production de la PGE₂ et du NO, induites par l'IL-1 β . L'effet inhibiteur a lieu sans affecter l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor κ B*). La TSA et le NaBu inhibent également la dégradation induite par l'IL-1 β des protéoglycanes au niveau du cartilage.

Nous avons également montré, qu'au niveau des fibroblastes synoviaux, les iHDAC, TSA, NaBu et acide valproïque (VA), suppriment l'expression de la mPGES-1 ainsi que la production de la PGE₂ induites par l'IL-1 β . En utilisant diverses approches

expérimentales, nous avons montré que HDAC4 est impliquée dans l'induction de l'expression de la mPGES-1 par l'IL-1 β . HDAC4 exerce son action, via son activité déacétylase, en augmentant l'activité transcriptionnelle de Egr-1 (*early growth factor 1*), facteur de transcription principal de l'expression de la mPGES-1.

L'ensemble de ces résultats suggère que les inhibiteurs des HDAC pourraient être utilisés dans le traitement de l'OA.

Mots-clés : Ostéoarthrose, chondrocyte, fibroblastes synoviaux, Il-1 β , COX-2, mPGES-1, PGE₂, iNOS, NO, inflammation, NF- κ B, Egr-1, HDAC, HDAC4, inhibiteurs des HDAC.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritic diseases in the world. It is primarily characterized by the loss of articular cartilage and inflammation of the synovial membrane. Interleukin (IL)-1 β is a pro-inflammatory cytokine that plays a major role in the pathogenesis of OA. It induces the expression of cyclo-oxygenase 2 (COX-2), microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), as well as the production of prostaglandin E₂ (PGE₂) and nitric oxide (NO). The later (PGE₂ and NO) contribute to articular cartilage destruction and synovitis through their pro-inflammatory, pro-catabolic, anti-anabolic, pro-angiogenic and pro-apoptotic effects.

Epigenetic modifications such as DNA methylation, histone acetylation and methylation play a crucial role in gene expression. Among these modifications, histone acetylation is the most studied. Histone acetylation is determined by two types of enzymes: histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC) which activate and repress transcription, respectively.

The purpose of these studies is to examine the role of HDAC enzymes in the regulation of COX-2, mPGES-1, and iNOS expression.

We demonstrated that HDAC inhibitors (HDACi), trichostatin A (TSA) and sodium butyrate (NaBu), suppressed the IL-1 β -induced transcription and translation of COX-2 and iNOS, as well as the production of PGE₂ and NO in chondrocytes. The inhibitory effect of HDACi on transcription does not affect the binding activity of NF- κ B (*nuclear factor κ B*) to DNA. Treatment with TSA and NaBu also inhibited the IL-1 β -induced degradation of proteoglycan in cartilage explants.

We also showed that HDACi, TSA, NaBu and valproic acid (VA), suppressed IL-1-induced-mPGES-1 expression and the production of PGE₂ in synovial fibroblasts. Our data indicated that HDAC4 is involved in IL-1 β -induced expression of mPGES-1. HDAC4, through its deacetylase activity, up-regulated the transcriptional activity of Egr-1 (*early growth factor-1*), a principal transcription factor for the expression of mPGES-1.

From our studies we propose that HDAC inhibitors can be used in the treatment of OA.

Key Words: Osteoarthritis, chondrocyte, synovial fibroblasts, Il-1 β , COX-2, mPGES-1, PGE₂, iNOS, NO, inflammation, NF- κ B, Egr-1, HDAC, HDAC4, HDAC inhibitors.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xix
Remerciement.....	xx
Introduction	1
I. L'ostéoarthrose.....	1
I.1. Données générales sur l'ostéoarthrose (OA).....	1
I.2. Structure et physiologie d'une articulation normale du genou	3
I.2.1. Le cartilage articulaire.....	4
I.2.1.1. Composition et morphologie.....	5
I.2.1.1.1. Les chondrocytes.....	5
I.2.1.1.2. La matrice extracellulaire.....	5
I.2.1.2. Physiologie.....	8
I.2.1.2.1. Nutrition du cartilage	8
I.2.1.2.2. Homéostasie du cartilage : anabolisme et catabolisme	8
I.2.2. La membrane synoviale et le liquide synovial	9
I.2.2.1. La membrane synoviale	9
I.2.2.1.1. Structure	9
I.2.2.1.2. Composition	10
I.2.2.1.2.1. Les synoviocytes de type A.....	10
I.2.2.1.2.2. Les synoviocytes de type B.....	10
I.2.2.2. Le liquide synovial.....	11
I.3. Physiopathologie de l'OA	11
I.3.1. Histopathologie de l'articulation arthrosique.....	11

I.3.1.1. Lésions cartilagineuses.....	11
I.3.1.2. L'inflammation synoviale	12
I.3.1.3. Formation d'ostéophytes et sclérose de l'os sous-chondral	13
I.3.2. Rôle de l'inflammation dans l'OA	14
I.3.3. La prostaglandine E ₂ (PGE ₂) et l'oxyde nitrique (NO) dans l'OA	19
I.4. Traitement de l'OA	22
II. Biologie de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), de la prostaglandine E synthétase microsomale-1 (mPGES-1) et de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS).....	24
II.1. La COX-2	24
II.1.1. Fonctions générales des COX.....	24
II.1.2. Caractéristiques biochimiques et moléculaires de la COX-2	27
II.1.3. Régulation de la COX-2.....	28
II.1.3.1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la COX-2	28
II.1.3.2. Régulation au niveau transcriptionnel	30
II.1.3.3. Régulation au niveau post-transcriptionnel	30
II.1.3.4. Régulation au niveau post-traductionnel	31
II.1.4. COX-2 et OA.....	32
II.2. La mPGES-1	33
II.2.1. Fonctions générales des PGES	33
II.2.2. Caractéristiques biochimiques et moléculaires de la mPGES-1	38
II.2.3. Régulation de la mPGES-1	38
II.2.3.1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la mPGES-1	38
II.2.3.2. Régulation au niveau transcriptionnel	38
II.2.3.1. Régulation par la PGE ₂	39
II.2.4. mPGES-1 et OA.....	40
II.3. La iNOS	42
II.3.1. Fonctions générales de la iNOS.....	42
II.3.2. Caractéristiques biochimiques et moléculaires de la iNOS	45
II.3.3. Régulation de la iNOS	45

II.3.3.1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la iNOS	45
II.3.3.2. Régulation au niveau transcriptionnel	45
II.3.3.3. Régulation au niveau post-transcriptionnel	47
II.3.3.4. Régulation au niveau post-traductionnel	47
II.3.4. iNOS et OA.....	488
III. Les histones déacétylases (HDAC) et leurs inhibiteurs (iHDAC)	49
III.1. La chromatine et le nucléosome	49
III.2. Épigenétique et code histone	50
III.3. L'acétylation et la déacétylation des histones	52
III.4. Les histone déacétylases (HDAC).....	55
III.4.1. Classification des HDAC	55
III.4.2. Les complexes à activité HDAC	58
III.4.3. Régulation de l'activité des HDAC	59
III.4.4. Les cibles non histones des HDAC	60
III.4.5. Fonctions biologiques des HDAC et pathologies.....	62
III.4.5.1. Fonctions/pathologies des HDAC de classe I	63
III.4.5.2. Fonctions/pathologies des HDAC de classe II	64
III.4.6. Régulation de l'expression des gènes de la COX-2 et iNOS par les HAT/HDAC	65
III.5. Les inhibiteurs des histones déacétylases (iHDAC).....	66
III.5.1. Classification des iHDAC	66
III.5.2. Propriétés générales des iHDAC	68
III.5.3. Mode d'action des iHDAC	69
III.5.4. Effets anti-inflammatoires des iHDAC	71
IV. Hypothèse de recherche.....	73
Articles	74
Article 1	74
Article 2	113
Discussion.....	158

Conclusion.....	181
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I Caractéristiques des différentes PGES	33
Tableau II Les sites d'acétylation sur les histones et leurs effets biologiques	55
Tableau III Acétylation des protéines non histones	61

Liste des figures

Introduction

Figure 1 Les structures articulaires affectées par l'ostéoarthrose (OA)	1
Figure 2 Shéma d'une articulation du genou	4
Figure 3 Structure du cartilage articulaire	7
Figure 4 Les médiateurs inflammatoires clés impliqués dans la pathogenèse de l'OA	19
Figure 5 Rôle de la PGE ₂ et du NO dans l'OA	22
Figure 6 Les Voies métaboliques de l'acide arachidonique	25
Figure 7 Cascade de signalisation conduisant à l'expression du gène de la COX-2 sous l'action de l'IL-1	29
Figure 8 Les éléments régulateurs au niveau du promoteur du gène de la COX-2 humaine	30
Figure 9 Couplage fonctionnel entre les PGES et les COX	35
Figure 10 Les fonctions physiopathologiques de la mPGES-1	37
Figure 11 Les éléments régulateurs au niveau du promoteur du gène de la m-PGES-1 humaine	39
Figure 12 La régulation positive de l'expression de la mPGES-1 par la PGE ₂ au niveau des chondrocytes	40
Figure 13 Biosynthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine	42
Figure 14 La chimie du NO produit par la iNOS et ses effets indirects.....	44
Figure 15 Les éléments régulateurs au niveau du promoteur du gène de la iNOS humaine	46
Figure 16 La chromatine et le nucléosome.....	49
Figure 17 Réaction d'acétylation/déacétylation des histones et conséquences sur l'état de la chromatine	53
Figure 18 Organisation en domaines des HDAC classiques de la levure à l'homme, et les modifications post-traductionnelles qui les affectent.....	58
Figure 19 Structures chimiques des principaux iHDAC employés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	67
Figure 20 Pharmacophore type des iHDAC	69
Figure 21 Les mécanismes d'action des iHDAC et les voies affectées.....	71

Figure 22 Action des iHDAC sur les gènes cibles selon l'hypothèse électrostatique et du code histone	174
Figure 23 Action des iHDAC sur les gènes anti-inflammatoires selon l'hypothèse électrostatique et du code histone	176
Figure 24 Action des iHDAC sur les protéines non histones	178

Article 1

Figure 1 HDAC inhibitors TSA and BA prevent IL-1-induced NO and PGE2 release from chondrocytes.....	106
Figure 2 TSA and BA suppress TNF- α and IL-17-induced NO and PGE ₂ production.....	107
Figure 3 TSA and BA decrease IL-1-induced iNOS and COX-2 protein expression.....	108
Figure 4 TSA and BA suppress TNF-a and IL-17-induced iNOS and COX-2 protein expression	109
Figure 5 TSA and BA decrease IL-1-induced iNOS and COX-2 mRNA expression.....	110
Figure 6 TSA and BA suppress IL-1-induced cartilage proteoglycan degradation	111
Figure 7 Effect of TSA and BA on DNA-binding activity of NF-kB	112

Article 2

Figure 1 HDAC inhibition suppressed IL-1-induced mPGES-1 expression.....	150
Figure 2 TSA inhibited IL-1-induced mPGES-1 expression at the transcriptional Level	151
Figure 3 HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 promoter activation.....	152
Figure 4 HDAC4-mediated enhancement of IL-1-induced mPGES-1 promoter activation requires deacetylase activity	153
Figure 5 HDAC4 is required for IL-1-induced mPGES-1 expression	154
Figure 6 Effect of IL-1 on HDAC4 recruitment and histone acetylation at the mPGES-1 promoter	155
Figure 7 Effect of Egr-1 siRNA on IL-1-induced mPGES-1 expression in HSF.....	156
Figure 8 HDAC4 is required for Egr-1-mediated mPGES-1 promoter activation.....	157

Liste des abréviations

aa	Acides aminés
AA	Acide arachidonique
AASAL	Anti-arthrosiques symptomatiques à action lente
Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif
AGE	Advanced glycation-end products
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activating protein-1
AR	Arthrite rhumatoïde
ARE	Adenylate- and uridylate (AU)-rich elements
ASK1	Apoptosis signaling kinase 1
ATF-1	Activating transcriptional factor-1
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bone morphogenetic proteins
CA	Cartilage articulaire
Ca ²⁺	Calcium
C/EBP	CCAAT/enhance-binding protein
CD-RAP	Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein
CK2	Caséine kinase 2
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX-2	Cyclo-oxygénase-2
cPGES	Cytoplasmic prostaglandine E synthase
cPLA ₂	Cytosolic phospholipase A ₂
CRE	cAMP-response element
CYP450	Cytochrome P450
DMOAD	Disease modifying OA drugs
E2F1	E2 transcription factor 1

Egr-1	Early growth response gene-1
EP	E prostanoïd
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FDA	Food and Drug Administration
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FLAP	5-lipoxygenase-activating protein
GADD45 β	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 45 beta
GAG	Glycoaminoglycans
GSH	Glutathion
GvHD	Graft versus Host Disease
HAT	Acétyltransférases
Hda1	Histone deacetylase 1
HDAC	Histones déacétylases
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 alpha
Hur	Hu antigen R
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%
ICE	IL-1-converting enzyme
iDAC	Inhibiteurs des déacétylases
IGF-1	Insulin growth factor
iHDAC	Inhibiteurs des HDAC
I κ B	Inhibitor of κ B
iKDAC	Inhibiteurs des lysine déacétylases
IL	Interleukine
IL-1Ra	IL-1 Receptor antagonist
iNOS	Inducible NOS
IRF-1	Interferon regulatory factor-1
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAK	Janus kinase
JNK	c-jun-N-terminal kinase

K	Lysine
KAT	Lysine acetyltransferases
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KDAC	Lysine deacetylases
KSRP	Kh-type splicing regulatory protein
LC ₄ S	Leukotriene C ₄ synthase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPEG	Membrane-associated protein involved in eicosanoid and glutathion metabolism
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MGST1-L1	Microsomal glutathione transferase-1-like-1
MMP	Matrix metalloproteinase
mPGES-1	Microsomal prostaglandine E synthase type 1
MRP4	Multidrug resistance protein 4
MS	Membrane synoviale
NAB-1	NGF1-A-binding proteins-1
NaBu	Sodium butyrate
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NCoR/SMRT	Nuclear receptor co-repressor/silencing mediator for retinoic acid and thyroid
NES	Nuclear export signal
NF-IL6	Nuclear factor for IL-6 transcription
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NLS	Nuclear localization signal
OA	Ostéoarthrose
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
OA-NOS	OA-affected NOS
pb	Paires de bases

PBA	Phénylbutyrate
PDAC	Protéine déacetylases
PCAF	p300/CBP-associated factor
Pg	Protéoglycanes
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGES	Prostaglandine E synthases
PM	Poids moléculaire
PMA	Phorbol myristate acetate
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTGS	Prostaglandin-endoperoxide synthase
PTM	Post-translational modifications
PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1B
Rb	Retinoblastoma protein
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RNA-BP	RNA-binding proteins
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Rpd3	Reduced potassium dependency 3
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acide
SAPK	Stress-activated protein kinase
Sir2	Silent information regulator 2
siRNA	Small interfering RNA
Sirtuines	Sir two ("tu")-like protein
Smad3	Small mothers against decapentaplegic deleted in pancreatic carcinoma 3
SNO	S-nitrosothiols
Sox-9	Sry (sex determining region y) box 9
Sp1	Specificity protein-1
STAT-1 α	Signal transducer and activator of transcription-1 α

$t_{1/2}$	Temps de demi-vie
TBP-2	Trx binding protein-2
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th1	T-helper 1
TIMP	Tissus inhibitors of metalloproteinases
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TPX	Trapoxine
Trx	Thioredoxin
TSA	Trichostatine A
TTP	Tristitraprolin
USE	Upstream sequence elements
UTR	Untranslated region
VA	Acide valproïque
Wnt	Wingless integration site
ZnF-UBP	Zinc-finger ubiquitin binding domain
15-dPGJ ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂

A ma mère, A mon père,

A ma femme ainsi que toute sa famille,

*A ma sœur, mon frère Akli et tous mes autres frères et leur
famille,*

A la mémoire de mon oncle,

A mes grands parents,

*A tous mes cousins et cousines et leur famille
à Montréal et ailleurs,*

A tous mes amis.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Hassan Fahmi, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa disponibilité, ses conseils, son enthousiasme pour la recherche scientifique et pour son esprit scientifique.

Je remercie aussi mon co-directeur de recherche, le Dr mohamed Benderdour, pour ses conseils et sa disponibilité.

Mes remerciements vont également aux directeurs de l'Unité de Recherche en Arthrose, les professeurs Johanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Pelletier, pour leur accueil à l'unité et pour leur disponibilité malgré leur emploi du temps chargé.

Je remercie aussi les autres membres de jury de ma thèse, Dr René Cardinal, Dr Sylvain Bourgoin et Dr Muhammad Zafarullah pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Dr Fahmi : Nadia, Fatima, Sarah, Edouard et spécifiquement Hassan Afif.

Je voudrais remercier aussi tous le personnel de l'URA, en particulier le Dr Lajeunesse pour ses conseils, David Hum et François Mineau pour leur aide technique, ainsi que les secrétaires pour leur gentillesse et disponibilité.

Un grand merci pour ma femme pour sa contribution directe et indirecte dans ce travail.

Enfin, je tiens à remercier le FRSQ et MENTOR/IRSC pour l'aide financière qu'ils m'ont accordé au cours de ma formation.

Introduction

I. L'ostéoarthrose

I.1. Données générales sur l'ostéoarthrose (OA)

L'arthrose ou ostéoarthrose (OA) est la forme la plus commune d'arthrite. Il s'agit d'une affection dégénérative du système musculo-squelettique qui affecte les articulations synoviales, avec une destruction progressive et la perte du cartilage articulaire. Outre le cartilage, d'autres structures articulaires sont également affectées par l'OA. Ainsi, on observe une formation d'excroissances osseuses ou ostéophytes en marge de l'articulation, un remodelage de l'os sous-chondral (sclérose et formation de géodes), une inflammation du tissu synovial, ainsi qu'une variété de changements dans les tissus périarticulaires (Altman, 2010) (**Figure 1**).

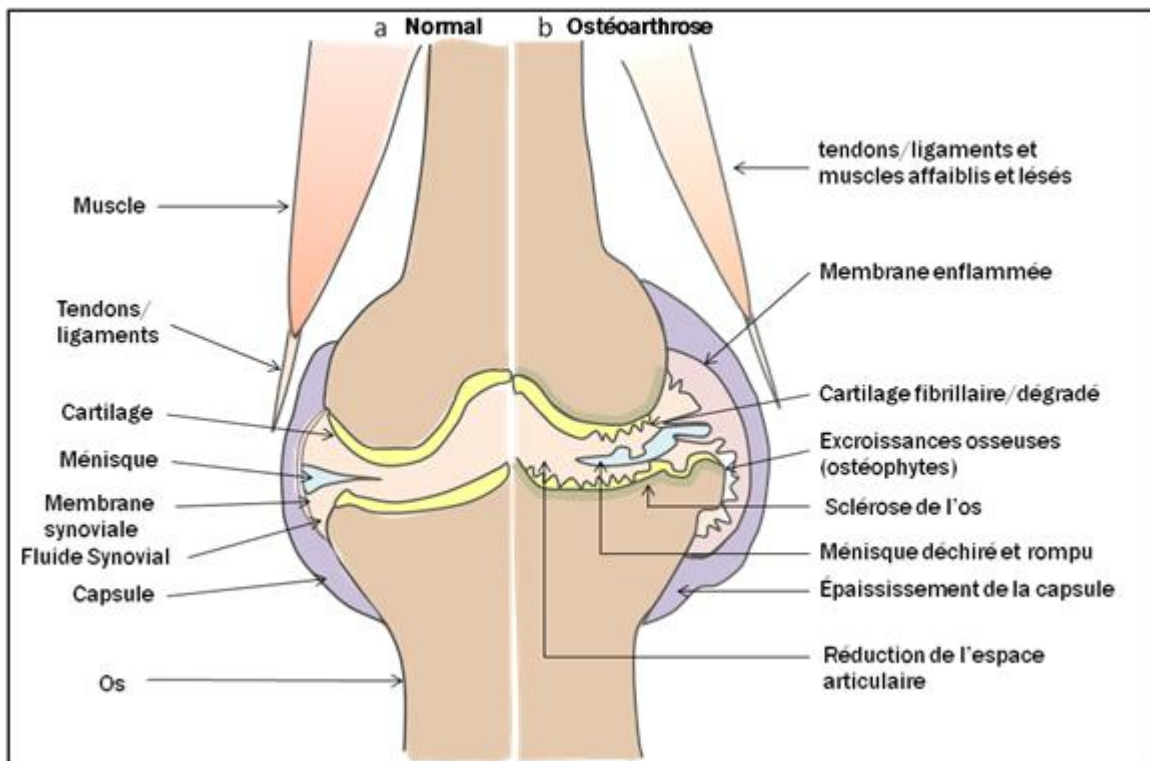


Figure 1 : Les structures articulaires affectées dans l'ostéoarthrose (OA). (a) articulation normale. (b) articulation OA. (Adaptée de Wieland, 2005).

L'OA est la plus fréquente des affections articulaires en Amérique du Nord. Pratiquement, 33% de tous les adultes (Felson et al., 1998) et plus de 60% des individus >75 ans (Busija et al., 2010) présentent des signes radiologiques d'OA. Au Canada, ~13% de la population est concernée par l'OA symptomatique (douleur la plupart de la journée + signes radiologiques), soit un Canadien sur 8 (4,4 millions). Ce nombre devrait augmenter à 10,4 millions (un Canadien sur quatre) d'ici 30 ans (Arthritis alliance of Canada, 2011).

La symptomatologie dominante de l'OA est la douleur. Celle-ci résulte de l'innervation des tissus articulaires autres que le cartilage, puisque ce dernier est aneuronal. Même si la majorité de ces structures ne sont pas observées dans la radiologie classique aux rayons X, la sévérité des changements radiologiques apparaît être reliée à l'intensité de la douleur (Felson, 2010). On observe également dans l'OA, une raideur articulaire avec gêne fonctionnelle et déformation des articulations (Das and Farooqi, 2008). L'enflure, la faiblesse musculaire et les craquements, sont d'autres symptômes qui caractérisent l'OA. Ils peuvent conduire à des changements de posture et une perte de mobilité (Wieland et al., 2005).

Le diagnostic de l'OA se fait grâce à des questions ciblées par le médecin et un examen physique des articulations. Pour confirmer le diagnostic, la radiographie simple reste la technique de référence, même si elle ne permet pas d'évaluer directement l'état du cartilage, puisque ce dernier n'est pas apparent (Kraus and Doherty, 2010). Les signes principaux qui sont détectés sur une radiologie standard regroupent le pincement articulaire, témoin d'une destruction du cartilage, l'apparition d'ostéophytes, le plus souvent en marge de l'articulation, et les réactions osseuses sous-chondrales de type sclérose et géode (Carillon, 2006). Aujourd'hui, des techniques plus avancées telles que l'arthroscanner, et surtout l'imagerie par résonance magnétique (IRM), sont utilisées soit pour confirmer le diagnostic en cas de doute, ou bien pour un examen détaillé des lésions (Cadet and Maheu, 2010).

L'OA est une affection multifactorielle où plusieurs facteurs peuvent influencer d'une manière directe ou indirecte son développement ainsi que sa progression. Les facteurs de risques peuvent être de nature systémique telle que l'âge, le sexe et l'origine ethnique (Berenbaume, 2001a). Le facteur génétique (Valdes and Spector, 2010), et les

facteurs environnementaux comme l'obésité (Blagojevic et al., 2010) et les contraintes mécaniques, peuvent aussi influencer le risque d'apparition de l'OA ainsi que son évolution durant les différents stades de la maladie. Les facteurs biomécaniques incluent les mauvais alignements osseux (Varus et Valgus), la réduction de la force musculaire, les chocs répétitifs tels que ceux subis dans les sports professionnels (soccer, course de fond) ainsi que les dommages acquis des tissus périarticulaires (déchirure de ménisque, rupture de ligament, etc) (Busija et al., 2010).

Enfin, l'impact socio-économique de l'OA est énorme. En effet, les personnes atteintes d'OA souffrent d'une diminution de la qualité de leur vie. D'autre part, en prenant en compte les coûts directs et indirects, le fardeau économique de l'OA au Canada est estimé en 2010 à 27.5 milliards \$. Le vieillissement de la population couplée à d'autres facteurs tels que l'augmentation de l'obésité et la diminution de l'activité physique suggèrent que les répercussions de l'OA seront encore plus importantes dans l'avenir (Arthritis alliance of Canada, 2011).

I.2. Structure et physiologie d'une articulation normale du genou

L'articulation du genou est de type synovial ou diarthrose. Le genou est composé des extrémités osseuses (ou épiphyses) du fémur et du tibia recouvertes par l'os sous-chondral et le cartilage. Les extrémités osseuses sont de formes différentes : 2 sphères accolantes (condyles) pour le fémur et un plateau tibial (**Figure 2**). Pour mieux articuler ces deux formes, et permettre la stabilité du genou et les principaux mouvements de flexion et d'extension, l'articulation est maintenue en contact par des structures de soutien : deux ménisques qui s'interposent entre les deux épiphyses, des haubans musculaires et tendons, et un appareil capsulo-ligamentaire. La capsule articulaire est un manchon fibreux qui enveloppe l'articulation. Elle est tapissée sur sa face interne par la membrane synoviale, et délimite une cavité close stérile où baigne le liquide synovial (ou synovie) (**Figure 1a**).

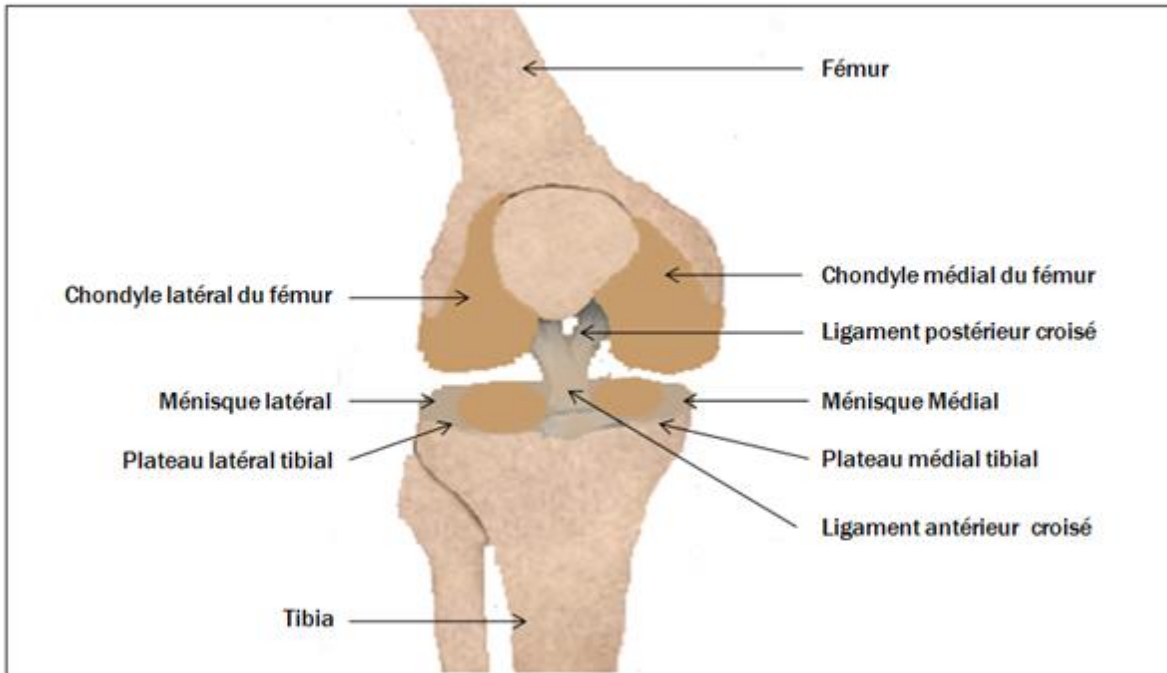


Figure 2 : Schéma d'une articulation du genou.

I.2.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire (CA) couvre les surfaces osseuses. Il s'agit d'un tissu conjonctif hautement spécialisé de type hyalin. Il est dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques, et de nerfs. Sa surface est blanche, un peu translucide, lisse et brillante. Son épaisseur varie en fonction de l'articulation : 6-7 mm pour le genou, 2 à 4 mm pour la hanche (Chevalier, 1998).

La fonction principale du CA est d'assurer l'absorption et la répartition des forces qui s'appliquent sur l'articulation, et de permettre les mouvements libres sans friction entre les os. Ces fonctions sont rendues possibles grâce à la composition et la structure de la matrice extracellulaire qui le compose. Cette dernière est synthétisée, mais aussi dégradée, par le seul type cellulaire qu'abrite le CA : le chondrocyte.

I.2.1.1. Composition et morphologie

I.2.1.1.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules sphériques ou ovoïdes mesurant entre 30-40 µm de diamètre, et qui n'entretiennent pas de contact entre-elles (Chevalier and Richette, 2005). Elles représentent ~10% du volume total du CA. Chez l'adulte, les chondrocytes sont fortement différenciés et leur prolifération est quasiment nulle. Ceci implique que leur mort n'est pratiquement pas compensée par des divisions cellulaires (Corvol, 2000; Tebib, 2006). Toutefois, les chondrocytes sont des cellules métaboliquement très actives, avec un réticulum endoplasmique (RE) et un appareil de Golgi bien développés. Ils assurent la synthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) des protéoglycanes et des protéines collagéniques et non collagéniques de la matrice extracellulaire.

I.2.1.1.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) représente 20-35% du poids total du cartilage. Elle est composée d'une trame fibrillaire et d'une substance fondamentale intermédiaire hydratée et riche en complexes protéiques.

La trame fibrillaire forme 15-25% du poids total du CA. Elle est constituée de collagène en majorité de type II. Ce dernier est assemblé en faisceaux ou trousseaux de collagène, qui donnent au cartilage sa forme, et assure ses propriétés mécaniques de tension, de force, et de rigidité (Martel-Pelletier et al., 2008). Le reste du collagène, dit « mineur », est représenté entre autre par les types XI, IX, VI, et X. Le rôle de ces collagènes est de limiter le diamètre et la séparation des fibrilles de collagène de type II. Ils assurent également l'interaction entre le collagène de type II et les protéoglycanes (Johnston, 1997).

La substance fondamentale est responsable de l'élasticité du CA. Ceci est rendu possible grâce à sa forte teneur en eau (75%) et aux macromolécules qu'elle contient : les protéoglycanes (Pg). Ces derniers occupent 5-10% du poids total du CA (Martel-Pelletier et al., 2008). Ils sont formés de multiples monomères dits « aggrecanes » branchés d'une façon non covalente sur l'acide hyaluronique (ou hyaluronane) (Dudhia, 2005).

L'aggrecane représente à lui seul ~90% du poids total des Pg. Il s'agit d'une protéine axiale sur laquelle sont greffés de nombreux glycoaminoglycanes (GAG). Ces derniers sont de

grandes chaînes d'unités disaccharidiques de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate (Martel-Pelletier et al., 2008).

Un grand nombre de molécules d'aggrécane (plus de 300) se fixent ainsi sur l'acide hyaluronique pour former un superagrégat de très haut poids moléculaire (PM) (Dudhia, 2005). La fonction de ces agrégats est définie par leur richesse en charges négatives, qui attirent les cations, créant un appel d'eau qui augmente la pression osmotique à l'intérieur du cartilage, mettant en tension les fibrilles de collagène. La rétention rapide d'eau et son relargage, assimilés à une éponge, confèrent au CA sa propriété d'élasticité qui assure la fonction biomécanique d'amortissement des chocs (Knudson and Knudson, 2001; Roughley and Lee, 1994).

Il existe en plus de ces grands Pg, des formes plus petites non agrégeantes, formées d'une ou deux chaînes de GAG tels que la décorine et le biglycane. Ces protéines seraient impliquées dans l'organisation de la trame fibrillaire et la modulation de son métabolisme (Iozzo, 1999; Martel-Pelletier et al., 2008). La MEC contient également des glycoprotéines et des protéines non collagéniques. C'est le cas des molécules d'adhésion qui permettent les interactions cellules/matrice telles que l'anchorine, la chondronectine, les matrilines, et *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP). Il a été suggéré que ces molécules pourraient jouer un rôle de mécanorécepteur, transmettant des signaux de stress vers l'intérieur de la cellule (Chevalier and Richette, 2005).

Enfin, l'eau et les sels inorganiques forment la majeure partie du tissu cartilagineux (65-80% du poids total du cartilage). Sa teneur dépend de la couche du CA. Elle est maximale en superficie et diminue en allant vers la profondeur. Elle forme une sorte de gel qui soude les fibres de collagène et les Pg, ce qui permet de résister aux compressions mécaniques (Martel-Pelletier et al., 2008).

Le CA chez l'adulte est formé de quatre couches ou zones histologiques, différenciées selon l'organisation des chondrocytes, l'orientation des fibrilles de collagène, la quantité d'eau, et le type et la quantité des Pg présents (Buckwalter et al., 1994) : la couche superficielle ou tangentielle, la couche intermédiaire ou de transition, la couche profonde ou radiale et la couche calcifiée (**Figure 3**). Cette dernière couche est localisée immédiatement après une ligne de démarcation ou *tide-mark*, qui la sépare de la zone

profonde. Elle permet d'isoler, physiquement et mécaniquement, le cartilage de l'os sous-chondral, en formant une barrière vis-à-vis des vaisseaux de l'os (Chevalier and Richette, 2005).

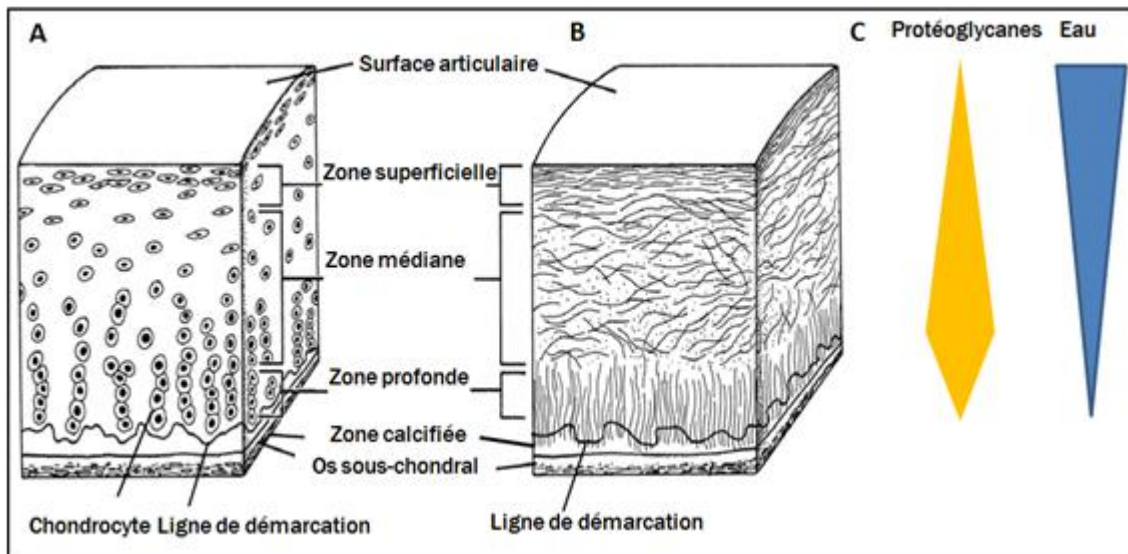


Figure 3 : Structure du cartilage articulaire. Quatre couches sont décrites dans le cartilage articulaire adulte. A- Organisation des chondrocytes de la couche superficielle (denses, plats et parallèles à la surface), intermédiaire (gros et arrondis) et profonde (groupés en colonne, orientés perpendiculairement à la surface). B- Orientation des fibres de collagènes de la zone superficielle (fines et tangentielles), intermédiaire (épaisses et enchevêtrées), et profonde (épaisses et perpendiculaires). C- Les changements des teneurs en eau et en Pg entre les différentes couches sont également schématisés. (Adaptée de Buckwalter, 1994).

Dans chacune des couches cartilagineuses, la MEC est distribuée en trois régions par rapport à sa proximité du chondrocyte (Heinegard and Saxne, 2011). La zone péri-cellulaire est de pH acide et est pauvre en collagène fibrillaire. Elle forme avec les cellules une unité fonctionnelle appelée « chondron ». La zone territoriale forme une capsule autour d'un ou plusieurs chondrocytes. Elle est riche en aggrecane et en microfibrille de collagène de type VI et peu ou pas de collagène fibrillaire (Thonar et al., 1999). Ces deux premières zones servent à protéger mécaniquement le chondrocyte et à lui

transmettre, via des récepteurs transmembranaires de la surface cellulaire (CD44, intégrines), les modifications physico-chimiques environnantes (Pollard et al., 2008). Enfin, la zone interterritoriale est de pH neutre et couvre la majeure partie de la MEC. Elle est métaboliquement inerte et son contenu est très élevé en fibres larges de collagène de type II et en aggrécane (Thonar et al., 1999).

I.2.1.2. Physiologie

I.2.1.2.1. Nutrition du cartilage

Chez l'adulte, le CA se nourrit presque exclusivement à partir du liquide synovial. Ce dernier reçoit ses nutriments des capillaires synoviaux. Le hyaluronane et certaines protéines sont produits par les synoviocytes (Sandell et al., 2007). Les molécules de petite taille et celles de taille intermédiaire peuvent traverser la MEC pour atteindre les chondrocytes, alors que les macromolécules en sont incapables (Chevalier, 1998).

L'os sous-chondral peut également participer dans la nutrition du cartilage (Madry et al., 2010). Sa principale fonction reste cependant l'absorption des contraintes mécaniques exercées sur l'articulation (jusqu'à 30%) (Imhof et al., 2000) et la congruence articulaire (Madry et al., 2010).

Les chondrocytes vivent dans un milieu hypoxique et tirent de ce fait leur énergie de la glycolyse anaérobie. Ainsi, la concentration en oxygène dans le CA varie de 10% en surface à 1% en profondeur. Le glucose est leur principale source d'énergie. Il sert surtout à la fabrication des GAG (Chevalier and Richette, 2005). Il a été rapporté, qu'au moins *in vitro*, les chondrocytes s'adaptent aux faibles tensions d'oxygène en surexprimant HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 alpha*). Ce facteur est capable de stimuler l'expression des transporteurs de glucose (Mobasheri et al., 2005), des facteurs angiogéniques (Lin et al., 2004), ainsi qu'un certain nombre de gènes associés à l'anabolisme du cartilage tels que Sox-9 (*sry (sex determining region y) box 9*) et à la différenciation et la survie des chondrocytes tels que le facteur anti-apoptotique GADD45B (*growth arrest and DNA damage-inducible gene 45 beta*) (Ijiri et al., 2008; Robins et al., 2005).

I.2.1.2.2. Homéostasie du cartilage : anabolisme et catabolisme

Les propriétés biomécaniques du CA sont définies, d'une part, par la rigidité de la charpente fibrillaire collagénique, dont l'orientation tangentielle dans la couche

superficielle confère au cartilage sa résistance à la déformation (pressions horizontales et frottement) sur toute la surface articulaire (Sandell et al., 2007). D'autre part, elles sont définies aussi par la grande quantité en Pg, fortement hydraté dans les couches intermédiaire et profonde. Le cartilage devient de ce fait élastique, ce qui est important dans l'amortissement des chocs et la résistance à l'écrasement (pressions verticales) (Chevalier and Richette, 2005). Par ailleurs, l'acide hyaluronique, joue le rôle de lubrificateur à la surface cartilagineuse. Son coefficient de friction très bas, assure un glissement sans frottement des surfaces articulaires (Smikin and Gardner, 2008).

Dans un CA normal, les chondrocytes s'adaptent aux changements de l'environnement mécanique et biochimique en ajustant le degré de synthèse et de dégradation des macromolécules dans le but de maintenir une homéostasie du cartilage (Pollard et al., 2008). Ceci est assuré par des enzymes anaboliques et cataboliques secrétées par les chondrocytes, et régulées par des cytokines et des facteurs de croissance (Martel-Pelletier et al., 2008).

I.2.2. La membrane synoviale et le liquide synovial

I.2.2.1. La membrane synoviale

La membrane synoviale (MS) délimite la cavité articulaire. Elle assure la fonction mécanique de lubrification et la nutrition du cartilage, via le liquide synovial qu'elle sécrète. Elle permet également le contrôle du volume synovial et l'élimination des métabolites et des produits de dégradation de la MEC de la cavité articulaire (Smith and Walker, 2008). La présence d'un réseau de capillaires apporte à la MS les nutriments nécessaires pour nourrir le cartilage, et lui permet de réagir et de contribuer à la réparation tissulaire en cas d'inflammation ou d'infection (Goldring and Goldring, 2005).

I.2.2.1.1. Structure

La MS est un tissu conjonctif lâche formé de deux couches : l'une intimale ou bordante (*lining region, synovial intima*), du côté de la cavité articulaire, et la seconde sous-intimale (*subintimal stroma*) en contact avec la capsule articulaire (Goldring and Goldring, 2005).

La couche intimale est composée d'une à trois assises de synoviocytes, ayant 20-40 µm d'épaisseur, baignant dans une MEC contenant de grande quantité d'acide hyaluronique (Garnero et al., 2000; Smith and Walker, 2008).

La couche sous-intimale est un tissu mésenchymateux hétérogène constitué essentiellement de MEC fibreuse et un petit nombre de cellules par rapport à la couche intimale. La majorité de ces cellules sont des fibroblastes et des macrophages, bien qu'on peut trouver également des adipocytes et occasionnellement des mastocytes (Smith and Walker, 2008). Cette couche contient en outre, des terminaisons nerveuses libres, et est riche en capillaires, en artérioles et en vaisseaux lymphatiques. Ce réseau vasculaire permet d'avoir un flux sanguin suffisant pour : 1) l'échange de soluté et de gaz avec le tissu synovial lui-même, 2) la génération du liquide synovial, important pour la nutrition du cartilage, 3) le recrutement de cellules et de substances en cas de stress ou d'inflammation, et enfin 4) la régulation de la température articulaire (Goldring and Goldring, 2005).

I.2.2.1.2. Composition

Les deux principales cellules qu'abrite la couche intimale sont les synoviocytes de type A et les synoviocytes de type B.

I.2.2.1.2.1. Les synoviocytes de type A

Ces cellules représentent 20-30% des cellules de la couche intimale (Iwanaga et al., 2000). Ce nombre peut augmenter jusqu'à 80% en conditions pathologiques (Smith and Walker, 2008). Elles ressemblent aux macrophages, d'où le surnom de « macrophages synoviaux » (Nozawa-Inoue et al., 2003). Elles sont souvent sphériques, localisées à la surface de la MS, projetant à la face luminale des filopodes. Elles interviennent dans le nettoyage de l'articulation, en phagocytant et dégradant les débris cellulaires de la cavité articulaire (Schneider et al., 2007). Ces cellules participent également dans l'initiation des réponses immunes en conditions pathologiques (Iwanaga et al., 2000).

I.2.2.1.2.2. Les synoviocytes de type B

Ces cellules sont apparentées aux fibroblastes avec des fonctions sécrétoires, elles sont par conséquent appelées « *fibroblast-like cells* » ou « fibroblastes synoviaux ». Elles constituent 70-80% des cellules de la couche intimale (Nozawa-Inoue et al., 2003). Leur RE rugueux est bien développé, ce qui témoigne d'une synthèse protéique accrue. Ces

cellules sont en effet, capables de sécréter dans l'intima et la cavité articulaire l'acide hyaluronique et la lubricine (Goldring and Goldring, 2005).

I.2.2.2. Le liquide synovial

La fonction du liquide synovial est la nutrition et la lubrification de l'articulation. Il permet aussi l'évacuation des débris issus du CA (Goldring and Goldring, 2005). En dehors de l'acide hyaluronique, la majorité des protéines et des autres molécules qui le compose tels que le glucose, l'urée, l'oxygène et les électrolytes, dérivent des vaisseaux sanguins de la couche sous-intimale de la MS. Il s'agit en fait d'un ultra-filtrat de plasma dépourvu des protéines de haut PM. On y trouve également les produits de dégradation du cartilage (Iwanaga et al., 2000).

L'acide hyaluronique est un GAG non sulfaté formé d'une longue chaîne d'un polymère de disaccharides (8000-16000 unités/chaîne) qui a l'aspect d'un gel (Schneider et al., 2007). Son PM chez l'adulte est de $0.5 \cdot 10^6$ daltons, et sa concentration varie entre 0.1-5 mg/ml (Garnero et al., 2000). Ces hautes concentrations confèrent au cartilage son importante viscosité. Cette propriété permet le maintien d'un film de lubricine sur les surfaces articulaires, et assure de ce fait la lubrification du cartilage (Smith and Walker, 2008). Enfin, par sa présence à la surface de la couche intimale, l'acide hyaluronique joue le rôle de filtre sélectif qui empêche le retour du liquide synovial dans la membrane (Goldring and Goldring, 2005).

I.3. Physiopathologie de l'OA

I.3.1. Histopathologie de l'articulation arthrosique

De nombreux systèmes d'évaluation histopathologique de l'OA permettent de suivre les changements qui ont lieu dans l'articulation OA (Mankin et al., 1971; Pritzker et al., 2006).

I.3.1.1. Lésions cartilagineuses

Sur le plan histologique, le cartilage subit différentes modifications structurales tout au long de la progression de l'OA.

Les stades précoces de l'OA correspondent aux grades 1 à 3 selon l'échelle de mesure de *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) (Pritzker et al., 2006), et

sur le plan clinique à la douleur articulaire avec manifestations arthroscopiques de l'OA (absence de signes radiologiques) (Sellam and Berenbaum, 2010). Durant ces stades, il se produit un changement dans la composition du cartilage. C'est l'œdème cartilagineux ou ramollissement du cartilage (Berenbaum, 2008b). Il résulte de l'hyperhydratation du cartilage, notamment dans sa couche intermédiaire, qui le fait apparaître plus épais qu'un cartilage normal. Il aurait pour origine, d'une part le relâchement du réseau collagénique suite à des lésions dans le cartilage, démasquant les charges négatives des Pg, et d'autre part la synthèse excessive de Pg, du fait de la tentative de réparation des lésions par le chondrocyte. Ces deux processus créent un appel d'eau vers le cartilage et l'hyperhydratation qui s'en suit. Les Pg qui étaient emprisonnés dans le réseau cartilagineux vont alors fuir la MEC. Le cartilage devient de ce fait moins élastique et plus dépressible (Pollard et al., 2008).

La perte des Pg rend le réseau collagénique fragile, on le qualifie de fibrillaire. Ceci conduit à l'apparition de fissures cartilagineuses. Ces dernières sont dans un premier temps tangentes à l'os sous-chondral puis perpendiculaire (Berenbaum, 2008b; Madry et al., 2011).

Les chondrocytes durant ce stade se divisent et se regroupent en amas autour des fissures et à la surface. On assiste également à l'hypertrophie des chondrocytes, qui aboutit à une différenciation des chondrocytes en fibrochondrocytes et à la mort des chondrocytes par apoptose (Pollard et al., 2008).

Les stades tardifs de l'OA correspondent aux grades 4 à 6 selon l'échelle de mesure de l'OARSI (Pritzker et al., 2006), et cliniquement à la nécessité d'une arthroplastie (Sellam and Berenbaum, 2010). Durant ces stades, les fissures deviennent plus nombreuses et plus profondes, conduisant à l'ulcération et la perte de substances cartilagineuses dans la cavité synoviale. L'os sous-chondral est à la fin mis à nu, c'est l'éburnation. Il en résulte le pincement de l'interligne articulaire, signe typique de l'OA radiologique (Berenbaum, 2008b; Pritzker et al., 2006).

I.3.1.2. L'inflammation synoviale

L'inflammation synoviale est responsable de certains signes cliniques de l'OA tels que l'enflure (développement d'un pannus), l'épanchement (effusion du liquide synovial),

la douleur et occasionnellement la rougeur (Poole et al., 2007). Elle est observée dans plus de 50% des cas d'OA symptomatique (Ayrat et al., 2005; D'Agostino et al., 2005; Rollin et al., 2008). Certaines études ont rapporté également sa manifestation durant les stades précoces de l'OA (Benito et al., 2005; Fernandez-Madrid et al., 1995; Loeuille et al., 2005).

Les changements histopathologiques qui s'opèrent dans la synoviale incluent l'hypertrophie et l'hyperplasie synoviale, avec une augmentation du nombre de cellules dans la couche intimale, et une infiltration de la couche sous-intimale par des cellules mononuclées : lymphocytes T, B et surtout les macrophages (Benito et al., 2005; Pelletier et al., 2001). Contrairement à l'inflammation de la synoviale au cours de l'arthrite rhumatoïde (AR), celle observée durant l'OA n'est pas diffuse et reste confinée dans les zones entourant les lésions cartilagineuses (Ayrat et al., 2005). Des études par IRM ont montré qu'il existe une corrélation entre l'augmentation du volume synovial et l'apparition d'une synovite (Loeuille et al., 2005) ainsi qu'avec la sévérité de l'OA du genou et du pincement articulaire (Ayrat et al., 2005; Sellam and Berenbaum, 2010).

On observe également dans la membrane synoviale une néoangiogénèse détectée par la présence de facteur pro-angiogéniques (Haywood et al., 2003), qui peuvent affecter la progression de la maladie ainsi que l'apparition de la douleur.

Dans les stades tardifs de l'OA, on observe dans la majorité des cas d'OA, une fibrose de la capsule articulaire, qui est responsable de certaines symptômes cliniques, en particulier la raideur articulaire (Aigner et al., 2006).

I.3.1.3. Formation d'ostéophytes et sclérose de l'os sous-chondral

Plusieurs études ont démontré qu'un remodelage intense de l'os sous-chondral est associé à l'OA. Dans les stades précoces de l'OA, l'os sous-chondral est le siège d'une résorption osseuse (Kwan Tat et al., 2010). Durant la progression de l'OA et à ces stades avancés, la formation osseuse prédomine, avec l'épaississement des extrémités osseuses et l'apparition d'excroissances osseuses marginales ou ostéophytes, qui peuvent, en clinique, générer de la douleur et une réduction de l'amplitude des mouvements articulaires (Brandt et al., 1991; Kwan Tat et al., 2010). On observe également dans l'os sous-chondral, l'augmentation de la densité osseuse (sclérose), qui peut diminuer les capacités absorbantes aux chocs de l'articulation. Elle serait due à une augmentation de la formation d'os ostéoïde

plutôt qu'à une augmentation de la densité minérale de l'os (Kwan Tat et al., 2010; Li and Aspden, 1997). Dans certaines OA, il peut aussi exister le développement de géodes (ou kystes) dans l'os sous-chondral et l'apparition d'un œdème dans l'os trabéculaire sous-chondral (Goldring, 2008). Enfin, à la jonction entre le cartilage et l'os sous-chondral se déroule une invasion de la vascularisation et l'avancement de la zone calcifiée du cartilage vers la ligne de démarcation, ce qui contribue au pincement de l'interligne articulaire (Goldring and Goldring, 2007).

I.3.2. Rôle de l'inflammation dans l'OA

Le premier mécanisme déclencheur de l'OA n'est pas connu. De même, jusqu'à aujourd'hui, on ne sait pas dans quel tissu articulaire débute l'OA (Martel-Pelletier and Pelletier, 2010). En effet, même si l'évènement central de l'OA est la dégradation du cartilage, celui-ci a lieu dans le joint articulaire où chaque structure assume une part plus ou moins importante du fonctionnement normal de l'articulation. Ceci amène à considérer aussi ces tissus (MS, os sous-chondral, ménisque, tendon, ligament et muscle) dans la genèse et/ou la progression de l'OA. Toutefois, les études de ces deux dernières décennies, soulignent le rôle prédominant, par rapport aux autres tissus, du cartilage (Martel-Pelletier et al., 2008), de la MS (Sellam and Berenbaum, 2010) et de l'os sous-chondral (Kwan Tat et al., 2010) dans la pathogenèse de l'OA.

La pathogenèse de l'OA résulte d'une boucle d'interaction et de rétrocontrôle entre des évènements mécaniques, biologiques, biochimiques, moléculaires et enzymatiques dans (et entre) le cartilage, la MS et l'os sous-chondral.

L'OA est une maladie du cartilage. En effet, l'OA est associée à une modulation phénotypique et métabolique au niveau des chondrocytes. Ces derniers répondent au stress qui s'exerce sur l'articulation en libérant des cytokines pro-inflammatoires et des protéases qui dégradent la matrice cartilagineuse. En réponse à ces dégradations, les chondrocytes augmentent leur anabolisme avec la synthèse de Pg (Lohmander et al., 1999) et de collagène (Nelson et al., 1998), et l'expression d'enzymes et de cytokines anti-cataboliques (interleukine (IL)-4, IL-10 et *IL-1 receptor antagonist* (IL-1Ra)) (Su et al., 1999). Cette synthèse est favorisée aussi par l'action des cytokines dites anaboliques tels que les facteurs de croissance *transforming growth factor β* (TGF- β), *bone morphogenetic proteins* (BMP),

fibroblast growth factor (FGF) et *insulin growth factor 1* (IGF-1) (Martel-Pelletier et al., 2008). Pour une raison encore mal comprise, les produits néosynthétisés sont anormaux et de moindre qualité. La synthèse du collagène de type II est ainsi réduite au dépend d'une synthèse plus importante de collagène de type I, III, VI et X, marqueurs des chondrocytes dédifférenciés et hypertrophiés (Aigner et al., 1993; Girkontaite et al., 1996; Swoboda et al., 1998). Les Pg néosynthétisés ressemblent à ceux du cartilage de croissance (immature) et possèdent des GAG plus courtes qui les rendent moins agrégeantes (Cs-Szabo et al., 1995; Vasan, 1980). De plus, le taux de Pg de petite taille est augmenté. Ces nouveaux composants de la MEC sont incapables de supporter les pressions mécaniques exercées sur l'articulation (Martel-Pelletier et al., 2008; Sandell et al., 2007). La tentative de réparation du chondrocyte échoue donc, et à un certain stade de l'évolution de l'OA, le catabolisme l'emporte sur l'anabolisme. Les chondrocytes perdent leur disposition initiale en colonne en faveur d'amas de clones (*clusters*), s'hypertrophient et finissent par s'épuiser et mourir par apoptose (Blanco et al., 1998; Lotz et al., 2010; Matsuo et al., 2001).

L'OA est aussi associée à une sécrétion accrue de cytokines, notamment de type pro-inflammatoire telles que l'IL-1 β , le *tumor necrosis factor α* (TNF- α), l'IL-6, l'IL-8, l'IL-17 et l'IL-18. Ces cytokines sont surexprimées par les chondrocytes mais aussi par les cellules de la synoviale, et sont retrouvées dans le liquide synovial. L'IL-1 β et le TNF- α sont les cytokines majoritaires impliquées dans la pathogenèse de l'OA (Kapoor et al., 2011). Au niveau des chondrocytes, ces cytokines stimulent le catabolisme en favorisant l'expression des protéases et d'autres molécules cataboliques (médiateurs lipidiques pro-inflammatoires dont la prostaglandine E₂ (PGE₂), et radicaux libres dont l'oxyde nitrique (NO)) (Goldring and Berenbaum, 2004). Elles diminuent, d'un autre côté, l'expression des inhibiteurs des protéases, et la synthèse des Pg et du collagène de type II et IX, au dépend des marqueurs des chondrocytes dédifférenciés (collagène de type I et III) (Goldring and Goldring, 2004). L'ensemble de ces effets altère l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme, en favorisant ce dernier, et contribue aux changements phénotypiques des chondrocytes. Le résultat final étant plus de dégradation de cartilage et de mort des chondrocytes (Goldring and Marcu, 2009).

Lors de l'OA, le chondrocyte surexprime également plusieurs familles de protéases de la MEC, qui sont responsables de la dégradation du cartilage : sérine protéases, thiol protéases (cathepsines), et surtout les métalloprotéases (Martel-Pelletier et al., 2008).

Les *matrix metalloproteinase* (MMP) agissent spécifiquement contre le collagène. La MMP-13 (collagénase 3) est la protéase qui joue le rôle central dans la dégradation de la MEC au cours de l'OA. Elle est surexprimée dans le cartilage OA et agit spécifiquement contre le collagène de type II (Bau et al., 2002; Billingham et al., 1997). Les principales autres MMP qui sont également surexprimées au cours de l'OA sont la MMP-1 (collagénase 1), la MMP-8 (collagénase 2), la MMP-2 (gélatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B). La MMP-3 (stromélysine 1) joue le rôle d'activateur des autres MMP, et son expression est élevée durant les phases précoces de l'OA (Martel-Pelletier et al., 2008).

Concernant la dégradation de l'aggrécane, elle implique aussi les MMP, mais après l'action des protéases *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif* (ADAMTS) (Pollard et al., 2008). Ces protéases, en particulier l'ADAMTS-4 (aggrécanease 1) et -5 (aggrécanease 2), sont surexprimées dans le cartilage OA (ADAMTS-5 > ADAMTS-4) (Bau et al., 2002). En dégradant les macromolécules d'aggrécane, elles conduisent aux pertes de Pg observées lors de l'OA (Malfait et al., 2002; Troeberg and Nagase, 2012).

Les MMP et ADAMTS sont inhibées par les *tissus inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) (TIMP-1 à -4) (Sandell et al., 2007), dont TIMP-3 apparaît jouer le rôle central du fait qu'elle peut inhiber les deux types de protéases (Troeberg and Nagase, 2012). Ces enzymes, sont surexprimées au cours des premières étapes de développement de l'OA où elles permettent un certain équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. Cependant, elles n'arrivent plus à assumer ce rôle lors des stades tardifs de l'OA où l'expression des protéases est excessive (Dean et al., 1989; Su et al., 1999).

L'OA est une maladie du tissu synovial également. Bien que le rôle de l'inflammation synoviale dans l'OA est toujours sujet à débat, de nombreuses études ont montré que plusieurs médiateurs pro-inflammatoires et cataboliques sont produits dans le tissu synovial. Historiquement, l'OA n'est pas classée comme une maladie arthritique inflammatoire, du fait du faible nombre de leucocytes dans le liquide synovial (<2000 cellules/mm³) (Goldring and Goldring, 2007; Krasnokutsky et al., 2008; Poole et al., 2007)

et de l'absence d'une manifestation systémique de l'inflammation (Vlad et al., 2011). Malgré ces données, il est reconnu aujourd'hui que l'OA est associée à un processus inflammatoire d'un certain degré, qui participe dans la pathogénèse de l'OA, et plusieurs manifestations cliniques de l'OA reflètent cette inflammation synoviale (Goldring and Otero, 2011; Sellam and Berenbaum, 2010). De plus, il a été rapporté qu'une synovite localisée près des sites de lésion de cartilage peut avoir lieu même en absence de signes cliniques de l'OA. Ainsi, le liquide synovial des patients avec l'OA précoce contient plus d'IL-1 β et de TNF- α que celui des patients avec l'OA tardive (Benito et al., 2005).

Le tissu synovial OA surexprime de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-1 β et le TNF- α , des chémokines (IL-8), des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire, et des protéases (MMP-1, MMP-3) (Furuzawa-Carballeda et al., 2008; Sellam and Berenbaum, 2010; Shibakawa et al., 2003; Smith et al., 1997). Il a été rapporté que les macrophages synoviaux CD14⁺ sont la source principale de la production de l'IL-1 β et de TNF- α . En effet, la déplétion de ces cellules dans une culture cellulaire de synoviocytes OA, réduit d'une manière importante la production de ces cytokines, ainsi que celles des cytokines et MMP produites souvent par les fibroblastes synoviaux (IL-6, IL-8, MMP-1 et MMP-3) (Bondeson et al., 2006). Par ailleurs, les fibroblastes synoviaux OA expriment fortement les récepteurs pour l'IL-1 β (Sadouk et al., 1995) et le TNF- α (Alaaeddine et al., 1997). Il semble donc que les macrophages synoviaux jouent un rôle important dans l'activation des fibroblastes synoviaux pour la production d'enzymes cataboliques et de cytokines qui entretiennent la réponse inflammatoire (Bondeson et al., 2010).

Le mécanisme déclencheur de l'activation des synoviocytes peut être, au moins pour l'OA tardive, les débris de la MEC résultant de la destruction mécanique ou enzymatique du cartilage et libérés dans le liquide synovial (Rosenthal, 2011). Les médiateurs produits vont agir d'une manière autocrine et paracrine au niveau de la synoviale mais aussi du cartilage, après leur libération dans le liquide synovial. Ils vont ainsi induire, au niveau des chondrocytes, la production de cytokines, de protéases, de la PGE₂, du NO et d'autres ROS (*reactive oxygen species*), qui sont déjà produits par le chondrocyte et sont fortement incriminés dans la mort des chondrocytes et la dégradation

de la MEC du cartilage (Krasnokutsky et al., 2008). Les produits de dégradation du cartilage générés vont à nouveau stimuler les cellules de la synoviale, et un cercle vicieux de rétrocontrôle se crée entre ces produits et l'inflammation synoviale, ce qui entretient le processus arthrosique (Sellam and Berenbaum, 2010) (**Figure 4**).

Les cellules du tissu synovial peuvent également agir sur d'autres tissus articulaires ou sur d'autres processus associés à l'OA. Elles peuvent ainsi stimuler l'angiogénèse. En général, l'inflammation et l'angiogénèse sont souvent liées, et ceci doit être aussi le cas dans l'articulation OA où l'inflammation facilite l'angiogénèse et cette dernière potentialise l'inflammation (Bonnet and Walsh, 2005). Elles sont aussi capables de produire des neuropeptides impliqués dans la douleur, et qui peuvent aussi induire l'inflammation, et la prolifération et l'activation des synoviocytes (Sutton et al., 2009). Enfin, elles peuvent stimuler, via la sécrétion des BMP, la formation des ostéophytes (van Lent et al., 2004).

L'OA est aussi une maladie de l'os sous-chondral. Les recherches de ces dernières années indiquent que l'os sous-chondral participe d'une manière active dans l'initiation et/ou la progression de l'OA, même si les médiateurs inflammatoires dérivant de ce tissu sont moins bien documentés par rapport à ceux provenant du cartilage ou de la synoviale (Kwan Tat et al., 2010). Sur le plan cellulaire et moléculaire, il se produit des modifications métaboliques dans les ostéoblastes qui aboutissent à des changements phénotypiques de ceux-ci. Ainsi, les ostéoblastes OA produisent plus de collagène de type I, mais la qualité de celui-ci est modifiée, ce qui ne lui permet pas d'assurer une minéralisation optimale de l'os sous-chondral, et aboutit à la sclérose de ce dernier (Couchourel et al., 2009). Les ostéoblastes produisent également plus de molécules pro-cataboliques comme MMP-1 et MMP-13, de cytokines pro-inflammatoires (IL-6), de la PGE₂, et des facteurs de croissance (IGF-1, TGF- β) (Martel-Pelletier et al., 2008). Ces molécules peuvent agir sur l'os lui-même, par exemple en induisant la formation d'ostéophytes (Krasnokutsky et al., 2007). Elles peuvent également agir sur les chondrocytes à travers des canaux, des microfissures, et le réseau vasculaire de l'os sous-chondral, qui rendent possible le transfert de signaux chimiques entre l'os sous-chondral et le cartilage (Lories and Luyten, 2011; Martel-Pelletier et al., 2008).

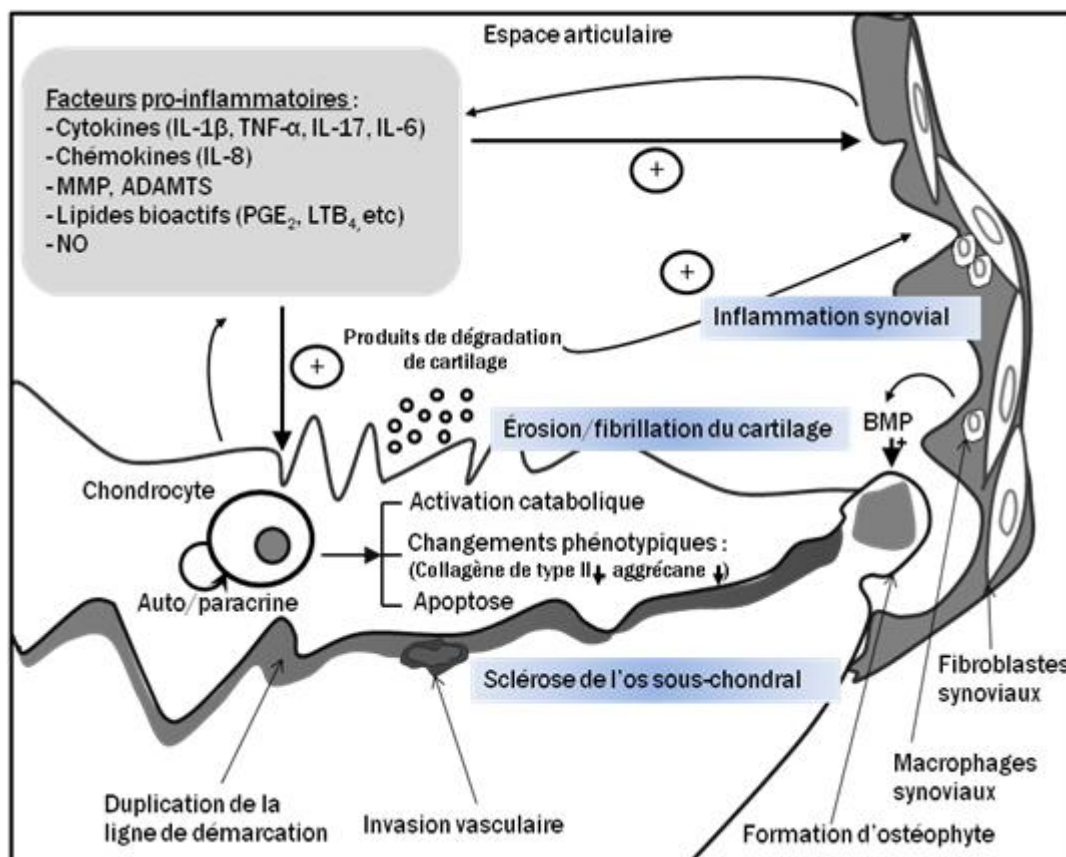


Figure 4 : Les médiateurs inflammatoires clés impliqués dans la pathogenèse de l'OA. LTB₄ : leucotriène B₄. (Adaptée de Goldring and Otero, 2011).

I.3.3. La prostaglandine E₂ (PGE₂) et l'oxyde nitrique (NO) dans l'OA

La PGE₂ est le prostanoloïde le plus abondant dans l'articulation des patients OA, où elle est synthétisée dans les chondrocytes et les synoviocytes sous l'action combinée de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et de la prostaglandine E synthétase microsomale-1 (mPGES-1) (Knott et al., 1994; Martel-Pelletier et al., 2003). Elle est considérée comme un des médiateurs cataboliques majeurs impliqués dans les lésions cartilagineuses (**Figure 5**). En effet, la PGE₂ stimule la résorption du cartilage en induisant la dégradation des composants de la MEC du cartilage à travers l'activation des MMP au niveau des chondrocytes (Bunning and Russell, 1989), des synoviocytes (Mehindate et al., 1995) et des explants de cartilage OA humains (Amin et al., 1997). La PGE₂ peut aussi agir sur l'anabolisme en

inhibant l'expression du gène de l'aggrécane au niveau des chondrocytes (Li et al., 2009). *In vitro*, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la COX-2, le célécoxib, supprime la dégradation du cartilage induite par les cytokines (Mastbergen et al., 2002) et augmente la synthèse des Pg dans les chondrocytes (de Boer et al., 2009; El Hajjaji et al., 2003; Mastbergen et al., 2005). Cet effet chondroprotecteur n'est cependant pas observé *in vivo* dans un modèle animal OA (Mastbergen et al., 2006) ainsi que chez l'homme (de Boer et al., 2010).

D'autres fonctions ont été attribuées à la PGE₂ dans l'OA :

- ✓ Elle présente des capacités pro-apoptotiques sur les chondrocytes, via des effets directs (Miwa et al., 2000) ou indirects à travers le NO produit par l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) (Notoya et al., 2000).

- ✓ Elle contribue à la néoangiogénèse par l'induction de la production de facteurs pro-angiogéniques, ce qui peut accentuer les réactions inflammatoires (Bonnet and Walsh, 2005; Martel-Pelletier et al., 2003).

- ✓ Elle participe grandement dans la douleur arthritique (Martel-Pelletier et al., 2003).

- ✓ Elle stimule l'expression de l'IL-1 β , amplifiant ainsi le processus inflammatoire local (Lorenz et al., 1995).

- ✓ Enfin, la PGE₂ est impliquée dans la déminéralisation osseuse à travers la stimulation de la formation des ostéoclastes (cellules qui dégradent l'os) (Lader and Flanagan, 1998).

En plus de la PGE₂, plusieurs données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le NO, produit par iNOS au niveau des chondrocytes, est fortement mis en jeu dans la pathogenèse de l'OA. En effet, le NO présente des capacités pro-inflammatoires, pro-cataboliques et pro-apoptotiques, avec comme résultat final la promotion de la dégradation du CA (**Figure 5**).

- ✓ Le NO amplifie le processus inflammatoire en induisant la production des cytokines pro-inflammatoires (McInnes et al., 1996), en réduisant la synthèse de l'IL-1Ra (Pelletier et al., 1996), en induisant l'expression de la COX-2 (Nedelec et al., 2001), et en augmentant la sensibilité à d'autres agents pro-oxydants (Clancy et al., 1997).

✓ Le NO peut favoriser les réponses cataboliques en stimulant l'expression et la production des MMP (Jarvinen et al., 2008; Murrell et al., 1995; Sasaki et al., 1998). D'un autre côté, le NO peut agir sur l'anabolisme à travers l'inhibition de la synthèse du TGF- β (Studer et al., 1999), du collagène de type II (Cao et al., 1997) et des Pg (Jarvinen et al., 1995; Taskiran et al., 1994). Le NO contribue en outre à la résistance contre les effets anaboliques de l'IGF-1 (Studer et al., 2000).

✓ L'action pro-apoptotique du NO a été rapportée dans de nombreux travaux. Ainsi, le NO peut induire l'apoptose des chondrocytes par lui-même ou en concert avec d'autres ROS (Clancy et al., 1997; Del Carlo and Loeser, 2002; Hashimoto et al., 1998). L'effet pro-apoptotique du NO peut être obtenu à travers son métabolite toxique, le peroxy-nitrite. Ce dernier est capable d'induire la nitration des tyrosines, ce qui peut affecter l'activité des protéines modifiées (Souza et al., 2008). Une étude immunohistochimique du cartilage OA a montré qu'une partie des sections fortement marquées à l'IL-1 β , le sont également pour les nitrotyrosines (Loeser et al., 2002b).

L'importance du NO au cours de l'OA est supportée également par des études *in vivo*. Dans un modèle animal OA chez le chien, l'inhibition sélective de l'activité de la iNOS diminue la progression des lésions cartilagineuses, avec réduction de l'activité métalloprotéasique au niveau du cartilage, et des taux de l'IL-1 β , de la PGE₂ et des nitrates/nitrites dans le liquide synovial (Pelletier et al., 1998). Dans le même modèle animal, une réduction est également observée pour l'expression des MMP dans le cartilage et de l'IL-1 β et la COX-2 dans la MS (Pelletier et al., 1999), pour l'apoptose des chondrocytes, possiblement via la réduction de l'expression de la caspase 3 (Pelletier et al., 2000), et de l'ICE (*IL-1-converting enzyme* ou caspase-1) et l'IL-18 dans le cartilage (Boileau et al., 2002). Dans un autre modèle animal OA, *Van den berg et al.* ont montré que les souris invalidées pour le gène de la iNOS présentent une diminution des lésions du cartilage et de la formation des ostéophytes (van den Berg et al., 1999). Par ailleurs, une réduction de la douleur dans un modèle animal OA chez le rat est obtenue dans le cadre d'un traitement prophylactique ciblant la iNOS (Castro et al., 2006).

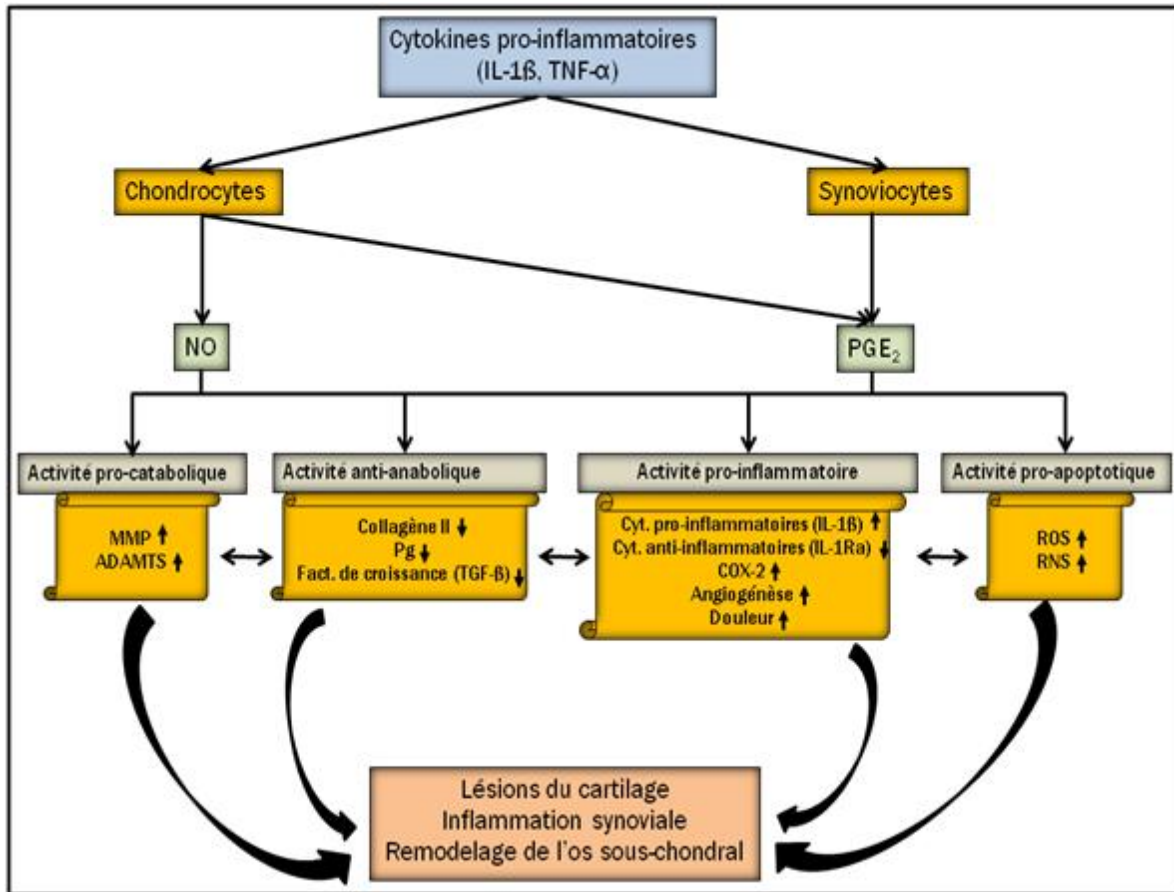


Figure 5 : Rôle de la PGE₂ et du NO dans l'OA.

I.4. Traitement de l'OA

Ces deux dernières décennies ont connu beaucoup d'efforts visant le traitement de l'OA, qui reste toujours une maladie incurable. Pour une meilleure utilisation des traitements existants, plusieurs organisations nationales et internationales (OARSI, ACR (*American College of Rheumatology*) et EULAR (*European League Against Rheumatism*)) ont permis de hiérarchiser ces traitements et ont émis des recommandations. Ces organisations préconisent une prise en charge globale et personnalisée de la maladie, avec la combinaison de traitements non pharmacologiques (éducation, lutte contre les facteurs de risque, rééducation, soutien psychologique et social, etc) et pharmacologiques, avant d'arriver au dernier recours qui est la chirurgie (arthroplastie) (Zhang et al., 2008a).

La thérapeutique médicamenteuse de l'OA peut être locale ou systémique, et à action rapide ou lente. Elle inclut le paracétamol, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) classiques ou spécifiques pour la COX-2 (coxibs), les analgésiques narcotiques ainsi que l'injection de stéroïdes et de l'acide hyaluronique. Ces traitements ont pour but de réduire la douleur et la raideur, et de maintenir la mobilité (fonction) de l'articulation (Zhang et al., 2008a). Ils sont cependant limités par leurs effets secondaires (ulcères digestifs, problèmes cardio-vasculaires et rénales, etc) et par l'absence d'effets sur la dégradation touchant le cartilage, c'est-à-dire sur l'évolution de la maladie (Richette, 2011). L'amélioration de la qualité de la vie et la préservation du capital cartilagineux, en ralentissant la progression de la maladie, sont en fait les objectifs à long terme de la thérapeutique arthrosique. Pour atteindre ces objectifs, des antiarthrosiques symptomatiques à action lente (AASAL), dont les plus connus sont la chondroïtine sulfate et la glucosamine sulfate, sont déjà employés. Ces produits ont cependant montré une capacité modeste à ralentir le pincement de l'interligne articulaire (Hunter and Hellio Le Graverand-Gastineau, 2009; Richette, 2011). D'autres agents de type DMOAD (*disease modifying OA drugs*) sont en cours d'essai clinique. Jusqu'à aujourd'hui, aucun traitement de fond de l'OA n'a été approuvé par les autorités réglementaires (Martel-Pelletier et al., 2011).

II. Biologie de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), de la prostaglandine E synthétase microsomale-1 (mPGES-1) et de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS)

II.1. La COX-2

II.1.1. Fonctions générales des COX

Les eicosanoïdes sont des composants lipidiques qui sont mis en jeu dans plusieurs fonctions physiologiques et physiopathologiques. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques dont la réaction inflammatoire, l'hyperalgésie et le cancer. Ils agissent en outre comme des médiateurs intercellulaires et des hormones locales dans la régulation de la reproduction, du tonus cardiovasculaire, de la fonction rénale, et du maintien de l'intégrité du tractus digestif.

Les eicosanoïdes dérivent d'acides gras insaturés dont le principal est l'acide arachidonique (AA). Celui-ci est libéré par hydrolyse enzymatique à partir des phospholipides membranaires sous l'action de phospholipases A₂, notamment le type cytosolique (cPLA₂) (Park et al., 2006). L'AA est ensuite converti en de nombreux métabolites oxydés selon plusieurs voies : cyclo-oxygénases ou *prostaglandin-endoperoxide synthase* (PTGS), lipoxygénases et cytochrome P450 (CYP450) (Smith et al., 2000) (**Figure 6**). Les eicosanoïdes générés ne sont pas stockés dans la cellule mais sont synthétisés de novo (Funk, 2001).

Les COX possèdent une activité cyclo-oxygénase qui convertit l'AA en PGG₂, en insérant deux molécules d'oxygènes, et une activité peroxydase qui réduit l'intermédiaire PGG₂ en PGH₂. Cette dernière diffuse à travers les membranes dans le cytoplasme où elle sera rapidement convertie par des isomérases en plusieurs types de prostanoïdes plus stables (**Figure 6**). Les prostanoïdes formés incluent les prostaglandines : PGE₂, PGF₂ et PGD₂; la prostacycline I₂ (PGI₂), et le thromboxane A₂ (TXA₂) (Smith et al., 2000). La production de ces composants est ubiquitaire, mais si l'on trouve l'ensemble des différents prostanoïdes au niveau par exemple du poumon et de la rate, on trouvera principalement du TXA₂ au niveau des plaquettes et de la PGI₂ au niveau des cellules endothéliales. Cette production dépend des synthétases qui sont exprimées sélectivement dans certains tissus ou

certain types cellulaires, et de la COX mise en jeu (cf. prochain paragraphe) (Dubois et al., 1998).

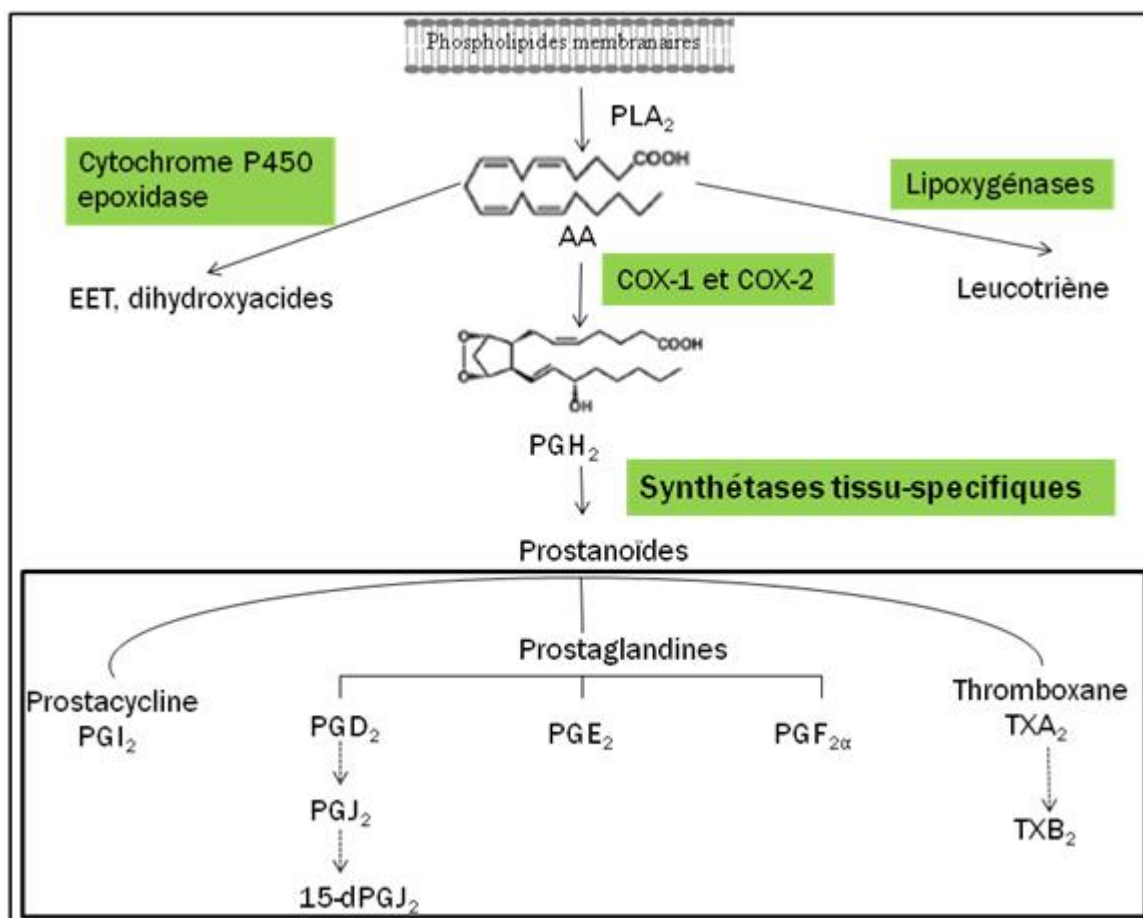


Figure 6 : Les Voies métaboliques de l'acide arachidonique. EET : epoxyeicosatrienoic; 15-dPGJ₂ : 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂.

Il existe au moins deux types de COX, codés par des gènes différents. La COX-1 (ou PTGS-1) est exprimée d'une façon constitutive et ubiquitaire, et est activée par les stimuli physiologiques. Elle est responsable d'effets nombreux et variés permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire, en particulier celle du rein et des vaisseaux ainsi que la cytoprotection gastrique (Morita, 2002). Il faut cependant noter que les souris dont le gène de la COX-1 a été invalidé ne présentent pas de pathologies gastriques et sont résistantes

aux ulcérations induites par l'indométacine, ce qui suggère que la suppression de la production des PG dérivant de la COX-1 n'est pas suffisante pour induire des ulcères gastriques (Langenbach et al., 1995; Loftin et al., 2002).

La COX-2 (ou PTGS-2) est le second type des COX. Elle est de nature inductible, notamment lors de la réponse inflammatoire où elle est responsable de la synthèse de la majorité des PG (Smith et al., 2000).

La COX-2 a été fortement incriminée dans les conditions pathologiques. Ceci est le cas des maladies dégénératives articulaires comme l'OA et l'AR (Martel-Pelletier et al., 2003), des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (Bartels and Leenders, 2010), et des maladies prolifératives comme le cancer (Rizzo, 2011). Dans certains modèles pathologiques comme celui de la colite ulcéreuse (Morteau et al., 2000) et des maladies respiratoires allergiques (Gavett et al., 1999), la COX-2 semble jouer un rôle anti-inflammatoire. Ce rôle est attribué, en moins en partie, à la production de prostanoides anti-inflammatoires comme les cyclopenténones (PGI₂ et 15d-PGJ₂) (Rajakariar et al., 2007), les lipoxines, les résolvines et les protectines (Serhan et al., 2008). En fait, les données actuelles suggèrent que la COX-2 possède une dualité fonctionnelle lors de l'inflammation, contribuant au départ au processus inflammatoire, et aidant à la fin à la résolution de celui-ci (Smyth et al., 2009). L'exemple de ce rôle est la fonction importante de la COX-2 dans la cicatrisation des lésions de la muqueuse digestive (Peskar, 2005).

Les COX ont une grande importance pharmacologique puisqu'elles sont la cible des AINS.

- ✓ Les AINS classiques se lient et inactivent le site actif de la COX-1 et la COX-2, ce qui bloque la synthèse des prostanoides (Yuan et al., 2009). Ils sont utilisés pour leurs activités antipyrétiques, analgésiques, anti-inflammatoires et antiagrégantes. L'inhibition de la COX-2 serait à l'origine de l'effet bénéfique des AINS classiques, alors que l'inhibition de la COX-1 serait responsable de leurs effets secondaires dont l'irritation de la muqueuse gastro-intestinale, potentiellement graves, notamment chez les sujets à risque (Patrono et al., 2001).

- ✓ Les AINS spécifiques de la COX-2 ou coxibs. Ces AINS permettent de réduire la

morbidité et les coûts liés aux traitements préventifs des effets iatrogènes imputables aux AINS classiques (Marnett, 2009). Bien que les coxibs entraînent moins de troubles digestifs, leur utilisation chronique a été associée à une augmentation des événements cardiovasculaires et cérébrovasculaires, en particulier chez les patients avec un risque élevé de thrombose. Ils sont de ce fait contre-indiqués chez les personnes souffrant de pathologies cardiaques (Marnett, 2009).

II.1.2. Caractéristiques biochimiques et moléculaires de la COX-2

Le gène de la COX-2 est situé sur le chromosome humain 1q25.2-q25.3 et montre 60% d'homologie avec celui de la COX-1 (Appleby et al., 1994; Tazawa et al., 1994). Il s'étend sur une longueur de 8.3 kb (kilobases) et contient 10 exons et 9 introns (Appleby et al., 1994). Le produit de transcription du gène de la COX-2 varie dans sa taille (2.8, 3.2 et 4.6 kb) en fonction de l'origine tissulaire et de la nature du stimulus (Appleby et al., 1994). Des variations supplémentaires peuvent être obtenues par épissage alternatif des ARNm (Roos and Simmons, 2005) ou par polymorphisme d'un seul nucléotide (Bi et al., 2010).

Le gène de la COX-2 code pour une protéine homodimérique avec une taille de 587 acides aminés (aa) sous sa forme mature (Smith et al., 2000). Chaque monomère peut subir une N-glycosylation et possède une masse moléculaire de ~70 kDa (kilodalton) (Otto et al., 1993). Le dimère COX-2 est localisé du côté luminal de la membrane du RE ainsi que de part et d'autre de l'enveloppe nucléaire où il est plus concentré (Morita et al., 1995). Des localisations dans la mitochondrie et dans les corps lipidiques au niveau des cellules tumorales ont également été rapportées (Accioly et al., 2008; Liou et al., 2005).

Il existe une différence majeure entre les structures de la COX-2 et la COX-1, et dont les conséquences biologiques et pharmacologiques sont importantes. En effet, le site actif de la COX-2 est ~20% plus large que celui de la COX-1 (Luong et al., 1996), ce qui explique que la COX-2 possède un plus grand nombre de substrats que la COX-1.

II.1.3. Régulation de la COX-2

II.1.3.1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la COX-2

Les différents stimuli qui induisent l'expression de la COX-2, agissent à travers des récepteurs membranaires qui peuvent être des récepteurs de type tyrosine kinase. Une fois liés, ces stimuli créent des modifications au niveau récepteur qui conduisent, via différentes voies de transduction de signal, à l'activation de facteurs de transcription. Il est difficile de connaître toutes les cascades de signalisation intracellulaire déclenchées pour tous les activateurs et sous toutes les conditions, mais celles qui concernent les agents pro-inflammatoires sont bien documentées. Elles mènent principalement, en fonction de la nature du stimulus et du type cellulaire, à l'activation de l'une des trois cascades MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) : ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), JNK/SAPK (*c-jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) ou p38, ainsi que de la voie NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) (Smith et al., 2000). Les facteurs de transcription activés NF- κ B et AP-1 (*activating protein-1*)/ATF (*activating transcriptional factor*) peuvent ensuite se lier sur leurs sites de fixation dans le promoteur du gène de la COX-2 et déclencher la transcription. La **figure 7** résume les événements moléculaires générés par la liaison de l'IL-1 jusqu'à l'expression de la COX-2.

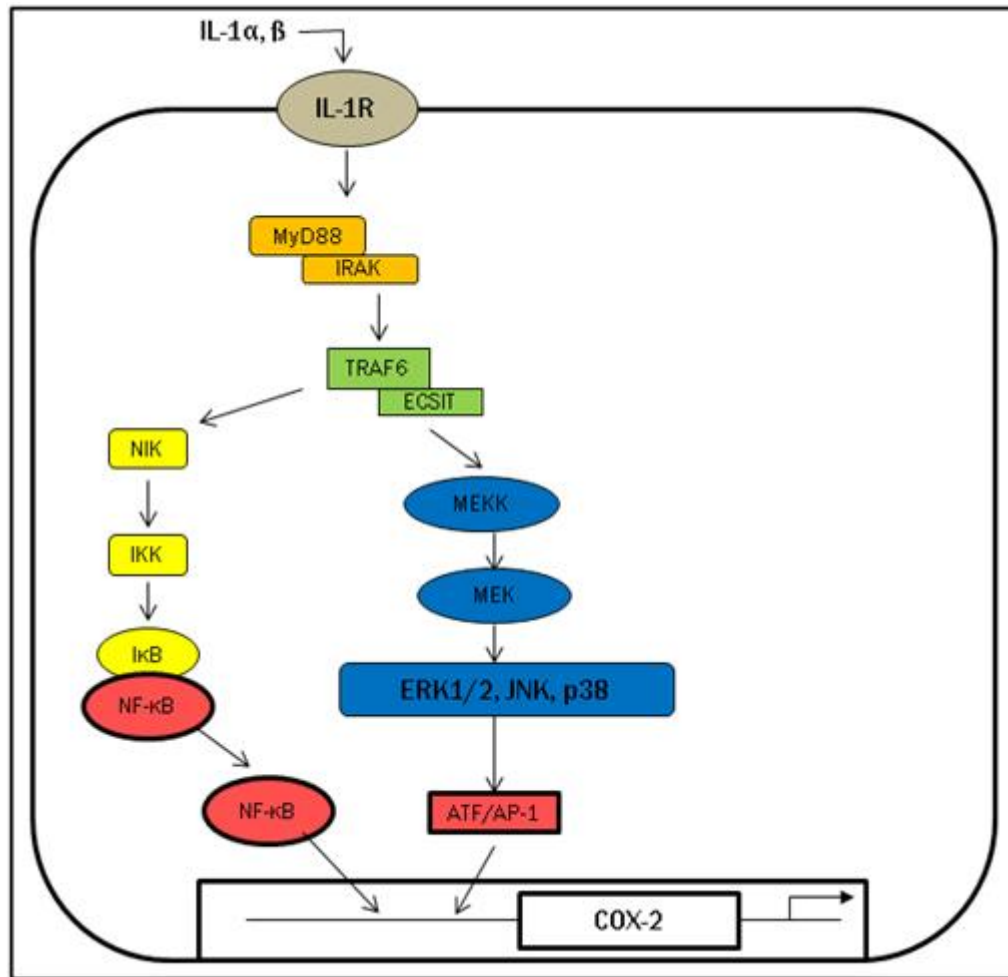


Figure 7 : Cascade de signalisation conduisant à l'expression du gène de la COX-2 sous l'action de l'IL-1. En présence de l'IL-1, l'adaptateur moléculaire MyD88 est activé et recrute à son tour deux serine thréonine kinases distinctes. L'une d'entre elles est IRAK, qui interagit avec une autre molécule adaptateur TRAF6, qui fait la liaison avec la deuxième kinase NIK. Cette dernière conduit au final à l'activation de NF-κB après celle de IKK, et phosphorylation par ce dernier complexe de IκB. La kinase ECSIT relie la signalisation IL-1 aux kinases MEKK, MEK, et MAPK (p38, ERK1/2 et JNK). MyD88 : *myeloid differentiation 88*; IRAK : *IL-1 receptor-activated kinase*; TRAF6 : *TNF-receptor-associated factor 6*; NIK : *NF-κB-inducing kinase*; IKK : *IκB kinase complex*; IκB : *inhibitor of NF-κB*; ECSIT : *evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways*; MEKK : MEK kinase; MEK : MAPK kinase.

II.1.3.2. Régulation au niveau transcriptionnel

Contrairement au promoteur de la COX-1, qui montre une homologie à ceux des gènes domestiques (*housekeeping gene*), l'analyse de la région 5'-UTR (*untranslated region*) de la COX-2 montre qu'elle est homologue à celles des gènes de réponse précoce (*immediate early gene*) puisque sa séquence contient une boîte TATA ainsi que d'autres éléments transcriptionnels qu'on trouve dans ce type de gène (Tazawa et al., 1994). Le promoteur de la COX-2 est truffé d'éléments régulateurs en cis, incluant deux sites CRE (*cAMP-response element*), C/EBP (*CCAAT/enhance-binding protein*), deux sites AP-1, deux sites NF- κ B et trois sites Sp1 (*specificity protein-1*) (Kraemer et al., 1992; Mitchell and Warner, 1999) (**Figure 8**). L'ensemble de ces sites rend la COX-2 sensible à des signaux intracellulaires initiés par des médiateurs inflammatoires, des facteurs de croissance et des hormones. L'expression de la COX-2 est activée par l'IL-1 β , le TNF- α et le lipopolysaccharide (LPS), alors qu'elle est inhibée en présence de glucocorticoïdes, d'IL-4 et d'IL-10. Ces derniers agissent en inhibant, entre autres, la voie NF- κ B (Kang et al., 2007; Tanabe and Tohrai, 2002).

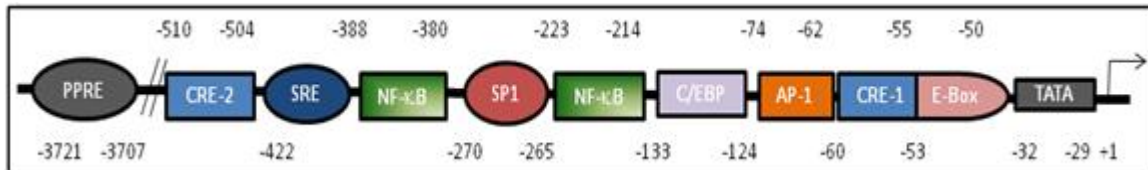


Figure 8 : Les éléments régulateurs au niveau du promoteur du gène de la COX-2 humaine. Les éléments en cis dans le promoteur de la COX-2 sont notés dans des boîtes colorées, et leur localisation par rapport au site d'initiation de la transcription est notée au dessus ou au dessous de chaque élément. (Adaptée de Kang et al., 2007).

II.1.3.3. Régulation au niveau post-transcriptionnel

La COX-2 est aussi régulée au niveau post-transcriptionnel. En effet, sa région non traduite 3'-UTR, d'une longueur de ~2.5 kb (Appleby et al., 1994), contient de multiples éléments régulateurs, ce qui laisse supposer son implication dans la régulation de la stabilité de l'ARNm et de l'efficacité de la traduction. Au niveau de cette région, plusieurs sites de

polyadénylation sont localisés. Il a été proposé que la spécificité de l'expression tissulaire détermine le choix du site de clivage (Hall-Pogar et al., 2005). La sélection de ces sites est favorisée également par la présence d'élément de séquence en amont USE (*upstream sequence elements*) ciblés par des *RNA-binding proteins* (RNA-BP) (Hall-Pogar et al., 2007).

Outre ces sites, la partie 3'-UTR contient une région riche en AU : ARE (*adenylate- and uridylate (AU)-rich elements*), composée de copies multiples de la séquence AUUUA réparties sur une longueur de plus de 2000 nucléotides. Chez les mammifères, les ARE permettent la dégradation de l'ARNm (*RNA decay*) souvent par le recrutement de l'exosome. Ce dernier reconnaît l'ARNm à travers des RNA-BP qui contrôlent la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de la traduction protéique (Eberhardt et al., 2007).

Enfin, il a été rapporté qu'au niveau des synoviocytes, la PGE₂ est capable de réguler sa propre synthèse en stabilisant l'ARNm de la COX-2, ceci grâce à l'activation de la voie p38 MAPK (Faour et al., 2001). Cette activation stimule le transfert vers le cytoplasme de la protéine stabilisant l'ARNm Hur (*Hu antigen R*), ce qui augmente la stabilité de l'ARNm de la COX-2 (Lin et al., 2011; Subbaramaiah et al., 2003).

II.1.3.4. Régulation au niveau post-traductionnel

La COX-2 possède un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de 2 à 7 h (Kang et al., 2007). Plusieurs études suggèrent que la dégradation de la COX-2 est programmée spécifiquement pour limiter la quantité de la COX-2 présente dans la cellule, qui lorsqu'elle est élevée, est associée à de nombreuses pathologies. Deux voies de dégradation protéique ont été décrites. La première voie fait intervenir le système ERAD (*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) (Kang et al., 2007). Alors que ce système agit souvent sur des protéines structurellement endommagées ou mal repliées, il agit sur la COX-2 sous son état natif (Rizzo, 2011). La deuxième voie de dégradation de la COX-2 correspond à l'inactivation suicide de son activité catalytique, qui s'opère *in vitro* et possiblement *in vivo*, et dont les mécanismes biochimiques et les significations biologiques ne sont pas encore connus (Mbonye et al., 2008).

II.1.4. COX-2 et OA

Il est admis aujourd'hui que la COX-2 est impliquée dans la pathogenèse des maladies arthritiques, en particulier l'OA. Comparée aux tissus normaux, l'expression de la COX-2 est augmentée dans la MS (Siegle et al., 1998) et le cartilage OA (Amin et al., 1997; Siegle et al., 1998). Dans la MS, la surexpression de la COX-2 est localisée au niveau de la couche intinale, sous-intinale et des vaisseaux sanguins.

Le cartilage OA libère spontanément 50 fois plus de PGE₂ que le cartilage normal, et 18 fois plus que le cartilage normal stimulé avec des cytokines et le LPS. De plus, la production de la PGE₂ est supprimée par les inhibiteurs de la synthèse protéique, ce qui implique que cette production est dépendante d'enzyme inductible (Amin et al., 1997). Enfin, la concentration de la PGE₂ est élevée dans le liquide synovial OA comparé à celui des sujets normaux (Li et al., 2009).

Au niveau cellulaire, aussi bien les chondrocytes que les fibroblastes synoviaux humains expriment la COX-2 et produisent la PGE₂ après induction par l'IL-1 β , l'IL-17, le TNF- α , ou le LPS (Martel-Pelletier et al., 2003). Au contraire, les cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-10 et IL-13, en agissant sur des voies de signalisation diverses, inhibent l'expression de la COX-2 (Alaaeddine et al., 1999; Alvarez-Soria et al., 2008; Fahmi et al., 2001).

II.2. La mPGES-1

II.2.1. Fonctions générales des PGES

La production de la PGE₂ nécessite en plus des PLA₂ et COX, un troisième type d'enzyme qui catalyse l'isomérisation de la PGH₂ : les *prostaglandine E synthases* (PGES). Jusqu'à aujourd'hui, trois types de ces enzymes ont été identifiés (**Tableau I**).

Tableau I : Caractéristiques des différentes PGES. KO : *knockout*. (Adapté de Hara, 2010; Park, 2006).

	mPGES-1	cPGES	mPGES-2
Localisation sur le génome (humain)	9q34.4	12q13.13	9q33-q34
Régulation transcriptionnelle	Inductible	Constitutive	Constitutive
Taille de l'ARNm	1.8, 2.4 ou 4.4 kb	1.9 kb	2 kb
PM des protéines	16 kDa	23 kDa	33 kDa
Composition en aa	152-153 aa	160 aa	377-384 aa
Localisation cellulaire	Membrane périnucléaire	Cytoplasme	Golgi, cytoplasme
Préférence pour l'isoenzyme	COX-2 > COX-1	COX-1 > COX-2	Pas de préférence
Distribution tissulaire	Prostate, testicule, placenta, glande mammaire, vessie, cartilage, tissu synovial, os, etc.	Ubiquitaire	Cerveau, cœur, rein, foie, muscle squelettique
Changements phénotypiques chez les souris KO	Réactions inflammatoires réduites, réduction de la douleur, suppression de la tumorigénèse, etc.	Mort périnatale avec défaut de développement de poumon, maturation retardée de la peau, retard dans la croissance	Absence de phénotype spécifique

La cPGES (*cytoplasmic PGES*) est fonctionnellement couplée à la COX-1, notamment durant la réponse immédiate de biosynthèse de la PGE₂ initiée par les stimuli qui déclenchent la libération de calcium (Ca²⁺) (**Figure 9**). La PGE₂ générée par la cPGES est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la protection gastro-

intestinale, la reproduction, le flux sanguin rénal, l'ostéogénèse, l'homéostasie pulmonaire, des fonctions immunitaires, et certaines fonctions neuronales qui conduisent à la douleur aiguë dans la périphérie et le système nerveux central (Hara et al., 2010; Samuelsson et al., 2007).

La PGE₂, après sa production, n'est pas stockée dans la cellule mais est métabolisée en quelques minutes par des enzymes cytoplasmiques (Tai et al., 2006). Elle est transportée activement via le transporteur MRP4 (*multidrug resistance protein 4*), ou diffuse à travers la membrane cytoplasmique (Park et al., 2006). La PGE₂ agit au niveau local d'une manière autocrine ou paracrine après sa liaison à des récepteurs EP (*E prostanoïd*), qui déterminent ses effets. Il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) localisés à la surface cellulaire. Ces récepteurs sont en nombre de quatre : EP1, EP2, EP3 et EP4 (Sugimoto and Narumiya, 2007).

Le second isoforme des PGES est mPGES-2 (*microsomal PGES type 2*). Des expériences de cotransfection ont montré que la mPGES-2 est impliquée dans la production de la PGE₂ lors des réponses immédiates et tardives, et peut fonctionnellement être couplée aussi bien à la COX-1 qu'à la COX-2 (**Figure 9**). La mPGES-2 peut donc intervenir dans la production de la PGE₂ dans les conditions physiologiques et pathologiques (Murakami et al., 2003). Récemment, une étude a montré que les souris invalidées pour le gène de la mPGES-2 ne montrent pas de phénotype spécifique et ne présentent pas d'altération de la production de la PGE₂ dans plusieurs tissus, incluant ceux dans lesquels la mPGES-2 est préférentiellement exprimée, ainsi que dans les macrophages stimulés avec le LPS (Jania et al., 2009).

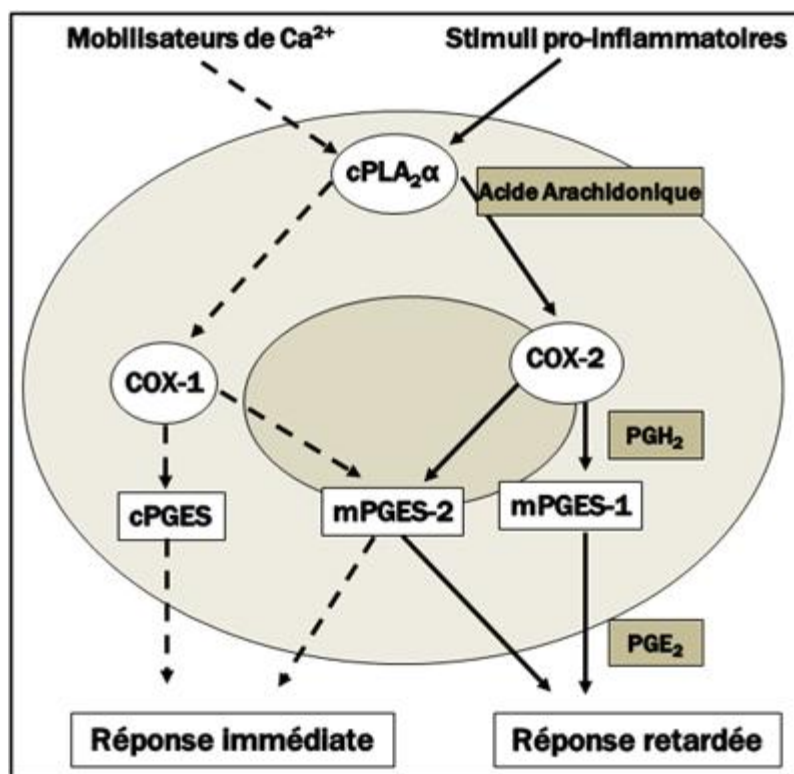


Figure 9 : Couplage fonctionnel entre les PGES et les COX. (Adaptée de Hara, 2010).

La mPGES-1 (*microsomal PGES type 1*), l'objectif de cette partie, est la première PGES qui a été identifiée par Jakobsson *et al.* en 1999 (Jakobsson *et al.*, 1999b). Elle se nommait autrefois *microsomal glutathione transferase-1-like-1* (MGST1-L1). Elle est de type inducible et appartient à la superfamille des *membrane-associated protein involved in eicosanoid and glutathione metabolism* (MAPEG). Ce groupe d'enzymes inclut également les MGST1 à 3 avec le type 1 qui est le mieux caractérisé, la LTC₄S (*leukotriene C₄ synthase*) et la FLAP (*5-lipoxygenase-activating protein*) (Jakobsson *et al.*, 1999a). Ces enzymes interviennent dans le métabolisme lipidique et la détoxification des substances exogènes (Naraba *et al.*, 2002). Au niveau cellulaire, la mPGES-1 est localisée dans la membrane périmoléculaire et du RE, et est séparée dans la fraction microsomique lors d'un fractionnement cellulaire (Jakobsson *et al.*, 1999b; Ouellet *et al.*, 2002). La réaction catalysée par la mPGES-1 nécessite le glutathion (GSH) comme cofacteur, comme pour la cPGES (Jakobsson *et al.*, 1999b).

La mPGES-1 est induite par les stimuli qui induisent aussi l'expression de la COX-2 tels que les cytokines, les facteurs de croissance, le LPS et les promoteurs tumoraux. D'un autre côté, lorsque les enzymes COX-2 et mPGES-1 sont cotransfectées dans les cellules HEK293, des quantités considérables de PGE₂ sont produites à partir d'AA exogène et endogène, comparativement aux cellules transfectées uniquement avec une seule des deux enzymes (Murakami et al., 2000). Dans une autre étude, l'inactivation du gène de la mPGES-1 par des oligonucléotides antisens ou par siRNA (*small interfering RNA*), diminue la production de la PGE₂ médiée par la COX-2 (Sweeney et al., 2003). La mPGES-1 et la COX-2 sont aussi coexprimées dans différentes maladies et conditions pathologiques. Ces données suggèrent que la mPGES-1 est fonctionnellement couplée d'une façon marquée à la COX-2 pour la production tardive de la PGE₂ (**Figure 9**).

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le couplage mPGES-1/COX-2. L'une d'elle repose sur le fait que la COX-2 et la m-PGES-1 colocalisent au niveau du RE et de la membrane périnucléaire. Cependant, dans les expériences de transfection (Murakami et al., 2000), les trois enzymes mPGES-1, COX-2 et COX-1 colocalisent au niveau périnucléaire. Une autre explication possible est la proximité physique entre la mPGES-1 et la COX-2 dans des microdomaines, ce qui permet un transfère plus efficace de la PGH₂ entre les deux enzymes (Ackerman et al., 2005).

La mPGES-1 est impliquée dans de nombreuses pathologies liées à l'inflammation, la douleur et la fièvre (**Figure 10**). Ainsi, les souris invalidées pour le gène de la mPGES-1, comparativement aux souris sauvages, présentent une réduction de la sévérité pathologique (réduction des dommages tissulaires, des cytokines pro-inflammatoires et de la douleur) dans des modèles d'AR (Kamei et al., 2004; Trebino et al., 2003) et de sclérose en plaques (Kihara et al., 2009). La PGE₂ produite par la mPGES-1 participe aussi dans la perte osseuse associée à l'inflammation induite par le LPS (Inada et al., 2006). Son absence retarde, par contre, la guérison des fractures lors de désordres squelettiques induits chez les animaux (Yamakawa et al., 2008).

D'autres fonctions ont été attribuées à la mPGES-1 dans la douleur nociceptive (Kamei et al., 2004) et neuropathique (Trebino et al., 2003) ainsi que dans la fièvre (Engblom et al., 2003).

La mPGES-1 constitue donc une cible thérapeutique de choix pouvant conduire à des effets anti-inflammatoire, anti-pyrétique et analgésique. De plus, le ciblage de la mPGES-1 n'est pas associé à une cardiotoxicité, liée à l'inhibition de la production de la PGI₂. En effet, dans un modèle animal de diète salée, la perte de la mPGES-1 conduit à une réduction de la production de la PGE₂, une augmentation du niveau de la PGI₂, sans altération de la synthèse de TXA₂, de la thrombogénèse et de la pression sanguine (Cheng et al., 2006). De même, dans un modèle animal d'athérosclérose, la délétion du gène de la mPGES-1 retarde l'apparition de la pathologie, en parallèle avec une réduction de la synthèse de la PGE₂, et une augmentation de la production de la PGI₂ (Wang et al., 2006). L'un des produits dirigés spécifiquement contre la mPGES-1 est MF63. Ce produit inhibe la mPGES-1 avec une forte puissance (IC₅₀ (*inhibitory concentration 50%*) de 1.3 nM) et un haut degré de sélectivité (>1000 fois) par rapport à d'autres prostanoides. Il supprime la douleur et la chaleur dans un modèle inflammatoire préclinique, avec absence de toxicité gastro-intestinale (Xu et al., 2008). Toutefois, certaines études ont rapporté que la mPGES-1 pourrait jouer un rôle homéostatique dans le rein, l'intestin et les poumons, et peut-être aussi dans le cœur (Brenneis et al., 2011) (**Figure 10**).

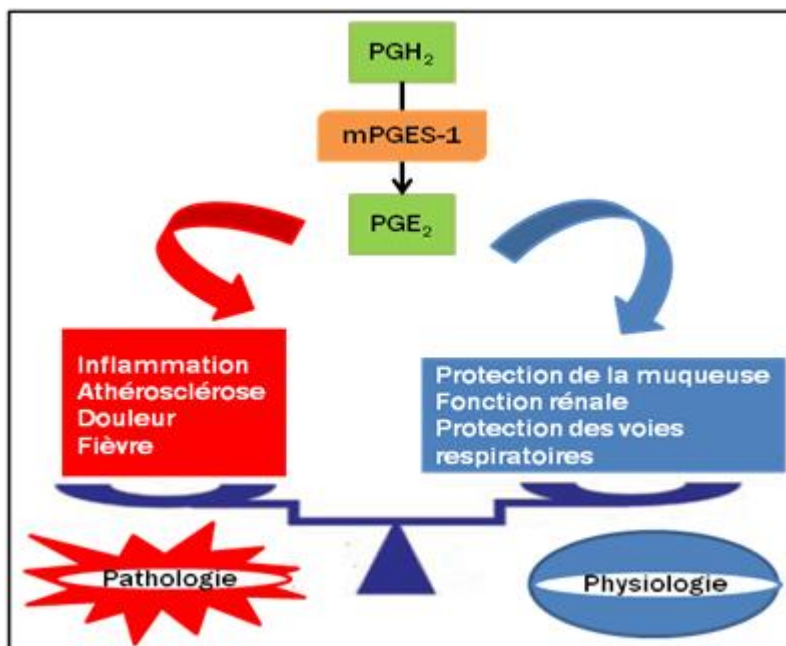


Figure 10 : Les fonctions physiopathologiques de la mPGES-1. (Adaptée de Murakami, 2011).

II.2.2. Caractéristiques biochimiques et moléculaires de la mPGES-1

Le gène codant pour la mPGES-1 chez l'homme est localisé sur le chromosome 9q34.4 et possède une taille ~14,8 kb. Il contient 3 exons et 2 introns (Forsberg et al., 2000a) (**Tableau I**).

La protéine mPGES-1 contient 152-153 aa avec un PM de ~16 kDa. Elle présente une homologie significative avec les protéines de la superfamille MAPEG, avec une plus forte homologie pour MGST1 (38%), et une haute homologie (80%) avec les mPGES-1 des autres espèces (rat, souris et lapin) (Iyer et al., 2009; Thoren et al., 2003).

II.2.3. Régulation de la mPGES-1

II.2.3.1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la mPGES-1

L'emploi d'inhibiteurs spécifiques des membres de la voie MAPK, a montré que p38 β et ERK1/2 sont impliquées dans l'expression induite de la mPGES-1 par l'IL-1 β au niveau des chondrocytes (Masuko-Hongo et al., 2004).

L'Egr-1 (*early growth response gene-1*) est le facteur de transcription principal de la transcription du gène de la mPGES-1 (Cheng et al., 2004; Naraba et al., 2002; Subbaramaiah et al., 2004).

II.2.3.2. Régulation au niveau transcriptionnel

Dans une variété de cultures cellulaires, une stimulation avec des produits pro-inflammatoires comme le LPS et les cytokines IL-1 β et TNF- α , induit une augmentation marquée de la mPGES-1 et de la production de la PGE₂, en parallèle avec l'induction et l'expression de la COX-2 (Li et al., 2005; Murakami et al., 2000; Stichtenoth et al., 2001). De même, les glucocorticoïdes inhibent toutes ces expressions, synthèses et productions. Cependant, des différences dans la cinétique d'induction de la mPGES-1 et la COX-2 existent, ce qui suggère que les deux enzymes sont soumises à des mécanismes de régulation différents (Stichtenoth et al., 2001). Ainsi, contrairement au gène de la COX-2, le promoteur de la mPGES-1 est dépourvu de la boîte TATA (Naraba et al., 2002), et la région 3'-UTR ne renferme pas les séquences d'instabilité de l'ARNm AUUUA (Hara et al., 2010). Le promoteur de la mPGES-1 ne contient pas également de site de liaison pour NF-kB, CRE ou encore la *E-box* (Naraba et al., 2002). Il est par contre riche en GC.

L'expression de la mPGES-1 nécessite la présence de deux boîtes GC près du site d'initiation (Forsberg et al., 2000b). Ces régions servent à la liaison des facteurs de transcription Egr-1 dans le cas d'une induction par le LPS, l'IL-1 β ou le TNF- α (Naraba et al., 2002; Subbaramaiah et al., 2004), ou Sp1 et Sp3 dans le cas d'une expression basale (Ekstrom et al., 2003). Outre ces régions, le promoteur de la mPGES-1 contient deux boîtes en tandem Barbies et un *Aryl hydrocarbon regulatory element* (Forsberg et al., 2000b) (**Figure 11**).

En plus des glucocorticoïdes, l'expression de la mPGES-1 peut aussi être inhibée par la 15d-PGJ2 d'une manière dépendante de PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) ou indépendante (Cheng et al., 2004; Li et al., 2005).



Figure 11 : Les éléments régulateurs au niveau du promoteur du gène de la m-PGES-1 humaine. GR : *glucocorticoid receptor*; PR : *progesterone receptor*.

II.2.3.1. Régulation par la PGE₂

Une boucle de rétrocontrôle positive existe entre la PGE₂ et la mPGES-1. En effet, au niveau des chondrocytes et des synoviocytes de patients atteints d'AR, la PGE₂ augmente l'expression de la mPGES-1 en augmentant l'AMPc, via les récepteurs EP2 et EP4 (Kojima et al., 2005; Kojima et al., 2003) (**Figure 12**).

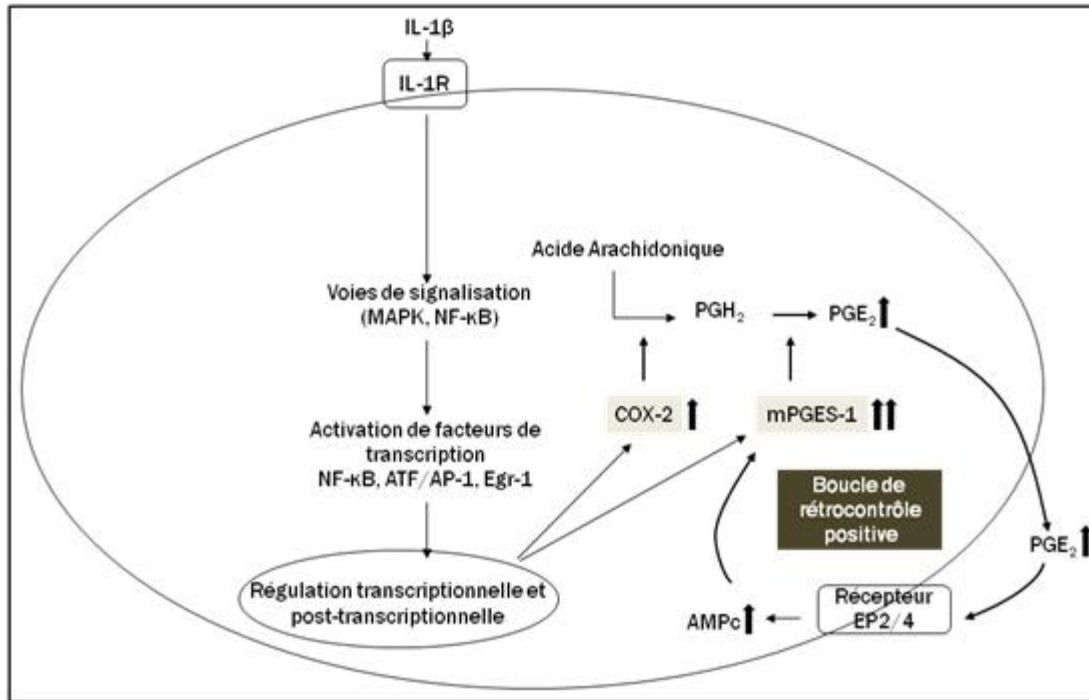


Figure 12 : La régulation positive de l'expression de la mPGES-1 par la PGE₂ au niveau des chondrocytes.

II.2.4. mPGES-1 et OA

La mPGES-1 est surexprimée dans les tissus articulaires humains OA : cartilage et zone intimale et sous-intimale de la MS, et ceci aussi bien au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique (Kojima et al., 2004; Korotkova and Jakobsson, 2010; Li et al., 2005). *In vitro*, le traitement des chondrocytes ou des synoviocytes OA avec l'IL-1 β conduit à l'induction de l'expression de la mPGES-1 et de la production de la PGE₂ (Cheng et al., 2004; Li et al., 2005; Masuko-Hongo et al., 2004). Les cytokines TNF- α et IL-17, à concentration optimale, sont aussi capables d'induire ces surexpressions, alors que les cytokines IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 et IFN- γ (*interferon* γ) en sont incapables (Alvarez-Soria et al., 2008; Kojima et al., 2004; Li et al., 2005). Les PGES constitutives (cPGES et mPGES-2), ne sont pas affectées par les cytokines pro-inflammatoires. Des concentrations faibles d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-17 induisent un léger effet sur l'expression de la

mPGES-1. Au contraire, la combinaison de ces trois cytokines montre un effet synergique (Li et al., 2005).

D'autres facteurs, qui participent dans la pathogenèse de l'OA, peuvent aussi induire l'expression de la mPGES-1 ainsi que celle de la COX-2 et la production de la PGE₂. Parmi eux citant HIF-1 α (Grimmer et al., 2007), les AGE (*advanced glycation-end products*) (Nah et al., 2008), les compressions mécaniques (Gosset et al., 2006) ainsi que les adipokines (adipocytokines impliquées dans l'obésité et l'OA) (Gosset et al., 2008).

II.3. La iNOS

II.3.1. Fonctions générales de la iNOS

L'oxyde nitrique (NO) est synthétisé par une classe d'enzyme appelée oxyde nitrique synthétases (NOS pour *nitric oxide synthase*). Celles-ci catalysent l'oxydation de l'atome d'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine (Bruckdorfer, 2005) (**Figure 13**).

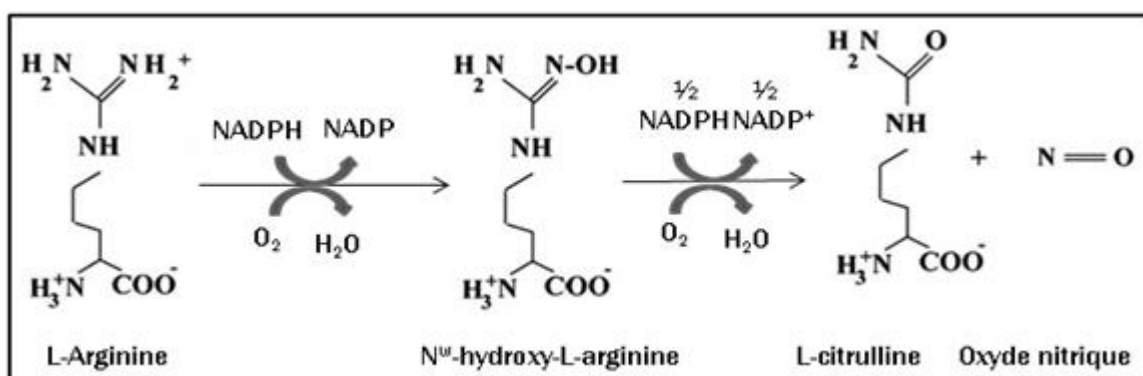


Figure 13 : Biosynthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine. Le NO est synthétisé grâce aux NOS à travers une oxydation séquentielle qui transforme la L-arginine en L-citrulline, en présence d'oxygène. Outre NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), les cofacteurs FAD (Flavine adénine dinucléotide), FMN (Flavine mononucléotide), BH4 (Tétrahydrobioptérine) et l'hème sont aussi nécessaires. (Adaptée de Pannu and Singh, 2006).

Trois isoformes distincts de la NOS ont été isolés. Le type inductible (iNOS pour *inducible NOS* ou NOS de type II) est exprimé dans plusieurs types cellulaires dont les cellules du système immunitaire tels que les macrophages, les cellules endothéliales, les astrocytes, les hépatocytes, les myocytes et les chondrocytes. Contrairement aux autres isoformes (NOS endothéliale et NOS neuronale) qui sont constitutives, la iNOS est généralement absente des cellules au repos. Son induction se fait d'une manière indépendante du taux de calcium intracellulaire, à cause de son interaction non covalente quasi-permanente avec la calmoduline (Alderton et al., 2001). Une fois induite, elle

demeure active dans le cytoplasme durant 4-24 h jusqu'à sa dégradation, et produit près de 100 fois plus de NO (micromolaire) que les NOS constitutives (picomolaire-nanomolaire) (Aktan, 2004; MacMicking et al., 1997). Le NO généré exerce alors des fonctions bénéfiques pour l'organisme à travers des actions cytotoxiques et cytostatiques bactéricides, antivirales, antiparasitaires et antitumorales (Bogdan et al., 2000). Sa production excessive peut au contraire conduire à des conséquences néfastes, et est impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies associées à l'inflammation telles que les maladies articulaires, l'asthme, les maladies neurodégénératives et le choc septique.

Le NO produit par la iNOS agit d'une manière indirecte (>400 nM) à travers les produits azotés réactifs (RNS pour *reactive nitrogen species*) formés de sa réaction avec l'oxygène ou l'anion superoxyde O_2^- , qui engendrent un stress nitrosatif et oxydatif (Alderton et al., 2001; Thomas et al., 2008; Wink and Mitchell, 1998). L'effet final du NO généré par la iNOS et ses dérivées peut être bénéfique ou toxique pour la cellule dépendamment de plusieurs facteurs dont la nature du stimulus, le type cellulaire, le niveau et la durée d'expression de la iNOS, et probablement le statut redox de la cellule. Ce dernier étant influencé par des antioxydants exogènes et endogènes (Masini et al., 2010). Parmi les RNS dérivés de NO, les nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-) sont les deux métabolites stables retrouvés dans le plasma. Les autres RNS incluent principalement le peroxyde d'azote ($ONOO^-$), le dioxyde d'azote (NO_2) et le trioxyde d'azote (N_2O_3) (Thomas et al., 2008). Ces RNS peuvent réagir avec différentes macromolécules (protéines, lipides et ADN) et altérer leur fonctions à travers des réactions d'oxydation, de S-nitrosylation oxydantes qui génèrent des S-nitrosothiols (SNO) (Sha and Marshall, 2011) et de nitration de tyrosine (Souza et al., 2008). Ainsi, les RNS peuvent causer des dommages aux membranes cellulaires, inhiber des réactions biochimiques vitales (cycle de Krebs et chaîne respiratoire) (Martinez-Ruiz et al., 2011) et même induire la mort cellulaire (Singh and Gupta, 2011). Ils peuvent aussi agir sur des cascades de transduction de signal (Kelleher et al., 2011) et déclencher la peroxydation des lipides (Stadler et al., 2008) (**Figure 14**).

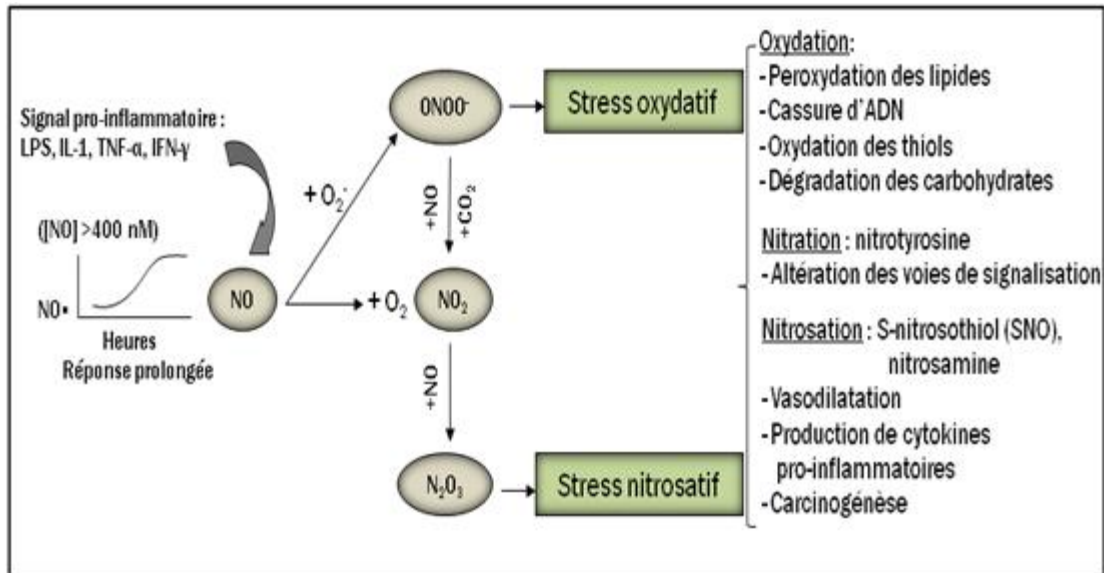


Figure 14 : La chimie du NO produit par la iNOS et ses effets indirects. La iNOS produit de grande quantité de NO et pour une durée prolongée. Les RNS formés de la combinaison de NO avec O_2 ou O_2^- génèrent un stress nitrosatif et oxydatif. Ces stress induisent des changements dans différentes molécules biologiques, avec des conséquences sur plusieurs évènements physiopathologiques. (Adaptée de Thomas et al., 2008; Wink and Mitchell, 1998).

Dans les conditions physiopathologiques où la composante inflammatoire est importante et où la iNOS est induite de façon continue dans plusieurs types cellulaires, en particulier les macrophages, les neutrophiles et les chondrocytes, l'action de NO est généralement délétère. Dans ce cas, en plus des cellules affectées, les cellules des tissus sains avoisinants sont aussi la cible des RNS (Forstermann and Sessa, 2011).

Les propriétés pharmacologiques de NO généré par la iNOS ont fait de cette enzyme une cible de choix pour le traitement des maladies inflammatoires aiguës et chroniques. Parmi les inhibiteurs non sélectifs de la iNOS citant les analogues d'arginine. Du fait de l'importance physiologique des autres NOS, des inhibiteurs sélectifs de la iNOS ont été développés. Ces derniers, bien qu'ayant donné des résultats prometteurs dans des modèles animaux, aucuns d'entre eux n'a encore reçu la validation pour une application clinique chez l'homme (Joubert and Malan, 2011).

II.3.2. Caractéristiques biochimiques et moléculaires de la iNOS

Le gène de la iNOS chez l'homme est localisé sur le chromosome 17q11.2-q12 et s'étend sur ~37 kb. Il code pour deux transcrits dont l'un est majoritaire avec 27 exons. Il n'y a pas suffisamment de données concernant l'expression et la traduction du second transcrit (Pautz et al., 2010). Le site d'initiation de la transcription commence à l'exon 2, et le codon stop se situe à l'exon 27 (Xu et al., 1996).

Les NOS ne peuvent être actives que sous forme d'homodimère. L'analyse de la protéine native de la iNOS a montré un PM de ~131 kDa pour la forme monomérique, et une homologie de séquence avec les autres NOS de ~50%, et avec la iNOS de macrophage murin de 80%. Des différences notables dans la structure primaire des NOS sont cependant observées (Alderton et al., 2001; Du, 2010).

II.3.3. Régulation de la iNOS

II.3.3.1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la iNOS

Les voies conduisant à l'induction de la iNOS peuvent varier en fonction des cellules et des espèces. Les voies de signalisation MAPK (p38, ERK et JNK), JAK (*Janus kinase*)/STAT (*signal transducer and activator of transcription*) et NF- κ B sont impliquées dans l'induction de la iNOS, dépendamment du stimulus et du type cellulaire (Sareila et al., 2008; Shalom-Barak et al., 1998).

II.3.3.2. Régulation au niveau transcriptionnel

Le promoteur du gène de la iNOS humaine dans la plupart des lignées cellulaires testées, s'étend sur une région qui peut aller jusqu'à 16 kb pour une expression optimale (de Vera et al., 1996b), alors que dans le système murin, 1.6 kb sont suffisantes pour une telle expression (Martin et al., 1994; Pautz et al., 2010). La taille du promoteur de la iNOS dépend en fait de l'espèce et du type cellulaire (Pautz et al., 2010). Différents polymorphismes ont été aussi rapportés dans la séquence du promoteur de la iNOS (Qidwai and Jamal, 2010).

Le promoteur de la iNOS contient plusieurs éléments régulateurs en cis pour la liaison de facteurs de transcriptions tels que AP-1, C/EBP, CREB, IRF-1 (*interferon regulatory factor-1*), NF- κ B, NF-IL6 (*nuclear factor for IL-6 transcription*), et STAT-1 α

(Kleinert et al., 2004). Les promoteurs des iNOS des différentes espèces analysées possèdent tous une région TATA box d'environ 30 pb à partir du site d'initiation. Alors qu'une forte homologie existe dans la séquence 5'-UTR de la iNOS humaine et celles des singes, macaques et rhésus, une homologie limitée existe avec celle des souris et rats (Pautz et al., 2010) (**Figure 15**).

L'expression de la iNOS est stimulée par certains médiateurs inflammatoires telles que les cytokines (IL-1 β , TNF- α et INF- γ) et les endotoxines bactériennes comme le LPS. Au niveau du promoteur de la iNOS, il existe plusieurs sites de liaison de NF- κ B entre les régions -4 et -8 kb. Les sites proximaux -76 et -85 pb sont importants pour une expression basale de la iNOS alors que le site -5.8 kb est nécessaire pour l'induction par les cytokines TNF- α et IL-1 β (Du, 2010). Au contraire, les cytokines TGF- β , IL-4 et IL-10 ainsi que les glucocorticoïdes suppriment la transcription de la iNOS (Schroeder and Kuo, 1995).

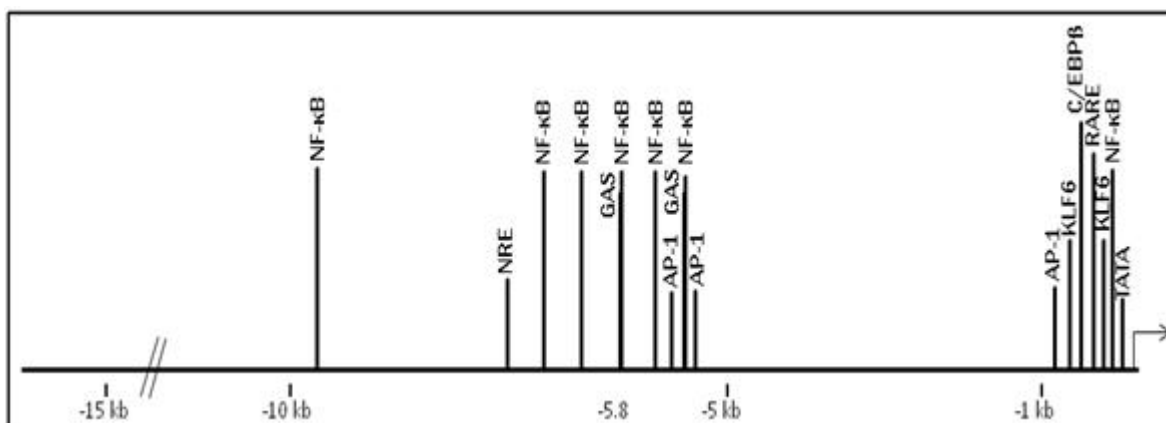


Figure 15 : Les éléments régulateurs au niveau du promoteur du gène de la iNOS humaine. Les éléments en cis dans le promoteur de 16 kb de la iNOS sont représentés sous forme de barres. Leur localisation par rapport au site d'initiation est aussi indiquée. KLF6 : *Krüppel-like factor 6*; GAS : *Interferon-gamma activated sequence*; NRE : *Negative regulatory element*. RARE : *Retinoic acid response element*. (Adaptée de Pautz et al., 2010).

II.3.3.3. Régulation au niveau post-transcriptionnel

Il y a une différence importante entre l'activité du promoteur et l'expression de l'ARNm iNOS, en particulier chez l'homme. En effet, sous l'action de cytokines, le taux de transcription de la iNOS est augmenté de seulement 2 à 5 fois, alors que les niveaux d'ARNm augmentent de plus de 20 fois, ce qui implique l'existence d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle (de Vera et al., 1996a; Linn et al., 1997).

Cinq séquences ARE (AUUUA ou AUUUUA) sont présentes dans la région 3'-UTR de l'ARNm de la iNOS (Pautz et al., 2010). Un modèle synthétique de la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de la iNOS humaine par l'interaction des ARE avec différentes RNA-BP a été proposé par *Linker et al.* (Linker et al., 2005). D'après ce modèle, au niveau des cellules qui n'ont pas subi de traitement, la protéine KSRP (*kh-type splicing regulatory protein*) se lie aux ARE de l'ARNm et recrute l'exosome qui assure la dégradation rapide de l'ARNm de la iNOS. Au niveau de la lignée chondrocytaire C-28/12, KSRP serait impliquée dans ce mode de régulation (Schmidt et al., 2010). Sous l'effet des cytokines, l'expression de la protéine TTP (*tristetraprolin*), une autre RNA-BP, et son interaction avec la protéine KSRP, sont augmentées. Le résultat de cette interaction est le délogement du complexe KSRP/exosome de l'ARNm de la iNOS. Le compétiteur de la protéine KSRP pour les sites ARE, Hur, peut ainsi se lier à ces sites et augmenter la stabilité de l'ARNm et l'expression de la iNOS (Linker et al., 2005).

II.3.3.4. Régulation au niveau post-traductionnel

Il a été rapporté que la voie du protéasome en coopération avec la cavéoline-1 est impliquée dans la dégradation protéique de la iNOS (Felley-Bosco et al., 2000). Au contraire, la phosphorylation de la iNOS via la tyrosine kinase Src augmente ses niveaux protéiques (Hausel et al., 2006).

II.3.4. iNOS et OA

Le NO est un des facteurs cataboliques majeurs impliqués dans l'OA (Scher et al., 2007). La capacité des chondrocytes à produire du NO a été démontrée pour la première fois dans une culture de chondrocytes articulaires bovins (Stadler et al., 1991), ensuite dans les chondrocytes humains (Charles et al., 1993). Par la suite, il a été rapporté l'expression d'une OA-NOS (*OA-affected NOS*), détectable uniquement dans le cartilage OA et avec des propriétés similaires à la NOS neuronale (Amin et al., 1995). Il est suggéré que cette isoforme soit une forme modifiée de la NOS neuronale ou inductible. Par immunohistochimie, plusieurs équipes ont montré que la iNOS est surexprimée dans le cartilage OA (Grabowski et al., 1997; Vuolteenaho et al., 2001). Le NO produit et ses dérivées (nitrite, nitrotyrosine, S-nitrosoprotéine) sont retrouvés dans le liquide synovial et le sérum des patients OA (Ersoy et al., 2002; Karan et al., 2003; Loeser et al., 2002a; Renoux et al., 1996).

In vitro, des cultures d'explants de cartilage OA sont capables de produire, d'une manière spontanée et temps dépendante (5-7 jours), des nitrites. Cette production qui est inhibée par les inhibiteurs non sélectifs des NOS. Les chondrocytes normaux nécessitent une stimulation pour que la iNOS puisse s'exprimer (Amin et al., 1995; Vuolteenaho et al., 2001; Wollheim and Lohmander, 2008). Les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-17), l'IFN- γ , le LPS, les forces de cisaillement, les AGE, ainsi que la leptine combinée à des cytokines, ont été rapportés comme étant capables d'induire la production de NO dans les chondrocytes humains (Huang et al., 2009; Vuolteenaho et al., 2007).

III. Les histones déacétylases (HDAC) et leurs inhibiteurs (iHDAC)

III.1. La chromatine et le nucléosome

La chromatine est une structure dynamique qui joue un rôle important dans les principales fonctions du génome : transcription, réplication, réparation et recombinaison de l'ADN. Son unité de base est le nucléosome. Celui-ci est composé de 146 paires de bases (pb) d'ADN (~1,65 tours), enroulées autour d'un octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B (Luger et al., 1997). L'addition d'une région d'ADN internucléosomique et de l'histone H1 génère une fibre de 30 nm de diamètre par condensation en spirale (Nemeth and Langst, 2004; Wolffe and Guschin, 2000) (**Figure 16**).

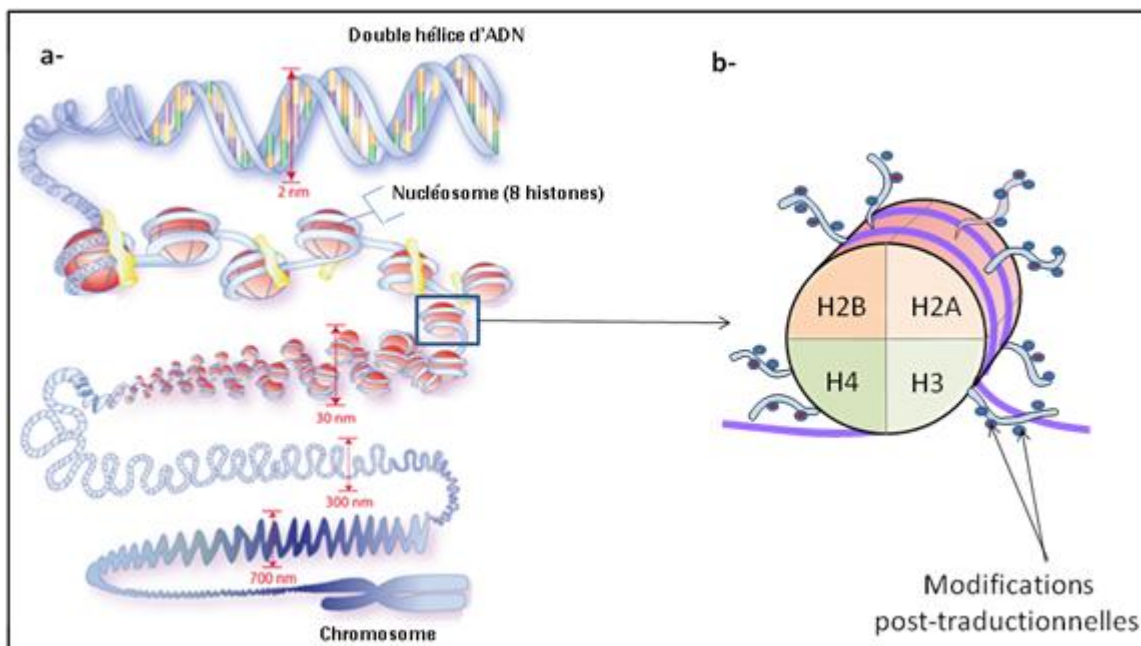


Figure 16 : La chromatine et le nucléosome. (a) La chromatine est un complexe formé d'histones et d'ADN qui sont organisés en de multiples niveaux qui permettent une grande condensation de l'hélice de l'ADN : chromosome, chromatine condensée, fibre de chromatine, collier de nucléosome et ADN double brin. (b) Le nucléosome est formé de 4 paires d'histones. Les parties N-terminales de ces histones sont la cible de modifications post-traductionnelles (b). (Adaptée de www.epitron.eu).

Les histones du cœur nucléosomique partagent en commun un motif globulaire, le domaine *histone-fold* ou repliement histone. Ce domaine est structurellement conservé, et est constitué de trois hélices α reliées entre-elles par deux courtes boucles L1 et L2 impliquées dans la dimérisation des histones, et une région flexible N-terminale ou queue de l'histone exposée à la surface des nucléosomes (Davey et al., 2002; Hansen, 2002; Luger et al., 1997).

Entre l'ADN et les histones s'établissent des interactions de type hydrogène et électrostatique, grâce aux groupes phosphates chargés négativement de l'ADN et aux charges positives portées par les lysines et arginines des histones (Szerlong and Hansen, 2011). Ces interactions sont importantes pour la compaction de la chromatine, mais elles limitent en même temps son accessibilité aux facteurs qui sont impliqués dans les différents événements la mettant en jeu. Afin de surmonter cet obstacle, plusieurs mécanismes cellulaires, qui permettent une réorganisation adéquate de la chromatine, ont été mis en évidence; ils font partie des modifications dites « épigénétiques ».

III.2. Épigénétique et code histone

La définition de l'épigénétique la plus couramment utilisée aujourd'hui est celle de *Riggs et Porter*. En 1996, ces auteurs l'ont définie comme étant l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes qui ne sont pas expliqués par des altérations dans la séquence de l'ADN (Riggs and Porter, 1996).

L'épigénétique englobe plusieurs modes de contrôle qui incluent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles (PTM) affectant la partie N-terminale des histones, le remplacement d'histones par des variants d'histones, la répression transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle par les ARN non codants comme les microARN ainsi que le remodelage dépendant d'ATP (adénosine triphosphate) des nucléosomes.

Les histones sont la cible d'au moins 8 modifications distinctes, détectées sur plus de 60 résidus d'aa des extrémités N-terminales et dans une moindre mesure C-terminales (Kouzarides, 2007) (**Figure 16**). Ces modifications régulent de nombreux événements cellulaires liés à l'ADN comme la transcription, lors du développement et en réponse à des

facteurs locaux ou environnementaux capables d'induire des changements physiologiques dans la cellule. Les modifications les plus étudiées à ce jour sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (Kouzarides, 2007).

Les PTM des histones et d'une manière générale les modulations épigénétiques sont définies, lues et interprétées par des protéines ou complexes protéiques selon un code dit : code histone ou code épigénétique, proposé en 2001 par *Thomas Jenuwein* et *C. David Allis* (Jenuwein and Allis, 2001). Ce code dicte l'état de la chromatine, et étend l'information potentielle du code génétique. Il stipule que l'établissement et la suppression des PTM par des enzymes : « *writers* » et « *erasers* » respectivement, servent comme une marque pour la liaison de facteurs d'interprétation spécifiques : « *readers* » (Jenuwein, 2001; Ruthenburg et al., 2007; Strahl and Allis, 2000; Wang et al., 2007). Son existence est avérée par la découverte de domaines protéiques : « *effectors* », qui se lient spécifiquement à ces marques, tels que le bromodomaine qui reconnaît les groupements acétyles, et le chromodomaine qui se lie aux groupements méthyles (Ruthenburg et al., 2007). Une fois en place, ces modules peuvent à leur tour recruter d'autres protéines afin d'induire l'activation ou la répression transcriptionnelle.

Le code histone stipule aussi qu'un cross-talk existe entre les différentes modifications, où une modification peut réguler une autre sur la même histone (régulation en cis), ou entre des molécules d'histones ou de nucléosomes (régulation en trans) (Jenuwein, 2001; Latham and Dent, 2007; Strahl and Allis, 2000). La complexité de ce code apparaît encore plus évidente par le fait qu'un même résidu d'aa peut subir plusieurs types de modifications, comme la lysine qui peut être méthylée, acétylée, ubiquitinylée et sumoylée. Un degré supérieur de complexité vient s'ajouter par le statut précis de méthylation des lysines : mono-, di- ou triméthylation, et des arginines : mono- et diméthylation (symétrique ou asymétrique), qui, *in vivo*, est associé à des réponses géniques différentes. De plus, certaines enzymes peuvent écrire, effacer ou lire plus qu'une modification, et une marque donnée peut recruter de multiples protéines effectrices (Gardner et al., 2011).

La fonction principale du code épigénétique serait de permettre ou non la lecture d'un gène, en fonction du stade de développement, et de l'état de la cellule et de la position qu'elle

occupe dans l'organisme. Ainsi, sous sa forme condensée : l'hétérochromatine, l'accessibilité de l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle est limitée, et il faut une dérepression de certaines régions pour donner une conformation ouverte favorable à la transcription : l'euchromatine. Si une dérégulation dans l'établissement de ces structures et des marques épigénétiques à lieu, l'expression de certains gènes peut être perturbée, et la mémoire cellulaire risque de ne plus être maintenue, ce qui peut conduire à l'apparition de pathologies. Cependant, à l'inverse des changements génétiques (les mutations) qui affectent la séquence d'ADN, les modifications épigénétiques sont réversibles, ce qui offre la possibilité d'interventions thérapeutiques.

III.3. L'acétylation et la déacétylation des histones

L'acétylation des histones a été rapportée pour la première fois en 1964 par *Allfrey* et ses collaborateurs comme étant associée à une synthèse plus efficace de l'ARN et donc à la régulation de la transcription (Allfrey et al., 1964). Ce processus résulte d'un équilibre entre deux types d'enzymes à activités antagonistes : les histones acétyltransférases (HAT) et les histones déacétylases (HDAC). L'acétylation des histones joue un rôle important dans la transcription qu'elle permet d'activer. En effet, les gènes de l'euchromatine en état actif sont enrichis en histones hyperacétylées (Tsukiyama, 2002). Si l'activité HAT est associée à une activation de la transcription, celle des HDAC conduit à des structures chromatiques répressives (Strahl et al., 1998). Toutefois, plusieurs études ont montré que ces associations ne sont pas systématiques, et que l'acétylation des histones peut être associée à des régions hétérochromatiques (Braunstein et al., 1996), de même que leur déacétylation ne conduit pas toujours à la répression des gènes concernés (Ellis et al., 2008a).

L'acétylation des histones se déroule à travers le transfert d'un groupe acétyle de l'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) vers la fonction amine (NH_3^+) ε d'une lysine située sur la partie N-terminale des histones (Hodawadekar and Marmorstein, 2007; Roth et al., 2001) (**Figure 17**).

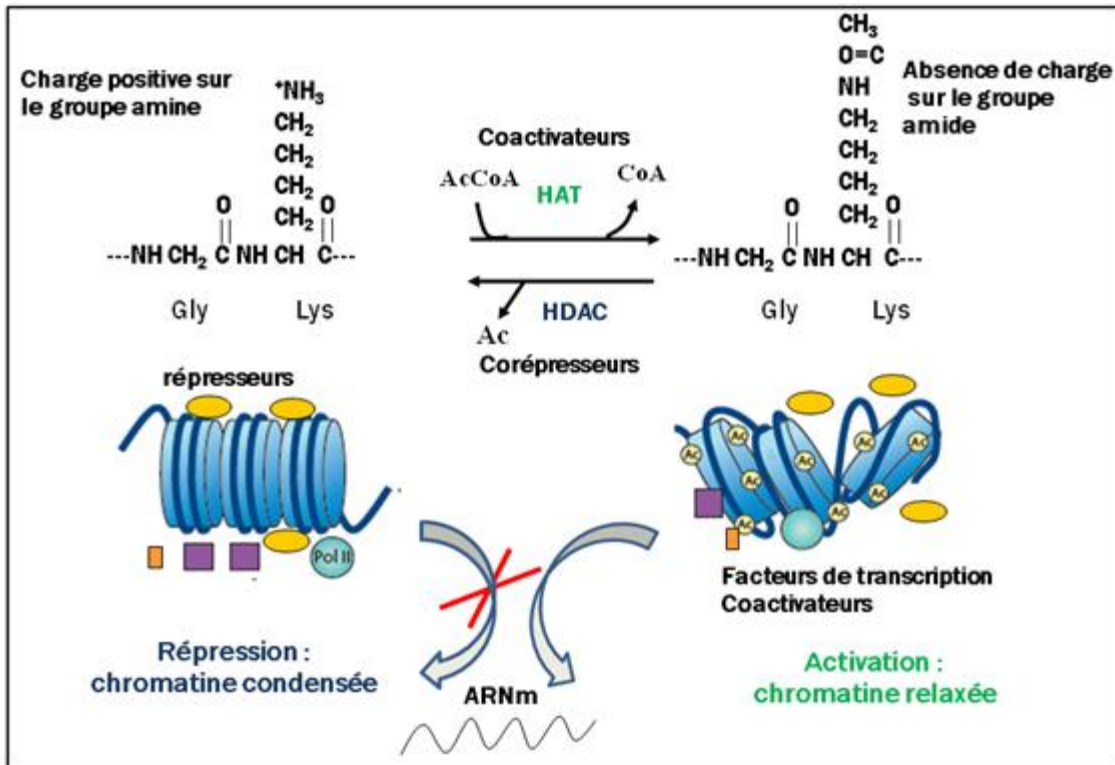


Figure 17 : Réaction d'acétylation/déacétylation des histones et conséquences sur l'état de la chromatine. Ac : acétyle; Gly : Glycine; Lys : Lysine.

Deux mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer l'action déclenchée par cette réaction sur l'état de la chromatine. Le premier mécanisme est le changement structural des nucléosomes, basé sur l'hypothèse électrostatique ou physico-chimique. Cette hypothèse repose sur le fait que les modifications covalentes au niveau de la queue des histones moduleraient leurs charges, influençant par conséquent, l'état de condensation de la chromatine. Dans le cas du processus d'acétylation, la neutralisation de la charge positive portée par le groupement amine ϵ de la lysine conduit à l'affaiblissement de l'interaction électrostatique entre l'ADN (chargé négativement) et les histones (chargées positivement) (Workman and Kingston, 1998). Il en résulte une augmentation de la fluidité du nucléosome et de l'accessibilité à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle (Kingston and Narlikar, 1999). Le second mécanisme fait intervenir l'hypothèse du code histone, selon laquelle le groupe acétyle porté par un résidu lysine constituerait un signal pour la liaison

de protéines possédant le bromodomaine (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). Il s'agit d'un motif ~110 aa qui reconnaît spécifiquement la lysine acétylée des histones, mais aussi de protéines non histones, grâce à une poche hydrophobe créée par quatre hélices alpha (Sanchez and Zhou, 2009).

Les principaux sites qui sont acétylés et les conséquences fonctionnelles qui leur sont associées sont décrits dans le Tableau II.

Il est maintenant admis que le processus d'acétylation/déacétylation ne concerne pas uniquement les histones mais également des substrats non histones (Peserico and Simone, 2011). En effet, il apparaît aujourd'hui que le phénomène l'acétylation/déacétylation peut agir sur une multitude de protéines nucléaires ou non, et pas nécessairement reliée à la fonction de la chromatine. Récemment, une étude a identifié, en utilisant la spectrométrie de masse à grande échelle, 3600 sites d'acétylation de lysine sur 1750 protéines (Choudhary et al., 2009). Cette même étude a montré que l'acétylation des lysines, cible préférentiellement des complexes macromoléculaires larges qui sont impliqués dans des processus très divers : remodelage de la chromatine, cycle cellulaire, épissage des ARNm, transport nucléaire, métabolisme énergétique et le remodelage du cytosquelette d'actine. Pour tenir compte de ces données, une nouvelle nomenclature a été proposée, même si l'ancienne appellation reste couramment utilisée (Allis et al., 2007). Ainsi, les HAT sont devenues KAT (*lysine acetyltransferases*). Les HDAC, par contre, ont conservé leur appellation de fait de la cohérence de leur nomenclature. Les gènes codant pour les enzymes KAT/HDAC ont conservé également leurs anciennes dénominations pour des considérations techniques.

Tableau II : Les sites d'acétylation sur les histones et leurs effets biologiques. K : lysine.
(Adapté de Selvi and Kundu, 2009).

Histone	Site acétylé	Conséquence fonctionnelle
H3	K9	Activation transcriptionnelle
	K14	Activation transcriptionnelle
	K18	Activation transcriptionnelle, enlèvement de H3, cycle cellulaire
	K23	Activation transcriptionnelle
	K56	Déposition d'histone et assemblage de la chromatine, réparation de l'ADN
H4	K5	Activation transcriptionnelle
	K8	Réparation de l'ADN
	K12	Activation transcriptionnelle
	K16	Inactivation de l'ADNr, développement, architecture de la chromatine
H2A	K5	Activation transcriptionnelle
	K14	Activation transcriptionnelle
H2B	K12	Architecture de la chromatine
	K15	Architecture de la chromatine
	K6, K11	Activation transcriptionnelle, survie cellulaire

III.4. Les histone déacétylases (HDAC)

Les HDAC font partie d'une famille d'enzymes trouvées chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. Leurs substrats types sont des protéines histones, mais aussi non histones (Minucci and Pelicci, 2006).

Seules les HDAC de classe I, II et IV seront abordées en détail. Les sirtuines seront citées d'une manière succincte, car elles ne font pas partie de l'objet de cette thèse.

III.4.1. Classification des HDAC

Basées sur leur homologie aux déacétylases des histones des levures et des analyses phylogénétiques, les HDAC se classent chez l'homme en quatre catégories contenant au total 18 membres (de Ruijter et al., 2003; Gregoretti et al., 2004).

✓ **Les HDAC de classe I (HDAC1, 2, 3 et 8)**. Elles sont homologues de la protéine Rpd3 (*reduced potassium dependency 3*) de la levure (Bjerling et al., 2002). Elles ont une expression tissulaire ubiquitaire, et sont localisées presque exclusivement dans le noyau, grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS pour *nuclear localization*

signal) et à l'absence, à l'exception pour HDAC3, du signal d'export nucléaire (NES pour *nuclear export signal*) (de Ruijter et al., 2003). L'HDAC3 peut être localisée en plus, dans le cytoplasme et la membrane plasmique (Takami and Nakayama, 2000; Waltregny et al., 2004b). Des localisations de HDAC8 dans le cytoplasme de cellules cancéreuses (Waltregny et al., 2004b) et des cellules musculaires différenciées, ont été aussi rapportées (Waltregny et al., 2004a). Les HDAC de classe I sont de petite taille (~40-55 kDa), et présentent une haute homologie dans leur site catalytique, localisé dans un domaine N-terminal qui couvre la majeure partie de la protéine (de Ruijter et al., 2003). Cette classe peut être divisée en sous classes Ia (HDAC1 et 2), Ib (HDAC3) et Ic (HDAC8) (Gregorette et al., 2004) (**Figure 18**).

✓ **Les HDAC de classe II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10)**. Elles sont homologues de la protéine Hda1 (*histone deacetylase 1*) de la levure (Bjerling et al., 2002). Elles sont de taille plus grande (~70-130 kDa), de distribution restreinte (cœur, cerveau, muscle, pancréas, placenta, plaquette, rein, rate, testicule, thymocytes CD4⁺/CD8⁺) et à localisation cytoplasmique et/ou migrent entre le noyau et le cytoplasme. Cette classe contient les domaines NLS en N-terminal et NES en C-terminal (de Ruijter et al., 2003). Elles sont divisées en sous classes IIa (HDAC4, 5, 7 et 9) et IIb (HDAC6 et 10) (Gregorette et al., 2004). Les membres de la sous-classe IIa possèdent un seul site catalytique situé dans un domaine C-terminal hautement conservé (~420 aa), et un grand domaine N-terminal (~600 aa) qui les différencie des HDAC des autres classes (Verdin et al., 2003). Ce dernier intervient dans la régulation de la migration entre le noyau et le cytoplasme (Witt et al., 2009). La sous-classe IIb est caractérisée par un domaine déacétylase supplémentaire qui est actif uniquement dans HDAC6. Cette dernière possède en plus un motif de type *zinc-finger ubiquitin binding domain* en C-terminal (ZnF-UBP) (Verdin et al., 2003) (**Figure 18**).

✓ **Les HDAC de classe III (SIRT1 à 7)**. Elles sont homologues de la protéine Sir2 (*silent information regulator 2*) de la levure (Blander and Guarente, 2004). Ces membres ne présentent pas d'homologie de séquence avec les HDAC de classe I, II et IV. Les sirtuines (*sir two ("tu")-like protein*) sont localisées dans le cytoplasme (SIRT1 et 2), le noyau (SIRT1, 2, 6 et 7) ou dans la mitochondrie (SIRT3, 4 et 5). Elles sont largement exprimées

et à des degrés variés dans une variété de tissus (Kelly, 2010). Elles catalysent la réaction de déacétylation d'une lysine couplée à l'hydrolyse du NAD^+ (*nicotinamide adenine dinucleotide*). Certains membres des sirtuines (SIRT3, 4 et 6) sont capables de catalyser une réaction d'ADP ribosylation, qui transfère un groupement ADP-ribose sur des protéines acceptrices (Kelly, 2010; Sauve, 2010).

✓ **L'HDAC de classe IV (HDAC11)**. Le seul membre de cette classe, HDAC11, partage des homologies de séquence dans son domaine catalytique avec les enzymes de classes I et II, et possède une taille de même ordre. Sa localisation est notamment nucléaire, et son expression est restreinte comme pour les HDAC de classe II (Gao et al., 2002) (**Figure 18**).

Les HDAC de classes I, II et IV, appelées aussi « HDAC classiques », nécessitent un ion zinc (Zn^{2+}) comme cofacteur essentiel pour leur activité catalytique, alors que les sirtuines nécessitent le NAD^+ comme cofacteur (Finnin et al., 1999).

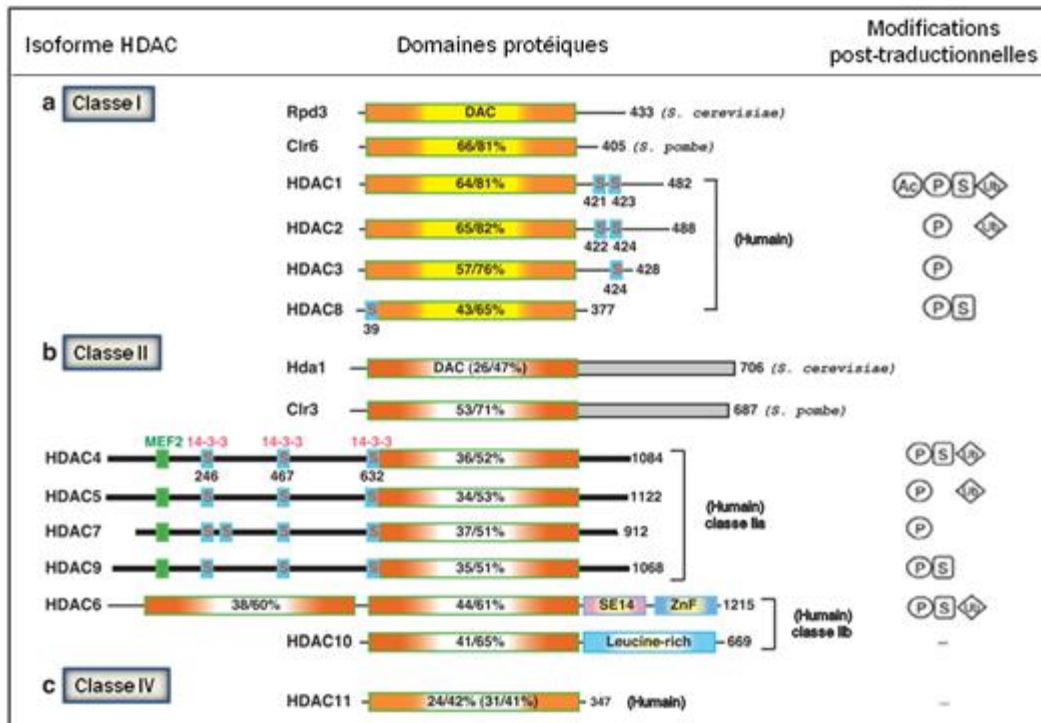


Figure 18 : Organisation en domaines des HDAC classiques de la levure à l'homme, et les modifications post-traductionnelles qui les affectent. Les HDAC classiques sont divisées en 3 groupes. La taille totale des séquences protéiques en aa est indiquée à droite des figures. Les domaines catalytiques sont schématisés en rectangle coloré en jaune (classe I), en claire (classe II) ou en vert claire (classe IV). Le pourcentage d'identité/similarité par rapport à Rpd3 (class I) ou Hda (classe II/IV) est indiqué. L'identité/similarité de séquence de Hda1 et HDAC11 est citée entre parenthèses. Les lignes épaisses représentent les domaines N- et C-terminal, similaires entre les HDAC de classe IIa. **S** : Serine; SE14 : *Ser-Glu-containing tetradecapeptide repeats*; Ac : acétylation; P : phosphorylation; S : sumoylation; Ub : ubiquitination. (Adaptée de Yang and Seto, 2008; Di Marcotullio et al., 2011).

III.4.2. Les complexes à activité HDAC

À l'exception de HDAC8, la majorité des HDAC recombinantes purifiées sont inactives, et sont retrouvées au sein de complexes répresseurs formés de plusieurs sous-unités (Bolden et al., 2006; Vannini et al., 2007). Dans ces complexes, différentes sous-classes de HDAC sont associées avec des corégulateurs spécifiques ainsi que d'autres

protéines impliquées dans la modification de la chromatine. Ces complexes ont pour fonction la définition de la spécificité des HDAC pour un gène ou un domaine chromatinien donné, la fixation à l'ADN puisque les HDAC sont dépourvues de structure leur permettant de le faire, la modulation de leur activité ainsi que le recrutement d'éléments indispensables à cette activité (Hayakawa and Nakayama, 2011).

III.4.3. Régulation de l'activité des HDAC

L'activité des HDAC peut être divisée en deux parties : l'activité enzymatique (la capacité à déacétyler des protéines histones ou non histones) et l'activité fonctionnelle (la capacité de réguler la transcription ainsi que d'autres fonctions biologiques indépendamment de leur activité enzymatique). Ces activités peuvent être contrôlées à différents niveaux : recrutement dans différents complexes corépresseurs, interactions protéine-protéine, localisation intracellulaire, dégradation par le système de protéasome, modifications post-traductionnelles, expression génique ainsi que la régulation par des cofacteurs métaboliques (Gallinari et al., 2007; Sengupta and Seto, 2004).

Les HDAC existent dans des complexes protéiques qui peuvent affecter leur activité biologique. Par exemple, des expériences de reconstitution *in vitro* ont montré que l'activité des HDAC4, 5 et 7 dépend de leur association au complexe NCoR (*nuclear receptor co-repressor*)/SMRT (*silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors*)-HDAC3. Dans le cadre de ce dernier, les trois HDAC montrent cependant, une faible activité catalytique (Fischle et al., 2002). Il apparaît en effet que les HDAC de la sous-classe IIa régulent la transcription non pas grâce à leur activité enzymatique intrinsèque, mais plutôt via des effets fonctionnels. Elles peuvent, notamment par l'intermédiaire leur domaine de régulation N-terminal, lier et inhiber directement des facteurs de transcription spécifiques. Elles peuvent aussi recruter des corépresseurs et/ou des enzymes qui, à leur tour, agissent sur leurs cibles (Gallinari et al., 2007). La faible activité de cette sous-classe peut être reliée au remplacement dans leur domaine catalytique d'un résidu tyrosine par une histidine (Lahm et al., 2007).

En dehors de leur activité, les HDAC peuvent aussi être régulées à d'autres niveaux comme l'expression tissu spécifique des HDAC II (Verdin et al., 2003), ou l'épissage alternatif de HDAC9 (Zhou et al., 2001).

III.4.4. Les cibles non histones des HDAC

L'étude des profils d'expression des gènes par la technique des biopuces d'ADN a montré que relativement un faible pourcentage de gènes est influencé sous l'action des inhibiteurs des HDAC (Glaser et al., 2003; Mariadason et al., 2000). Il est clair aujourd'hui que les HDAC régulent en plus de la chromatine, un éventail de protéines non histones, à travers le contrôle de leur niveau d'acétylation. Plusieurs auteurs ont qualifié de ce fait les HDAC de « protéine déacetylases (PDAC) » ou « lysine deacetylases (KDAC) ». Différentes protéines cibles des HDAC ont été identifiées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* : facteurs et régulateurs de la transcription, médiateurs des signaux de transduction, enzymes de réparation de l'ADN, régulateurs de l'import nucléaire, protéines chaperonnes, protéines de structure, médiateurs inflammatoires, et des protéines virales.

Les conséquences fonctionnelles de l'acétylation/déacétylation des protéines non histones incluent des effets positifs ou négatifs à plusieurs niveaux comme le résume le **Tableau III** (Spange et al., 2009).

L'activité de liaison à l'ADN et les effets qui en résultent comme l'expression génique, la rétention nucléaire ou cytoplasmique, et les interactions entre partenaires protéiques, ont été rapportées pour de nombreux facteurs de transcription. Par exemple, l'acétylation de K221 (lysine 221) de la sous-unité p65 de NF- κ B est liée à une augmentation de la fixation à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, celui de K310 à seulement l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Chen et al., 2002). Les effets de l'acétylation de NF- κ B sont encore plus complexe, puisque l'acétylation des sites K122 et K123 par p300 et PCAF (*p300/CBP-associated factor*), deux membres des HAT, réduit la liaison à l'ADN de NF- κ B, avec comme conséquence, une augmentation de sa liaison à I κ B (*inhibitor of κ B*) et de son export nucléaire (Kiernan et al., 2003). Les HDAC, notamment de la classe I et SIRT1, catalysent la déacétylation de p65, engendrant des effets opposés à ceux induits par l'acétylation (Ashburner et al., 2001; Kiernan et al., 2003; Yeung et al., 2004).

Tableau III : Acétylation des protéines non histones. Liste non exhaustive des protéines non histones acétylées et les conséquences fonctionnelles de leur acétylation. (Adapté de Spange et al., 2009).

Implication biologique	Protéines affectées par l'acétylation	
Stabilité protéique	<u>L'acétylation augmente la stabilité</u> : p53, p73, Smad7, c-Myc, Runx3	<u>L'acétylation diminue la stabilité</u> : GATA1, HIF-1 α , pRb
Liaison à l'ADN	<u>Augmentation de la liaison à l'ADN</u> : p53, STAT3, GATA, E2F1, p50 (NF- κ B), p65 (NF- κ B), c-Myb, MyoD	<u>Diminution de la liaison à l'ADN</u> : p65 (NF- κ B)
Expression génique	<u>Activation transcriptionnelle</u> : p53, HMG-A1, STAT3, GATA, MyoD, E2F1, p65 (NF- κ B), β -Catenin, Sp1	<u>Inactivation transcriptionnelle</u> : HIF-1 α , STAT1
Interaction protéique	<u>Augmentée</u> : STAT3, α -Tubulin, actin, cortactin	<u>Réduite</u> : p65 (RelA), Ku70, Hsp90
Localisation	<u>Ac \rightarrow noyau</u> : PCAF, SRY	<u>Ac \rightarrow cytoplasme</u> : p300, PAP
Stabilité de l'ARNm	<u>Augmentée</u> : p21, Brm	<u>Diminuée</u> : Tyrosinhydrolase (Th), eNOS
Activité enzymatique	<u>Augmentée</u> : p300	<u>Diminuée</u> : PTEN, HDAC1, Mdm2
Protéines mitochondriales	ACS (Ac-CoA-Synthetase), Sod1/2, Thiorédoxine	
Protéines virales	HIV Tat, SV40 T-Ag	

L'acétylation/déacétylation des protéines non histones régule également la stabilité protéique et donc leur demi-vie, par compétition avec l'ubiquitination qui s'opère sur le même résidu lysine (Sadoul et al., 2008). Les HDAC peuvent induire la dégradation des protéines et accélérer leur turnover, alors que les HAT les protégeraient (Caron et al., 2005). Certaines HDAC font partie de complexes à activité ubiquitinase, et posséderaient même une activité ubiquitinase intrinsèque (Ito et al., 2002). La stabilité protéique peut aussi résulter des changements conformationnels qui empêchent l'ubiquitination de s'opérer, ou bien des interactions avec des protéines partenaires qui masquent le site

d'ubiquitination. Ceci est le cas du facteur de régulation du cycle cellulaire E2F1 (*E2 transcription factor 1*), dont l'acétylation permet son interaction avec son inhibiteur Rb (*retinoblastoma protein*), et une augmentation de sa stabilité en conséquence (Galbiati et al., 2005; Ianari et al., 2004).

Pour certains événements cellulaires, l'action des HAT/HDAC est associée à une perte/maintien de la stabilité protéique respectivement (Spange et al., 2009). Les mécanismes mis en jeu impliquent notamment des E3 ubiquitine ligases dont l'affinité devient plus élevée après l'acétylation du facteur concerné. Cet effet peut résulter aussi indirectement de la modulation de l'activité de protéines régulatrices comme les chaperonnes. L'exemple type est celui de l'acétylation du site K294 de la protéine chaperonne HSP90 (*heat-shock protein 90*), qui réduit l'association HSP90/protéines clientes et accélère la dégradation de celles-ci. L'HDAC6 prévient ses événements en déacétylant HSP90 (Bali et al., 2005; Scroggins et al., 2007).

III.4.5. Fonctions biologiques des HDAC et pathologies

Les HDAC sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, incluant le développement, le métabolisme cellulaire, la prolifération, la différenciation ainsi que la mort cellulaire. La présence de nombreuses HDAC chez les mammifères reflète une diversification fonctionnelle dans différents tissus et processus biologiques, avec l'existence d'une certaine part de redondance.

Par ailleurs, le déséquilibre entre l'acétylation et la déacétylation des histones joue un rôle important dans le développement de pathologies. Ainsi, la perte de l'acétylation associée à une hyperméthylation locale de l'ADN, est une caractéristique bien connue des cellules cancéreuses. Les altérations structurales directes des HDAC sont rares, contrairement aux délétions, translocations et mutations ponctuelles qui affectent les gènes HAT (Riester et al., 2007). Cependant, les HDAC sont recrutées d'une manière aberrante aux promoteurs par les protéines de fusion de liaison à l'ADN, résultant de translocation chromosomique, et par les facteurs de transcription répresseurs surexprimés et qui sont physiquement associés aux HDAC (Minucci and Pelicci, 2006). Le déséquilibre HAT/HDAC est aussi associé à de nombreuses maladies inflammatoires où l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs de ces

enzymes dans des modèles animaux et dans certains cas chez l'homme a entraîné des changements dans l'évolution de ces pathologies (Dinarello et al., 2011).

III.4.5.1. Fonctions/pathologies des HDAC de classe I

Les HDAC de classe I jouent un rôle important dans la prolifération et la survie cellulaire. Les HDAC1 et 2 sont des protéines fortement homologues (82% d'identité en aa) (de Ruijter et al., 2003), et ont de ce fait une redondance dans de nombreuses fonctions biologiques, en particulier dans le système nerveux et cardiaque (Haberland et al., 2009c; Montgomery et al., 2007). Un effet compensatoire a également été observé dans le cycle cellulaire, la mort cellulaire (Haberland et al., 2009a), la différenciation des précurseurs neuronaux (Montgomery et al., 2009) ainsi que dans le système hématopoïétique (Wilting et al., 2010). Les HDAC1 et 2 ont, cependant, des fonctions qui leur sont propres à chacune, et sont de ce fait requises toutes les deux surtout lors de certaines étapes clés du développement comme la gastrulation. Les souris invalidées pour les gènes codant pour HDAC1 ou HDAC2 meurent avant la naissance et 24h après, respectivement (Montgomery et al., 2007). Récemment, une étude a montré que HDAC1, mais non pas HDAC2, contrôle la différenciation des cellules souches embryonnaires (Dovey et al., 2010).

Concernant HDAC3, elle intervient dans la progression du cycle cellulaire, la réponse aux dommages de l'ADN (Bhaskara et al., 2008) ainsi que dans l'assemblage du fuseau mitotique et la cohésion des chromatides sœurs. Les souris invalidées pour le gène de HDAC3 meurent à un stade embryonnaire précoce de développement, alors qu'une délétion conditionnelle de HDAC3 affecte le métabolisme lipidique, induit une hypertrophie des hépatocytes ou du cœur, et conduit à la mort des souris après quelques mois de naissance (Bhaskara et al., 2008; Knutson et al., 2008; Montgomery et al., 2008).

Aussi bien HDAC1, 2 que HDAC3 sont surexprimées dans plusieurs cancers solides et hématologiques (Bolden et al., 2006; Karagianni and Wong, 2007).

Par rapport aux autres membres de classe I, HDAC8 possède des fonctions plus spécifiques (Gregoret et al., 2004). Elle contrôlerait le développement du crâne en réprimant des facteurs de transcription dans les cellules de la crête neurale crânienne (Haberland et al., 2009b). L'HDAC8 jouerait également un rôle dans les cellules musculaires lisses, où elle est associée avec α -actine, et est essentielle à la capacité contractile de ces cellules

(Waltregny et al., 2005). Récemment, une relation a été rapportée entre la surexpression de HDAC8 et le degré de sévérité du neuroblastome, une tumeur qui touche les cellules de la crête neurale chez les enfants (Oehme et al., 2009).

III.4.5.2. Fonctions/pathologies des HDAC de classe II

Les HDAC II ont une activité limitée par rapport à celles de la classe I (Fischle et al., 2002). Celles du sous-groupe IIa agissent comme corépresseur transcriptionnel grâce à leur domaine de répression, en coopérant avec d'autres corépresseurs ou en se fixant directement sur des facteurs de transcription (Yang and Gregoire, 2005).

Les souris dont le gène de HDAC4 a été invalidé montrent une hypertrophie des chondrocytes et meurent durant les 10 jours suivant la naissance, à cause d'un excès d'ossification, néfaste pour la respiration. L'HDAC4 jouerait donc un rôle central dans la formation du squelette (Vega et al., 2004).

Les souris invalidées pour les gènes des HDAC5 ou 9 sont viables mais montrent des dysfonctionnements cardiaques sévères incluant l'hypertrophie et la fibrose (Chang et al., 2004; Zhang et al., 2002).

Les souris invalidées pour les gènes de HDAC7 meurent au stade embryonnaire, du fait d'une perte de la vascularisation (Chang et al., 2006). L'HDAC7 régule l'intégrité des vaisseaux sanguins en interagissant avec MEF2, un activateur direct de l'expression de la MMP-10 et un régulateur essentiel de développement des vaisseaux sanguins. Cette interaction conduit à une réduction de l'expression de la MMP-10 et une surexpression de TIMP-1 (Chang et al., 2006). L'HDAC7 interviendrait aussi dans le développement des cellules T, où elle favoriserait la sélection positive (Dequiedt et al., 2003), et dans le catabolisme du cholestérol en inhibant CYP7A1 (Mitro et al., 2007). Cette dernière fonction, fait de HDAC7 une cible potentielle dans le traitement de maladies liées au cholestérol telles que l'hypercholestérolémie.

Les souris invalidées pour le gène de HDAC6 survivent avec absence de phénotype, excepté une augmentation du niveau d'acétylation de la tubuline (Zhang et al., 2008b). L'HDAC6 est impliquée dans des processus biologiques importants reliés au réseau des microtubules, tels que la migration cellulaire et la dégradation des protéines mal repliées. Elle utilise pour cela des mécanismes dépendants et indépendants de son activité

déacétylase. Du fait de ces fonctions, HDAC6 a été associée à de nombreuses pathologies, notamment les troubles neurodégénératifs (Li et al., 2011).

Le second membre de la classe IIb, HDAC10, bien qu'il partage des similarités fonctionnelles avec HDAC6, exerce des fonctions différentes, même si très peu connues. Aucune étude n'a rapporté pour le moment la génération de souris délétées pour ce membre des HDAC. L'HDAC10 peut dans le noyau réprimer la transcription de gènes qui contrôlent le programme mélanogénique d'une manière indirecte, sans déacétyler les histones (Lai et al., 2010). Une association entre HDAC10 et le cancer a été aussi décrite (Osada et al., 2004).

Enfin, pour HDAC11, du fait de l'absence d'étude sur le phénotype de souris délétée pour son gène, sa fonction demeure peu connue. Les données disponibles montrent que HDAC11 est exprimée dans les cellules présentatrices d'antigènes où elle régule la balance entre l'activation et la tolérance immunitaire, en favorisant la première réponse par inhibition de l'expression de l'IL-10, cytokine immunosuppressive (Lian et al., 2011; Villagra et al., 2009; Wang et al., 2011). L'HDAC11 interviendrait en outre dans la différenciation oligodendrocytaire (Liu et al., 2009), et dans la régulation de la survie des cellules tumorales lors du lymphome d'Hodgkin (Buglio et al., 2011).

III.4.6. Régulation de l'expression des gènes de la COX-2 et iNOS par les HAT/HDAC

En plus des modes de régulation traités dans les parties II.1.3 et II.3.3, la COX-2 et la iNOS sont également régulées sur le plan épigénétique, en particulier par les enzymes HAT/HDAC. Ainsi, l'expression au niveau transcriptionnel de la COX-2 est associée à une augmentation du niveau d'acétylation des histones H3 et H4 (Nie et al., 2005; Park et al., 2004; Pero et al., 2011), et à une dissociation de HDAC1 de son promoteur (Cao et al., 2007; Pero et al., 2011). L'acétylation des histones par p300/PCAF, joue un rôle central dans l'activation de la COX-2. Ceci a été démontré au niveau des fibroblastes synoviaux OA (Farrajota et al., 2005), des fibroblastes de peaux humaines stimulées par le PMA (*phorbol myristate acetate*), l'IL-1 β ou le LPS, et des macrophages murins stimulés par le LPS. Cet effet est complètement aboli lorsque les cellules sont transfectées par HDAC1 (Deng et al., 2004). En plus de HDAC1, il a été rapporté que HDAC 3 (Subbaramaiah and

Dannenbergh, 2007), HDAC8 (Aung et al., 2006) et HDAC4 (Wang et al., 2008) peuvent aussi participer dans la répression transcriptionnelle de la COX-2. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu au cours de ce mode de régulation du gène de la COX-2, dont l'ouverture de la chromatine et peut être l'acétylation des composants de NF- κ B (Deng et al., 2004).

Plusieurs études ont également rapporté la régulation de la iNOS par l'acétylation/déacétylation des protéines histones et non histones. Certaines d'entre elles ont montré qu'au niveau des macrophages de souris RAW traitées avec le LPS et IFN γ , p300 est recrutée au niveau du promoteur de la iNOS, et que ceci induit l'acétylation de p50 et augmente l'activité de liaison à l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Deng and Wu, 2003; Granja et al., 2006).

III.5. Les inhibiteurs des histones déacétylases (iHDAC)

III.5.1. Classification des iHDAC

Il existe une grande diversité des iHDAC, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique. Leur utilisation a même précédé la découverte des HDAC, et a servi pour la purification et le clonage de celles-ci chez les mammifères. Six classes ont été décrites (**Figure 19**).

✓ **Les acides gras à courtes chaînes aliphatiques** : tels que le butyrate de sodium (NaBu), le phénylbutyrate (PB) et l'acide valproïque (VA). Les molécules de cette classe sont bien tolérées par les patients et sont métabolisées facilement. Elles sont cependant, du fait de leur courte chaîne, incapables d'établir un contact significatif au niveau de la poche catalytique des HDAC, d'où leur faible puissance et un IC₅₀ voisin du millimolaire (Johnstone and Licht, 2003). Elles inhibent les HDAC des classes I et II, excepté HDAC6 et 10, et présentent un temps de demi-vie court ($t_{1/2} = 6$ mn) (de Ruijter et al., 2003).

✓ **Les dérivés d'acides hydroxamiques** : comme l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA) et la trichostatine A (TSA). Cette classe est caractérisée par une puissance d'inhibition élevée (IC₅₀ de l'ordre de nM) (Blanchard and Chipoy, 2005). La TSA, de même que le SAHA, inhibent toutes les HDAC des classes I et II, avec une faible efficacité contre HDAC8 (Khan et al., 2008).

✓ **Les tétrapeptides cycliques** : comme la trapoxine (TPX), la dépuécine et le depsipeptide (FK228). Ils sont doués d'une puissance d'inhibition élevée (IC_{50} de l'ordre de nM) et ont une structure qui est la plus complexe parmi les iHDAC (Gallinari et al., 2007). La trapoxine inhibe fortement et irréversiblement les HDAC (Kijima et al., 1993).

✓ **Les Benzamides** : tel que MS-275. Ils présentent une demi-vie de 45-100 h et une puissance d'inhibition modérément élevée (IC_{50} de l'ordre de μ M) (Gallinari et al., 2007). Le MS-275 inhibe HDAC1, 2, 3 et 9 mais est inactif contre HDAC4, 6, 7 et 8 (Khan et al., 2008). Le MGCD0103 est un autre benzamide, qui agit spécifiquement contre les HDAC des classes I et IV (Le Tourneau and Siu, 2008).

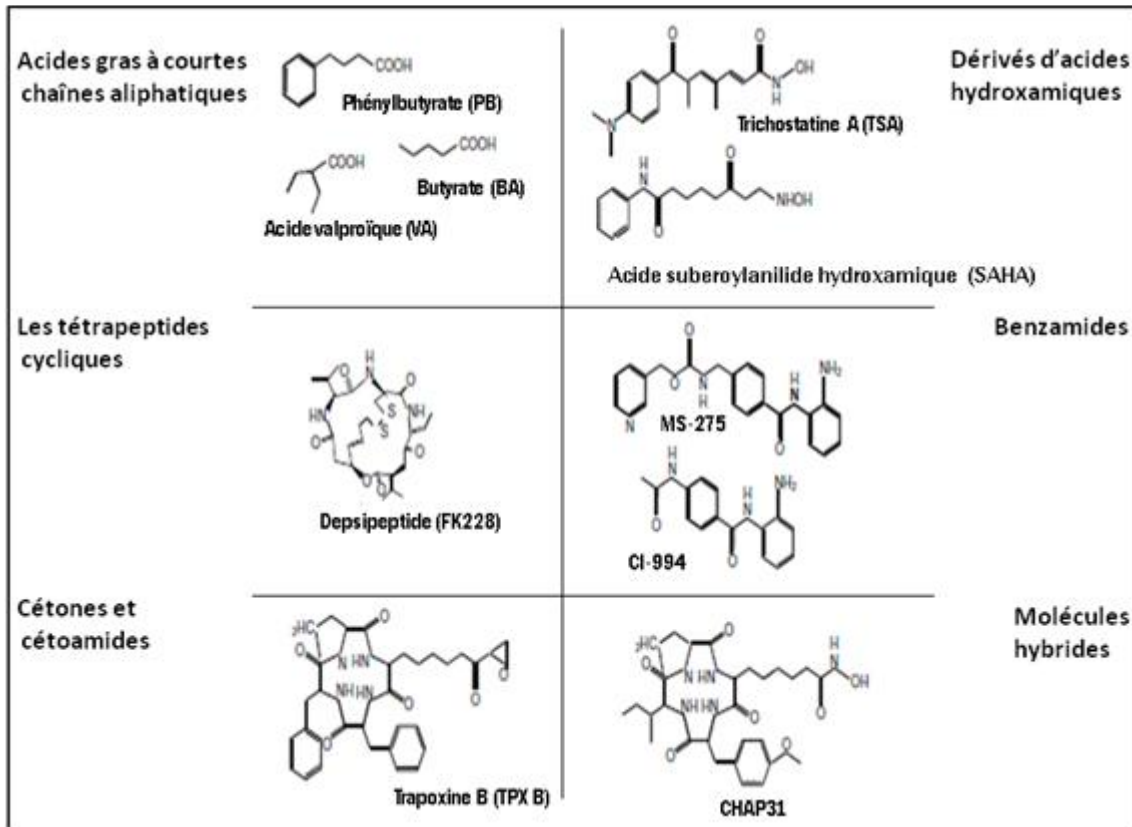


Figure 19 : Structures chimiques des principaux iHDAC employés *in vitro* et *in vivo*. Les iHDAC sont réparties en 6 groupes. Le SAHA et le depsipéptide sont approuvés pour le traitement anti-tumoral. (Adaptée de Ellis and Pili, 2010).

✓ **Les cétones et les cétoamides** : tels que les trifluorométhylcétones. Ils possèdent une faible capacité à inhiber les HDAC du fait de leur instabilité, puisqu'ils sont facilement réduits en alcools inactifs (Furumai et al., 2001; Gallinari et al., 2007).

✓ **Les molécules hybrides** : telles que CHAP31 et CHAP50. Il s'agit de molécules synthétiques formées de la combinaison de deux iHDAC différents. L'hybridation peut servir pour rendre la réaction réversible, à augmenter l'affinité pour les HDAC et à améliorer leur stabilité dans le sang (Hoshino and Matsubara, 2010).

III.5.2. Propriétés générales des iHDAC

La plupart des iHDAC sont des inhibiteurs compétitifs des HDAC de classe I, II et IV, et agissent en déplaçant le Zn^{+2} du site actif (Somoza et al., 2004; Vanommeslaeghe et al., 2005). Ils exercent leurs effets d'une manière réversible, excepté pour la dépudécine et la trapoxine qui se lient de façon covalente au site actif des HDAC (Furumai et al., 2001).

La structure cristallographique de *histone deacetylase-like protein*, l'homologue des HDAC de classe I des mammifères chez les bactéries, en complexe avec la TSA et le SAHA (Finnin et al., 1999), et celle de HDAC8 en complexe avec le SAHA (Somoza et al., 2004; Vannini et al., 2004) ont été résolues. Ces structures montrent que les iHDAC interagissent avec trois régions du site actif et ont, particulièrement ceux de la classe des acides hydroxamiques, des caractéristiques structurales communes : un domaine de reconnaissance hydrophobe très souvent aromatique qui interagit avec les résidus autour du site actif, un domaine de liaison linéaire alkyl, vinyl ou aryl, qui occupe le canal, et enfin un site de liaison au Zn^{+2} avec un groupe fonctionnel différent d'un iHDAC à un autre (Marks, 2010b; Miller et al., 2003) (**Figure 20**).

Les iHDAC diffèrent entre eux par le fait qu'ils n'induisent pas les mêmes événements d'acétylation. Par exemple, l'acétylation de HSP90 est induite par le SAHA mais non pas par MS-275, alors que l'inverse est observé pour l'acétylation de p53 (Norris et al., 2009). Ils diffèrent aussi par leur capacité à induire l'hyperacétylation ainsi que par leurs propriétés pharmacocinétiques.

Les iHDAC peuvent agir d'une manière non spécifique (*broad-spectrum* ou *pan-HDACi*) comme le font les acides hydroxamiques. Ils peuvent aussi agir d'une manière sélective contre un seul isoforme (*isoform-selective HDACi*), comme la tubactin qui inhibe

sélectivement HDAC6 (Haggarty et al., 2003), et PC-34051 qui inhibe HDAC8 (Marks, 2010a). Leur sélectivité peut aussi être dirigée contre plusieurs isoformes de la même classe HDAC (*class-selective HDACi*), comme MS-275 et VA qui inhibent les HDAC de classe I, bien qu'à haute concentration, ils peuvent aussi affecter les HDAC de classe II (Balasubramanian et al., 2009).

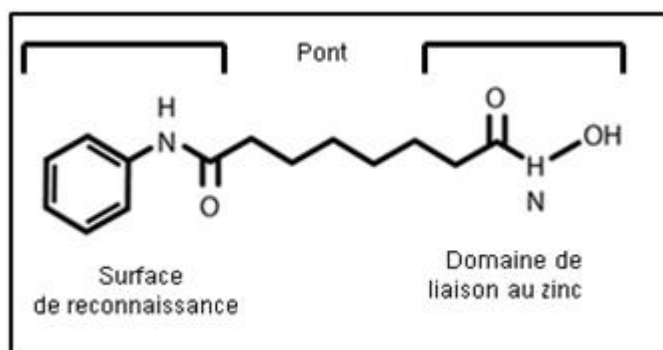


Figure 20 : Pharmacophore type des iHDAC. Le pharmacophore des iHDAC, représenté ici par un iHDAC à base d'acide hydroxamique, est constitué d'un domaine de reconnaissance hydrophobe, d'un domaine de liaison linéaire et d'un site de liaison de Zn^{2+} . (Adaptée de Marks, 2010c).

Enfin, il est intéressant de signaler que, comme pour les HDAC et les HAT, la nomination des iHDAC devrait aussi être reconsidérée. Des appellations comme les inhibiteurs des lysine déacétylases (iKDAC) ou plus simplement les inhibiteurs des déacétylases (iDAC) ont été proposées (Prince, 2010).

III.5.3. Mode d'action des iHDAC

Les iHDAC exercent leurs effets via la modulation de l'expression génique et indirectement en inhibant l'effet des HDAC sur les protéines non histones (Ellis and Pili, 2010). Des études transcriptomiques sur des cultures de lignées cellulaires ont démontré que les iHDAC modifient l'expression de 2 à 22% des gènes analysés, avec autant de gènes activés que réprimés (Chambers et al., 2003; Glaser et al., 2003; Peart et al., 2005). Chez les patients ayant reçu des iHDAC on observe également l'augmentation du niveau d'acétylation de plusieurs gènes bien que cela ne permet pas de conclure à une corrélation

entre l'acétylation des histones et les réponses cliniques, du fait du faible nombre des patients utilisés (Ellis et al., 2008b; Ellis and Pili, 2010; Schrump et al., 2008).

L'effet des iHDAC dépendrait de plusieurs facteurs, dont le stade et le type cellulaire, l'inhibiteur lui-même, la concentration et le temps d'exposition, ainsi que le contexte cellulaire (état normal ou pathologique des cellules) (Marks, 2010a). Le dernier point implique que les iHDAC n'agissent pas de la même manière selon que les cellules soient saines ou pathologiques (Qiu et al., 2000).

La **figure 21** résume certains des mécanismes d'action par lesquels les iHDAC agissent. Ces effets ont été étudiés surtout au niveau des lignées cellulaires cancéreuses, et dans divers modèles d'animaux porteurs de tumeurs. Ils sont à large spectre et cibleraient différentes fonctions cellulaires. Fait important, les iHDAC induisent la sénescence et la mort cellulaire spécifiquement dans les cellules tumorales, alors que les cellules saines sont épargnées (Xu et al., 2007). La dérégulation des gènes qui participent dans les voies pro-apoptotiques, et leurs actions restreintes contre les cellules tumorales permet d'éviter les effets secondaires observés avec plusieurs médicaments utilisés en chimiothérapie.

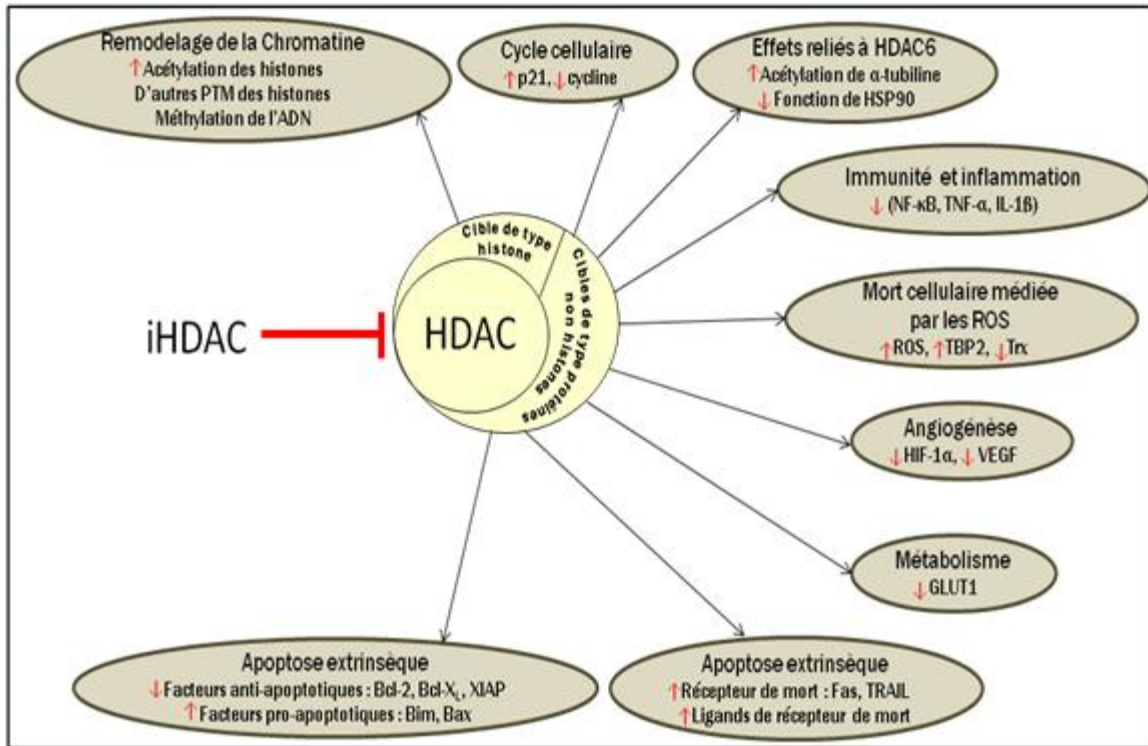


Figure 21 : Les mécanismes d'action des iHDAC et les voies affectées. Les iHDAC exercent leurs actions par des mécanismes impliquant des effets sur les histones et sur des protéines non histones mises en jeu dans diverses fonctions cellulaires, lors de pathologies inflammatoires ou de développement de cancer. (Adaptée de Xu et al., 2007; Lemoine and Younes, 2010).

III.5.4. Effets anti-inflammatoires des iHDAC

Il existe de plus en plus d'évidences que les iHDAC ont un potentiel thérapeutique contre des pathologies avec une composante inflammatoire qui est importante. En effet, plusieurs études ont montré que les iHDAC ont des propriétés anti-inflammatoires aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, dans une variété de modèles pathologiques, incluant ceux des maladies dégénératives du cerveau, des muscles et des articulations, les maladies auto-immunes, le diabète, les maladies inflammatoires de l'intestin ainsi que le rejet de greffe (Blanchard and Chipoy, 2005; Ververis and Karagiannis, 2011). Ainsi, l'inhibiteur ITF2357 (givinostat) supprime l'expression de TNF- α et de l'IFN- γ ainsi que la synthèse et

la sécrétion de l'IL-1 β au niveau des cellules mononuclées sanguines (Leoni et al., 2005). De même, la TSA inhibe la synthèse de l'IL-6 au niveau des fibroblastes et macrophages synoviaux, induite par le TNF- α ou l'IL-1 β (Grabiec et al., 2011). Le VA est capable d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires et des ROS, induites par le LPS au niveau des cellules de la microglie (Peng et al., 2005). *In vivo*, dans le modèle animal d'arthrite à adjuvant chez le rat, l'utilisation de la TSA ou de PB permet de diminuer l'inflammation locale, avec réduction de l'infiltration synoviale, prévention des érosions cartilagineuses et osseuses et inhibition de l'expression de TNF- α (Chung et al., 2003). Dans un modèle animal de lupus érythémateux, l'administration des inhibiteurs TSA ou SAHA déclenche des effets immuno-modulateurs, en réduisant la production des cytokines IL-12 et IL-23 par les cellules Th1 (*T-helper 1*) et Th17 ainsi que des chémokines par les cellules Th1 (Bosisio et al., 2008). De même, plusieurs iHDAC (SAHA, ITF2357 et VA) suppriment la réponse inflammatoire dans un modèle animal de colite chimiquement induite par le dextran sulfate de sodium.

IV. Hypothèse de recherche

L'OA est associée à des changements dans l'expression de plusieurs gènes. Ainsi, les gènes tels que ceux codant pour COX-2, iNOS, mPGES-1, IL-1 β , TNF- α et collagène de type I et III, qui sont normalement réprimés ou faiblement exprimés dans une articulation normale, s'expriment fortement. De même, les gènes qui s'exprimaient dans l'articulation saine, deviennent réprimés ou faiblement exprimés (gènes codant pour l'aggrécane et le collagène de type II par exemple). Plusieurs modes de régulation gouvernent ces changements. Parmi elles, les modifications épigénétiques sont fortement incriminées. L'acétylation/déacétylation des histones est la modification épigénétique la plus étudiée. Les recherches des deux précédentes décennies ont permis le développement d'inhibiteurs des HDAC, ce qui a accéléré les découvertes concernant la fonction de ces enzymes. Les HDAC sont de plus en plus mises en jeu dans la pathogenèse de nombreux désordres inflammatoires et immunologiques, ce qui a ouvert la voie à des essais cliniques ciblant ces enzymes. L'OA, bien que n'est pas classée comme une maladie inflammatoire dans le sens classique du terme, renferme une composante inflammatoire qui entretient et accentue le processus arthrosique. Les enzymes COX-2, mPGES-1 et iNOS sont les éléments clés de ce phénomène, et assument une partie des changements phénotypiques et biochimiques qui affectent le cartilage et la MS. La régulation de ces enzymes se fait à plusieurs niveaux. Des études effectuées ces dernières années ont montrées que l'expression de ces enzymes peut aussi être régulée par le processus d'acétylation.

L'objectif de cette thèse est de déterminer, au niveau des chondrocytes et les fibroblastes synoviaux, si les enzymes COX-2, mPGES-1 et iNOS sont régulées au niveau épigénétique par les HDAC, les conséquences de cette régulation sur la synthèse de la MEC (au niveau du cartilage OA), et de rechercher les HDAC mises en jeu dans cette régulation (au niveau des synoviocytes OA). Les iHDAC sont l'outil le plus employé dans l'étude des HDAC. Nous avons alors, comme autre objectif, de rechercher les mécanismes moléculaires par les quels ces inhibiteurs agissent. Les résultats de ces travaux nous permettront d'approfondir nos connaissances sur la régulation des enzymes COX-2, mPGES-1 et iNOS dans les tissus articulaires, et pourront également avoir un impact sur le plan clinique.

Articles

Article 1

Histone deacetylase inhibitors suppress interleukin-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production in human chondrocytes

Nadir Chabane¹, Nadia Zayed¹, Hassan Afif¹, Leandra Mfuna-Endam¹, Mohamed Benderdour², Christelle Boileau¹, Johanne Martel-Pelletier¹, Jean-Pierre Pelletier¹, Nicolas Duval³, and Hassan Fahmi¹.

¹Address: Osteoarthritis Research Unit, Notre-Dame Hospital, CR-CHUM, 1560 Sherbrooke Street East, Pavillon J.A. DeSève, Y-2628, Montreal, QC, Canada, H2L 4M1. Tel: 514 890 8000 ext 25119, Fax: 514 412 7583.

Keywords: chondrocytes, nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), Prostaglandin E₂ (PGE₂), cyclooxygenase-2 (COX-2), histone deacetylases (HDAC), nuclear factor- κ B (NF- κ B).

Publié dans: *Osteoarthritis and Cartilage* 16(10):1267-74 (2008).

Pour cette première publication, j'ai réalisé toutes les expériences. J'ai également participé à l'analyse des résultats, la rédaction et la préparation des figures.

Abstract

Objective: Overproduction of nitric oxide (NO) and prostaglandin (PG) E₂ plays an important role in the pathogenesis of osteoarthritis (OA). In the present study, we determined the effect of trichostatin A (TSA) and butyric acid (BA), two histone deacetylase (HDAC) inhibitors, on NO and PGE₂ synthesis, inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 expression, and NF-κB DNA-binding activity, in interleukin-1β (IL-1)-stimulated human OA chondrocytes, and on IL-1-induced proteoglycan degradation in cartilage explants.

Methods: Chondrocytes were stimulated with IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA or BA. The production of NO and PGE₂ was evaluated using Griess reagent and an enzyme immunoassay, respectively. The expression of iNOS and COX-2 proteins and mRNAs were evaluated using Western blotting and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. Proteoglycan degradation was measured with dimethylmethylene blue assay. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was utilized to analyze the DNA binding activity of NF-κB.

Results: HDAC inhibition with TSA or BA resulted in a dose-dependent inhibition of IL-1-induced NO and PGE₂ production. IL-17- and tumor necrosis factor-α(TNF-α)-induced NO and PGE₂ production was also inhibited by TSA and BA. This inhibition correlated with the suppression of iNOS and COX-2 protein and mRNA expression. TSA and BA also prevented IL-1-induced proteoglycan release from cartilage explants. Finally, we demonstrate that the DNA-binding activity of NF-κB, was induced by IL-1, but was not affected by treatment with HDAC inhibitors.

Conclusions: These data indicate that HDAC inhibitors suppressed IL-1-induced NO and PGE₂ synthesis, iNOS and COX-2 expression, as well as proteoglycan degradation. The suppressive effect of HDAC inhibitors is not due to impaired DNA-binding activity of NF- κ B. These findings also suggest that HDAC inhibitors may be of potential therapeutic value in the treatment of OA.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disorder and a leading cause of disability among the elderly population. It is characterized by progressive degenerative structural changes in articular cartilage, leading to loss of joint function. It is also characterized by excessive production of several inflammatory mediators [1-3]. Among these mediators, the proinflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1) plays a pivotal role in the pathophysiology of OA. It induces a cascade of inflammatory and catabolic events in chondrocytes including the synthesis of prostaglandin (PG) E₂ and nitric oxide (NO). IL-1 also alters chondrocyte anabolism by suppressing the synthesis of proteoglycan and collagen and by enhancing the production of matrix metalloproteinases (MMPs) [1-3].

NO is synthesized from L-arginine by a family of NO synthases of which three isoforms have been identified. Neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS) are constitutively expressed, while the inducible NOS (iNOS) is expressed following stimulation with a variety of inflammatory agents such as endotoxins or cytokines [4]. NO promotes inflammation by enhancing the production of inflammatory cytokines [5] and PGE₂ [6] and by reducing the synthesis of endogenous IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) [7]. NO is also considered a potent catabolic agent in OA since it inhibits collagen and proteoglycan synthesis [8,9], stimulates the production and activation of MMPs [10] and induces chondrocyte apoptosis [11]. Accordingly, the in vivo selective inhibition of iNOS in an experimental model of OA reduces the joint structural changes and the expression of several inflammatory and catabolic factors, including IL-1 and MMP-1 [12].

The biosynthesis of PGE₂ from arachidonic acid (AA) involves multiple enzymes including, cyclooxygenases (COX). Two isoforms of COX have been identified: COX-1 is

constitutively expressed in most tissues, whereas COX-2 is induced by various stimuli such as endotoxins, growth factors and pro-inflammatory cytokines [13]. PGE₂ is the most abundant prostanoid in arthritic joint and one of the major catabolic mediators involved in cartilage resorption. PGE₂ elicits cartilage resorption by enhancing the activation and production of MMPs and the degradation of cartilage matrix components [14,15] and by promoting chondrocyte apoptosis [16]. In addition PGE₂ mediates pain responses and potentiates the effects of other inflammatory mediators [13].

Acetylation and deacetylation of nucleosomal histones play an important role in the regulation of gene expression [17,18]. The histone acetylation status is controlled by the opposing actions of two classes of enzymes: histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Acetylation of histones loosens nucleosomal structures, thereby promoting gene transcription. In contrast, deacetylation of histones stabilizes nucleosomal structures and represses gene transcription [17,18]. However, emerging evidence indicates that gene regulation by acetylation/deacetylation is more dynamic and complex, and that HATs can act as repressors and HDAC as activators of transcription. Indeed, global analysis of gene expression has shown that inhibition of HDAC activity results both in induction and repression of gene expression [19-24].

In recent years, significant interest has emerged in the inhibition of HDAC activity as a possible anticancer treatment. HDAC inhibitors induce growth arrest, differentiation and apoptosis of cancer cells in vitro and reduce the growth of experimental tumors in vivo [25,26]. Presently, several HDAC inhibitors are in clinical trials for the treatment of solid and hematological tumors [27,28]. In addition to their anti-cancer effects, recent studies have demonstrated that HDAC inhibitors modulate inflammatory responses. For instance,

HDAC inhibitors reduce the production of IL-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN γ) in LPS-stimulated human peripheral blood mononuclear cells [29,30]. Likewise, HDAC inhibitors prevent LPS-induced production of TNF- α , IL-6 and reactive oxygen species in neuroglia cultures, and primary microglia [31-33]. HDAC inhibitors have also been reported to suppress IL-12 production in dendritic cells and macrophages [34]. However, it is currently unknown whether HDAC inhibitors regulate inflammatory responses in articular chondrocytes.

Since excessive production of the inflammatory mediators NO and PGE₂ plays an important role in the pathogenesis of OA, we assessed the effect of two HDAC inhibitors, trichostatin A (TSA) and butyric acid (BA), on the production of NO and PGE₂ in primary cultured human chondrocytes stimulated with IL-1. We additionally analyzed the expression of iNOS and COX-2 as well as the binding activity of transcription factor NF- κ B.

Materials and methods

REAGENTS

Recombinant human (rh) IL-1 β was obtained from Genzyme (Cambridge, MA), rhTNF- α and rhIL-17 were from R&D Systems (Minneapolis, MN). Trichostatin A and butyric acid 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 from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). All other chemicals were purchased from either Sigma-Aldrich Canada or Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada).

SPECIMEN SELECTION AND CHONDROCYTE CULTURE

Human normal cartilage (from femoral condyles) was obtained at necropsy, within 12 hours of death, from donors with no history of arthritic disease ($n = 7$, mean \pm SD age: 54 ± 16 years). To ensure that only normal tissue was used, cartilage specimens were thoroughly examined both macroscopically and microscopically. Only those with no alterations were further processed. Human OA cartilage samples from femoral condyles and tibial plateaus were obtained from OA patients undergoing total knee replacement ($n = 47$, mean \pm SD age: 66 ± 12 years). All OA patients were diagnosed according to the criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA [35]. At the time of surgery, the patients had symptomatic disease requiring medical treatment in the form of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or selective COX-2 inhibitors. Patients who had received intraarticular injections of steroids were excluded. The Clinical Research Ethics Committee of Notre-Dame Hospital approved the study protocol and the use of human articular tissues.

Chondrocytes were released from cartilage by sequential enzymatic digestion as previously described [36]. In brief, this consisted of 2 mg/ml pronase for 1 hour followed by 1 mg/ml collagenase (type IV; Sigma-Aldrich) for 6 hours at 37°C in DMEM and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin). The digested tissue was briefly centrifuged and the pellet was washed. The isolated chondrocytes were seeded at high density in tissue culture flasks and cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS. At confluence, the chondrocytes were detached, seeded at high density, and allowed to grow in DMEM, supplemented as above. The culture medium was changed every second day, and 24 hours before the experiment the cells were incubated in fresh medium containing 0.5% FCS. Only first passaged chondrocytes were used.

NO AND PGE₂ DETERMINATIONS

The nitrite levels, used as an indicator of NO production, were determined using the Griess assay as previously described [36]. The levels of PGE₂ were determined using a PGE₂ enzyme immunoassay from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). The detection limit and sensitivity was 9 pg/ml. All assays were performed in duplicate

WESTERN BLOT ANALYSIS

Chondrocytes were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, and 1 mM NaF). Lysates were sonicated on ice and centrifuged at 12000 rpm for 15 min. The protein concentration of the supernatant was determined using the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL). Twenty µg of total

cell lysate was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After blocking in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, and 5% (w/v) non-fat dry milk, blots were incubated overnight at 4°C with the primary antibody and washed with a tris buffer (Tris-buffered saline (TBS) pH 7.5, with 0.1% Tween 20). The blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Pierce), washed again, incubated with SuperSignal Ultra Chemiluminescent reagent (Pierce), and exposed to Kodak X-Omat film (Eastman Kodak Ltd, Rochester, NY).

RNA EXTRACTION AND REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION

Total RNA from stimulated chondrocytes was isolated using the TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To remove contaminating DNA, isolated RNA was treated with RNase-free DNase I (Ambion, Austin, TX). The RNA was quantitated using the RiboGreen RNA quantitation kit (Molecular Probes, Eugene, OR), dissolved in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated-H₂O and stored at -80°C until use. One µg of total RNA was reverse-transcribed using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, ON, Canada) as detailed in the manufacturer's guidelines. One fifth of the reverse transcriptase reaction was analyzed by real-time PCR as described below. The following primers were used: iNOS, sense 5'-ACATTGATGAGAAGCTGTCCCAC-3' and antisense 5'-CAAAGGCTGTGAGTCCTGCAC-3'; COX-2, sense 5'-TGTGTTGACATCCAGATCAC-3' and antisense 5'-ACATCATGTTTGAGCCCTGG-3';

and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), sense 5'-
 CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' and antisense 5'-
 GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG -3'.

REAL-TIME PCR

Real-time PCR analysis was performed in a total volume of 50 μ l containing template DNA, 200 nM of sense and antisense primers, 25 μ l of SYBR[®] Green master mix (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) and uracil-N-glycosylase (UNG, 0.5 Unit, Epicentre Technologies, Madison, WI). After incubation at 50°C for 2 min (UNG reaction), and at 95°C for 10 min (UNG inactivation and activation of the AmpliTaq Gold enzyme), the mixtures were subjected to 40 amplification cycles (15 sec at 95°C for denaturation and 1 min for annealing and extension at 60°C). Incorporation of SYBR[®] Green dye into PCR products was monitored in real time using a GeneAmp 5700 Sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) allowing determination of the threshold cycle (C_T) at which exponential amplification of PCR products begins. 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).

Relative mRNA expression in chondrocytes was determined 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 housekeeping gene GAPDH from the C_T value for each sample. A $\Delta\Delta C_T$ value was then calculated by subtracting the ΔC_T

value of the control (unstimulated cells) from the ΔC_T value of each treatment. Fold changes compared with the control 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 for each independent experiment.

PROTEOGLYCAN RELEASE

Cartilage proteoglycan degradation was assessed by measuring sulfated glycosaminoglycan (GAG) released into culture media using dimethyl methylene blue (DMMB) with chondroitin sulfate as a standard [37]. Results are expressed as μg of GAG released per mg cartilage.

NUCLEAR EXTRACT PREPARATION AND ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY

Nuclear extracts were prepared as previously described [38]. Briefly, chondrocytes were washed in ice-cold PBS and gently scraped in ice-cold hypotonic buffer containing 10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aprotinin, leupeptin, and pepstatin. The cells were allowed to swell on ice and the nuclei were recovered by brief centrifugation. The pellets were resuspended in high salt buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.2 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 25 % glycerol, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aprotinin, leupeptin, and pepstatin, followed by incubation on ice for 20 min.

The nuclear extracts were recovered by centrifugation and protein concentration was determined using the Bradford method (Bio-Rad). A synthetic double-stranded oligonucleotide containing the κ B consensus sequence 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' was end-labeled by T4 polynucleotide kinase in the presence of [γ - 32 P]ATP. The mutant competitor oligonucleotide had the following sequence with a one bp substitution (underlined): 5'-AGTTGAGGCGACTTTCCCAGGC-3'. The binding buffer consisted of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 4 % glycerol and 2.5 μ g poly (dI-dC). Binding reactions were conducted with 5 μ g nuclear extract and 100,000 cpm 32 [P]-labeled oligonucleotide probe at 22°C for 20 min in a final volume of 10 μ l. In supershift assays, the antibody to p65 (1 μ g/reaction) was incubated with the reaction mixture for 1 h at 4 °C before the addition of 32 [P]-labeled oligonucleotide. In cold competition assays, 50-fold molar excess of cold wild-type or mutant oligonucleotide was used. Binding complexes were resolved on non-denaturing 6% polyacrylamide gel electrophoresis in Tris-borate buffer system, after which the gels were fixed, dried, and subjected to autoradiography.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by the 2-tailed Student's t-test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

TSA AND BA ATTENUATE IL-1-INDUCED NO AND PGE₂ PRODUCTION IN HUMAN CHONDROCYTES.

Chondrocytes were stimulated with 100 pg/ml IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of two HDAC inhibitors, TSA and BA, and the production of NO was evaluated using Griess reagent. As shown in Fig. 1A, treatment with either TSA or BA suppressed IL-1-induced NO production in a dose-dependent manner. Similarly, the production of PGE₂ was dose-dependently suppressed in the presence of each HDAC inhibitor (Fig. 1B). In another set of experiments, we found that TSA and BA also dose-dependently inhibited IL-1-induced iNOS and COX-2 protein expression in normal chondrocytes (n = 3, data not shown). The observed inhibition was not a result of reduced cell viability as confirmed by the MTT assay (data not shown).

TSA AND BA INHIBIT TNF- α AND IL-17-INDUCED NO AND PGE₂ PRODUCTION.

The pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-17 also contribute to the pathogenesis of OA and are potent inducers of NO and PGE₂ production [1-3]. Therefore, we examined whether HDAC inhibition could also attenuate TNF- α and IL-17-induced NO and PGE₂ production. As shown in Fig. 2, stimulation of chondrocytes with TNF- α or IL-17 dramatically increased the production of NO and PGE₂. Interestingly, the induction of NO and PGE₂ production by TNF- α or IL-17 was almost completely abolished after treatment with TSA or BA. These data suggest that the suppressive effect of HDAC inhibitors was not specific to IL-1, and that HDAC inhibitors might target common pathways implicated in NO and PGE₂ production.

TSA AND BA DECREASE IL-1-INDUCED iNOS AND COX-2 EXPRESSION IN CHONDROCYTES.

To determine whether the inhibition of IL-1-induced NO and PGE₂ production is due to reduced iNOS, and COX-2 protein expression, the effects of HDAC inhibitors on the expression of both proteins were analyzed by Western blotting. Under basal conditions, iNOS and COX-2 proteins were undetectable and treatment with IL-1 resulted in a strong induction of both protein expression (Fig. 3). Consistent with their effects on NO and PGE₂ production, HDAC inhibitors prevented the induction of iNOS and COX-2 protein expression by IL-1, in a concentration-dependent manner (Fig. 3). The levels of β -actin and COX-1 were not influenced by IL-1 alone or in combination with each HDAC inhibitors (Fig. 3). IL-1-induced iNOS and COX-2 protein expression was also inhibited by TSA and BA in normal chondrocytes (n = 3; data not shown). As expected, the induction of iNOS and COX-2 proteins by TNF- α or IL-17 was also suppressed by each HDAC inhibitor (Fig. 4).

Next, we used real-time PCR to determine whether HDAC inhibitors modulate iNOS and COX-2 mRNAs induction. The relative expression level of each gene mRNA was plotted as fold changes over untreated control cells. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene expression was used for normalization. As expected, IL-1 induced a marked increase of both iNOS and COX-2 mRNA levels (Fig. 5). Treatment with either TSA or BA dose-dependently suppressed the induction of iNOS and COX-2 mRNA expression (Fig. 5), suggesting that HDAC inhibitors exert their effects at the

transcriptional level. Similar results were observed with normal chondrocytes (n = 3; data not shown).

TSA AND BA PREVENT IL-1-INDUCED PROTEOGLYCAN DEGRADATION IN CARTILAGE EXPLANTS.

To investigate the effect of HDAC inhibitors on IL-1-induced proteoglycan degradation, cartilage explants were incubated in DMEM with 10% FBS for 48 h and then transferred to medium containing 0.5% FBS and reincubated for an additional 48 h. Thereafter, the explants were stimulated with IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA or BA for 72 h, and GAG release into the supernatants was determined [37]. As shown in Fig. 6, IL-1-induced GAG release was inhibited in a dose-dependent manner by either TSA or BA.

TSA AND BA DO NOT IMPAIR NF- κ B BINDING TO THE iNOS AND COX-2 PROMOTERS.

The transcription factor NF- κ B, mainly composed of p50 and p65 dimers, plays a pivotal role in mediating the effects of IL-1 in chondrocytes [39,40]. Therefore, we performed EMSA to determine whether HDAC inhibitors modulate IL-1 effects by interfering with the DNA-binding activity of NF- κ B. Nuclear extracts from chondrocytes treated with IL-1 alone, or in combination with increasing concentrations of HDAC inhibitors for 1 h, were used for these assays. As shown in Fig. 7, IL-1 treatment induced a prominent increase in the DNA binding activity of NF- κ B. Interestingly, treatment with

each HDAC inhibitor did not decrease the DNA-binding activity of NF- κ B at any concentration point. The specificity of DNA binding was confirmed using unlabelled wild type and mutant oligonucleotides. The specificity was further evidenced using supershift assays and a specific anti-p65 antibody. Together these data suggest that HDAC inhibitors modulate IL-1 effects in chondrocytes without interfering with the DNA binding activity of NF- κ B.

Discussion

In the present study we demonstrated that inhibition of HDACs by two structurally unrelated HDAC inhibitors, TSA and BA, results in a dose-dependent suppression of IL-1-induced NO and PGE₂ production. The inhibition of NO and PGE₂ production was concomitant with the suppression of iNOS and COX-2 expression at both the protein and mRNA levels. We also showed that this inhibition is not associated with changes in NF- κ B DNA binding activity.

The effects of HDAC inhibition on the production of NO and the expression of iNOS have been examined in a few recent studies. Yu et al demonstrated that TSA inhibited IL-1- or LPS + IFN γ -induced NO production in mesangial cells and RAW 264.7 cells [41]. Leoni et al [29] showed that another HDAC inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), dose-dependently attenuated NO release from mouse peritoneal macrophages stimulated by the combination of TNF- α and IFN γ . Similarly, Larsen et al [42] found that TSA and SAHA prevented the production of NO and the expression of iNOS in the β cell line INS-1 and in intact rat islets treated with IL-1 + IFN γ [42]. On the other hand, TSA and SAHA have been shown to enhance LPS-induced production of NO in microglial cells [43], and butyrate was reported to increase the expression of iNOS and the production of NO in response to treatment with LPS + IFN γ in intestinal epithelial cells [44]. The reasons for these discrepancies are unclear but may be attributable to several factors including cell type and stimulation conditions. We also demonstrated that TSA and BA prevented IL-1-induced PGE₂ release in chondrocytes. Furthermore, TSA and BA suppressed IL-1-induced COX-2 expression at the mRNA and protein levels. These

findings are in agreement with previous studies showing that HDAC inhibitors prevented the induction of PGE₂ production and COX-2 expression in several cell types [45,46].

Pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-17 are also believed to contribute to the pathogenesis of OA and are strong inducers of NO and PGE₂ synthesis in chondrocytes [1-3]. Interestingly, HDAC inhibitors blocked the production of NO and PGE₂ in chondrocytes treated with either TNF- α or IL-17. Thus, the suppression of NO and PGE₂ synthesis by HDAC inhibitors is not specific to IL-1 and is independent of the nature of the stimulus that triggers NO and PGE₂ production.

Several studies have demonstrated that HDAC inhibitors suppress the production of a number of pro-inflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo*. For example, treatment with SAHA or ITF2357 decreased the release of IL-1, IL-12, TNF- α and IFN γ from LPS-stimulated human peripheral blood mononuclear cells [29,30]. TSA treatment was also reported to prevent the expression of IL-8 in Caco-2 cells [47] and of IL-12 in lung epithelial cells stimulated with LPS [48]. *In vivo*, SAHA dose-dependently reduced the circulating levels of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1, and IL-6 in an endotoxemia model [29]. In addition to their anti-inflammatory effects, HDAC inhibitors display chondroprotective properties. Indeed, we demonstrated here that treatment with TSA or BA prevents IL-1-induced proteoglycan degradation in cartilage explants. Moreover, Young et al [49] showed that HDAC inhibitors blocked the induction of several enzymes responsible for cartilage degradation, including MMP-1, MMP-13, ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motifs) -4, -5 and -9 and prevented cartilage degradation in an explant assay [49]. Together these data suggest that HDAC inhibitors may prevent cartilage destruction in arthritis. Indeed, HDAC inhibitors

prevent cartilage damage in models of adjuvant-induced arthritis [50] and autoantibody-mediated arthritis [51]. Protective effects of HDAC inhibitors on cartilage were also observed in collagen-induced arthritis models [52].

The transcription factor NF- κ B is important in the induction of iNOS and COX-2 by pro-inflammatory cytokines and stimuli in chondrocytes, and the 5'-flanking regions of both iNOS and COX-2 genes contain binding sites for NF- κ B [39,40]. In the present study, we demonstrated that IL-1 enhances the binding activity of NF- κ B p65. Interestingly, treatment with TSA or butyrate did not affect the binding activity of NF- κ B, suggesting that HDAC inhibitors influence NF- κ B-dependent gene expression down-stream of DNA binding in chondrocytes. These results are in accordance with previous reports showing that HDAC inhibitors did not affect the DNA-binding activity of NF- κ B in IL-1-stimulated mesangial cells [41], and Caco-2 cells [47], as well as in LPS-stimulated N9 microglia cells [43]. In contrast, other groups have reported that HDAC inhibitors reduced the DNA-binding activity of NF- κ B in A549 cells [53] and human colon cell lines [54] treated with proinflammatory cytokines. Several reasons may explain this dichotomy including the differences in time exposure to HDAC inhibitors and the model used.

There are a number of potential mechanisms by which HDAC inhibitors could inhibit IL-1-induced iNOS and COX-2 expression. First, HDAC inhibitors may down-regulate gene expression by altering local chromatin structure secondary to increased histone acetylation. Secondly, the suppressive effect of HDAC inhibitors could be mediated by hyperacetylation of transcription factors or signalling molecules that participate in IL-1-induced iNOS and COX-2 expression. Finally, gene products induced by HDAC inhibitors may also interfere with the signalling pathways involved in iNOS and COX-2 expression.

Regardless of the exact mechanism by which HDAC inhibitors down-regulate IL-1-induced NO and PGE₂ production, these results are very interesting from a pharmacological point of view since inhibitors of PGE₂ and NO production are a promising class of compounds with therapeutic potential for OA.

In conclusion, we have shown that HDAC inhibitors suppress IL-1-induced NO and PGE₂ production, iNOS and COX-2 expression as well as proteoglycan degradation. The mechanism by which HDAC inhibitors attenuate IL-1-effects is independent of the DNA binding activity of the transcription factor NF- κ B. These data also suggest that HDAC inhibitors represent a promising new class of compounds in the treatment of OA

List of abbreviations

BA, butyric acid; COX-2, cyclooxygenase-2; HDAC, histone deacetylase; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NO, nitric oxide; OA, osteoarthritis; PGE₂, prostaglandin E2; TNF- α , Tumor necrosis factor- α ; TSA, trichostatin A.

Acknowledgements

The authors thank Virginia Wallis for her assistance with the manuscript preparation. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-84282, and the Fonds de la Recherche du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). HF is a Research Scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

1. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001;44:1237-47.
2. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1916-26.
3. Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res* 2004;S37-46.
4. Scher JU, Pillinger MH, Abramson SB. Nitric oxide synthases and osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9:9-15.
5. McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996;184:1519-24.
6. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:7240-4.
7. Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:77-84.
8. Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF, et al. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1

mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J* 1997;324 (Pt 1):305-10.

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

10. Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, Takigawa M. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem (Tokyo)* 1998;123 :431-9.

11. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1266-74.

12. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998;41:1275-86.

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

14. Mehindate K, al-Daccak R, Dayer JM, Kennedy BP, Kris C, Borgeat P, et al. Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E2. Evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2. *J Immunol* 1995;155:3570-7.

15. Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, et al. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E₂ modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* 2002;46:1789-803.
16. Miwa M, Saura R, Hirata S, Hayashi Y, Mizuno K, Itoh H. Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E₂ through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:17-24.
17. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-80.
18. Urnov FD. Chromatin remodeling as a guide to transcriptional regulatory networks in mammals. *J Cell Biochem* 2003;88:684-94.
19. Chang S, Pikaard CS. Transcript profiling in *Arabidopsis* reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *J Biol Chem* 2005;280:796-804.
20. Reid G, Metivier R, Lin CY, Denger S, Ibberson D, Ivacevic T, et al. Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene* 2005;24:4894-907.
21. Bernstein BE, Tong JK, Schreiber SL. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13708-13.
22. Nawaz Z, Baniahmad C, Burriss TP, Stillman DJ, O'Malley BW, Tsai MJ. The yeast SIN3 gene product negatively regulates the activity of the human progesterone receptor and positively regulates the activities of GAL4 and the HAP1 activator. *Mol Gen Genet* 1994;245:724-33.

23. Mariadason JM , Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* 2000;60:4561-72.
24. Chambers AE, Banerjee S, Chaplin T, Dunne J, Debernardi S, Joel SP, et al. Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells. *Eur J Cancer* 2003;39:1165-75.
25. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:287-99.
26. Kortenhorst MS, Carducci MA, Shabbeer S. Acetylation and histone deacetylase inhibitors in cancer. *Cell Oncol* 2006;28:191-222.
27. Glaser KB. HDAC inhibitors: Clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol* 2007;74:659-71.
28. Piekarz RL, Sackett DL, Bates SE. Histone deacetylase inhibitors and demethylating agents: clinical development of histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 2007;13:30-9.
29. Leoni F, Zaliani A, Bertolini G, Porro G, Pagani P, Pozzi P, et al. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2995-3000.
30. Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee JK, Porro G, Pagani P, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med* 2005;11:1-15.

31. Peng GS, Li G, Tzeng NS, Chen PS, Chuang DM, Hsu YD, et al. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;134:162-9.
32. Huuskonen J, Suuronen T, Nuutinen T, Kyrylenko S, Salminen A. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *Br J Pharmacol* 2004;141:874-80.
33. Chen PS, Wang CC, Bortner CD, Peng GS, Wu X, Pang H, et al. Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience* 2007;149:203-12.
34. Bode KA, Schroder K, Hume DA, Ravasi T, Heeg K, Sweet MJ, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology* 2007;122:596-606.
35. Altman RD. Criteria for the classification of osteoarthritis of the knee and hip. *Scand J Rheumatol Suppl* 1987;65:31-9.
36. 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.
37. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986;883:173-7.

38. 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;279:22057-65.
39. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 1998;273:27467-73.
40. Lianxu C, Hongti J, Changlong Y. NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:367-76.
41. Yu Z, Zhang W, Kone BC. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2009-17.
42. Larsen L, Tonnesen M, Ronn SG, Storling J, Jorgensen S, Mascagni P, et al. Inhibition of histone deacetylases prevents cytokine-induced toxicity in beta cells. *Diabetologia* 2007;50:779-89.
43. Suuronen T, Huuskonen J, Pihlaja R, Kyrylenko S, Salminen A. Regulation of microglial inflammatory response by histone deacetylase inhibitors. *J Neurochem* 2003;87:407-16.
44. Stempelj M, Kedinger M, Augenlicht L, Klampfer L. Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate. *J Biol Chem* 2007;282:9797-804.

45. Tong X, Yin L, Joshi S, Rosenberg DW, Giardina C. Cyclooxygenase-2 regulation in colon cancer cells: modulation of RNA polymerase II elongation by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 2005;280:15503-9.
46. Yamaguchi K, Lantowski A, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. Histone deacetylase inhibitors suppress the induction of c-Jun and its target genes including COX-2. *J Biol Chem* 2005;280:32569-77.
47. Hoshimoto A, Suzuki Y, Katsuno T, Nakajima H, Saito Y. Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Br J Pharmacol* 2002;136:280-6.
48. Iwata K, Tomita K, Sano H, Fujii Y, Yamasaki A, Shimizu E. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, down-regulates interleukin-12 transcription in SV-40-transformed lung epithelial cells. *Cell Immunol* 2002;218:26-33.
49. Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, Jones D, Kevorkian L, Edwards DR, et al. Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R503-12.
50. Chung YL, Lee MY, Wang AJ, Yao LF. A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol Ther* 2003;8:707-17.
51. Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, et al. Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum* 2004;50:3365-76.

52. Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepscheux L, et al. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents . *Br J Pharmacol* 2007; 150:862-72.
53. Imre G, Gekeler V, Leja A, Beckers T, Boehm M. Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha receptor-1 down-regulation. *Cancer Res* 2006;66:5409-18.
54. Yin L, Laevsky G, Giardina C. Butyrate suppression of colonocyte NF- kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem* 2001;276:44641-6.

Figure Legends

Fig. 1. HDAC inhibitors TSA and BA prevent IL-1-induced NO and PGE₂ release from chondrocytes. Chondrocytes were stimulated with 100 pg/ml IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA or BA for 24 h. Conditioned media were collected and analyzed for NO (A) and PGE₂ (B) release. Results are expressed as percentage of control (i.e. cells treated with IL-1 alone) and are the mean ± SEM from four independent experiments. *, p<0.05 compared with cells treated with IL-1 alone.

Fig. 2. TSA and BA suppress TNF- α and IL-17-induced NO and PGE₂ production Chondrocytes were treated with TNF- α (1 ng/ml) or IL-17 (100 ng/ml) in the absence or presence of TSA (250 ng/ml) or BA (10 mM) for 24 h. Culture media were collected and analyzed for the production of NO (A) and PGE₂ (B). Results are expressed as mean ± SEM of three independent experiments. *, p<0.05 compared with cells treated with TNF- α or IL-17 alone.

Fig. 3. TSA and BA decrease IL-1-induced iNOS and COX-2 protein expression Chondrocytes were stimulated with 100 pg/ml IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA (A) or BA (B) for 24 h. Cell lysates were prepared and analyzed for iNOS and COX-2 protein expression by Western blotting. In the lower panels the blots were stripped and reprobbed with specific anti- β -actin or anti-COX-1 antibodies. The blots are representative of similar results obtained from four independent experiments.

Fig. 4. TSA and BA suppress TNF- α and IL-17 iNOS and COX-2 protein expression

Chondrocytes were treated with TNF- α (1 ng/ml) or IL-17 (100 ng/ml) in the absence or presence of TSA (250 ng/ml) or BA (10 mM) for 24 h. Cell lysates were prepared and analyzed for iNOS and COX-2 protein expression by Western blotting. In the lower panels, the blots were stripped and re-probed with specific anti- β -actin or anti-COX-1 antibodies. The blots are representative of similar results obtained from three independent experiments.

Fig. 5. TSA and BA decrease IL-1-induced iNOS and COX-2 mRNA expression

Chondrocytes were stimulated with 100 pg/ml IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA or BA for 6 h. Total RNA was isolated, cDNA was synthesized; and iNOS and COX-2 mRNAs were quantified using real-time PCR. GAPDH gene expression was used for normalization. The results are expressed as -fold changes considering 1 as the value of untreated cells. All experiments were performed in triplicate, and negative controls without template RNA were included in each experiment. The results are expressed as mean \pm SEM of four independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with cells treated with IL-1 alone (control).

Fig. 6. TSA and BA suppress IL-1-induced cartilage proteoglycan degradation

Cartilage explants were stimulated with 1 ng/ml IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA or BA for 72 h. Proteoglycan degradation was assessed by assaying aliquots of culture media for GAG release. Results are expressed as μ g GAG/mg cartilage and are the mean \pm SEM from four independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with cells treated with IL-1 alone.

Figure 7. Effect of TSA and BA on DNA-binding activity of NF- κ B

Confluent chondrocytes were treated with IL-1 (100 pg/ml) in the absence or presence of increasing concentrations of TSA (A) or BA (B) for 1h. Nuclear extracts were prepared and incubated with a 32 [P]-labeled oligonucleotide containing the NF- κ B sequence. Specificity of binding was confirmed using 50-molar excess of wild type and mutated unlabeled oligonucleotides. The supershifted (SS) band is indicated. The autoradiograph shown is representative of similar results obtained from four independent experiments.

Figure 1

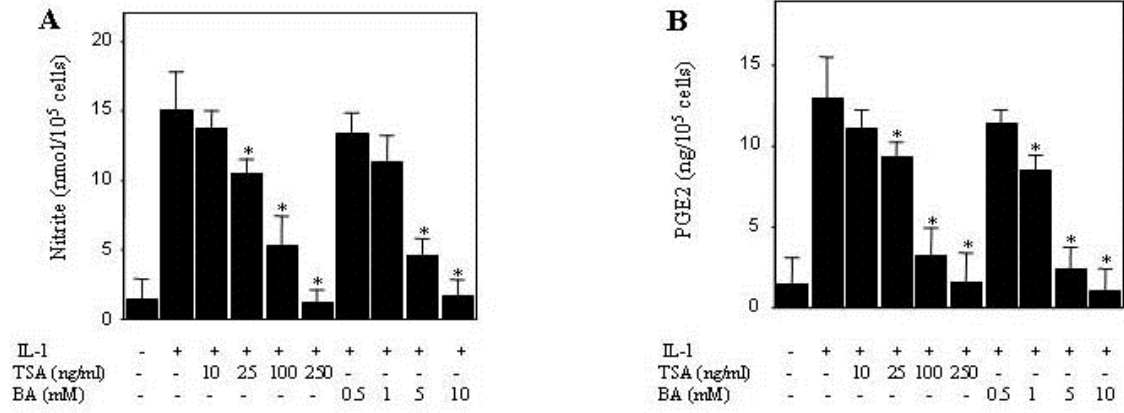


Figure 2

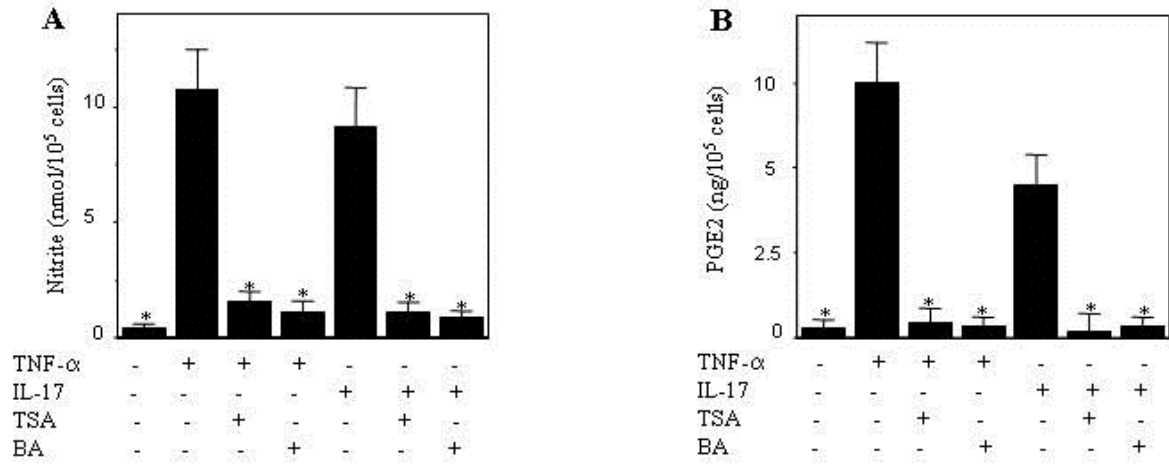


Figure 3

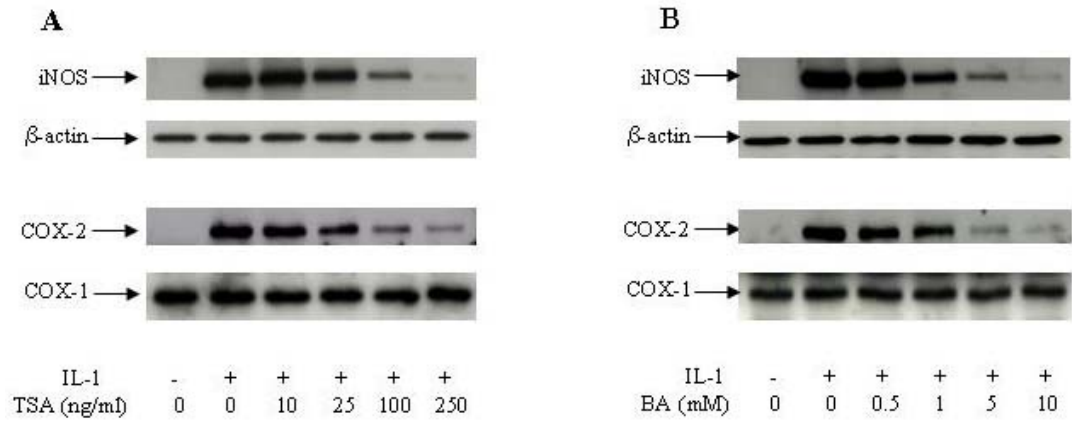


Figure 4

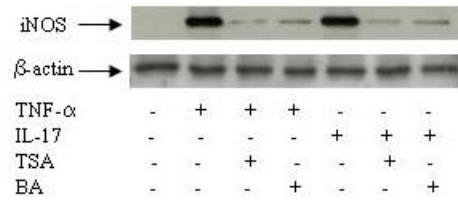
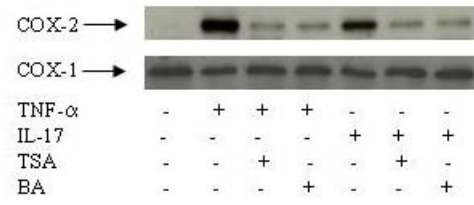
A**B**

Figure 5

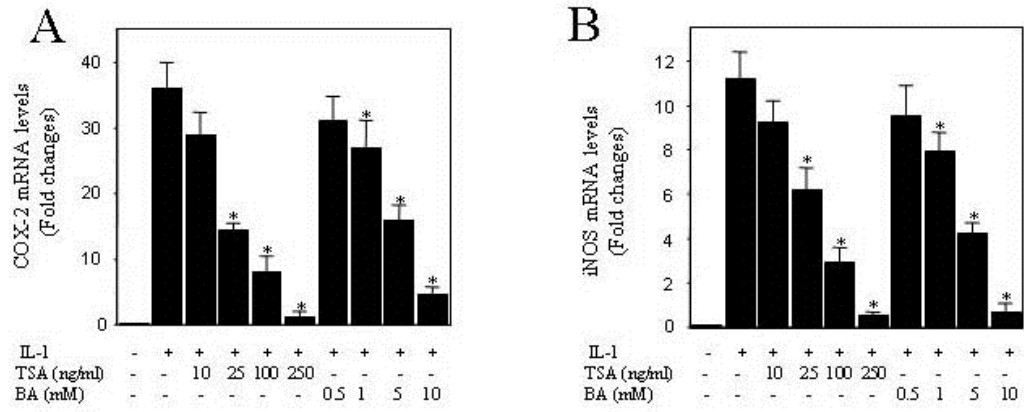


Figure 6

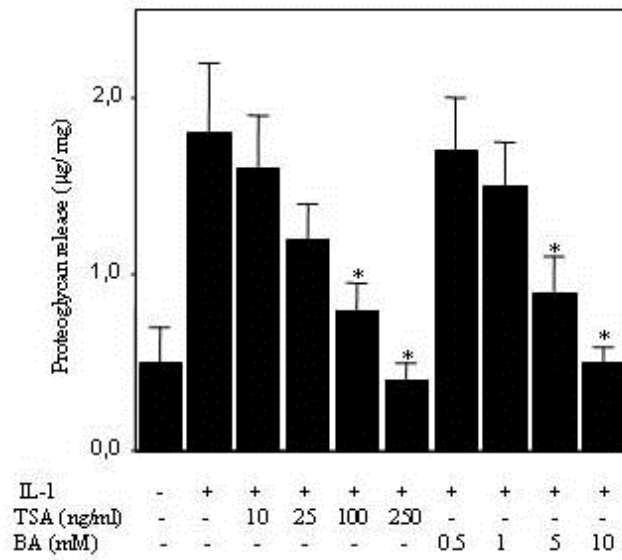
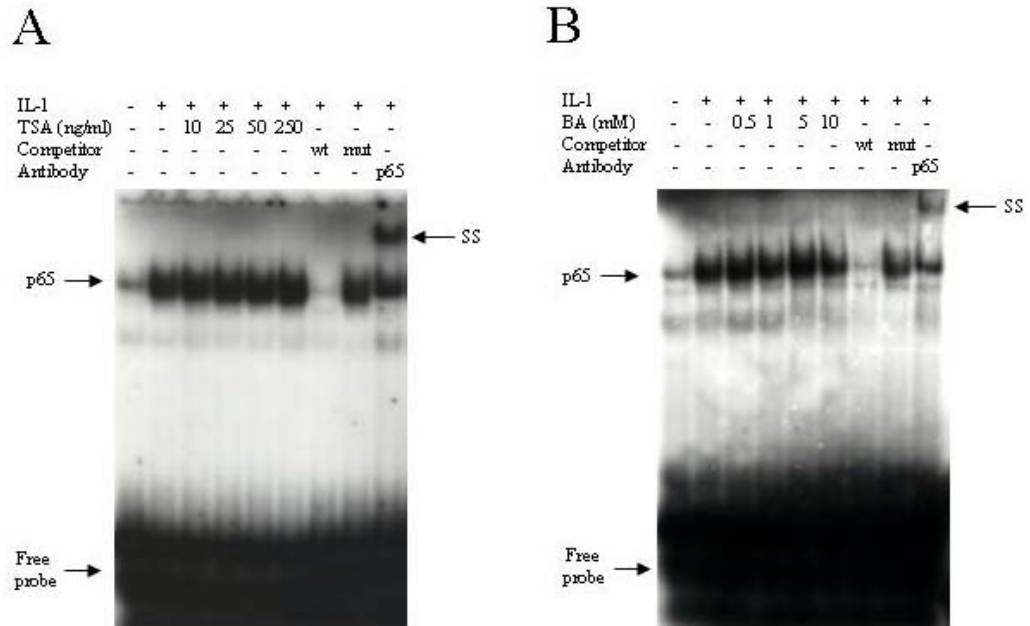


Figure 7



Article 2

HDAC4 Contributes to IL-1-Induced mPGES-1 Expression in Human Synovial Fibroblasts through Up-Regulation of Egr-1 Transcriptional Activity

Nadir Chabane, Xinfang Li, and Hassan Fahmi*

*Address: Osteoarthritis Research Unit, Notre-Dame Hospital, CR-CHUM, 1560 Sherbrooke Street East, Pavillon J.A. DeSève, Y-2628, Montreal, QC, Canada, H2L 4M1.
Tel: 514 890 8000 ext 25119, Fax: 514 412 7583.

Keywords: microsomal Prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1), Interleukin-1 (IL-1), Early growth response factor-1 (Egr-1), histone deacetylase (HDAC).

Publié dans: *Journal of Cellular Biochemistry* 106:453-463 (2009).

Pour cette deuxième publication, j'ai réalisé toutes les expériences. J'ai également participé à l'analyse des résultats, la rédaction et la préparation des figures.

ABSTRACT

Microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) catalyzes the terminal step in the biosynthesis of PGE₂, which contributes to many physiopathological processes. We show here that inhibitors of histone deacetylase (HDAC) activity, trichostatin A (TSA), butyric acid (BA) and valproic acid (VA) prevented IL-1-induced mPGES-1 protein expression in human synovial fibroblasts. TSA also inhibited IL-1-induced mPGES-1 mRNA expression and promoter activation. Overexpression of HDAC4, but not of HDAC1, 2, 3, 5, or 6 enhanced, whereas HDAC4 silencing with small interfering RNA (siRNA) reduced, IL-1-induced mPGES-1 promoter activation, implying that HDAC4 contributes to mPGES-1 gene expression. Consistently, IL-1-induced mPGES-1 protein expression was prevented by siRNA for HDAC4. We also demonstrate that IL-1 induced HDAC4 recruitment to the mPGES-1 promoter. This recruitment was not accompanied by deacetylation of histones H3 and H4, suggesting that HDAC4 contributes to mPGES-1 induction independently of local deacetylation of histone H3 and H4. We then investigated whether HDAC4 regulates mPGES-1 expression by modulating the activity of Egr-1, a key transcription factor in IL-1-induced mPGES-1 expression. We found that HDAC4 overexpression enhances, whereas HDAC4 knockdown by siRNA reduces Egr-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. Together these data indicate that HDAC4 contributes to transcriptional induction of mPGES-1 by IL-1 through a mechanism involving up-regulation of Egr-1 transcriptional activity.

INTRODUCTION

The lipid mediator prostaglandin (PG) E₂ is produced by various cells and has been implicated in a wide range of physiological and pathological processes including cell growth, vascular homeostasis, inflammation, pain, arthritis and cancer [Wang and Dubois, 2006; McCoy et al., 2002]. The biosynthesis of PGE₂ from arachidonic acid requires two enzymatic activities. Cyclooxygenase (COX) enzymes convert arachidonic acid (AA) into PGH₂ which is in turn isomerized to PGE₂ by PGE synthase (PGES) enzymes [Smith and Langenbach, 2001; Tanioka et al., 2000; Murakami et al., 2000]. Two isoforms of the COX enzyme, COX-1 and COX-2, have been identified. COX-1 is constitutively expressed in most tissues, whereas COX-2 is inducible by various stimuli including pro-inflammatory signals [Smith and Langenbach, 2001]. Several PGES have been cloned and characterized including microsomal PGES-1 (mPGES-1), which was originally named MGST-L-1 (membrane-bound glutathione S-transferase-1-like-1), mPGES-2, and cytosolic PGES (cPGES, or the heat shock protein-associated protein p23). cPGES is constitutively expressed and is functionally coupled with COX-1 to promote immediate PGE₂ production [Tanioka et al., 2000]. In contrast, mPGES-1 is markedly up-regulated by inflammatory or mitogenic stimuli and functionally coupled with COX-2 for delayed PGE₂ production [Murakami et al., 2000]. mPGES-2 is constitutively expressed in various cells and tissues and can be coupled with both COX-1 and COX-2 [Murakami et al., 2003].

The expression of mPGES-1 is up-regulated in several cell types after treatment with pro-inflammatory stimuli such as interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and is down-regulated by anti-inflammatory glucocorticoids [Murakami et al., 2000; Stichtenoth et al., 2001]. The transcriptional induction of mPGES-1 is primarily

controlled by Egr-1 through two Egr-1 binding motifs located in the proximal region of the mPGES-1 promoter [Naraba et al., 2002; Subbaramaiah et al., 2004; Cheng et al., 2004]. The importance of mPGES-1 in induced PGE₂ production was evidenced in studies using mPGES-1 deficient mice. In these mice, induced PGE₂ production was almost completely abrogated [Boulet et al., 2004; Uematsu et al., 2002; Trebino et al., 2003; Engblom et al., 2003]. Importantly, mPGES-1 deficiency was protective in animal models of conditions in which PGE₂ has been implicated such as inflammation, pain, arthritis [Trebino et al., 2003; Kamei et al., 2004], pyresis [Engblom et al., 2003], bone loss [Inada et al., 2006], stroke [Ikeda-Matsuo et al., 2006], and atherogenesis [Wang et al., 2006], which implies that mPGES-1 is a potential target for therapeutic intervention.

The reversible acetylation of histone proteins plays a critical role in the control of gene transcription [Jenuwein and Allis, 2001; Urnov, 2003]. In general, acetylation which is catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) is associated with transcription activation through relaxed chromatin structure. In contrast, histone deacetylation by deacetylases (HDACs) is associated with transcription repression via chromatin condensation [Jenuwein and Allis, 2001; Urnov, 2003]. However, emerging evidence indicates that gene regulation by acetylation/deacetylation is more dynamic and complex, and that HATs can act as repressors and HDACs as activators. For instance, HDAC inhibitors were reported to prevent the inducible expression of several genes including IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, TNF- α , Id-1, and a number of IFN α and γ responsive genes [Leoni et al., 2002; Leoni et al., 2005; Koyama et al., 2000; Huang et al., 1997; Xu et al., 2003; Nusinzon and Horvath, 2003; Klampfer et al., 2004; Chang and Pikaard, 2005]. Moreover, global analysis of gene expression showed that inhibition of HDAC activity can result in the induction of gene

expression [Chambers et al., 2003; Mariadason et al., 2000; Chang and Pikaard, 2005; Reid et al., 2005]. In addition, genome-wide genetic studies with yeast clearly demonstrated that HDACs also participate in transcriptional activation [Bernstein et al., 2000; Nawaz et al., 1994; Vidal and Gaber, 1991], and gene profiling experiments have identified many *Drosophila* genes that are activated by overexpression of individual HDACs [Cho et al., 2005]. HATs and HDACs were also reported to impact gene expression by modulating the activity of a variety of signalling proteins and transcription factors such as C/EBP β [Xu et al., 2003], HIF- α [Kato et al., 2004; Qian et al., 2006], and GR [Qiu et al., 2006] STAT1 [Klampfer et al., 2004], STAT2 [Nusinzon and Horvath, 2003], and STAT5 [Xu et al., 2003], adding another layer of complexity to the process.

In this report we have shown that HDAC inhibitors prevent IL-1-induced mPGES-1 expression in human synovial fibroblasts. HDAC4 overexpression enhances, whereas HDAC4 knock-down abrogates, IL-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter, suggesting that HDAC4 participates in mPGES-1 transcription. Accordingly, HDAC4 silencing reduces IL-1-induced mPGES-1 protein expression. Moreover, HDAC4 is recruited to the mPGES-1 promoter in the presence of IL-1. Surprisingly, this recruitment was not associated with local histone deacetylation of histone H3 and H4. We also show that HDAC4 overexpression enhances, whereas HDAC4 silencing reduces, Egr-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. These findings indicate that HDAC4 contributes to mPGES-1 expression via a mechanism involving enhancement of Egr-1 transcriptional activity.

MATERIALS AND METHODS

REAGENTS AND ANTIBODIES

Human recombinant (rh) IL-1 β was obtained from Genzyme (Cambridge, MA). TNF- α and IL-17 were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Trichostatin A (TSA), Butyric acid (BA), valproic acid (VA), aprotinin, leupeptin, pepstatin, and phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) were from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin and streptomycin, foetal calf serum (FCS) and Trizol reagent were supplied by Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Plasmid DNA was prepared using a kit from Qiagen (Mississauga, ON, Canada). FuGene 6 transfection reagent was from Roche Applied Science (Laval, QC, Canada). The luciferase reporter assay system was from Promega (Madison, WI). All other chemicals were purchased from either Sigma-Aldrich or Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). The following antibodies were used: anti-mPGES-1 (catalog no P9053-28; US Biological, Swampscott, MA); anti-cPGES (catalog no 160150; Cayman Chemical); anti-Egr-1 (sc-110; Santa Cruz, Santa Cruz, CA); anti- β -actin (sc-7210; Santa Cruz); anti-Flag (catalog no F3165; Sigma); anti-HDAC1 (catalog no 06-720; Upstate/Millipore, Lake Placid, NY); anti-HDAC2 (catalog no 05-814; Upstate/Millipore); anti-HDAC3 (catalog no 07-522; Upstate/Millipore); anti-HDAC4 (catalog no 2072; Cell Signaling); anti-HDAC5 (catalog no 2082; Cell Signaling); anti-HDAC6 (catalog no 2162; Cell Signaling). Antiacetyl histone H3 antibodies (catalog no 06-599; Upstate/Millipore) were generated against the peptide ARTKQTAR[K*]STGG[K*]APRKQLC, and antiacetyl histone H4 antibodies (catalog no 06-866; Upstate/Millipore) were generated against the peptide

AGG[K*]GG[K*]GMG[K*]VGA[K*]RHSC where [K*] denotes acetylated lysine residues.

SPECIMEN SELECTION AND CELL CULTURE

Human synovial fibroblasts (HSF) were isolated from synovial membranes obtained from osteoarthritic (OA) patients undergoing total knee replacement. All OA patients were evaluated by a certified rheumatologist and diagnosed based on criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA. Briefly, synovial fibroblasts were released by sequential enzymatic digestion with 1 mg/ml pronase (Roche Applied Science) for 1 h followed by a 6 h incubation with 2 mg/ml collagenase (Type IA, Sigma) at 37 °C in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The cells were seeded in tissue culture flasks and cultured until confluence in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/ 95% air. Only cells between passages 3 and 7 were used.

WESTERN BLOT ANALYSIS

Cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin and pepstatin, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄), and 1 mM NaF). Lysates were sonicated on ice and centrifuged at 12000 rpm for 15 min. The protein concentration of the supernatant was determined using the bicinchoninic acid method (Pierce). Twenty µg of cell lysate was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to a

nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After blocking in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, and 5% (w/v) non-fat dry milk, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies and washed with wash buffer (TBS pH 7.5, with 0.1% Tween 20). The blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Pierce), washed again, incubated with SuperSignal Ultra Chemiluminescent reagent (Pierce) and finally exposed to Kodak X-Omat film (Eastman Kodak Ltd).

PGE₂ ASSAYS

At the end of the incubation period, the culture medium was collected and stored at – 80° C. Levels of PGE₂ were determined using a PGE₂ enzyme immunoassay kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). The detection limit and sensitivity was 9 pg/ml. All assays were performed in duplicate.

RNA EXTRACTION AND cDNA SYNTHESIS

Total RNA was isolated from HSF using the TRIzol reagent (Invitrogen), and dissolved in 20 µl of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated-H₂O. One µg of total RNA was treated with RNase-free DNase and reverse-transcribed using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fermentas) as detailed in the manufacturer's guidelines. One-fifth of the reverse transcriptase reaction was analyzed by real-time PCR as described below. The following primers were used: mPGES-1: sense 5'-GAAGAAGGCCTTTGCCAAC-3' and antisense 5'-GGAAGACCAGGAAGTGCATC-3'; cPGES : sense 5'-GCAAAGTGGTACGATCGAAGG-3' and antisense 5'-

TGTCGGTTCTTTTATGCTTGG-3’; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): sense 5’-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3’ and antisense 5’-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG -3’.

REAL-TIME PCR

Real-time PCR analysis was performed in a total volume of 50 μ l containing cDNA template, 200 nM of sense and antisense primers and 25 μ l of SYBR[®] Green master mix (Qiagen). 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 housekeeping gene GAPDH from the C_T value for each sample. 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.

TRANSIENT TRANSFECTION

The mPGES-1 promoter construct (-538/-28) was provided by Dr. Terry Smith (University of California, Los Angeles). Flag-tagged expression vectors for HDAC1, 5 and 6 were donated by Dr. Stuart Schreiber (Howard Hughes Medical Institute, Cambridge) and HDAC2 and 3 by Dr. Edward Seto (H. Lee Moffitt Cancer Center, Tampa). The flag-tagged expression vectors for wild type HDAC4 and a mutant HDAC4 that lacks deacetylase activity were a kind gift from Dr. Xiang-Jiao Yang (McGill University, Montreal, Quebec, Canada). Egr-1 expression vector was provided by Dr. Yuqing Chen (Morehouse School of Medicine, Atlanta). A β -galactosidase reporter vector under the control of SV40 promoter (pSV40- β -gal) was from Promega. siRNA for HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, or scrambled control were obtained from Dharmacon.

Transient transfection experiments were performed using FuGene-6 Transfection reagent (Roche Applied Science) according to the manufacturer's recommended protocol. Briefly, HSF were seeded 24 h prior to transfection at a density of $3 \cdot 10^5$ cells/well in 12 well plates and transiently transfected with 1 μ g of the mPGES-1 promoter construct and 0.5 μ g of the internal control pSV40- β -galactosidase. Six hours later, the medium was replaced with DMEM containing 1% FCS. At 1 day after transfection, the cells were treated or not with IL-1 in the absence or presence of TSA for 18 h. In the overexpression experiments, the amount of transfected DNA was kept constant by using the corresponding empty vector. In

some assays, HSF were co-transfected with 200 nM of HDAC4 siRNA or scrambled control. At the end of the indicated treatment, the cells were washed twice in ice-cold PBS and extracts were prepared for luciferase reporter assay or Western blot analysis. Luciferase activity was normalized for transfection efficiency using the corresponding β -galactosidase activity [Cheng et al., 2004].

CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (ChIP) ASSAY

The ChIP experiments were performed according to the ChIP protocol provided by Upstate/Millipore. Following treatment, the cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. The fixed cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline containing protease inhibitors and then lysed for 10 min at 1×10^6 cells/200 μ l of SDS lysis buffer (50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.5% SDS, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) plus protease inhibitors. The chromatin samples were sonicated to reduce DNA length to 200-500 bp. Twenty μ l of the supernatant were saved as the input DNA and the remainder was diluted 1:10 in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA and 16.7 mM Tris-Cl) containing protease inhibitors. The chromatin samples were precleared with a salmon sperm DNA/protein A-agarose 50% gel slurry (Upstate Biotechnology Inc.) for 3 h. The samples were then immunoprecipitated overnight at 4°C with antibodies specific for either HDAC4, acetylated H3, or acetylated H4 (Upstate Biotechnology, Inc.). As negative controls, cross-linked chromatin was incubated overnight with control Ig or in the absence of antibody. Immune complexes were recovered by addition of salmon sperm DNA/protein A-agarose slurry for 2 h at 4°C. The immune complexes were sequentially washed three times each (5 min on a rotating platform), with

low salt, high salt, lithium chloride, and Tris/EDTA buffers, and eluted twice with 250 μ l 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃ for 15 min. The eluted material and the DNA input samples were heated for 4 h at 65°C to reverse cross-linking. The samples were treated with 40 μ g/ml DNase-free proteinase K for 1 h at 45°C, extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and chloroform, and ethanol precipitated in the presence of 20 μ g of glycogen. Pellets were suspended in 25-30 μ l H₂O and subjected to PCR analysis. The primer sequences used were: mPGES-1 promoter sense 5'-CCCGGAGACTCTCTGCTTC-3' and antisense 5'-TCAACTGTGGGTGTGATCAGC-3'; COX-2 sense 5'-AGAAAAGACATCTGGCGGAAAC-3' and antisense 5'-TATGACAATTGGTCGCTAACCG-3'

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

HDAC INHIBITION PREVENTS IL-1-INDUCED mPGES-1 EXPRESSION

To examine the role of HDACs in IL-1-induced mPGES-1 expression in HSF, cells were stimulated with IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of trichostatin A (TSA) and the expression of mPGES-1 was evaluated by Western blotting. As shown in Fig. 1A, TSA inhibited IL-1-induced mPGES-1 expression in a dose-dependent manner. In contrast, the expression of cPGES was not affected by these treatments. To rule out nonspecific effects of TSA, we tested two additional HDAC inhibitors, butyric acid (BA) and valproic acid (VA). Treatment of HSF with BA and VA also prevented IL-1-induced mPGES-1 expression in a dose-dependent manner (Fig. 1B, C). To determine whether the inhibitory effect of HDAC inhibitors was specific to IL-1, we assessed their effects on TNF- α and IL-17-induced mPGES-1 expression. Interestingly, TSA prevented the induction of mPGES-1 expression by both TNF- α and IL-17 (Fig. 1D), indicating that its effect was not restricted to IL-1. Taken together, these results suggest that HDAC activity is required for induced mPGES-1 expression.

HDAC INHIBITION PREVENTS IL-1-INDUCED mPGES-1 EXPRESSION AT THE TRANSCRIPTIONAL LEVEL

To understand the molecular mechanisms by which HDAC inhibition prevented IL-1-induced mPGES-1 expression we analyzed the effect of TSA on IL-1-induced mPGES-1 mRNA expression by real-time PCR. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used for normalization. Treatment with IL-1 increased mPGES-1 mRNA

expression ~7-fold (Fig. 2A), an effect that was dose-dependently suppressed by TSA (Fig. 2A). These data suggest that TSA suppressed IL-1-induced mPGES-1 expression through a transcriptional mechanism. To verify this, we performed transient transfection experiments. HSF were transfected with the human mPGES-1 promoter-luciferase reporter gene and stimulated with IL-1 in the absence or presence of TSA. The results in Fig. 2B show that IL-1 activates the mPGES-1 promoter and this activation was dose-dependently reduced by TSA. This suggests that the suppressive effect of TSA on IL-1-induced mPGES-1 takes place, at least in part, at the transcriptional level.

HDAC4 CONTRIBUTES TO IL-1-INDUCED mPGES-1 EXPRESSION

To define which HDAC is important in IL-1-induced mPGES-1 transcription, we examined the effect of elevated expression of individual HDAC on IL-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. HSF were co-transfected with the mPGES-1 promoter and increasing concentrations of expression vectors that encode HDAC1, 2, 3, 4, 5 or 6, and 24 h post-transfection the cells were stimulated with IL-1 for an additional 18 h. Overexpression of HDAC4 dose-dependently enhanced IL-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter (Fig. 3A). In contrast, overexpression of HDAC1, 2, 3, 5 and 6 had no significant effect on mPGES-1 promoter activation by IL-1 (Fig. 3A). These data demonstrate that HDAC4 plays an essential role in IL-1-induced mPGES-1 promoter activation.

Next, we evaluated the impact of endogenous HDAC4 silencing by small interfering RNA (siRNA) on IL-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. HSF were co-transfected with the mPGES-1 promoter and scrambled control siRNA or siRNA for HDAC1, 2, 3, 4, 5, or 6 and after 24 h of transfection, the cells were stimulated with IL-1 for 18 h. As shown

in Fig. 3B, transfection with HDAC4 siRNA reduced IL-1-induced mPGES-1 promoter activity by more than 75%, whereas transfection with control scrambled siRNA or siRNA for HDAC1, 2, 3, 5, or 6 had no effect. Immunoblotting demonstrated that transfection with each siRNA resulted in a marked reduction in protein levels of the corresponding HDAC, but did not affect the levels of other HDACs (Fig. 3B, *lower panel*), indicating the specificity and selectivity of the siRNA used. Together, these results indicate that HDAC4 is needed for IL-1-induced mPGES-1 transcription

To determine whether the effect of HDAC4 requires its deacetylase activity, we tested a mutant version of HDAC4 that lacks deacetylase activity (HDAC4-H803L). Substitution of a histidine for a lysine residue at position 802 resulted in complete loss of deacetylase activity [Wang et al., 1999]. As shown in Fig. 4A, HDAC4 increased IL-1-induced mPGES-1 promoter activity in a dose-dependent manner, whereas the deacetylase-deficient HDAC4 mutant had no significant effect on mPGES-1 promoter activity, suggesting that deacetylase activity is needed for HDAC4 to enhance IL-1-induced mPGES-1 promoter activation. Transfected HDAC4 and HDAC4-H803L were expressed at comparable levels as revealed by Western blotting (Fig. 4A, *lower panel*). Treatment with TSA dose-dependently attenuated the enhancing effect of HDAC4 on IL-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter (Fig. 4B), confirming the requirement of deacetylase activity for the effect of HDAC4 on IL-1-induced mPGES-1 promoter activation.

To further characterize the role of HDAC4 in IL-1-induced mPGES-1 protein expression and activity, we analyzed the effect of HDAC4 siRNA on IL-1-induced mPGES-1 protein expression and PGE₂ production. HSF were transfected with scrambled control siRNA or siRNA for HDAC1, 2, 3, 4, 5, or 6 and then treated or not with IL-1 for 20 h. As shown in

Fig. 5, siRNA for HDAC4 reduced IL-1-induced mPGES-1 expression and PGE2 production by as much as 80-85%. In contrast, control siRNA or siRNA for HDAC1, 2, 3, 5, or 6 had no effect. Each siRNA reduced the level of the corresponding HDAC without affecting the levels of other HDACs (Fig. 5). Together, these data clearly show that HDAC4 is required for IL-1-induced mPGES-1 protein expression.

IL-1 INDUCES HDAC4 RECRUITMENT TO THE mPGES-1 PROMOTER WITHOUT CONCOMITANT DEACETYLATION OF HISTONE H3 AND H4

Next we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays to determine whether IL-1 promotes HDAC4 recruitment to the mPGES-1 promoter. As shown in Fig. 6A, treatment with IL-1 induced the binding of HDAC4 to the proximal region of the mPGES-1 promoter. No PCR products were obtained with control rabbit IgG (data not shown). Thus, IL-1 induced HDAC4 recruitment to the mPGES-1 promoter *in vivo*. Given that histones H3 and H4 are important targets of HDAC, we assessed whether IL-1-induced HDAC4 recruitment to the mPGES-1 promoter correlates with local histone deacetylation. The status of histone acetylation at the mPGES promoter was analyzed using ChIP assays with antibodies against both acetylated histones H3 and H4. Acetylated histones H3 and H4 were readily detected at the mPGES-1 promoter. Unexpectedly, and despite the fact that IL-1 induced HDAC4 recruitment to the mPGES promoter, treatment with IL-1 had no effect on the level of acetylated histones H3 and H4 at the mPGES-1 promoter (Fig. 6B). As previously reported [Farrajota et al., 2005; Nie et al., 2003; Miao et al., 2004] we found that IL-1 enhances the levels of histone H3 and H4 acetylation at the COX-2 promoter (Fig. 6C), confirming the suitability of each antibody for ChIP assays. Together, these data

indicate that the IL-1-induced mPGES-1 expression does not involve deacetylation of histones H3 and H4 at the analyzed region of this gene promoter and suggest that deacetylation of histones H3 and H4 is not the major mechanism by which HDAC4 contributes to mPGES-1 expression.

HDAC4 IS REQUIRED FOR EGR-1-MEDIATED ACTIVATION OF THE mPGES-1 PROMOTER

We have previously shown that IL-1 induces Egr-1 expression in HSF [Cheng et al., 2004]. Moreover, Egr-1 is known to play a crucial role in mPGES-1 transcription [Naraba et al., 2002; Subbaramaiah et al., 2004]. To evaluate the involvement of this transcription factor in IL-1-induced mPGES-1 expression in HSF, cells were transfected with a control or Egr-1 siRNA and then treated with IL-1 for 1 or 20 h. As shown in Fig. 7, Egr-1 siRNA almost completely blocked IL-1-induced Egr-1 and mPGES-1 expression as well as PGE₂ production. These results clearly show that Egr-1 is crucial for IL-1-induced mPGES-1 expression in HSF.

HDACs are also known to regulate transcription by modulating the activity of transcription factors [Xu et al., 2003; Kato et al., 2004; Qian et al., 2006; Qiu et al., 2006; Klampfer et al., 2004; Nusinzon and Horvath, 2003]. Therefore, we hypothesized that HDAC4 may contribute to IL-1-induced mPGES-1 expression by enhancing Egr-1 activity. To test this hypothesis, HSF were co-transfected with the mPGES-1 promoter and an expression vector for Egr-1 together with increasing concentrations of vectors encoding for HDAC1, 2, 3, 4, 5 or 6. As shown in Fig. 8A, overexpression of Egr-1 caused a strong increase in the mPGES-1 promoter activity. Interestingly, co-transfection with HDAC4 further enhanced Egr-1-

mediated activation of the mPGES-1 promoter. In contrast, overexpression of HDAC1, 2, 3, 5, and 6 had no effect on Egr-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. These results strongly implicate HDAC4 as a critical positive coactivator of Egr-1-dependent activation of the mPGES-1 promoter. This effect of HDAC4 appears to require its deacetylase activity since TSA dose-dependently suppressed the enhancing effect of HDAC4 (Fig. 8B) and the deacetylase-deficient HDAC4 mutant failed to enhance Egr-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter (Fig. 8C).

Next, we examined the effect of silencing endogenous HDAC4 on Egr-1-dependent activation of the mPGES-1 promoter. HSF were co-transfected with the mPGES-1 promoter and an expression vector for Egr-1 together with HDAC4 siRNA or scrambled control siRNA. As shown in Fig. 8D, overexpression of Egr-1 strongly activated the mPGES-1 promoter and this effect of Egr-1 was reduced by ~75% in the presence of HDAC4 siRNA. In contrast, transfection with control siRNA did not affect Egr-1-induced mPGES-1 promoter activation. The effectiveness of HDAC4 siRNA in down-regulating HDAC4 expression was documented by densitometry analysis showing that HDAC4 levels were reduced by as much as 70% in cells transfected with HDAC4 siRNA when compared to cells transfected with control siRNA. These findings suggest that HDAC4 is required for Egr-1-mediated mPGES-1 promoter activation.

DISCUSSION

In this report we have shown that deacetylase inhibition prevents IL-1-induced mPGES-1 expression in HSF. HDAC4 overexpression enhanced, whereas HDAC4 silencing by siRNA reduced, IL-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. IL-1-induced mPGES-1 protein expression was also prevented by HDAC4 siRNA. Using ChIP analysis, we demonstrated that HDAC4 is recruited to the mPGES-1 promoter in the presence of IL-1, but without concomitant local deacetylation of histones H3 and H4. HDAC4 overexpression enhances, whereas HDAC4 knockdown, reduces Egr-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. Together, these data indicate that HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 expression through a mechanism that involves up-regulation of Egr-1 transcriptional activity.

Our current data show that inhibitors of HDAC activity, including TSA, butyric acid and valproic acid, prevent IL-1-induced mPGES-1 protein expression, suggesting that a deacetylase activity is required for IL-1-induced mPGES-1 expression. The repressive effect of TSA on IL-1-induced mPGES-1 expression occurred at the transcriptional level, as determined by real-time RT-PCR analysis and transient transfection assays. Interestingly, the induction of mPGES-1 expression by TNF- α and IL-17 was also inhibited by HDAC inhibitors, suggesting that the requirement for deacetylase activity might be a general mechanism involved in mPGES-1 expression.

Analysis of individual HDAC family members revealed that overexpression of HDAC4 enhanced IL-1-induced mPGES-1 promoter activation, while HDAC1, 2, 3, 5 and 6 had little or no effect. Moreover, siRNA-mediated HDAC4 silencing reduced IL-1-induced mPGES-1 promoter activation, suggesting that HDAC4 contributes to IL-1-induced

mPGES-1 expression. Indeed, HDAC4 siRNA strongly reduced IL-1-induced mPGES-1 protein expression. These data suggest that HDACs can function not only as transcription repressors, but also as transcription activators. This is supported by the current finding as well as data from several studies. For example, treatment with HDAC inhibitors prevents the expression of several genes including IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, TNF- α , Id-1, and a number of IFN α and γ responsive genes [Leoni et al., 2002; Leoni et al., 2005; Koyama et al., 2000; Huang et al., 1997; Xu et al., 2003; Nusinzon and Horvath, 2003; Klampfer et al., 2004; Chang and Pikaard, 2005]. Furthermore, gene profiling studies have identified many genes that are activated by overexpression of individual HDACs in yeast [Bernstein et al., 2000], *Drosophila* [Cho et al., 2005], and mammalian cells [Zupkovitz et al., 2006]. Therefore, HDACs, besides their well-documented role as transcription repressors, may also function as positive regulators of gene expression.

Furthermore, we showed by ChIP assays that HDAC4 is recruited to the mPGES-1 promoter when the cells are stimulated with IL-1. Surprisingly, HDAC4 recruitment does not correlate with deacetylation of histones H3 or H4 at the mPGES-1 promoter, suggesting that local deacetylation of histones H3 and H4 is not the primary mechanism by which HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 expression.

In addition to histones, HDACs have been shown to modulate gene expression by enhancing the activity of several transcription factors such as C/EBP β [Xu et al., 2003], HIF- α , [Kato et al., 2004; Qian et al., 2006], GR [Qiu et al., 2006], STAT1 [Klampfer et al., 2004], STAT2 [Nusinzon and Horvath, 2003], and STAT5 [Xu et al., 2003]. Therefore, it is possible that HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 expression by increasing Egr-1-dependent transcriptional activity. Indeed, overexpression of HDAC4 enhanced, whereas

silencing of endogenous HDAC4 by siRNA, reduced Egr-1-mediated activation of the mPGES-1 promoter. This is the first evidence that HDAC4 up-regulates Egr-1 transcriptional activity in HSF. Taken together, these data suggest that HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 expression through a histone deacetylation-independent mechanism that involves up-regulation of Egr-1 transcriptional activity.

The molecular mechanism by which HDAC4 promotes transcriptional activity of Egr-1 remains undefined but it may include modulation of the acetylation level of Egr-1 itself. Indeed, Yu et al reported that the acetylation status of Egr-1 appears to modulate its activity. Acetylated Egr-1 activates growth and survival genes, while nonacetylated Egr-1 activates genes involved in apoptosis [Yu et al., 2004]. Egr-1 transcriptional activity involves structural and functional cooperativity (positive and negative) with numerous transcription or regulatory factors [Mouillet et al., 2004; Tsai et al., 2000; Barthel et al., 2003; Svaren et al., 1996]. Therefore, it also is possible that HDAC4 regulates Egr-1 activity through deacetylation of co-factors involved in Egr-1 transcriptional response. Additional molecular and biochemical studies are needed to understand the detailed mechanism by which HDAC4 regulates Egr-1 transcriptional activity.

The realization that HDAC4 contributes to mPGES-1 expression has potentially important implications for a variety of human disorders associated with increased mPGES-1 levels, such as arthritis [Westman et al., 2004; Li et al., 2005] inflammatory bowel disease [Subbaramaiah et al., 2004] atherosclerosis [Gomez-Hernandez et al., 2006] and tumorigenesis [Kamei et al., 2003]. Thus, strategies to suppress mPGES-1 expression by inhibiting HDAC4 activity would be predicted to have therapeutic values.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-84282, and the Fonds de la Recherche du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). HF is a Research Scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We would like to thank Dr. T. J. Smith (University of California, Los Angeles) for the mPGES-1 promoter, Dr. S. Schreiber (Howard Hughes Medical Institute, Cambridge) for the HDAC1, 5, and 6 expression plasmids, Dr. E. Seto (H. Lee Moffitt Cancer Center, Tampa) for HDAC2 and 3 expression plasmids, Dr. X-J Yang (McGill University, Montreal) for the WT and mutant HDAC4 and Dr. Y. E. Chen (Morehouse School of Medicine, Atlanta) for Egr-1 expression vector.

REFERENCES.

- Barthel, R., Tsytsykova, A.V., Barczak, A.K., Tsai, E.Y., Dascher, C.C., Brenner, M.B., and Goldfeld, A.E. (2003) Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Mol Cell Biol*, 23:526-33.
- Bernstein, B.E., Tong, J.K., and Schreiber, S.L. (2000) Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:13708-13.
- Boulet, L., Ouellet, M., Bateman, K.P., Ethier, D., Percival, M.D., Riendeau, D., Mancini, J.A., and Methot, N. (2004) Deletion of microsomal prostaglandin E2 (PGE2) synthase-1 reduces inducible and basal PGE2 production and alters the gastric prostanoid profile. *J Biol Chem*, 279:23229-37.
- Chambers, A.E., Banerjee, S., Chaplin, T., Dunne, J., Debernardi, S., Joel, S.P., and Young, B.D. (2003) Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells. *Eur J Cancer*, 39:1165-75.
- Chang, S. and Pikaard, C.S. (2005) Transcript profiling in Arabidopsis reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *J Biol Chem*, 280:796-804.
- Cheng, S., Afif, H., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Li, X., Farrajota, K., Lavigne, M., and 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*, 279:22057-65.

Cho, Y., Griswold, A., Campbell, C., and Min, K.T. (2005) Individual histone deacetylases in *Drosophila* modulate transcription of distinct genes. *Genomics*, 86:606-17.

Engblom, D., Saha, S., Engstrom, L., Westman, M., Audoly, L.P., Jakobsson, P.J., and Blomqvist, A. (2003) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci*, 6:1137-8.

Farrajota, K., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Afif, H., Pelletier, J.P., Li, X., Ranger, P., and Fahmi, H. (2005) Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum*, 52:94-104.

Gomez-Hernandez, A., Martin-Ventura, J.L., Sanchez-Galan, E., Vidal, C., Ortego, M., Blanco-Colio, L.M., Ortega, L., Tunon, J., and Egido, J. (2006) Overexpression of COX-2, Prostaglandin E synthase-1 and prostaglandin E receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: regulation by nuclear factor-kappaB. *Atherosclerosis*, 187:139-49.

Huang, N., Katz, J.P., Martin, D.R., and Wu, G.D. (1997) Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine*, 9:27-36.

Ikeda-Matsuo, Y., Ota, A., Fukada, T., Uematsu, S., Akira, S., and Sasaki, Y. (2006) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:11790-5.

Inada, M., Matsumoto, C., Uematsu, S., Akira, S., and Miyaura, C. (2006) Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. *J Immunol*, 177:1879-85.

Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, 293:1074-80.

Kamei, D., Murakami, M., Nakatani, Y., Ishikawa, Y., Ishii, T., and Kudo, I. (2003) Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem*, 278:19396-405.

Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-Ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M., and Kudo, I. (2004) Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. *J Biol Chem*, 279:33684-95.

Kato, H., Tamamizu-Kato, S., and Shibasaki, F. (2004) Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor-1alpha and increases transcriptional activity. *J Biol Chem*.

Klampfer, L., Huang, J., Swaby, L.A., and Augenlicht, L. (2004) Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1. *J Biol Chem*, 279:30358-68.

- Koyama, Y., Adachi, M., Sekiya, M., Takekawa, M., and Imai, K. (2000) Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood*, 96:1490-5.
- Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E.C., Lee, J.K., Porro, G., Pagani, P., Modena, D., Moras, M.L., Pozzi, P., Reznikov, L.L., Siegmund, B., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A., and Mascagni, P. (2005) The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med*, 11:1-15.
- Leoni, F., Zaliani, A., Bertolini, G., Porro, G., Pagani, P., Pozzi, P., Dona, G., Fossati, G., Sozzani, S., Azam, T., Bufler, P., Fantuzzi, G., Goncharov, I., Kim, S.H., Pomerantz, B.J., Reznikov, L.L., Siegmund, B., Dinarello, C.A., and Mascagni, P. (2002) The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:2995-3000.
- Li, X., Afif, H., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P., and Fahmi, H. (2005) Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol*, 32:887-95.
- Mariadason, J.M., Corner, G.A., and Augenlicht, L.H. (2000) Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res*, 60:4561-72.
- McCoy, J.M., Wicks, J.R., and Audoly, L.P. (2002) The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 110:651-8.

Miao, F., Gonzalo, I.G., Lanting, L., and Natarajan, R. (2004) In Vivo Chromatin Remodeling Events Leading to Inflammatory Gene Transcription under Diabetic Conditions. *J Biol Chem*, 279:18091-7.

Mouillet, J.F., Sonnenberg-Hirche, C., Yan, X., and Sadovsky, Y. (2004) p300 regulates the synergy of steroidogenic factor-1 and early growth response-1 in activating luteinizing hormone-beta subunit gene. *J Biol Chem*, 279:7832-9.

Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K., and Kudo, I. (2003) Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem*, 278:37937-47.

Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., and Kudo, I. (2000) Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275:32783-92.

Naraba, H., Yokoyama, C., Tago, N., Murakami, M., Kudo, I., Fueki, M., Oh-Ishi, S., and Tanabe, T. (2002) Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem*, 277:28601-8.

Nawaz, Z., Baniahmad, C., Burris, T.P., Stillman, D.J., O'Malley, B.W., and Tsai, M.J. (1994) The yeast SIN3 gene product negatively regulates the activity of the human progesterone receptor and positively regulates the activities of GAL4 and the HAP1 activator. *Mol Gen Genet*, 245:724-33.

Nie, M., Pang, L., Inoue, H., and Knox, A.J. (2003) 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*, 23:9233-44.

Nusinzon, I. and Horvath, C.M. (2003) Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:14742-7.

Qian, D.Z., Kachhap, S.K., Collis, S.J., Verheul, H.M., Carducci, M.A., Atadja, P., and Pili, R. (2006) Class II Histone Deacetylases Are Associated with VHL-Independent Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 {alpha}. *Cancer Res*, 66:8814-21.

Qiu, Y., Zhao, Y., Becker, M., John, S., Parekh, B.S., Huang, S., Hendarwanto, A., Martinez, E.D., Chen, Y., Lu, H., Adkins, N.L., Stavreva, D.A., Wiench, M., Georgel, P.T., Schiltz, R.L., and Hager, G.L. (2006) HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transcription. *Mol Cell*, 22:669-79.

Reid, G., Metivier, R., Lin, C.Y., Denger, S., Ibberson, D., Ivacevic, T., Brand, H., Benes, V., Liu, E.T., and Gannon, F. (2005) Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene*, 24:4894-907.

Smith, W.L. and Langenbach, R. (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*, 107:1491-5.

Stichtenoth, D.O., Thoren, S., Bian, H., Peters-Golden, M., Jakobsson, P.J., and Crofford, L.J. (2001) Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol*, 167:469-74.

Subbaramaiah, K., Yoshimatsu, K., Scherl, E., Das, K.M., Glazier, K.D., Golijanin, D., Soslow, R.A., Tanabe, T., Naraba, H., and Dannenberg, A.J. (2004) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem*.

Svaren, J., Severson, B.R., Apel, E.D., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., and Milbrandt, J. (1996) NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol*, 16:3545-53.

Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem*, 275:32775-82.

Trebino, C.E., Stock, J.L., Gibbons, C.P., Naiman, B.M., Wachtmann, T.S., Umland, J.P., Pandher, K., Lapointe, J.M., Saha, S., Roach, M.L., Carter, D., Thomas, N.A., Durtschi, B.A., McNeish, J.D., Hambor, J.E., Jakobsson, P.J., Carty, T.J., Perez, J.R., and Audoly, L.P. (2003) Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:9044-9.

- Tsai, E.Y., Falvo, J.V., Tsytsykova, A.V., Barczak, A.K., Reimold, A.M., Glimcher, L.H., Fenton, M.J., Gordon, D.C., Dunn, I.F., and Goldfeld, A.E. (2000) A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol*, 20:6084-94.
- Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K., and Akira, S. (2002) Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol*, 168:5811-6.
- Urnov, F.D. (2003) Chromatin remodeling as a guide to transcriptional regulatory networks in mammals. *J Cell Biochem*, 88:684-94.
- Vidal, M. and Gaber, R.F. (1991) RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11:6317-27.
- Wang, A.H., Bertos, N.R., Vezmar, M., Pelletier, N., Crosato, M., Heng, H.H., Th'ng, J., Han, J., and Yang, X.J. (1999) HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol*, 19:7816-27.
- Wang, D. and Dubois, R.N. (2006) Prostaglandins and cancer. *Gut*, 55:115-22.
- Wang, M., Zukas, A.M., Hui, Y., Ricciotti, E., Pure, E., and FitzGerald, G.A. (2006) Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:14507-12.

Westman, M., Korotkova, M., af Klint, E., Stark, A., Audoly, L.P., Klareskog, L., Ulfgren, A.K., and Jakobsson, P.J. (2004) Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*, 50:1774-80.

Xu, M., Nie, L., Kim, S.H., and Sun, X.H. (2003) STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J*, 22:893-904.

Yu, J., de Belle, I., Liang, H., and Adamson, E.D. (2004) Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses. *Mol Cell*, 15:83-94.

Zupkovitz, G., Tischler, J., Posch, M., Sadzak, I., Ramsauer, K., Egger, G., Grausenburger, R., Schweifer, N., Chiocca, S., Decker, T., and Seiser, C. (2006) Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*, 26:7913-28.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. HDAC inhibition suppressed IL-1-induced mPGES-1 expression. HSF were stimulated with 100 pg/ml IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA (A), VA (B), or BA (C) for 20 h. D, HSF were treated with 1 ng/ml TNF- α or 100 ng/ml IL-17 in the absence or presence of TSA (250 ng/ml) for 20 h. Cell lysates were prepared and analyzed for mPGES-1 protein expression by Western blotting. In the *lower panels* the blots were stripped and reprobbed with specific anti-cPGES antibody. The blots are representative of similar results obtained from four independent experiments.

Fig. 2. TSA inhibited IL-1-induced mPGES-1 expression at the transcriptional level. A, HSF were stimulated with 100 pg/ml IL-1 in the absence or presence of increasing concentrations of TSA for 8 h. Total RNA was isolated, reverse transcribed into cDNA, and mPGES-1 levels were quantified using real-time PCR. GAPDH gene expression was used for normalization. All experiments were performed in triplicate, and negative controls without template RNA were included in each experiment. B, HSF were co-transfected with the human mPGES-1 promoter (1 μ g/well) and the internal control pSV40- β -galactosidase (0.5 μ g/well) using FuGene 6 transfection reagent. The next day, transfected cells were treated with IL-1 (100 pg/ml) in the absence or presence of increasing concentrations of TSA for 18 h. Luciferase activity values were determined and normalized to β -galactosidase activity. Results are expressed as -fold changes, considering 1 as the value of untreated cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. * p <0.05 compared with cells treated with IL-1 alone (control).

Fig. 3. HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 promoter activation. A. HSF were co-transfected with the human mPGES-1 promoter (1 $\mu\text{g}/\text{well}$), the internal control pSV40- β -gal (0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$) and increasing concentrations (0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{g}/\text{well}$) of expression vectors for HDAC1, 2, 3, 4, 5, or 6. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of the empty vector. The next day, transfected cells were stimulated with IL-1 (100 pg/ml) for 18 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activity. Results are expressed as -fold changes, considering 1 as the value of untreated cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. * $p < 0.05$ compared with cells treated with IL-1 alone (control). B, HSF were co-transfected with the human mPGES-1 promoter (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the internal control pSV40- β -gal (0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$) together with 200 nM of control scrambled siRNA or siRNA for HDAC1, 2, 3, 4, 5 or 6. The next day, transfected cells were treated with IL-1 (100 pg/ml) for 18 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activity. Specific knockdown of each HDAC isoform was confirmed by Western-blotting using antibodies specific for HDAC1, 2, 3, 4, 5 or 6 (*lower panel*).

Fig. 4. HDAC4-mediated enhancement of IL-1-induced mPGES-1 promoter activation requires deacetylase activity. HSF were co-transfected with the human mPGES-1 promoter (1 $\mu\text{g}/\text{well}$), the internal control pSV40- β -gal (0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$) and increasing concentrations (0.01, 0.1, 1 and 2 $\mu\text{g}/\text{well}$) of an expression vector for HDAC4 (HDAC4-

WT) or HDAC mutant that lack deacetylase activity (HDAC4-H803L). The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of the empty vector. The next day, transfected cells were stimulated with IL-1 (100 pg/ml) for 18 h. Results are expressed as – fold changes, considering 1 as the value of untreated cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. * $p < 0.05$ compared with cells treated with IL-1 alone (control). The expression levels of HDAC4 and HDAC4-H803L were analyzed by Western blotting using an anti-Flag antibody (*lower panel*)

B. HSF were co-transfected with 1 μ g of the human mPGES-1 promoter, 0.5 μ g of pSV40- β -gal, and 1 μ g of an expression vector for HDAC4. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of the empty vector. The next day, transfected cells were stimulated with IL-1 (100 pg/ml) in the absence or presence of increasing concentrations of TSA for 18 h. Results are expressed as –fold changes, considering 1 as the value of untreated cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. * $p < 0.05$ compared with cells transfected with Egr-1 and treated with IL-1 alone (control).

Fig. 5. HDAC4 is required for IL-1-induced mPGES-1 expression. HSF were transfected with 200 nM of control scrambled siRNA or siRNA for HDAC1, 2, 3, 4, 5, or 6. At 24 h post-transfection, cells were washed and left untreated or treated with IL-1 for 20 h. The culture media were collected and PGE₂ production was determined by EIA (upper panel). Data are expressed as mean \pm SEM from four independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with cells treated with IL-1 β alone (control). Cell lysates were prepared and

analyzed for the expression level of mPGES-1, cPGES (middle panel), HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6 or β -actin (lower panel) proteins by Western blotting. The blots are representative of similar results obtained from four independent experiments.

Fig. 6. Effect of IL-1 on HDAC4 recruitment and histone acetylation at the mPGES-1 promoter. A, Confluent HSF were treated with 100 pg/ml IL-1 for the indicated time periods. ChIP assays, coupled with real-time PCR, were performed using a specific anti-HDAC4 antibody. The results are expressed as fold changes of HDAC4 binding to the mPGES-1 promoter relative to untreated cells (*upper panel*) and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. No PCR product was detected when a control IgG was used for immunoprecipitation. B, C, Confluent HSF were treated as in (A) and ChIP assays were performed using antibodies specific to acetylated histone H3 and H4. The results are expressed as -fold changes of histones H3 and H4 acetylation at the mPGES-1 (B) or the COX-2 promoter (C) over untreated cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. For each ChIP assay, the immunoprecipitated DNA was quantitated in triplicate on two separate occasions. *, $p < 0.05$ compared with untreated cells.

Fig. 7. Effect of Egr-1 siRNA on IL-1-induced mPGES-1 expression in HSF. HSF were transfected with 200 nM of control scrambled siRNA or Egr-1 siRNA. At 24 h post-transfection, cells were washed and treated with IL-1 for 1 or 20 h. Cell lysates were prepared and analyzed for Egr-1, β -actin (1 h treatment) mPGES-1 and cPGES (20 h

treatment) protein expression by Western blotting. The blots are representative of similar results obtained from three independent experiments. The upper graph shows the production of PGE2 in the cultured media of cells transfected with Egr-1 siRNA and treated with IL-1 for 20 h. Data are expressed as mean \pm SEM from four independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with cells treated with IL-1 alone (control).

Fig. 8. HDAC4 is required for Egr-1-mediated mPGES-1 promoter activation. A, HSF were co-transfected with 1 μ g of the human mPGES-1 promoter, 0.5 μ g of pSV40- β -gal, 100 ng of the Egr-1 expression vector and increasing concentrations (0.1, 0.5 and 1 μ g/ml) of expression vectors for HDAC1, 2, 3, 4, 5 or 6. The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of the empty vector. Total cell extracts were prepared 40 h after transfection and analyzed for luciferase activity. Results are expressed as –fold changes, considering 1 as the value of untreated cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. * $p < 0.05$ compared with cells transfected with Egr-1 alone (control). B, HSF were co-transfected with 1 μ g of the human mPGES-1 promoter, 0.5 μ g of pSV40- β -gal, 100 ng of the Egr-1 expression vector and 1 μ g of an expression vector for HDAC4. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of the empty vector. The cells were then left untreated or treated with increasing concentrations of TSA for 40 h. Total cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activity as indicated above. Results are expressed as –fold changes, considering 1 as the value of untreated cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. * $p < 0.05$

compared with cells transfected with Egr-1 and HDAC4 (control). C, HSF were co-transfected with 1 μ g of the human mPGES-1 promoter, 0.5 μ g of pSV40- β -gal, 100 ng of the Egr-1 expression vector and increasing concentrations (0.01, 0.1 and 1 μ g/well) of an expression vector for HDAC4 (HDAC4-WT) or HDAC mutant that lack deacetylase activity (HDAC4-H803L). The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of the empty vector. Total cell extracts were prepared 40 h after transfection and analyzed for luciferase activity. Results are expressed as -fold changes, considering 1 as the value of untransfected cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments. * p <0.05 compared with cells transfected with Egr-1 alone (control). D, HSF were co-transfected with the human mPGES-1 promoter (1 μ g/ml), 0.5 μ g of pSV40- β -gal, 100 ng of the Egr-1 expression vector, together with 200 nM of control scrambled siRNA or HDAC4 siRNA. Total cell extracts were prepared 40 h after transfection for luciferase activity analysis or for Western blot analysis to evaluate HDAC4 levels.

Figure 1

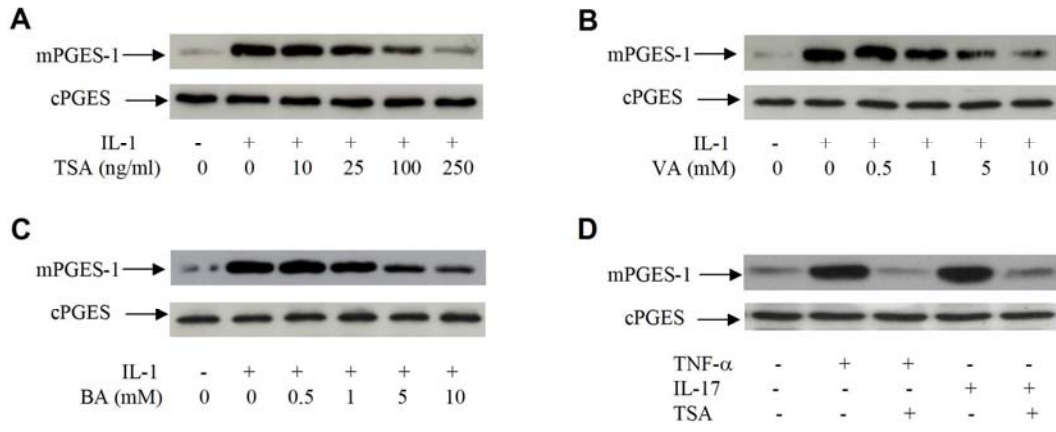


Figure 2

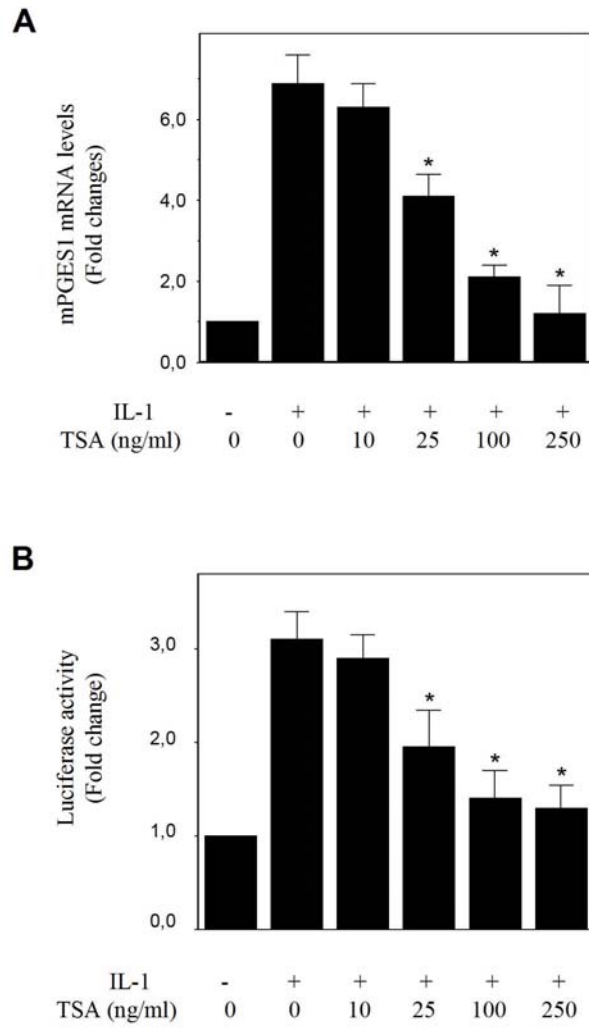


Figure 3

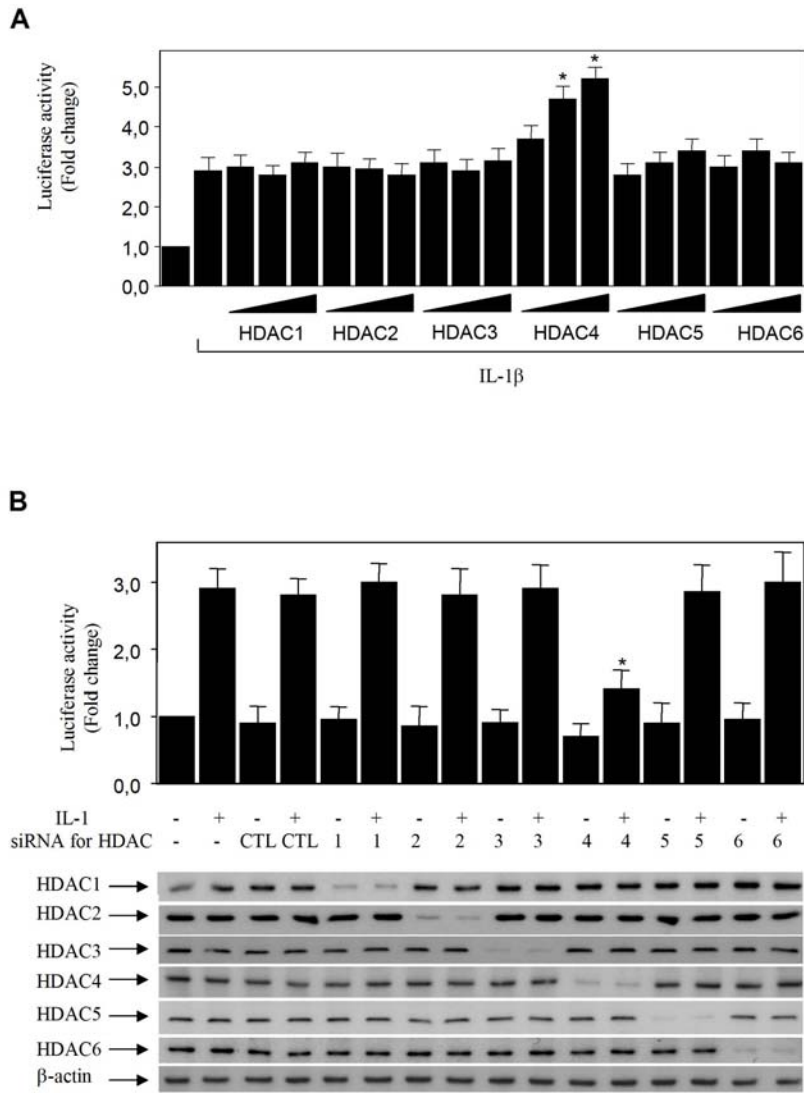


Figure 4

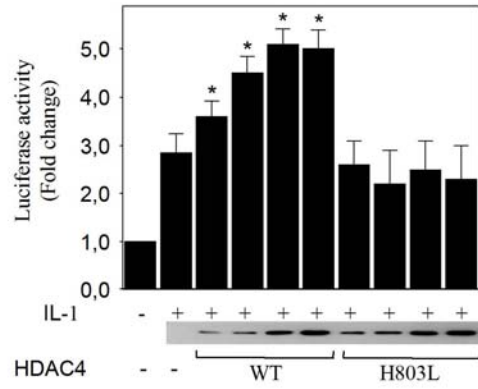
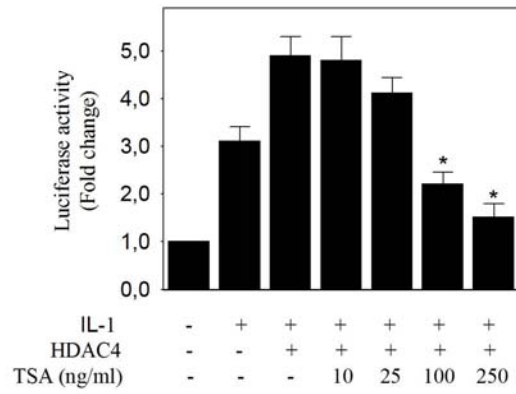
A**B**

Figure 5

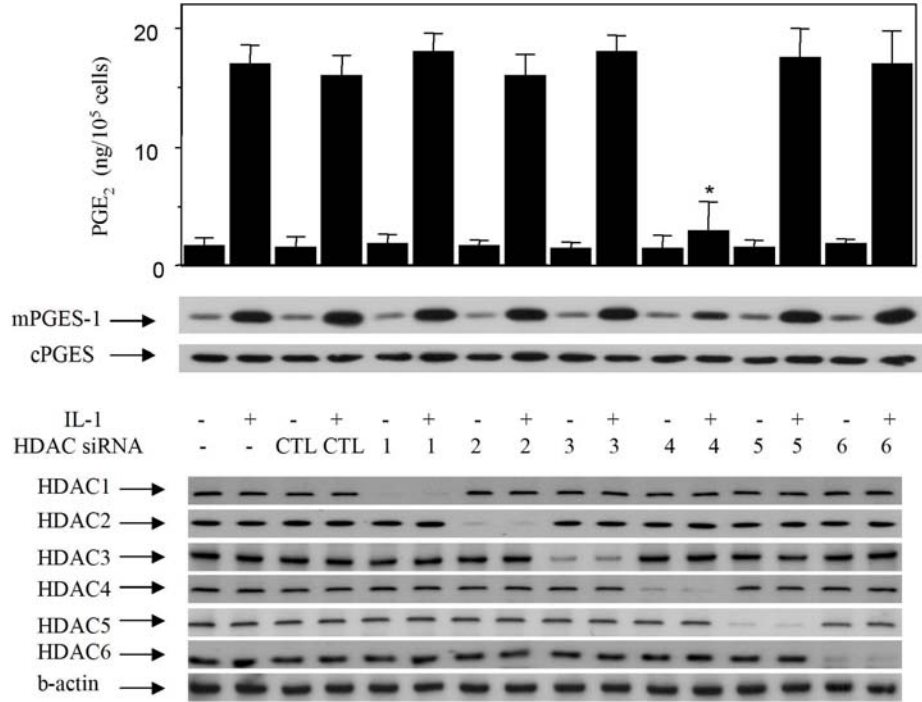


Figure 6

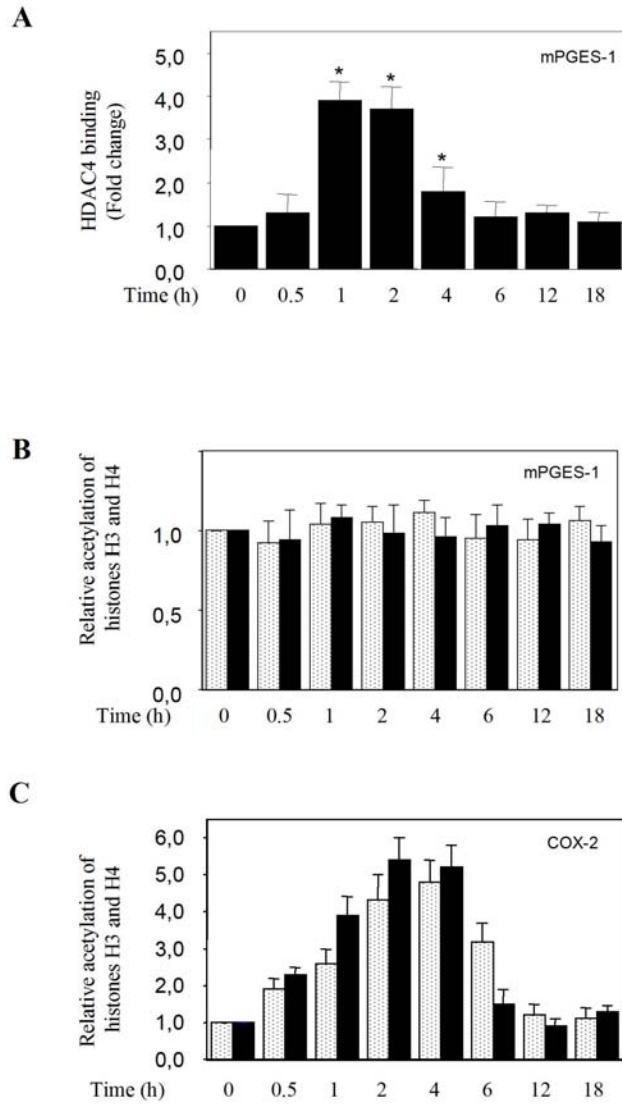


Figure 7

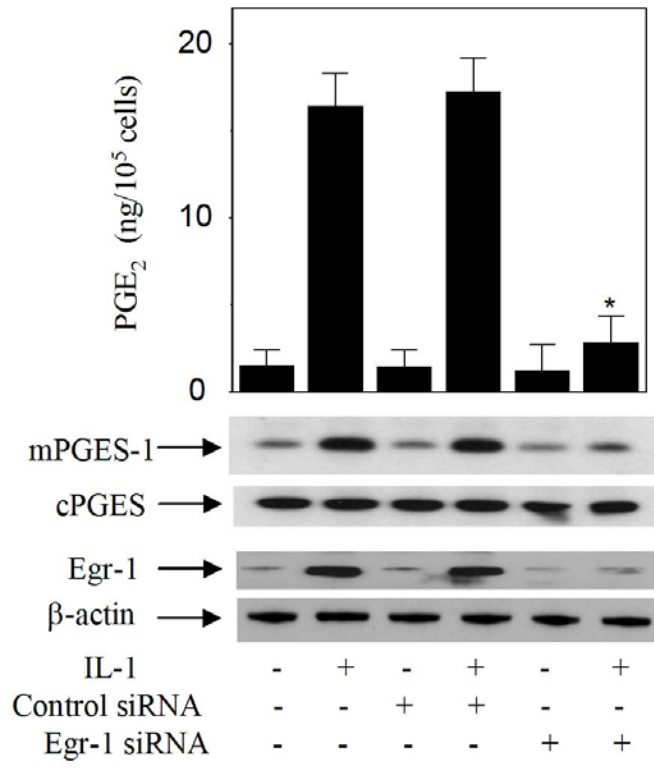
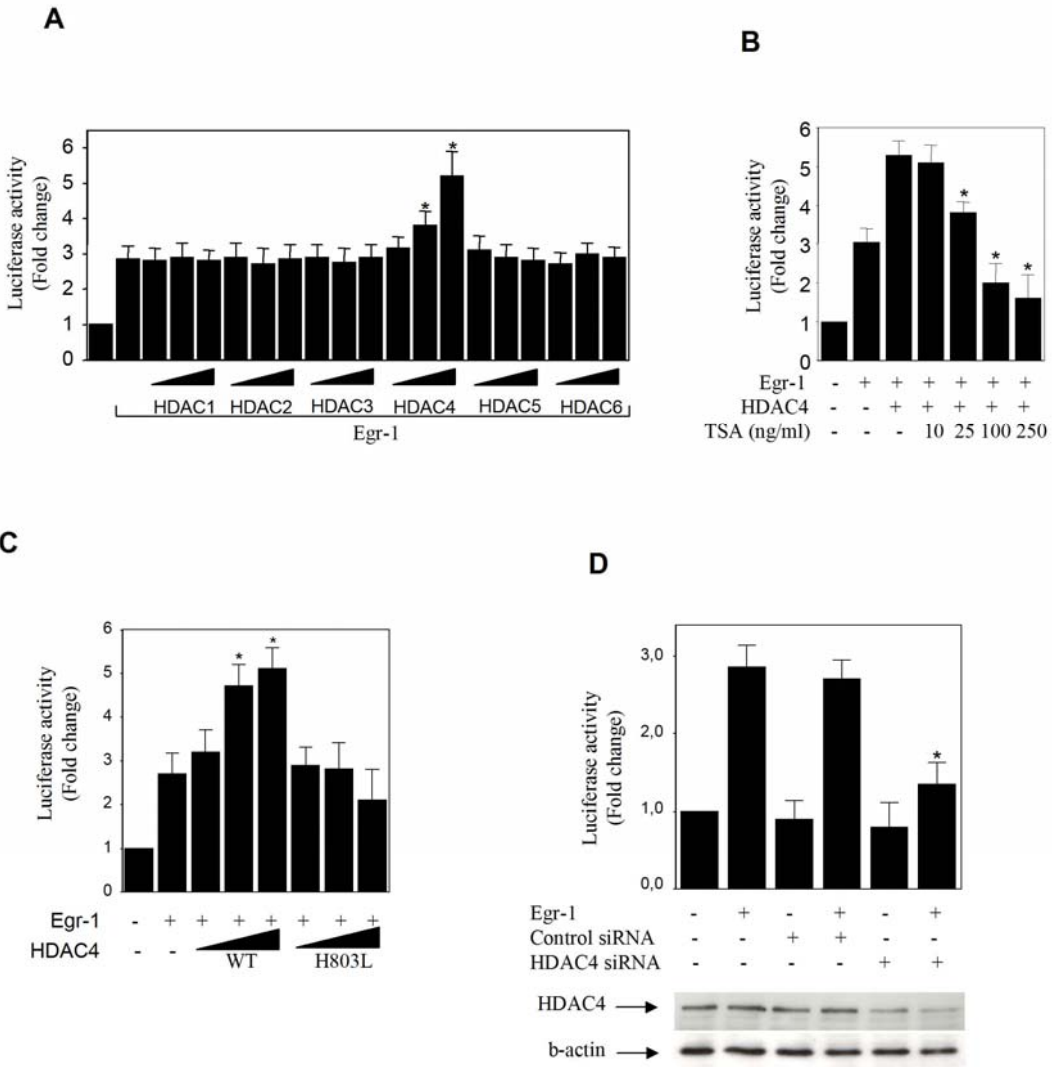


Figure 8



Discussion

L'arthrose est associée à des changements dans l'expression de certains gènes, qui aboutit à une augmentation ou à une diminution de leur niveau d'expression. À l'origine de ces changements, les régulations épigénétiques sont fortement mises en cause. Une caractéristique importante de ce mode de contrôle est sa réversibilité, ce qui a suscité la recherche de molécules capables de cibler les enzymes impliquées dans ces processus. L'acétylation/déacétylation des histones est la modification épigénétique la plus étudiée. Les enzymes HAT et HDAC catalysent respectivement ces réactions. Les HAT conduisent en général à l'augmentation du niveau d'expression des gènes, en établissant des structures chromatiques relâchées qui favorisent la transcription, alors que les HDAC répriment la transcription à travers des structures chromatiques compactes qui limitent l'accessibilité des éléments régulateurs en cis au niveau de l'ADN aux facteurs de transcription. Plusieurs données expérimentales ont montré que l'inhibition de l'activité des HDAC, par les iHDAC, peut avoir des effets anti-inflammatoires, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Dinarelli et al., 2011; Ververis and Karagiannis, 2011). Ces données suggèrent que l'induction d'une hyperacétylation des histones, mais aussi des protéines non histones, est à l'origine de cet effet anti-inflammatoire. Elles suggèrent également que les HDAC peuvent être mises en jeu dans l'expression de gènes pro-inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies où la composante inflammatoire est importante.

D'un autre côté, les recherches des deux dernières décennies, en particulier celles menées à l'unité de recherche en arthrose, ont permis de démontrer l'importance des phénomènes inflammatoires dans le développement de l'OA (Kapoor et al., 2011; Pelletier et al., 1991). La tendance actuelle assimile l'OA à une maladie inflammatoire locale où plusieurs médiateurs inflammatoires sont mis en jeu dans la destruction du cartilage ainsi que dans les différents changements s'opérant dans les autres tissus articulaires, la MS en particulier (Sellam and Berenbaum, 2010).

L'objectif de mon projet de recherche a été d'étudier les capacités anti-inflammatoires des iHDAC au niveau des cellules du cartilage articulaire : les chondrocytes, et de celles majoritaires de la MS : les fibroblastes synoviaux. Dans ce projet, nous avons également déterminé les mécanismes moléculaires par lesquels les

iHDAC exercent leurs actions anti-inflammatoires, ainsi que les HDAC impliquées dans la régulation de l'expression de la mPGES-1.

Association HDAC/répression versus activation transcriptionnelle.

Nous avons commencé ce projet par l'analyse de l'effet des iHDAC sur l'expression des gènes pro-inflammatoires COX-2 et iNOS au niveau des chondrocytes articulaires de genoux humain OA (Chabane et al., 2008). Nous avons montré (Chabane et al., 2008) que l'inhibition des HDAC par la TSA et le NaBu, deux des iHDAC les plus utilisés *in vitro*, au niveau des chondrocytes OA, conduit à une suppression dose-dépendante de la production de NO et de la PGE₂ induite par l'IL-1 β , le TNF- α ou l'IL-17. Ceci démontre que l'effet des iHDAC utilisés n'est pas IL-1 spécifique et qu'il cible des voies communes impliquées dans la production de la PGE₂ et de NO. Les inhibitions obtenues sont en corrélation avec la suppression de la synthèse protéique des enzymes COX-2 et iNOS. De même, la TSA et le NaBu suppriment l'expression des deux enzymes au niveau de l'ARNm, ce qui implique que ces inhibiteurs agissent au moins au niveau transcriptionnel.

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que ces résultats diffèrent de ce qui est connu en général quand à l'association acétylation/déacétylation des histones à l'activation/répression de la transcription respectivement. En effet, l'utilisation d'un iHDAC devrait en théorie activer l'expression génique au lieu de la réprimer, puisque l'inhibition des HDAC favoriserait l'action des HAT, qui, en acétylant les histones, permettent l'ouverture de la chromatine et ainsi la transcription. Cependant, ceci n'est pas notre cas. En réalité, ce profil de résultats a commencé à être observé il y a déjà une décennie. Des études avaient montré que la TSA et le NaBu sont capables de supprimer l'action et la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales coliques (Segain et al., 2000; Yin et al., 2001). Des études de transcriptome ont montré par la suite qu'il y a autant de gènes activés que réprimés, lors d'un traitement de cellules par des iHDAC (Chambers et al., 2003; Glaser et al., 2003; Peart et al., 2005). La régulation

des gènes par les HAT/HDAC est donc complexe et dynamique avec les HAT qui peuvent verrouiller l'expression génique, et les HDAC qui peuvent favoriser la transcription.

L'effet suppresseur des iHDAC sur l'expression des enzymes COX-2 et iNOS a aussi été rapporté dans d'autres études. Ainsi, l'expression de la COX-2 dans une lignée cellulaire de colon est inhibée par la TSA et le NaBu en présence de TNF- α (Tong et al., 2005). De même, l'expression de la COX-2 et la production de la PGE₂ sont inhibées par la TSA dans une lignée de cellules stromales endométriales stimulées avec l'IL-1 β (Wu and Guo, 2007), ainsi que dans les cellules endothéliales vasculaires ombilicales stimulées avec le LPS (Hsu et al., 2011).

Il a été rapporté que l'expression de la iNOS et la production de NO sont également affectées par les iHDAC (Larsen et al., 2007; Lewis et al., 2011). Ainsi, le traitement des cellules mésangiales murines par la TSA diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur de la iNOS et la production de NO induite par les cytokines ou le LPS (Yu et al., 2002). Dans une autre étude, l'inhibiteur ITF2357 supprime, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, dans un modèle animal de diabète, la production de NO et l'expression de la iNOS (Lewis et al., 2011). Un autre iHDAC, MS-275, inhibe l'expression de la iNOS dans un modèle expérimental de polyradiculonévrite (Zhang et al., 2010).

À partir de ces données, il apparaît que les iHDAC induisent des effets anti-inflammatoires, malgré la diversité des inhibiteurs utilisés, ainsi que celle des stimuli et des modèles pathologiques. Une explication possible de cette propriété se trouve au niveau du mode d'action des iHDAC. Ces derniers sont en effet capables d'agir non seulement sur les histones, mais aussi sur des protéines non histones, et principalement sur les facteurs de transcription. Les différents agents inflammatoires cités dans les deux paragraphes précédents partagent dans leur voie de signalisation plusieurs facteurs de transcription, ce qui implique que l'inhibition de ces facteurs bloquerait les effets situés en aval dont la suppression de l'expression des gènes cibles, ceux codant pour la COX-2 et la iNOS dans notre cas.

À l'inverse de nos résultats, il existe des études qui ont montré que l'induction de la iNOS et la COX-2 par des médiateurs pro-inflammatoires peut être augmentée par les iHDAC dont ceux que nous avons utilisés. Ainsi, l'expression de la COX-2 est augmentée dans les macrophages dérivant de la moelle osseuse de souris stimulés avec le LPS et traités avec la TSA, le NaBu ou le SAHA (Halili et al., 2010). Les mêmes résultats ont été obtenus dans une autre étude, avec la TSA comme inhibiteur et le LPS comme inducteur (Aung et al., 2006). D'autres équipes ont également rapportés des situations pareilles avec la iNOS. Ainsi, la TSA et le SAHA augmentent la production de NO induite par le LPS dans les cellules mésangiales (Suuronen et al., 2003). De même, le NaBu augmente l'expression de la iNOS et la production de NO dans les cellules épithéliales intestinales traitées avec le LPS + IFN- γ (Stempelj et al., 2007). Ces données sont en accord avec la fonction répressive attribuée aux HDAC dans le contrôle de l'expression des gènes de la COX-2 et iNOS. En effet, le processus d'acétylation joue un rôle important dans l'expression de ces deux gènes (Farrajota et al., 2005; Granja et al., 2006; Pero et al., 2011).

Ces divergences (association HDAC/répression transcriptionnelle ou HDAC/activation transcriptionnelle) peuvent résulter des différences dans les concentrations utilisées entre les différents travaux. En effet, certaines données suggèrent que l'effet anti-inflammatoire des iHDAC est obtenu aux faibles concentrations, alors que l'effet pro-inflammatoire s'observe lorsque des concentrations élevées sont employées. Par exemple, dans l'étude de *Halili et al.* (cf. paragraphe précédent), pour obtenir une surexpression de la COX-2 induite par le LPS, la TSA a été utilisée à une concentration de 500 nM. Lorsqu'une concentration de 10 nM est utilisée, il y a absence d'effet sur l'expression de la COX-2 induite par le LPS (Halili et al., 2010).

Dans notre étude, les concentrations utilisées pour la TSA et le NaBu sont de 250 ng/ml (~800 nM) et 10 mM respectivement. Des concentrations un peu plus faibles peuvent aussi avoir un effet suppresseur significatif, mais la suppression est presque totale aux concentrations maximales. Le NaBu appartient aux iHDAC de la classe des acides gras à courte chaîne aliphatique. Ces derniers sont caractérisés par leur faible puissance d'où les

concentrations en mM utilisées. De plus, plusieurs études ont rapporté un effet anti-inflammatoire pour la TSA lorsque celle-ci est utilisée à des concentrations de quelques centaines de nM (Larsen et al., 2007; Wu and Guo, 2007; Yamaguchi et al., 2005; Yu et al., 2002). Il est donc possible que l'effet anti- ou pro-inflammatoire des iHDAC soit également dépendant de d'autres facteurs tels que l'inhibiteur utilisé, le type cellulaire, la pathologie concernée et l'agent inducteur.

Effets des iHDAC sur le catabolisme et l'anabolisme.

Les conséquences de la suppression de l'expression de la COX-2 et de la iNOS par les iHDAC peuvent être multiples. En analysant l'effet de la TSA et de NaBu sur l'activité pro-catabolique de l'IL-1, nous avons montré que les deux inhibiteurs suppriment d'une manière dose-dépendante la dégradation des Pg de la MEC induite par l'IL-1, ce qui suggère que les iHDAC que nous avons utilisés sont chondroprotecteurs. Ce résultat est en accord avec les travaux de *Young et al.* qui ont montré que la TSA et le NaBu sont capables de supprimer la perte de Pg et de collagène induite par les cytokines (IL-1 α /oncostatine M) dans une culture d'explants de cartilage nasal bovin (Young et al., 2005).

L'implication de l'IL-1 β et des enzymes iNOS et COX-2 dans la dégradation du cartilage articulaire est bien documentée. Avec les travaux qui ont été effectués ces dernières années, il apparait que l'effet protecteur du cartilage conféré par les iHDAC peut être direct ou indirect (Hong et al., 2009; Wang et al., 2009; Young et al., 2005). Ainsi, les iHDAC, en supprimant la production de NO et de la PGE₂, réduisent indirectement la dégradation du cartilage. Il est possible, toujours dans l'effet indirect, qu'en absence de NO et de la PGE₂, on supprime toutes les boucles de rétrocontrôle positives que peuvent avoir ces molécules entre elles, ainsi qu'avec les cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 β et le TNF- α . Il a également été rapporté que les iHDAC peuvent aussi agir sur l'expression de ces cytokines ainsi que d'autres cytokines de type inflammatoire. Ainsi, *in vitro*, l'expression induite par les TLR (*Toll-like receptor*) de l'IL-12p40, au niveau protéique et de l'ARNm, est fortement inhibée par la TSA ou le SAHA au niveau des cellules

dendritiques murines (Bode et al., 2007). De même, la production de l'IL-6 et de TNF- α par les macrophages synoviaux stimulés par le LPS est supprimée sous l'action de la TSA (Grabiec et al., 2010). Enfin, le SAHA supprime plus de 50% de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IFN- γ et IL-12 au niveau des cellules mononuclées sanguines stimulées par le LPS (Leoni et al., 2002). *In vivo*, il a été montré que le taux des cytokines pro-inflammatoires circulantes IL-1 β , TNF- α et IL-6 diminue chez les souris traitées avec le LPS et ayant reçu par voie orale le SAHA (Leoni et al., 2002). L'utilisation d'un autre inhibiteur, ITF2357, réduit de 50% les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ , chez les souris traitées avec le LPS (Leoni et al., 2005).

Un effet direct des iHDAC sur les protéases de la MEC a aussi été rapporté. Ainsi, dans une culture de cellules SW1353 (lignée cellulaire de chondrosarcome) et de chondrocyte articulaire humain OA, la TSA et le NaBu inhibent l'expression induite par l'IL-1/oncostatine M des MMP-1 et -13, et des ADAMTS-4, -5 et -9 (Young et al., 2005). Les niveaux protéiques et l'activité enzymatique des MMP-1 et -13 sont également affectés par ces inhibiteurs. Dans une autre étude, Wang *et al.* ont montré que la TSA est capable d'inhiber l'effet inducteur de l'IL-1 β et de FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) sur l'expression des MMP-1, -3 et -13 (Wang et al., 2009).

Les iHDAC possèdent donc des effets anti-cataboliques. Quel est leur effet sur l'anabolisme ? L'action des iHDAC sur l'anabolisme a été examinée dans quelques études au niveau des chondrocytes. D'après ces travaux, l'effet des iHDAC est temps-dépendant. En effet, alors que certaines études ont montré une activation précoce (4-8h) de l'expression des gènes *Col2a1* (code pour le collagène de type II) et de l'*aggrécane* en présence de la TSA (Furumatsu et al., 2005b; Wang et al., 2009), d'autres ont rapporté que ces gènes sont inhibés à des temps tardifs de culture (>24h) (Huh et al., 2007; Wang et al., 2009). Entre les deux temps (6h), les iHDAC sont sans effet sur les deux gènes (Wang et al., 2009; Young et al., 2005). Dans une étude de Hong *et al.*, les mêmes résultats ont été obtenus, mais avec des fenêtres de temps qui sont décalées (12h (augmentation de l'expression), 72h (sans effet) et 6 jours (réduction de l'expression) de culture) (Hong et al.,

2009). Il est possible que l'inhibiteur utilisé soit à l'origine de ces différences puisque dans cette dernière étude, c'est le NaBu qui est employé. Les auteurs de ce travail suggèrent que les iHDAC, en diminuant les processus cataboliques et anaboliques au niveau du cartilage, permettent de ralentir le turnover de la MEC, ce qui permet de la préserver.

Effets des iHDAC sur la prolifération et la survie cellulaire.

Les iHDAC sont capables d'induire des effets anti-prolifératif et pro-apoptotique (Xu et al., 2007). Il est alors raisonnable de se demander si ces effets sont observés lorsque des cellules articulaires, comme les chondrocytes et les synoviocytes, sont traitées avec les iHDAC.

L'apoptose des chondrocytes étant augmentée dans l'OA (Kuhn et al., 2004; Zamli and Sharif, 2011), il est donc important de préserver le lot cellulaire restant pour assurer un certain renouvellement de la matrice cartilagineuse. Dans nos travaux, nous n'avons pas observé d'effet sur la survie des chondrocytes ou des fibroblastes synoviaux sous l'action de la TSA, NaBu ou VA, ce qui est en accord avec d'autres études. *Wang et al.* ont montré que la TSA (200nM) n'induit pas l'apoptose des chondrocytes, mais possède des effets anti-prolifératifs dans une culture de chondrocyte stimulée avec le facteur de croissance FGF2. L'action favorable à la survie des chondrocytes par le FGF2 n'est pas également réduite par la TSA. L'effet anti-prolifératif des iHDAC est observé après 6 jours de culture, mais non pas à 1 jour ou 3 jours (Wang et al., 2009). Dans une autre étude, il a été rapporté que le traitement prolongé (>2 semaines) d'une culture de chondrocyte OA par le NaBu (5mM) conduit à un arrêt de la croissance cellulaire, mais sans affecter la viabilité cellulaire, contrairement à son action pro-apoptotique dans des cultures de lignées cellulaires tumorales de chondrosarcome, et de sarcome synovial humain (Hong et al., 2009). De plus, dans notre étude, nous avons également travaillé sur les chondrocytes de sujets normaux, et nous n'avons pas observé de différence dans la réponse des cellules aux traitements par les iHDAC par rapport aux chondrocytes OA.

L'ensemble de ces données sont en accord avec ce qui est connu dans la littérature quant à l'arrêt de la prolifération cellulaire sous l'action des iHDAC, aussi bien dans les cellules normales que dans les cellules transformées, avec une différence dans le temps nécessaire pour obtenir cet arrêt (Xu et al., 2007). L'arrêt de la division cellulaire peut être le résultat de l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines (Hong et al., 2009). L'inhibition de ces kinases a été observée également dans les fibroblastes synoviaux de patients AR stimulés avec le depsipeptide (Nishida et al., 2004). Les mécanismes moléculaires de la résistance relative des cellules normales à l'apoptose sous l'effet des iHDAC sont mal connus. Une des hypothèses émises est la capacité des iHDAC à induire la protéine TBP-2 (*Trx binding protein-2*) dans les cellules tumorales et non pas dans les cellules normales. La TBP-2 est capable de se lier à la protéine Trx (*thioredoxin*), un antioxydant capable de capter les ROS et d'inhiber la protéine inductrice de l'apoptose ASK1 (*apoptosis signaling kinase 1*). L'emploi d'un iHDAC dans les cellules normales, comme il ne conduit pas à une augmentation de la TBP2, conserve l'activité antioxydante des Trx, empêchant l'accumulation des ROS, et protégeant les cellules contre l'apoptose via l'inhibition de l'ASK1 (Marks and Xu, 2009). Il a été rapporté que la Trx est exprimée dans le cartilage murin où elle favoriserait la réparation tissulaire lors du stress oxydatif (Kakimaru et al., 2005).

Expression et fonction des HDAC au niveau du cartilage.

Plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'expression et au rôle des HDAC dans le cartilage OA. Higashiyama et al. ont montré que les HDAC1 à 11 sont exprimées dans le cartilage OA. Le taux d'ARNm de HDAC7 est significativement plus élevé dans le cartilage OA que normal, et plusieurs cellules de la zone moyenne et profonde du cartilage OA expriment fortement HDAC7. Le ciblage de HDAC7 par siRNA au niveau des cellules SW1353 supprime l'expression induite par l'IL-1 β de la MMP-13, ce qui implique que HDAC7 pourrait contribuer dans la dégradation du cartilage via l'induction de l'expression génique de la MMP-13 (Higashiyama et al., 2010). Dans une autre étude,

qui s'est intéressée principalement aux HDAC1, 2 et 6, il a été montré que les niveaux protéiques des HDAC1 et 2, et le taux d'ARNm de HDAC2 sont élevés dans les chondrocytes OA comparés aux cellules normales. La surexpression de HDAC1 et 2 dans les chondrocytes conduit à la diminution de l'expression de l'*aggrécane* et de celle de *coll2A1*. Le ciblage de HDAC2 par siRNA permet une augmentation de l'expression de ces deux gènes anaboliques (Hong et al., 2009). Les HDAC1 et 2 exercent leur effet répressur en partie via leur domaine C-terminal. Ce dernier sert de module de ciblage des gènes et au recrutement du facteur répressur de l'expression de *col2a1*, Snail (Hong et al., 2009).

Ces données suggèrent que le processus d'acétylation/déacétylation des histones est impliqué dans l'homéostasie du cartilage. Ceci a été démontré pour les gènes anaboliques tel que *Col2a1* au niveau des chondrocytes. En effet, l'expression de ce gène nécessite l'ouverture de la chromatine via l'acétylation des histones par CBP/p300. Ces HAT sont importantes dans la chondrogenèse. Elles sont recrutées par le complexe formé de l'association entre Sox9, un régulateur clé de l'expression de *Col2a1*, et le facteur de transcription Smad3 (*small mothers against decapentaplegic deleted in pancreatic carcinoma*) (Furumatsu et al., 2005b; Furumatsu et al., 2005a). Les HAT CBP/p300 sont également mises en jeu dans l'expression du marqueur chondrocytaire *cd-rap* (*cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein*) qui code pour une protéine de la MEC du cartilage (Imamura et al., 2008).

Les HDAC sont également importantes pour l'homéostasie du cartilage. Ainsi, HDAC4 joue un rôle crucial dans le contrôle du développement du cartilage, puisque les souris invalidées pour le gène codant pour HDAC4 présentent un excès dans l'hypertrophie des chondrocytes et l'ossification (Vega et al., 2004). L'HDAC4 contrôlerait l'hypertrophie des chondrocytes et la croissance osseuse en se liant et inhibant l'activité du facteur de transcription Runx2 (*runt-related transcription factor 2*), le régulateur de l'hypertrophie des chondrocytes et de l'ossification endochondrale et intra-membranaire (Stein et al., 2004). Cette inhibition empêche l'hypertrophie prématurée des chondrocytes.

La classe III des HDAC, les sirtuines, est également impliquée dans l'homéostasie du cartilage. Cette classe intervient dans les processus de survie, de vieillissement cellulaire et d'apoptose (Lavu et al., 2008). Comme l'OA est une maladie liée à l'âge et où les chondrocytes se font rares, du fait de l'apoptose, des études ont analysé l'expression ainsi que la fonction des sirtuines dans les chondrocytes. Parmi celles-ci, SIRT1 est exprimée aussi bien dans les chondrocytes OA que normaux avec une tendance vers des niveaux plus faibles dans les chondrocytes OA (Takayama et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés par des analyses immunohistochimiques ainsi que par d'autres équipes (Fujita et al., 2011; Gagarina et al., 2010). *Fujita et al.* ont montré également que le cartilage issu des zones sévèrement atteintes par la dégradation exprime moins SIRT1 par rapport à celui des zones plus conservées.

La fonction de SIRT1 dans les chondrocytes serait de les protéger contre l'hypertrophie (Fujita et al., 2011) et l'apoptose (Takayama et al., 2009), en partie en réprimant l'expression de la phosphatase PTP1B (*protein tyrosin phosphatase 1B*), une protéine pro-apoptotique puissante qui est surexprimée dans le cartilage OA (Gagarina et al., 2010).

D'autres fonctions ont également été attribuées aux SIRT au niveau des chondrocytes. Ainsi, SIRT1 possède des capacités pro-anaboliques et anti-cataboliques en favorisant l'expression du collagène de type II et de l'aggrécane, et la répression de ADAMTS-5 (Dvir-Ginzberg et al., 2008; Fujita et al., 2011). La SIRT1 présente aussi des propriétés anti-inflammatoires, puisque, activée par le resvératrol, un anti-oxydant naturel et un activateur potentiel de SIRT1, elle est capable de supprimer l'expression induite par l'IL-1 β de la iNOS au niveau des chondrocytes murins (Lei et al., 2011).

Étant donné que la PGE₂ et le NO possèdent des effets pro-apoptotiques et pro-inflammatoires, il est possible que l'inhibition des différents membres des HDAC, en dehors de ceux de la classe III, favorise l'action des SIRT, en particulier SIRT1, et renforce ainsi les capacités anti-inflammatoires et anti-apoptotiques des cellules chondrocytaires.

Effet anti-inflammatoire des iHDAC au niveau des cellules de la synoviale.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons analysé l'effet des iHDAC sur l'expression du gène pro-inflammatoire codant pour la mPGES-1 dans les fibroblastes synoviaux OA humains. Nous avons également déterminé l'isoforme HDAC qui est impliquée dans l'expression de la mPGES-1 ainsi que le mécanisme moléculaire par lequel la TSA agit. Nous avons montré que la TSA, NaBu et VA suppriment l'expression au niveau protéique et de l'ARNm de la mPGES-1 induite par l'IL-1 β , le TNF- α ou l'IL-17. La TSA inhibe également l'activation du promoteur de la mPGES-1, confirmant que la suppression de l'expression de la mPGES-1 se fait au niveau transcriptionnel. La surexpression de HDAC4 augmente l'activation du promoteur de la mPGES-1, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on surexprime HDAC1, 2, 3, 5 ou 6. En accord avec ce résultat, l'inhibition de HDAC4 par siRNA réduit l'expression protéique et l'activation du promoteur de la mPGES-1, ainsi que la production de la PGE₂. L'HDAC4 contribue donc dans l'expression de la mPGES-1 (Chabane et al., 2009).

La régulation de l'expression de la mPGES-1 sur le plan épigénétique n'a pas été rapportée auparavant. Nous sommes donc les premiers à montrer qu'en plus des autres modes de régulation auxquels la mPGES-1 est soumise, le processus d'acétylation/déacétylation est également impliqué dans son expression.

L'inflammation de la MS est observée dans plus de 50% des cas d'OA symptomatique (Ayril et al., 2005). Même si l'OA n'est pas classée traditionnellement comme un désordre inflammatoire et que la synovite dans ce cas est moins intense par rapport à celle observée chez les sujets avec AR, de plus en plus d'étude sont en faveur du rôle important de la MS dans l'inflammation et la dégradation du cartilage articulaire (Sellam and Berenbaum, 2010). La capacité des iHDAC à supprimer la production de la PGE₂ induite par les cytokines pro-inflammatoires, par les cellules majoritaires de l'intima synoviale, suggère qu'ils peuvent exercer des effets bénéfiques (directs ou indirects) sur l'articulation en inhibant/ralentissant le processus d'aggravation de la dégradation du cartilage articulaire assuré par la MS inflammée. Ils peuvent exercer cet effet en supprimant

l'expression induite par la PGE₂ des cytokines pro-inflammatoires, des MMP, des chémokines, des facteurs pro-angiogéniques générés par les différentes cellules qui composent la MS, ainsi que par les chondrocytes. Par exemple, il a été rapporté que le traitement des souris par le decapeptide, dans un modèle d'arthrite médiée par les anticorps, permet de réduire l'inflammation de la synoviale et la destruction du cartilage et de l'os (Nishida et al., 2004). Les niveaux d'IL-1 β et de TNF- α dans le tissu synovial sont aussi réduits. La TSA, dans un modèle d'arthrite induite au collagène chez la souris, permet aussi d'avoir une réduction de l'inflammation, de la dégradation du cartilage et de l'érosion osseuse. Le nombre de cellules marquées pour MMP-1 et -13 est réduit chez les animaux traités avec la TSA, l'inverse étant observé pour TIMP-1 (Nasu et al., 2008).

En diminuant la production de la PGE₂, les iHDAC pourraient également agir sur la douleur, étant donné que la MS est un tissu innervé et vascularisé, et que la PGE₂ est le médiateur majoritaire responsable de l'hyperalgie dans l'OA. De plus, il existe des données qui démontrent le potentiel thérapeutique contre la douleur des iHDAC (Chiechio et al., 2009; Lu et al., 2010).

Expression des HDAC dans la synoviale.

Les données disponibles, concernant l'expression des HDAC dans la MS, sont limitées. Dans notre travail, nous avons observé que HDAC1 à 6 sont exprimées dans les fibroblastes synoviaux OA. L'expression tissulaire synoviale des HDAC a été évaluée chez les sujets OA, AR et normaux dans deux études. Ces dernières ont montré qu'il n'existe pas de différence significative dans l'activité des HDAC entre le tissu synovial OA et celui de sujets sains. Les mêmes résultats sont observés pour l'activité HAT (Huber et al., 2007; Kawabata et al., 2010). Toutes les HDAC analysées (HDAC1 à 8) sont exprimées dans le tissu synovial OA et normal avec l'absence de différences entre les deux tissus pour chacune des HDAC testées (Kawabata et al., 2010). Les deux études divergent cependant concernant l'activité HDAC totale et l'expression de HDAC1 au niveau du tissu synovial AR par rapport aux tissus OA et normaux. Alors que le travail de *Huber et al.* rapporte une

baisse de l'activité des HDAC, et donc du rapport HDAC/HAT dans le groupe AR, celui de *Kawabata et al.*, à l'inverse de la précédente étude, souligne que la synoviale des sujets AR présente une augmentation de l'activité HDAC et de l'expression de l'ARNm de HDAC1. De plus, dans cette étude, le niveau d'expression de HDAC4 est plus faible chez les sujets AR par rapport aux sujets OA et normaux. Une troisième étude a comparé, au niveau des fibroblastes synoviaux, le taux d'ARNm des HDAC1 à 11 entre les sujets OA et AR. Il est montré dans cette étude que les taux les plus élevés des HDAC sont ceux de HDAC2, et que seule HDAC1 présente une différence significative, avec des valeurs plus élevées dans les tissus AR (Horiuchi et al., 2009), ce qui est en accord avec l'étude de *Kawabata et al.*

La conclusion de ces différents travaux est que l'expression des gènes pro-inflammatoires dans la MS est soit favorisée par la baisse de l'activité HDAC (Huber et al., 2007) ou bien par sa hausse (Horiuchi et al., 2009; Kawabata et al., 2010). Dans le premier cas, l'utilisation des iHDAC ne serait pas recommandable, dans le second cas, il l'est. D'un autre côté, *Horiuchi et al.* ont aussi montré que l'inhibition de HDAC1 par siRNA augmente la production de la MMP-1 par les fibroblastes synoviaux AR induites par le TNF- α , ce qui ne concorde pas avec la présence de niveau élevé de HDAC1 dans les fibroblastes synoviaux AR (Horiuchi et al., 2009).

Plusieurs limites peuvent être à l'origine des contradictions observées dans ces travaux : utilisation de tissu total versus cellules, petit nombre d'échantillons, analyse d'ARN versus protéine, différences techniques, patients OA utilisés comme contrôle, durée de la maladie, sites d'articulation touchés différents dans la même étude, et personnes de sexes différents. L'utilisation d'une grande cohorte de patients semble être nécessaire pour avoir une idée définitive sur l'expression des HDAC dans le tissu synovial y compris chez les patients OA.

Effets des iHDAC in vivo dans les modèles animaux OA.

L'analyse de l'effet des iHDAC dans un modèle animal OA a été rapportée récemment. *Chen et al.*, dans une première publication, ont examiné l'effet de la TSA (250 ng/ml) dans un modèle expérimental OA par chirurgie (rupture unilatérale du ligament croisé antérieur), chez le lapin (*Chen et al.*, 2010). Cette étude a montré qu'au niveau morphologique, il n'existe pas de différence significative dans la dégradation du cartilage entre les animaux traités avec la TSA (groupe TSA) et ceux qui n'ont pas été traités (groupe OA), bien que la dégradation dans le groupe TSA apparait moins sévère. Au niveau histologique, l'hypocellularité et la perte de Pg sont plus prononcées chez les animaux du groupe OA. L'expression des gènes cataboliques codant pour les MMP-1, -3 et -13 et pour l'IL-1 β dans le cartilage des animaux du groupe TSA est supprimée.

La même équipe de recherche, dans une seconde étude, a montré que l'expression au niveau de l'ARNm des cathepsines (K, B, L et S) est également supprimée dans le cartilage des animaux ayant été traités avec la TSA (*Chen et al.*, 2011).

D'autres études *in vivo* plus approfondies sont certainement nécessaires pour évaluer l'effet prophylactique des iHDAC, ainsi que leur effet sur la progression de l'OA. L'intérêt doit en particulier être porté sur l'utilisation d'autres modèles animaux, l'analyse des niveaux protéiques des facteurs cataboliques et pro-inflammatoires dont ceux de la COX 2 et de la iNOS dans le cartilage, et l'analyse des facteurs anaboliques et des facteurs de croissance. L'utilisation d'autres iHDAC doit également être envisagée. En effet, la TSA est utilisée à l'origine comme antifongique isolé à partir de *Streptomyces hygroscopicus* (*Tsuji et al.*, 1976). C'est le premier hydroxamate naturel découvert comme un iHDAC avec des propriétés antiprolifératives, mais elle n'est pas utilisée en thérapeutique du fait de sa toxicité (*Kijima et al.*, 1993; *Yoshida et al.*, 1990).

L'état de la MS n'a pas aussi été examiné dans les deux études précédentes. Néanmoins, plusieurs données dans des modèles animaux AR apportent des arguments en faveur de fonctions anti-inflammatoires des iHDAC dans ce tissu. En effet, en plus des travaux que j'ai cités dans l'introduction et la discussion, d'autres études confirment ce rôle. Ainsi,

l'utilisation du depsipeptide, dans un modèle d'arthrite à adjuvant chez le rat, permet de prévenir le développement de la maladie lors d'un traitement prophylactique, et de réduire la destruction de l'os et les gonflements articulaires dans un modèle thérapeutique (Nakamura et al., 2005). Deux études récentes ont montré, dans des modèles d'AR aiguës (AR induite par une paroi streptococcique) ou chroniques (AR à adjuvant ou au collagène), que les composants ITF-2357 et TSA sont capables de réduire le gonflement articulaire, la destruction de l'os (Joosten et al., 2011; Zhou et al., 2011), l'influx cellulaire dans la cavité articulaire, l'inhibition de la synthèse des Pg et les niveaux d'IL-1, de TNF- α , d'IL-6, d'IL-12 et des chémokines (Joosten et al., 2011).

Des différences existent entre les fibroblastes synoviaux OA et AR, quant à leur réponse *in vitro* aux traitements par les iHDAC, avec un effet antiprolifératif pour les premières cellules et pro-apoptotique pour les secondes, dû au fait que les fibroblastes synoviaux AR sont des *tumor-like cells*. Malgré ça, les effets anti-inflammatoires et anti-cataboliques avec arrêt/réduction de l'érosion osseuse, de la dégradation du cartilage et de l'inflammation synoviale observés dans les différents modèles animaux AR, suggèrent le potentiel élevé que peuvent avoir les iHDAC dans le traitement de l'OA.

iHDAC et application thérapeutique chez l'homme.

Les iHDAC sont utilisés chez l'homme pour le traitement de pathologies néoplasiques. À ce jour, la FDA (*Food and Drug Administration*) a approuvé le vorinostat (Zolinza®, SAHA) en 2006 (Duvic et al., 2007), et la romedepsine (Istodax®, depsipeptide, FK228) en 2009, pour le traitement du lymphome cutané à cellule T (Bertino and Otterson, 2011).

L'optimisme concernant l'avenir des iHDAC dans les maladies dégénératives articulaires est renforcé par un essai clinique réalisé récemment chez des enfants atteints d'arthrite juvénile idiopathique avec début systémique (SOJIA pour *systemic onset juvenile idiopathic arthritis*) (Vojinovic and Damjanov, 2011; Vojinovic et al., 2011). La SOJIA est une atteinte inflammatoire articulaire, débutant dans l'enfance ou l'adolescence, et qui est

caractérisée par l'intensité des signes extra-articulaires (fièvre, éruption) (Gare and Fasth 2008). Dans leur étude, Vojinovic et al. ont évalué par voie orale, l'efficacité et la toxicité du givinostat qui inhibe les HDAC de classe I et II, chez 17 enfants atteints de SOJIA, pendant 12 semaines. Les résultats obtenus à la fin de l'essai ont montré une réduction du nombre d'articulations avec des signes de maladie active et/ou une limitation de l'amplitude des mouvements. Le nombre total de globules blancs, le pourcentage des neutrophiles, les concentrations de l'IL-1 α et de CD40L sont également réduites, après 2 à 4 semaines de traitement. La tolérance aux médicaments a été aussi jugée excellente avec des effets secondaires, nausées, vomissements et fatigue, légers à modérés et de courte durée.

Dans plusieurs maladies articulaires, les iHDAC ont donc montré, *in vitro* et/ou *in vivo*, des effets anti-inflammatoires avec la suppression de la production des médiateurs inflammatoires dont les cytokines et les prostaglandines, et des protéases de la MEC. L'avantage de ces effets, c'est qu'ils peuvent être obtenus à des doses qui sont considérablement plus faibles que celles nécessaires pour avoir un effet anti-tumoral dans les essais contre le cancer. L'autre avantage des iHDAC est qu'ils ont déjà été utilisés en médecine et continuent de l'être pour certains, même si on ignorait leur effet sur les histones. Ainsi, le NaBu, premier produit à être décrit comme un iHDAC (Boffa et al., 1978), a été utilisé pendant plusieurs années pour induire l'expression génique de l'hémoglobine F chez les enfants et les adultes atteints de drépanocytose (Dover et al., 1994; Wang, 2008). Cependant, à cause de sa très faible puissance et de sa courte demi-vie (30-40 capsules/jour), son utilisation a été abandonnée *in vivo* (Davie, 2003; Wang, 2008), même si d'autres stratégies d'utilisation sont explorées (Hines et al., 2008). Le VA est à l'origine un agent antiépileptique utilisé dans le traitement de l'épilepsie, mais qui peut aussi être utilisé comme régulateur de l'humeur, dans le traitement de fond de la migraine et dans les douleurs neurogènes (Peterson and Naunton, 2005). Des essais cliniques avec d'autres iHDAC sont en cours également, pour le traitement d'autres maladies non cancéreuses comme le GvHD (*Graft Versus Host Disease*) (Choi and Reddy, 2011).

Mécanismes moléculaires d'action des iHDAC.

Parmi les objectifs de cette thèse, déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels les iHDAC exercent leurs effets anti-inflammatoires. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour rendre compte de ces effets.

Effet sur l'acétylation des histones des gènes cibles (Figure 22).

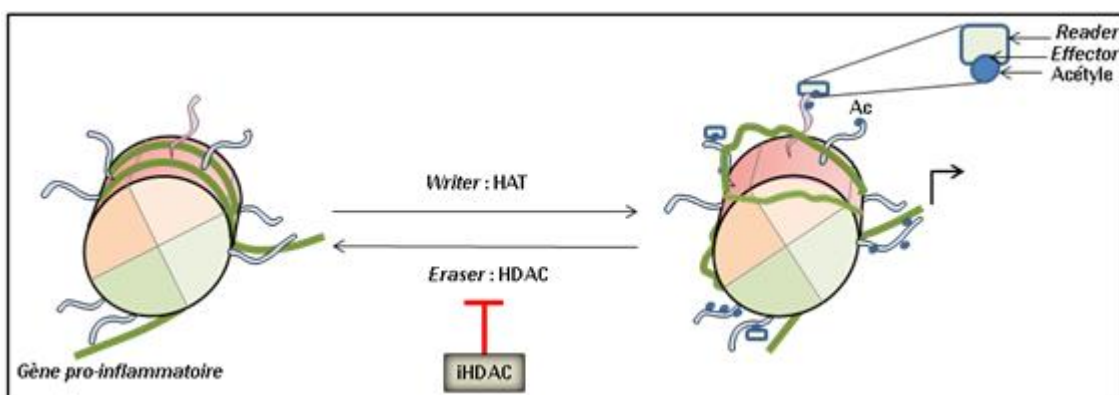


Figure 22 : Action des iHDAC sur les gènes cibles selon l'hypothèse électrostatique et du code histone.

Ce mécanisme ne permet pas d'expliquer l'effet suppresseur des iHDAC sur l'expression de la COX-2 et iNOS. D'une part, ces gènes sont connus pour être régulés par les HAT, qui favorisent leur expression, et par certaines HDAC qui les inhibent (Cao et al., 2007; Granja et al., 2006; Pero et al., 2011). Le traitement des fibroblastes synoviaux avec l'Il-1 β permet une augmentation du niveau d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur du gène de la COX-2 (Chabane et al., 2009; Farrajota et al., 2005). D'autre part, le traitement par les iHDAC, induit une hyperacétylation des histones *in vitro* (Ellis et al., 2008a; Roger et al., 2011) et *in vivo* (Schrump et al., 2008). Or, l'expression induite par les cytokines pro-inflammatoires de nos gènes d'intérêt est supprimée dans les

chondrocytes traités avec la TSA ou NaBu. Ceci implique que l'acétylation des histones n'est pas automatiquement associée à l'activation de la transcription.

Ce mécanisme ne permet pas également d'expliquer l'effet de la TSA sur l'expression de la mPGES-1. En effet, l'IL-1 β induit le recrutement de HDAC4 au niveau du promoteur de la mPGES-1. Ce recrutement n'est pas accompagné d'une déacétylation des histones H3 et H4, suggérant que HDAC4 participe dans l'induction de la mPGES-1 de manière indépendante de la déacétylation locale des histones H3 et H4, et que de ce fait, la TSA ne peut pas agir à travers l'hyperacétylation des histones (Chabane et al., 2009). De plus, il a été rapporté que les iHDAC induisent l'expression d'Egr-1 (Kim et al., 2009; Pan et al., 2007; Tur et al., 2010). Si ce dernier est induit dans les fibroblastes synoviaux, ceci devrait théoriquement augmenter l'expression de la mPGES-1, ce qui n'est pas le cas. Il est alors possible que la TSA exerce son action, soit sur la liaison d'Egr-1 aux sites GC box du promoteur de la mPGES-1 ou sur son activité transcriptionnelle.

Ce mécanisme d'action pourrait cependant être à l'origine de l'effet pro-anabolique des iHDAC rapporté par certaines études, au moins celui observée *in vitro* dans les phases précoces de traitement des cellules par les iHDAC. Ainsi, au niveau des chondrocytes traités avec la TSA pendant 4h, le niveau d'acétylation des histones H3/H4 autour de l'enhancer du gène *Col2a1* est augmenté via l'action de la p300. L'enhancer du collagène de type II contient le site de liaison de Sox9. Celui-ci peut s'associer à p300, ce qui permet la transcription génique (Furumatsu et al., 2005b).

Effet sur l'acétylation des histones des gènes codant pour des protéines anti-inflammatoires (Figure 23).

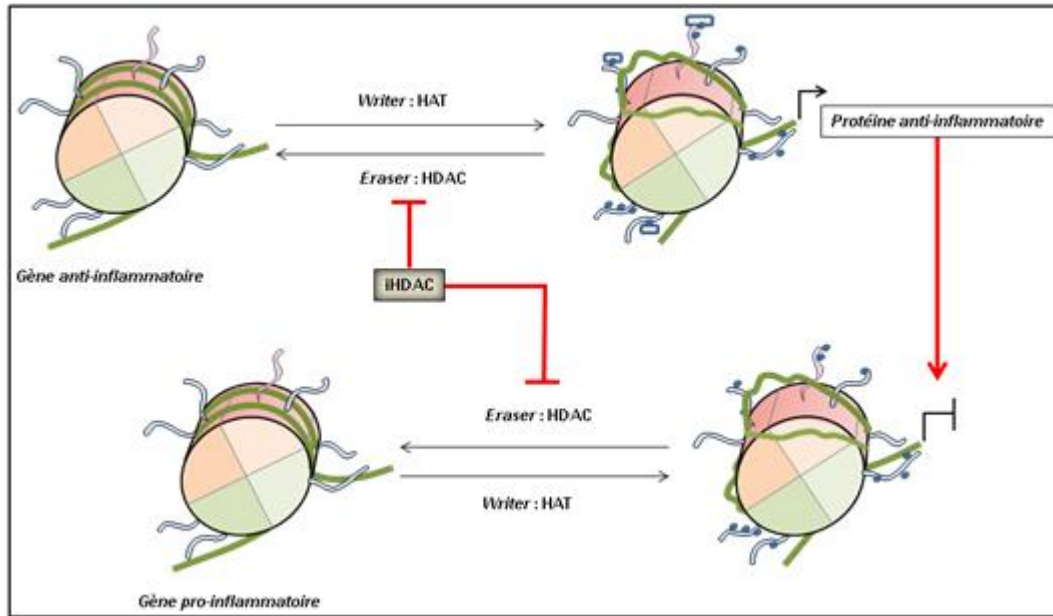


Figure 23 : Action des iHDAC sur les gènes anti-inflammatoires selon l'hypothèse électrostatique et du code histone.

Cet effet donne un sens au précédent dans le cadre de l'hypothèse électrostatique et du code histone. Nous pouvons, en effet, supposer que les iHDAC en induisant l'hyperacétylation des histones, peuvent favoriser l'expression de gènes qui contrôlent ceux codant pour la COX-2, iNOS ou mPGES-1. Ainsi, *in vitro*, les iHDAC induisent pratiquement l'activation et la répression du même nombre de gènes (Peart et al., 2005). De plus, les gènes induits peuvent avoir des fonctions qui sont opposées, par exemple immunosuppressive et immunostimulatrice (Roger et al., 2011).

Ce mode d'action a été décrit précédemment pour expliquer l'inhibition qu'exercerait les iHDAC sur l'expression du collagène de type II au temps tardifs de culture des chondrocytes (12h). En effet, cette période de temps est associée à l'activation du gène

répresseur *Wnt-5* (*wingless integration site*), régulateur négatif de l'expression de *col2a1*. L'expression de ce répresseur est elle-même associée à l'augmentation du niveau d'acétylation de l'histone H4 au niveau du promoteur de *Wnt-5* (Huh et al., 2007).

Nous avons montré, dans un travail dans le quel j'ai participé, qu'au niveau des chondrocytes OA, le VA est également capable de supprimer l'expression de la mPGES-1 ainsi que la production de la PGE₂. Cette expression est dépendante de la synthèse protéique *de novo*, ce qui nous a amené à rechercher les protéines qui peuvent être mises en jeu dans la suppression de l'expression de la mPGES-1 par le VA. Nous avons montré que le corépresseur physiologique du facteur de transcription Egr-1, appelé NAB-1 (*NGF1-A-binding protein 1*), est impliqué dans cette répression puisque son expression est induite par VA. NAB-1 induit se lie à Egr-1, ce qui inhibe l'activité transcriptionnelle de ce dernier (Zayed et al., 2011). On ne sait pas par contre, si le VA induit l'expression de NAB-1 selon le premier modèle, c'est-à-dire en augmentant le niveau d'acétylation des histones de son promoteur. On ne sait pas aussi si la TSA utilise ce mécanisme pour inhiber l'expression de la mPGES-1 au niveau des fibroblastes synoviaux.

Effet sur la stabilité de l'ARNm des gènes cibles.

Dans une étude récente, Grabiek et al. ont montré qu'au niveau des fibroblastes et macrophages synoviaux AR traités avec les iHDAC (TSA ou ITF2357), la production de l'IL-6 induite par l'IL-1 β , TNF- α ou les ligands des TLR, est supprimée. La réduction de la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 est à l'origine de ces suppressions (Grabiec et al., 2011).

Il est possible que les gènes de la COX-2 et iNOS, vue qu'ils possèdent dans leur partie 5'-UTR des éléments de régulation post-transcriptionnel (Hall-Pogar et al., 2007; Pautz et al., 2010), soient affectés par les iHDAC au niveau de la stabilité de leur ARNm.

Effet sur l'acétylation de protéines non histones (Figure 24).

Ce mécanisme peut être à l'origine des effets anti-inflammatoires que nous avons observé. Il apparait, d'après les données actuelles *in vitro* et sur les modèles animaux, que

l'effet bénéfique des iHDAC dans les maladies inflammatoires et immunologiques, découle de leur capacité à déclencher une hyperacétylation de protéines cytoplasmiques, et non pas de leur action au niveau nucléaire, bien que les deux effets ont lieu en même temps. Les conséquences de ces acétylations sont diverses, en particulier celles qui affectent la translocation entre le cytoplasme et le noyau, la liaison à l'ADN, l'activité transcriptionnelle, et la stabilité protéique des facteurs de transcription (**Tableau III**). Dans notre étude, nous avons remarqué que les iHDAC seuls n'ont pas d'effet sur l'expression des gènes codant pour COX-2, mPGES-1 et iNOS. L'action des iHDAC nécessite donc la présence d'inducteurs capables de déclencher des événements cytoplasmiques régulés par les HDAC.

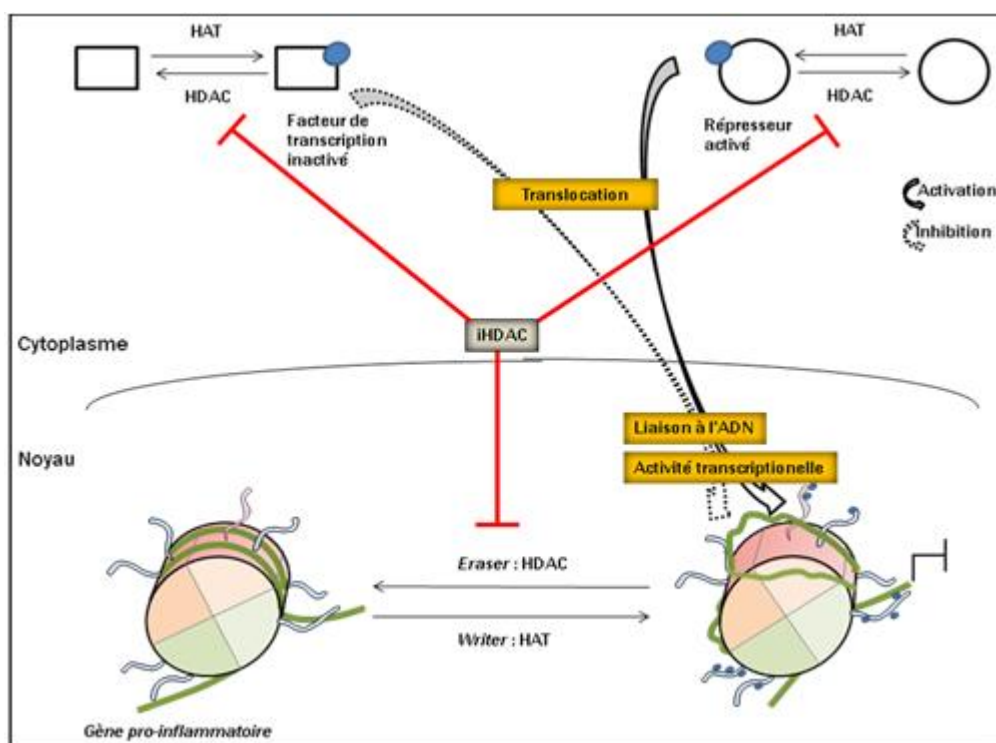


Figure 24 : Action des iHDAC sur les protéines non histones.

Le NF- κ B fait partie des facteurs qui ont reçus le plus d'intérêt à ce propos, du fait de son implication dans l'induction par les cytokines de plusieurs gènes pro-inflammatoires, en particulier dans l'OA. En effet, dans un modèle expérimental OA par chirurgie chez le rat, l'injection intra-articulaire d'un vecteur contenant le siRNA spécifique de p65NF- κ B réduit la progression de l'OA et inhibe la production de l'IL-1 β et de TNF- α (Chen et al., 2008). Les cytokines IL-1 β , TNF- α et IL-17 partagent dans leurs voies de signalisation ce facteur pour l'induction de l'expression des gènes de la COX-2 et iNOS (Lianxu et al., 2006; Shalom-Barak et al., 1998). Ce facteur étant connu pour être régulé par les enzymes HAT/HDAC (Chen et al., 2002), et être influencé par les iHDAC que ce soit au niveau de sa translocation vers le noyau, que de sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle (Calao et al., 2008). Par exemple, il a été rapporté que la SAHA et la TSA réduisent la phosphorylation de I κ B induite par l'IL-1 β au niveau d'une lignée cellulaire beta (Larsen et al., 2007). De même, la TSA, le SAHA et le NaBu réduisent l'activité de translocation nucléaire et de liaison à l'ADN de NF- κ B dans les cellules A549 (Imre et al., 2006), ou les lignées cellulaires de colon humain (Yin et al., 2001) stimulées avec le TNF- α . En agissant sur au moins une de ces étapes, les iHDAC peuvent bloquer l'expression de tous les gènes ciblés par les trois cytokines et dont l'expression est NF- κ B-dépendante. Il nous a alors paru logique de vérifier si les iHDAC employés affectent l'activité de NF- κ B. Nous avons analysé l'effet de la TSA et du NaBu sur la capacité de l'IL-1 β à induire la liaison de NF- κ B à une séquence consensus. Les expériences de gel retard ont montré que l'activité de liaison de NF- κ B à l'ADN n'est pas affectée par la TSA ou le NaBu. Ce résultat est en accord avec les travaux d'autres groupes de recherche qui ont rapporté également que la TSA et le SAHA suppriment l'expression de la iNOS induite par l'IL-1 β sans affecter l'activité de NF- κ B (Larsen et al., 2007). De même, les suppressions par la TSA de l'expression de l'IL-6 induite par l'IL-1 β au niveau des fibroblastes synoviaux (Grabiec et al., 2011), et de celle de TNF- α induit par les agonistes des TLR par la TSA et le SAHA dans les cellules murines dendritiques (Bode et al., 2007), se font sans

affecter l'activation de la voie NF- κ B. Dans ce dernier travail, la voie MAPK n'est pas également affectée par la TSA et le SAHA.

Nos résultats et ceux des autres équipes, suggèrent que l'inhibition de l'activité de NF- κ B n'est pas nécessaire pour que les iHDAC manifestent leurs propriétés anti-inflammatoires.

Dans mon second travail, nous avons montré que la surexpression de HDAC4 augmente l'activation médiée par Egr-1 du promoteur de la mPGES-1, alors que son inhibition par siRNA diminue cette activation. De plus, la surexpression de HDAC4 dépourvue de son domaine catalytique, ou le prétraitement des cellules par la TSA, supprime la capacité de HDAC4 à induire l'activité transcriptionnelle d'Egr-1. L'HDAC4 fait partie de la sous-classe IIa des HDAC qui agit notamment via des effets fonctionnels, qui ne requièrent pas l'activité déacétylase. Cependant, au niveau des fibroblastes synoviaux, l'activité déacétylase de HDAC4 est nécessaire pour l'induction de la mPGES-1 par l'IL-1 β . Nos résultats indiquent que HDAC4 participe dans cette induction à travers un mécanisme impliquant l'augmentation de l'activité transcriptionnelle d'Egr-1. Nous avons émis l'hypothèse que la TSA pourrait agir en modulant le niveau d'acétylation d'Egr-1 ou de facteur impliqué positivement ou négativement dans la réponse transcriptionnelle dépendante d'Egr-1. L'hyperacétylation d'Egr-1 inhiberait son activité transcriptionnelle. En effet, *Yu et al.* ont rapporté que le statut d'acétylation d'Egr-1 peut réguler son activité et déclencher des réponses cellulaires différentes (Yu et al., 2004).

Les iHDAC, toujours selon ce mode d'action, peuvent également déclencher l'hyperacétylation de facteur de transcription qui régule l'expression de gènes anti-inflammatoires. Ceci a été rapporté pour le facteur de transcription STAT3 qui est associé à des réponses anti-inflammatoires et immunosuppressives (Stepkowski et al., 2008), et dont l'acétylation conduit à sa dimérisation et son activation (Yuan et al., 2005). Il a été suggéré que les inhibiteurs ITF2357 et SAHA induisent l'expression de *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), qui est responsable de la réduction de nombreuses réponses des cellules dendritiques, en favorisant l'acétylation de STAT3 (Choi and Reddy, 2011; Reddy et al., 2008).

Conclusion

En conclusion, les travaux de cette thèse ont permis de montrer que les gènes de la COX-2 et la iNOS, au niveau des chondrocytes, sont régulés par les HDAC. De même, le gène de la mPGES-1, au niveau des fibroblastes synoviaux, est aussi régulé par les HDAC, en particulier par HDAC4. Les iHDAC sont capables d'inhiber l'expression de ces trois enzymes pro-inflammatoires. Ils suppriment également la production induite par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-17), de la PGE2 et du NO, ce qui peut avoir des effets bénéfiques sur l'intégrité des tissus cibles de ces médiateurs. Ainsi, la dégradation de l'aggrécane au niveau du cartilage, induite par l'IL-1 β , est inhibée par les iHDAC. La recherche des mécanismes moléculaires d'action des iHDAC ont permis de montrer, concernant l'expression de la mPGES-1, que ceux-ci agissent en inhibant l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Egr-1. Leur mécanisme d'action sur l'expression des enzymes COX-2 et iNOS reste à découvrir, mais nous avons montré qu'il s'effectue au moins en partie au niveau transcriptionnel, et qu'il n'affecte pas le facteur de transcription NF- κ B.

Nos travaux ont donc permis de montrer que les modifications épigénétiques définies par les HDAC participent dans l'activation des gènes inflammatoires. L'effet suppresseur des iHDAC sur ces gènes ouvre la voie vers une utilisation clinique de ces produits. De nombreuses questions demeurent cependant, concernant les HDAC impliquées dans la régulation des gènes de la COX-2 et iNOS dans les chondrocytes, et les mécanismes moléculaires précis de ces régulations. De même, l'expression et le rôle des HDAC dans le tissu synovial doivent être clarifiés dans l'avenir. Les réponses à ces questions permettront de mieux comprendre la fonction des HDAC dans le processus arthrosique.

Bibliographie

Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J.A., Bozza, P.T., and Viola, J.P. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 68, 1732-1740.

Ackerman, W.E.t., Robinson, J.M., and Kniss, D.A. (2005). Despite transcriptional and functional coordination, cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 largely reside in distinct lipid microdomains in WISH epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 53, 1391-1401.

Aigner, T., Bertling, W., Stoss, H., Weseloh, G., and von der Mark, K. (1993). Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *The Journal of clinical investigation* 91, 829-837.

Aigner, T., Sachse, A., Gebhard, P.M., and Roach, H.I. (2006). Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 128-149.

Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75, 639-653.

Alaaeddine, N., Di Battista, J.A., Pelletier, J.P., Kiansa, K., Cloutier, J.M., and Martel-Pelletier, J. (1999). Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. *Arthritis Rheum* 42, 710-718.

Alaaeddine, N., DiBattista, J.A., Pelletier, J.P., Cloutier, J.M., Kiansa, K., Dupuis, M., and Martel-Pelletier, J. (1997). Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol* 24, 1985-1994.

Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615.

- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51, 786-794.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhattar, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.
- Altman, R.D. (2010). Early management of osteoarthritis. *Am J Manag Care* 16 *Suppl Management*, S41-47.
- Alvarez-Soria, M.A., Herrero-Beaumont, G., Moreno-Rubio, J., Calvo, E., Santillana, J., Egido, J., and Largo, R. (2008). Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1484-1493.
- Amin, A.R., Attur, M., Patel, R.N., Thakker, G.D., Marshall, P.J., Rediske, J., Stuchin, S.A., Patel, I.R., and Abramson, S.B. (1997). Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest* 99, 1231-1237.
- Amin, A.R., Di Cesare, P.E., Vyas, P., Attur, M., Tzeng, E., Billiar, T.R., Stuchin, S.A., and Abramson, S.B. (1995). The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 182, 2097-2102.
- Appleby, S.B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K., and Hla, T. (1994). Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 302 (Pt 3), 723-727.
- Arthritis alliance of Canada. (2011). L'impact de l'arthrite au Canada : aujourd'hui et au cours des 30 prochaines années. www.arthritisalliance.ca. Consulté le 08 novembre.
- Ashburner, B.P., Westerheide, S.D., and Baldwin, A.S., Jr. (2001). The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol* 21, 7065-7077.
- Aung, H.T., Schroder, K., Himes, S.R., Brion, K., van Zuylen, W., Trieu, A., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Hume, D.A., Sweet, M.J., *et al.* (2006). LPS regulates proinflammatory

gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. *FASEB J* 20, 1315-1327.

Ayral, X., Pickering, E.H., Woodworth, T.G., Mackillop, N., and Dougados, M. (2005). Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis -- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 361-367.

Balasubramanian, S., Verner, E., and Buggy, J.J. (2009). Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Lett* 280, 211-221.

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., *et al.* (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280, 26729-26734.

Bartels, A.L., and Leenders, K.L. (2010). Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 8, 62-68.

Bau, B., Gebhard, P.M., Haag, J., Knorr, T., Bartnik, E., and Aigner, T. (2002). Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis and Rheumatism* 46, 2648-2657.

Benito, M.J., Veale, D.J., FitzGerald, O., van den Berg, W.B., and Bresnihan, B. (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 64, 1263-1267.

Berenbaum, F. (2008a). Osteoarthritis. B. Pathology and pathogenesis. In : Klippel, J.H., **Stone**, J.H., Crofford, L.J., White, P.H. eds. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 13th ed. New York: Springer, 229-234.

Berenbaum, F. (2001b). Osteoarthritis: Epidemiology, Pathology, and Pathogenesis. In : Klippel, J.H., Crofford, L.J., Stone, J.H., and Weyand, C.M. eds. *Primer on the rheumatic diseases*. 12th ed. Atlanta, GA: Arthritis Foundation, 284-289.

Bertino, E.M., and Otterson, G.A. (2011). Romidepsin: a novel histone deacetylase inhibitor for cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 20, 1151-1158.

- Bhaskara, S., Chyla, B.J., Amann, J.M., Knutson, S.K., Cortez, D., Sun, Z.W., and Hiebert, S.W. (2008). Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell* 30, 61-72.
- Bi, N., Yang, M., Zhang, L., Chen, X., Ji, W., Ou, G., Lin, D., and Wang, L. (2010). Cyclooxygenase-2 genetic variants are associated with survival in unresectable locally advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16, 2383-2390.
- Billinghurst, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., *et al.* (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *The Journal of clinical investigation* 99, 1534-1545.
- Bjerling, P., Silverstein, R.A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S., and Ekwall, K. (2002). Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Molecular and Cellular Biology* 22, 2170-2181.
- Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A., and Jordan, K.P. (2010). Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 24-33.
- Blanchard, F., and Chipoy, C. (2005). Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* 10, 197-204.
- Blanco, F.J., Guitian, R., Vazquez-Martul, E., de Toro, F.J., and Galdo, F. (1998). Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis and Rheumatism* 41, 284-289.
- Blander, G., and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry* 73, 417-435.
- Bode, K.A., Schroder, K., Hume, D.A., Ravasi, T., Heeg, K., Sweet, M.J., and Dalpke, A.H. (2007). Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology* 122, 596-606.
- Boffa, L.C., Vidali, G., Mann, R.S., and Allfrey, V.G. (1978). Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 253, 3364-3366.

- Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 64-76.
- Boileau, C., Martel-Pelletier, J., Moldovan, F., Jouzeau, J.Y., Netter, P., Manning, P.T., and Pelletier, J.P. (2002). The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide. *Arthritis and Rheumatism* 46, 2637-2647.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5, 769-784.
- Bondeson, J., Blom, A.B., Wainwright, S., Hughes, C., Caterson, B., and van den Berg, W.B. (2010). The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 62, 647-657.
- Bondeson, J., Wainwright, S.D., Lauder, S., Amos, N., and Hughes, C.E. (2006). The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis research & therapy* 8, R187.
- Bonnet, C.S., and Walsh, D.A. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 44, 7-16.
- Bosisio, D., Vulcano, M., Del Prete, A., Sironi, M., Salvi, V., Salogni, L., Riboldi, E., Leoni, F., Dinarello, C.A., Girolomoni, G., *et al.* (2008). Blocking TH17-polarizing cytokines by histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology* 84, 1540-1548.
- Brandt, K.D., Myers, S.L., Burr, D., and Albrecht, M. (1991). Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis and Rheumatism* 34, 1560-1570.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M., and Broach, J.R. (1996). Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Molecular and Cellular Biology* 16, 4349-4356.

- Brenneis, C., Coste, O., Altenrath, K., Angioni, C., Schmidt, H., Schuh, C.D., Zhang, D.D., Henke, M., Weigert, A., Brune, B., *et al.* (2011). Anti-inflammatory role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in a model of neuroinflammation. *J Biol Chem* 286, 2331-2342.
- Bruckdorfer, R. (2005). The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 26, 3-31.
- Buckwalter, J.A., Mow, V.C., and Ratcliffe, A. (1994). Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *J Am Acad Orthop Surg* 2, 192-201.
- Buglio, D., Khaskhely, N.M., Voo, K.S., Martinez-Valdez, H., Liu, Y.J., and Younes, A. (2011). HDAC11 plays an essential role in regulating OX40 ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Blood* 117, 2910-2917.
- Bunning, R.A., and Russell, R.G. (1989). The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 32, 780-784.
- Busija, L., Bridgett, L., Williams, S.R., Osborne, R.H., Buchbinder, R., March, L., and Fransen, M. (2010). Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24, 757-768.
- Cadet, C., and Maheu, E. (2010). Évaluation radiographique de l'artrose: criteres et indices. *Revue du rhumatisme monographies* 77, 135-143.
- Calao, M., Burny, A., Quivy, V., Dekoninck, A., and Van Lint, C. (2008). A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends Biochem Sci* 33, 339-349.
- Cao, D., Bromberg, P.A., and Samet, J.M. (2007). COX-2 expression induced by diesel particles involves chromatin modification and degradation of HDAC1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 232-239.
- Cao, M., Westerhausen-Larson, A., Niyibizi, C., Kavalkovich, K., Georgescu, H.I., Rizzo, C.F., Hebda, P.A., Stefanovic-Racic, M., and Evans, C.H. (1997). Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J* 324 (Pt 1), 305-310.

- Carillon, Y. (2006). Imagerie de la gonarthrose. In : Bonnin, M., Chambat, P. eds. La gonarthrose Traitement chirurgical : de l'arthroscopie à la prothèse. Paris; New Yor: Springer, 24-36.
- Caron, C., Boyault, C., and Khochbin, S. (2005). Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* 27, 408-415.
- Castro, R.R., Cunha, F.Q., Silva, F.S., Jr., and Rocha, F.A. (2006). A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis--evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 14, 769-776.
- Chabane, N., Li, X., and Fahmi, H. (2009). HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 expression in human synovial fibroblasts through up-regulation of Egr-1 transcriptional activity. *Journal of Cellular Biochemistry* 106, 453-463.
- Chabane, N., Zayed, N., Afif, H., Mfuna-Endam, L., Benderdour, M., Boileau, C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Duval, N., and Fahmi, H. (2008). Histone deacetylase inhibitors suppress interleukin-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1267-1274.
- Chambers, A.E., Banerjee, S., Chaplin, T., Dunne, J., Debernardi, S., Joel, S.P., and Young, B.D. (2003). Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells. *European Journal of Cancer* 39, 1165-1175.
- Chang, S., McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2004). Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol* 24, 8467-8476.
- Chang, S., Young, B.D., Li, S., Qi, X., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2006). Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 126, 321-334.
- Charles, I.G., Palmer, R.M., Hickery, M.S., Bayliss, M.T., Chubb, A.P., Hall, V.S., Moss, D.W., and Moncada, S. (1993). Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11419-11423.

- Chen, L.F., Mu, Y., and Greene, W.C. (2002). Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J* 21, 6539-6548.
- Chen, L.X., Lin, L., Wang, H.J., Wei, X.L., Fu, X., Zhang, J.Y., and Yu, C.L. (2008). Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF-kappaBp65-specific siRNA. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16, 174-184.
- Chen, W.P., Bao, J.P., Hu, P.F., Feng, J., and Wu, L.D. (2010). Alleviation of osteoarthritis by Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in experimental osteoarthritis. *Molecular biology reports* 37, 3967-3972.
- Chen, W.P., Bao, J.P., Tang, J.L., Hu, P.F., and Wu, L.D. (2011). Trichostatin A inhibits expression of cathepsins in experimental osteoarthritis. *Rheumatology international* 31, 1325-1331.
- Cheng, S., Afif, H., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Li, X., Farrajota, K., Lavigne, M., and 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* 279, 22057-22065.
- Cheng, Y., Wang, M., Yu, Y., Lawson, J., Funk, C.D., and Fitzgerald, G.A. (2006). Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *The Journal of clinical investigation* 116, 1391-1399.
- Chevalier, X. (1998). [Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage]. *Presse Med* 27, 75-80.
- Chevalier, X., and Richette, P. (2005). Normal joint cartilage: anatomy, physiology, metabolism, ageing. *EMC-Rhumatologie Orthopédie* 2, 41-58.
- Chiechio, S., Zammataro, M., Morales, M.E., Busceti, C.L., Drago, F., Gereau, R.W.t., Copani, A., and Nicoletti, F. (2009). Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain. *Molecular pharmacology* 75, 1014-1020.
- Choi, S., and Reddy, P. (2011). HDAC inhibition and graft versus host disease. *Mol Med* 17, 404-416.

- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.
- Chung, Y.L., Lee, M.Y., Wang, A.J., and Yao, L.F. (2003). A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol Ther* 8, 707-717.
- Clancy, R.M., Abramson, S.B., Kohne, C., and Rediske, J. (1997). Nitric oxide attenuates cellular hexose monophosphate shunt response to oxidants in articular chondrocytes and acts to promote oxidant injury. *J Cell Physiol* 172, 183-191.
- Corvol, M.T. (2000). The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 67, 557-560.
- Couchourel, D., Aubry, I., Delalandre, A., Lavigne, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., and Lajeunesse, D. (2009). Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis and Rheumatism* 60, 1438-1450.
- Cs-Szabo, G., Roughley, P.J., Plaas, A.H., and Glant, T.T. (1995). Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 38, 660-668.
- D'Agostino, M.A., Conaghan, P., Le Bars, M., Baron, G., Grassi, W., Martin-Mola, E., Wakefield, R., Brasseur, J.L., So, A., Backhaus, M., *et al.* (2005). EULAR report on the use of ultrasonography in painful knee osteoarthritis. Part 1: prevalence of inflammation in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 64, 1703-1709.
- Das, S.K., and Farooqi, A. (2008). Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 657-675.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *Journal of Molecular Biology* 319, 1097-1113.
- Davie, J.R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133, 2485S-2493S.

- de Boer, T.N., Huisman, A.M., Polak, A.A., Niehoff, A.G., van Rinsum, A.C., Saris, D., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.J., and Mastbergen, S.C. (2009). The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in vivo treatment. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 482-488.
- de Boer, T.N., Mastbergen, S.C., Huisman, A.M., Polak, A.A., Bijlsma, J.W., and Lafeber, F.P. (2010). Lack of disease modifying activity of celecoxib in end-stage OA: A randomized controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage* 18 S145.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal* 370, 737-749.
- de Vera, M.E., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Mudgett, J.S., Simmons, R.L., Morris, S.M., Jr., Billiar, T.R., and Geller, D.A. (1996a). Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1054-1059.
- de Vera, M.E., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Mudgett, J.S., Simmons, R.L., Morris, S.M., Jr., Billiar, T.R., and Geller, D.A. (1996b). Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1054-1059.
- Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S., and Woessner, J.F., Jr. (1989). Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of clinical investigation* 84, 678-685.
- Del Carlo, M., Jr., and Loeser, R.F. (2002). Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum* 46, 394-403.
- Deng, W.G., and Wu, K.K. (2003). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. *J Immunol* 171, 6581-6588.
- Deng, W.G., Zhu, Y., and Wu, K.K. (2004). Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood* 103, 2135-2142.

- Dequiedt, F., Kasler, H., Fischle, W., Kiermer, V., Weinstein, M., Herndier, B.G., and Verdin, E. (2003). HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* *18*, 687-698.
- Di Marcotullio, L., Canettieri, G., Infante, P., Greco, A., and Gulino, A. (2011). Protected from the inside: endogenous histone deacetylase inhibitors and the road to cancer. *Biochim Biophys Acta* *1815*, 241-252.
- Dinarello, C.A., Fossati, G., and Mascagni, P. (2011). Histone Deacetylase Inhibitors for Treating a Spectrum of Diseases Not Related to Cancer. *Mol Med* *17*, 333-352.
- Dover, G.J., Brusilow, S., and Charache, S. (1994). Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* *84*, 339-343.
- Dovey, O.M., Foster, C.T., and Cowley, S.M. (2010). Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 8242-8247.
- Du, Q. (2010). Molecular regulation of inducible nitric oxide synthase (London, Ignarro, Louis J.), pp. 269-300.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* *12*, 1063-1073.
- Dudhia, J. (2005). Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *62*, 2241-2256.
- Duvic, M., Talpur, R., Ni, X., Zhang, C., Hazarika, P., Kelly, C., Chiao, J.H., Reilly, J.F., Ricker, J.L., Richon, V.M., *et al.* (2007). Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* *109*, 31-39.
- Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E.J., and Hall, D.J. (2008). Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by SirT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* *283*, 36300-36310.
- Eberhardt, W., Doller, A., Akool el, S., and Pfeilschifter, J. (2007). Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther* *114*, 56-73.

- Ekstrom, L., Lyrenas, L., Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., and Kelner, M.J. (2003). Basal expression of the human MAPEG members microsomal glutathione transferase 1 and prostaglandin E synthase genes is mediated by Sp1 and Sp3. *Biochim Biophys Acta* 1627, 79-84.
- El Hajjaji, H., Marcelis, A., Devogelaer, J.P., and Manicourt, D.H. (2003). Celecoxib has a positive effect on the overall metabolism of hyaluronan and proteoglycans in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol* 30, 2444-2451.
- Ellis, D.J., Lawman, Z.K., and Bonham, K. (2008a). Histone acetylation is not an accurate predictor of gene expression following treatment with histone deacetylase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367, 656-662.
- Ellis, L., Pan, Y., Smyth, G.K., George, D.J., McCormack, C., Williams-Truax, R., Mita, M., Beck, J., Burris, H., Ryan, G., *et al.* (2008b). Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces clinical responses with associated alterations in gene expression profiles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 14, 4500-4510.
- Ellis, L., and Pili, R. (2010). Histone Deacetylase Inhibitors: Advancing Therapeutic Strategies in Hematological and Solid Malignancies. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 2411-2469.
- Engblom, D., Saha, S., Engstrom, L., Westman, M., Audoly, L.P., Jakobsson, P.J., and Blomqvist, A. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nature neuroscience* 6, 1137-1138.
- Ersoy, Y., Ozerol, E., Baysal, O., Temel, I., MacWalter, R.S., Meral, U., and Altay, Z.E. (2002). Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 61, 76-78.
- Fahmi, H., He, Y., Zhang, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., and Di Battista, J.A. (2001). Nimesulide reduces interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 gene expression in human synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 9, 332-340.
- Faour, W.H., He, Y., He, Q.W., de Ladurantaye, M., Quintero, M., Mancini, A., and Di Battista, J.A. (2001). Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 31720-31731.

- Farrajota, K., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Afif, H., Pelletier, J.P., Li, X., Ranger, P., and Fahmi, H. (2005). Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum* 52, 94-104.
- Felley-Bosco, E., Bender, F.C., Courjault-Gautier, F., Bron, C., and Quest, A.F. (2000). Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14334-14339.
- Felson, D.T. (2010). Osteoarthritis. In: Fauci, A.S., and Langford, C.A. eds. *Harrison's rheumatology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 224-233.
- Felson, D.T., Couropmitree, N.N., Chaisson, C.E., Hannan, M.T., Zhang, Y., McAlindon, T.E., LaValley, M., Levy, D., and Myers, R.H. (1998). Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 41, 1064-1071.
- Fernandez-Madrid, F., Karvonen, R.L., Teitge, R.A., Miller, P.R., An, T., and Negendank, W.G. (1995). Synovial thickening detected by MR imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis. *Magn Reson Imaging* 13, 177-183.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., and Pavletich, N.P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188-193.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W., and Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Molecular Cell* 9, 45-57.
- Forsberg, L., Leeb, L., Thoren, S., Morgenstern, R., and Jakobsson, P. (2000a). Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett* 471, 78-82.
- Forsberg, L., Leeb, L., Thoren, S., Morgenstern, R., and Jakobsson, P. (2000b). Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS letters* 471, 78-82.
- Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*.

- Fujita, N., Matsushita, T., Ishida, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Takayama, K., Kurosaka, M., and Kuroda, R. (2011). Potential involvement of SIRT1 in the pathogenesis of osteoarthritis through the modulation of chondrocyte gene expressions. *J Orthop Res* 29, 511-515.
- Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.
- Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (2001). Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 87-92.
- Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y., and Asahara, H. (2005a). Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *The Journal of biological chemistry* 280, 8343-8350.
- Furumatsu, T., Tsuda, M., Yoshida, K., Taniguchi, N., Ito, T., Hashimoto, M., and Asahara, H. (2005b). Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J Biol Chem* 280, 35203-35208.
- Furuzawa-Carballeda, J., Macip-Rodriguez, P.M., and Cabral, A.R. (2008). Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clinical and experimental rheumatology* 26, 554-560.
- Gagarina, V., Gabay, O., Dvir-Ginzberg, M., Lee, E.J., Brady, J.K., Quon, M.J., and Hall, D.J. (2010). SirT1 enhances survival of human osteoarthritic chondrocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and activating the insulin-like growth factor receptor pathway. *Arthritis Rheum* 62, 1383-1392.
- Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* 4, 930-939.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., and Steinkuhler, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research* 17, 195-211.

- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25748-25755.
- Gardner, K.E., Allis, C.D., and Strahl, B.D. (2011). OPERating ON Chromatin, a Colorful Language where Context Matters. *Journal of Molecular Biology* 409, 36-46.
- Gare, B.A., and Fasth, A. (2008). Presentations, clinical features and special problems in children. In: Hochberg, M.C., Silman, A.J., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E., and Weisman, M.H. eds. *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, 937-951.
- Garnero, P., Rousseau, J.C., and Delmas, P.D. (2000). Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis and Rheumatism* 43, 953-968.
- Gavett, S.H., Madison, S.L., Chulada, P.C., Scarborough, P.E., Qu, W., Boyle, J.E., Tiano, H.F., Lee, C.A., Langenbach, R., Roggli, V.L., *et al.* (1999). Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest* 104, 721-732.
- Girkontaite, I., Frischholz, S., Lammi, P., Wagner, K., Swoboda, B., Aigner, T., and Von der Mark, K. (1996). Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol* 15, 231-238.
- Glaser, K.B., Staver, M.J., Waring, J.F., Stender, J., Ulrich, R.G., and Davidsen, S.K. (2003). Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2, 151-163.
- Goldring, M.B., and Berenbaum, F. (2004). The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res*, S37-46.
- Goldring, M.B., and Goldring, S.R. (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213, 626-634.
- Goldring, S.R., and Goldring, M.B. (2005). Structure and function of bone, joints, and connective tissue. *Biology of the normal joint*. In: Ruddy, S., Harris, E.D., Sledge, C.B., and Kelley, W.N. eds. *Kelley's Textbook of rheumatology*. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders.

- Goldring, M.B., and Marcu, K.B. (2009). Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* *11*, 224.
- Goldring, M.B., and Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* *23*, 471-478.
- Goldring, S.R. (2008). The role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *Rheumatic diseases clinics of North America* *34*, 561-571.
- Goldring, S.R., and Goldring, M.B. (2004). The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clinical orthopaedics and related research*, S27-36.
- Gosset, M., Berenbaum, F., Levy, A., Pigenet, A., Thirion, S., Saffar, J.L., and Jacques, C. (2006). Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis Res Ther* *8*, R135.
- Gosset, M., Berenbaum, F., Salvat, C., Sautet, A., Pigenet, A., Tahiri, K., and Jacques, C. (2008). Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis. *Arthritis Rheum* *58*, 1399-1409.
- Grabiec, A.M., Korchynskiy, O., Tak, P.P., and Reedquist, K.A. (2011). Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Ann Rheum Dis*.
- Grabiec, A.M., Krausz, S., de Jager, W., Burakowski, T., Groot, D., Sanders, M.E., Prakken, B.J., Maslinski, W., Eldering, E., Tak, P.P., *et al.* (2010). Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J Immunol* *184*, 2718-2728.
- Grabowski, P.S., Wright, P.K., Van 't Hof, R.J., Helfrich, M.H., Ohshima, H., and Ralston, S.H. (1997). Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* *36*, 651-655.
- Granja, A.G., Sabina, P., Salas, M.L., Fresno, M., and Revilla, Y. (2006). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation. *J Virol* *80*, 10487-10496.

- Gregoretto, I.V., Lee, Y.M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology* 338, 17-31.
- Grimmer, C., Pfander, D., Swoboda, B., Aigner, T., Mueller, L., Hennig, F.F., and Gelse, K. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 56, 4084-4094.
- Haberland, M., Johnson, A., Mokalled, M.H., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009a). Genetic dissection of histone deacetylase requirement in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7751-7755.
- Haberland, M., Mokalled, M.H., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009b). Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8. *Genes & development* 23, 1625-1630.
- Haberland, M., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009c). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10, 32-42.
- Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4389-4394.
- Halili, M.A., Andrews, M.R., Labzin, L.I., Schroder, K., Matthias, G., Cao, C., Lovelace, E., Reid, R.C., Le, G.T., Hume, D.A., *et al.* (2010). Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol* 87, 1103-1114.
- Hall-Pogar, T., Liang, S., Hague, L.K., and Lutz, C.S. (2007). Specific trans-acting proteins interact with auxiliary RNA polyadenylation elements in the COX-2 3'-UTR. *RNA* 13, 1103-1115.
- Hall-Pogar, T., Zhang, H., Tian, B., and Lutz, C.S. (2005). Alternative polyadenylation of cyclooxygenase-2. *Nucleic Acids Res* 33, 2565-2579.
- Hansen, J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 361-392.

- Hara, S., Kamei, D., Sasaki, Y., Tanemoto, A., Nakatani, Y., and Murakami, M. (2010). Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie* 92, 651-659.
- Hashimoto, S., Takahashi, K., Amiel, D., Coutts, R.D., and Lotz, M. (1998). Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41, 1266-1274.
- Hausel, P., Latado, H., Courjault-Gautier, F., and Felley-Bosco, E. (2006). Src-mediated phosphorylation regulates subcellular distribution and activity of human inducible nitric oxide synthase. *Oncogene* 25, 198-206.
- Hayakawa, T., and Nakayama, J. (2011). Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J Biomed Biotechnol* 2011, 129383.
- Haywood, L., McWilliams, D.F., Pearson, C.I., Gill, S.E., Ganesan, A., Wilson, D., and Walsh, D.A. (2003). Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 48, 2173-2177.
- Heinegard, D., and Saxne, T. (2011). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 50-56.
- Higashiyama, R., Miyaki, S., Yamashita, S., Yoshitaka, T., Lindman, G., Ito, Y., Sasho, T., Takahashi, K., Lotz, M., and Asahara, H. (2010). Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 20, 11-17.
- Hines, P., Dover, G.J., and Resar, L.M. (2008). Pulsed-dosing with oral sodium phenylbutyrate increases hemoglobin F in a patient with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 50, 357-359.
- Hodawadekar, S.C., and Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26, 5528-5540.
- Hong, S., Derfoul, A., Pereira-Mouries, L., and Hall, D.J. (2009). A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *FASEB J*.

- Horiuchi, M., Morinobu, A., Chin, T., Sakai, Y., Kurosaka, M., and Kumagai, S. (2009). Expression and function of histone deacetylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 36, 1580-1589.
- Hoshino, I., and Matsubara, H. (2010). Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surg Today* 40, 809-815.
- Hsu, Y.F., Sheu, J.R., Lin, C.H., Chen, W.C., Hsiao, G., Ou, G., Chiu, P.T., and Hsu, M.J. (2011). MAPK phosphatase-1 contributes to trichostatin A inhibition of cyclooxygenase-2 expression in human umbilical vascular endothelial cells exposed to lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta* 1810, 1160-1169.
- Huang, C.Y., Hung, L.F., Liang, C.C., and Ho, L.J. (2009). COX-2 and iNOS are critical in advanced glycation end product-activated chondrocytes in vitro. *Eur J Clin Invest* 39, 417-428.
- Huber, L.C., Brock, M., Hemmatazad, H., Giger, O.T., Moritz, F., Trenkmann, M., Distler, J.H., Gay, R.E., Kolling, C., Moch, H., *et al.* (2007). Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56, 1087-1093.
- Huh, Y.H., Ryu, J.H., and Chun, J.S. (2007). Regulation of type II collagen expression by histone deacetylase in articular chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 282, 17123-17131.
- Hunter, D.J., and Hellio Le Graverand-Gastineau, M.P. (2009). How close are we to having structure-modifying drugs available? *Med Clin North Am* 93, 223-234, xiii.
- Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* 279, 30830-30835.
- Ijiri, K., Zerbini, L.F., Peng, H., Otu, H.H., Tsuchimochi, K., Otero, M., Dragomir, C., Walsh, N., Bierbaum, B.E., Mattingly, D., *et al.* (2008). Differential expression of GADD45beta in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 58, 2075-2087.
- Imamura, T., Imamura, C., McAlinden, A., Davies, S.R., Iwamoto, Y., and Sandell, L.J. (2008). A novel tumor necrosis factor alpha-responsive CCAAT/enhancer binding protein

- site regulates expression of the cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene in cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 58, 1366-1376.
- Imhof, H., Sulzbacher, I., Grampp, S., Czerny, C., Youssefzadeh, S., and Kainberger, F. (2000). Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol* 35, 581-588.
- Imre, G., Gekeler, V., Leja, A., Beckers, T., and Boehm, M. (2006). Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha receptor-1 down-regulation. *Cancer Research* 66, 5409-5418.
- Inada, M., Matsumoto, C., Uematsu, S., Akira, S., and Miyaura, C. (2006). Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. *Journal of immunology* 177, 1879-1885.
- Iozzo, R.V. (1999). The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *The Journal of biological chemistry* 274, 18843-18846.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E., and Yao, T.P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO Journal* 21, 6236-6245.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H., and Nozawa-Inoue, K. (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63, 17-31.
- Iyer, J.P., Srivastava, P.K., Dev, R., Dastidar, S.G., and Ray, A. (2009). Prostaglandin E(2) synthase inhibition as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 13, 849-865.
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., and Persson, B. (1999a). Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* 8, 689-692.
- Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999b). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7220-7225.
- Jania, L.A., Chandrasekharan, S., Backlund, M.G., Foley, N.A., Snouwaert, J., Wang, I.M., Clark, P., Audoly, L.P., and Koller, B.H. (2009). Microsomal prostaglandin E synthase-2 is

not essential for in vivo prostaglandin E2 biosynthesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 88, 73-81.

Jarvinen, K., Vuolteenaho, K., Nieminen, R., Moilanen, T., Knowles, R.G., and Moilanen, E. (2008). Selective iNOS inhibitor 1400W enhances anti-catabolic IL-10 and reduces destructive MMP-10 in OA cartilage. Survey of the effects of 1400W on inflammatory mediators produced by OA cartilage as detected by protein antibody array. *Clinical and experimental rheumatology* 26, 275-282.

Jarvinen, T.A., Moilanen, T., Jarvinen, T.L., and Moilanen, E. (1995). Nitric oxide mediates interleukin-1 induced inhibition of glycosaminoglycan synthesis in rat articular cartilage. *Mediators Inflamm* 4, 107-111.

Jenuwein, T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends in Cell Biology* 11, 266-273.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Johnston, S.A. (1997). Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27, 699-723.

Johnstone, R.W., and Licht, J.D. (2003). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell* 4, 13-18.

Joosten, L.A., Leoni, F., Meghji, S., and Mascagni, P. (2011). Inhibition of HDAC activity by ITF2357 ameliorates joint inflammation and prevents cartilage and bone destruction in experimental arthritis. *Molecular medicine* 17, 391-396.

Joubert, J., and Malan, S.F. (2011). Novel nitric oxide synthase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 21, 537-560.

Kakimaru, H., Kataoka, H., Enomoto, K., Kumahashi, N., Ohira, A., Yodoi, J., Uchio, Y., and Ochi, M. (2005). Thioredoxin gene expression in rat knee articular cartilage after full-thickness injury. *Connect Tissue Res* 46, 27-32.

Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-Ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., *et al.* (2004). Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. *J Biol Chem* 279, 33684-33695.

- Kang, Y.J., Mbonye, U.R., DeLong, C.J., Wada, M., and Smith, W.L. (2007). Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res* 46, 108-125.
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.P., and Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 33-42.
- Karagianni, P., and Wong, J. (2007). HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. *Oncogene* 26, 5439-5449.
- Karan, A., Karan, M.A., Vural, P., Erten, N., Tascioglu, C., Aksoy, C., Canbaz, M., and Oncel, A. (2003). Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 22, 397-399.
- Kawabata, T., Nishida, K., Takasugi, K., Ogawa, H., Sada, K., Kadota, Y., Inagaki, J., Hirohata, S., Ninomiya, Y., and Makino, H. (2010). Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R133.
- Kelleher, Z.T., Potts, E.N., Brahmajothi, M.V., Foster, M.W., Auten, R.L., Foster, W.M., and Marshall, H.E. (2011). NOS2 regulation of LPS-induced airway inflammation via S-nitrosylation of NF- κ B p65. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 301, L327-333.
- Kelly, G. (2010). A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Altern Med Rev* 15, 245-263.
- Khan, N., Jeffers, M., Kumar, S., Hackett, C., Boldog, F., Khramtsov, N., Qian, X., Mills, E., Berghs, S.C., Carey, N., *et al.* (2008). Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 409, 581-589.
- Kiernan, R., Bres, V., Ng, R.W., Coudart, M.P., El Messaoudi, S., Sardet, C., Jin, D.Y., Emiliani, S., and Benkirane, M. (2003). Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem* 278, 2758-2766.
- Kihara, Y., Matsushita, T., Kita, Y., Uematsu, S., Akira, S., Kira, J., Ishii, S., and Shimizu, T. (2009). Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple

- sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 21807-21812.
- Kijima, M., Yoshida, M., Sugita, K., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1993). Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J Biol Chem* 268, 22429-22435.
- Kim, S.O., Choi, B.T., Choi, I.W., Cheong, J., Kim, G.Y., Kwon, T.K., Kim, N.D., and Choi, Y.H. (2009). Anti-invasive activity of histone deacetylase inhibitors via the induction of Egr-1 and the modulation of tight junction-related proteins in human hepatocarcinoma cells. *BMB Rep* 42, 655-660.
- Kingston, R.E., and Narlikar, G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes and Development* 13, 2339-2352.
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., and Schwarz, P.M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 500, 255-266.
- Knott, I., Dieu, M., Burton, M., Houbion, A., Remacle, J., and Raes, M. (1994). Induction of cyclooxygenase by interleukin 1: comparative study between human synovial cells and chondrocytes. *The Journal of rheumatology* 21, 462-466.
- Knudson, C.B., and Knudson, W. (2001). Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 12, 69-78.
- Knutson, S.K., Chyla, B.J., Amann, J.M., Bhaskara, S., Huppert, S.S., and Hiebert, S.W. (2008). Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J* 27, 1017-1028.
- Kojima, F., Kato, S., and Kawai, S. (2005). Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol* 19, 255-261.
- Kojima, F., Naraba, H., Miyamoto, S., Beppu, M., Aoki, H., and Kawai, S. (2004). Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 6, R355-365.
- Kojima, F., Naraba, H., Sasaki, Y., Beppu, M., Aoki, H., and Kawai, S. (2003). Prostaglandin E2 is an enhancer of interleukin-1beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 48, 2819-2828.

- Korotkova, M., and Jakobsson, P.J. (2010). Microsomal prostaglandin e synthase-1 in rheumatic diseases. *Front Pharmacol* 1, 146.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kraemer, S.A., Meade, E.A., and DeWitt, D.L. (1992). Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 293, 391-400.
- Krasnokutsky, S., Attur, M., Palmer, G., Samuels, J., and Abramson, S.B. (2008). Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16 Suppl 3, S1-3.
- Krasnokutsky, S., Samuels, J., and Abramson, S.B. (2007). Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65, 222-228.
- Kraus, V.B., and Doherty, M. (2010). Osteoarthritis. In : Adebajo, A. eds. ABC of rheumatology. 4th ed. Chapter 9. UK: Blackwell Publishing Ltd, 51-58.
- Kuhn, K., D'Lima, D.D., Hashimoto, S., and Lotz, M. (2004). Cell death in cartilage. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 12, 1-16.
- Kwan Tat, S., Lajeunesse, D., Pelletier, J.P., and Martel-Pelletier, J. (2010). Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best practice & research Clinical rheumatology* 24, 51-70.
- Lader, C.S., and Flanagan, A.M. (1998). Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 139, 3157-3164.
- Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M.C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M.J., Lo Surdo, P., Carfi, A., *et al.* (2007). Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17335-17340.
- Lai, I.L., Lin, T.P., Yao, Y.L., Lin, C.Y., Hsieh, M.J., and Yang, W.M. (2010). Histone deacetylase 10 relieves repression on the melanogenic program by maintaining the deacetylation status of repressors. *J Biol Chem* 285, 7187-7196.
- Langenbach, R., Morham, S.G., Tian, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., *et al.* (1995). Prostaglandin

- synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83, 483-492.
- Larsen, L., Tonnesen, M., Ronn, S.G., Storling, J., Jorgensen, S., Mascagni, P., Dinarello, C.A., Billestrup, N., and Mandrup-Poulsen, T. (2007). Inhibition of histone deacetylases prevents cytokine-induced toxicity in beta cells. *Diabetologia* 50, 779-789.
- Latham, J.A., and Dent, S.Y. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nature structural & molecular biology* 14, 1017-1024.
- Lavu, S., Boss, O., Elliott, P.J., and Lambert, P.D. (2008). Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7, 841-853.
- Le Tourneau, C., and Siu, L.L. (2008). Promising antitumor activity with MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* 17, 1247-1254.
- Lei, M., Wang, J.G., Xiao, D.M., Fan, M., Wang, D.P., Xiong, J.Y., Chen, Y., Ding, Y., and Liu, S.L. (2011). Resveratrol inhibits interleukin 1beta-mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor-kappaB activity. *Eur J Pharmacol*.
- Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E.C., Lee, J.K., Porro, G., Pagani, P., Modena, D., Moras, M.L., Pozzi, P., Reznikov, L.L., *et al.* (2005). The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med* 11, 1-15.
- Leoni, F., Zaliani, A., Bertolini, G., Porro, G., Pagani, P., Pozzi, P., Dona, G., Fossati, G., Sozzani, S., Azam, T., *et al.* (2002). The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2995-3000.
- Lewis, E.C., Blaabjerg, L., Storling, J., Ronn, S.G., Mascagni, P., Dinarello, C.A., and Mandrup-Poulsen, T. (2011). The oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces cytokines and protects islet beta cells in vivo and in vitro. *Mol Med* 17, 369-377.
- Li, B., and Aspden, R.M. (1997). Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Annals of the rheumatic diseases* 56, 247-254.

- Li, G., Jiang, H., Chang, M., Xie, H., and Hu, L. (2011). HDAC6 alpha-tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 304, 1-8.
- Li, X., Afif, H., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P., and Fahmi, H. (2005). Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol* 32, 887-895.
- Li, X., Ellman, M., Muddasani, P., Wang, J.H., Cs-Szabo, G., van Wijnen, A.J., and Im, H.J. (2009). Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 60, 513-523.
- Lian, Z.R., Xu, Y.F., Wang, X.B., Gong, J.P., and Liu, Z.J. (2011). Suppression of Histone Deacetylase 11 Promotes Expression of IL-10 in Kupffer Cells and Induces Tolerance Following Orthotopic Liver Transplantation in Rats. *J Surg Res*.
- Lianxu, C., Hongti, J., and Changlong, Y. (2006). NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 367-376.
- Lin, C., McGough, R., Aswad, B., Block, J.A., and Terek, R. (2004). Hypoxia induces HIF-1alpha and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J Orthop Res* 22, 1175-1181.
- Lin, W.N., Lin, C.C., Cheng, H.Y., and Yang, C.M. (2011). Regulation of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A(2) gene expression by lipopolysaccharide through the RNA-binding protein HuR: involvement of NADPH oxidase, reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases. *Br J Pharmacol* 163, 1691-1706.
- Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Hubrich, T., Greeve, J., and Kleinert, H. (2005). Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res* 33, 4813-4827.
- Linn, S.C., Morelli, P.J., Edry, I., Cottongim, S.E., Szabo, C., and Salzman, A.L. (1997). Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene in an intestinal epithelial cell line. *Am J Physiol* 272, G1499-1508.

- Liou, J.Y., Aleksic, N., Chen, S.F., Han, T.J., Shyue, S.K., and Wu, K.K. (2005). Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance. *Exp Cell Res* 306, 75-84.
- Liu, H., Hu, Q., D'Ercole A, J., and Ye, P. (2009). Histone deacetylase 11 regulates oligodendrocyte-specific gene expression and cell development in OL-1 oligodendroglia cells. *Glia* 57, 1-12.
- Loeser, R.F., Carlson, C.S., Del Carlo, M., and Cole, A. (2002a). Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum* 46, 2349-2357.
- Loeser, R.F., Carlson, C.S., Del Carlo, M., and Cole, A. (2002b). Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis and Rheumatism* 46, 2349-2357.
- Loeuille, D., Chary-Valckenaere, I., Champigneulle, J., Rat, A.C., Toussaint, F., Pinzano-Watrin, A., Goebel, J.C., Mainard, D., Blum, A., Pourel, J., *et al.* (2005). Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis and Rheumatism* 52, 3492-3501.
- Loftin, C.D., Tiano, H.F., and Langenbach, R. (2002). Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 177-185.
- Lohmander, L.S., Ionescu, M., Jugessur, H., and Poole, A.R. (1999). Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 42, 534-544.
- Lorenz, J.J., Furdon, P.J., Taylor, J.D., Verghese, M.W., Chandra, G., Kost, T.A., Haneline, S.A., Roner, L.A., and Gray, J.G. (1995). A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal is required for the induction of IL-1 beta by TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol* 155, 836-844.

- Lories, R.J., and Luyten, F.P. (2011). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology* 7, 43-49.
- Lotz, M.K., Otsuki, S., Grogan, S.P., Sah, R., Terkeltaub, R., and D'Lima, D. (2010). Cartilage cell clusters. *Arthritis and Rheumatism* 62, 2206-2218.
- Lu, Y., Nie, J., Liu, X., Zheng, Y., and Guo, S.W. (2010). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reduces lesion growth and hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in mice. *Hum Reprod* 25, 1014-1025.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., and Browner, M.F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 3, 927-933.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15, 323-350.
- Madry, H., Luyten, F.P., and Facchini, A. (2011). Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*.
- Madry, H., van Dijk, C.N., and Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 18, 419-433.
- Malfait, A.M., Liu, R.Q., Ijiri, K., Komiya, S., and Tortorella, M.D. (2002). Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *The Journal of biological chemistry* 277, 22201-22208.
- Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., and Zarins, A. (1971). Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 53, 523-537.
- Mariadason, J.M., Corner, G.A., and Augenlicht, L.H. (2000). Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Research* 60, 4561-4572.

- Marks, P.A. (2010a). The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 1049-1066.
- Marks, P.A. (2010b). Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 1799, 717-725.
- Marks, P.A., and Xu, W.S. (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 107, 600-608.
- Marnett, L.J. (2009). The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 265-290.
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.P., and Roughley, P.J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 351-384.
- Martel-Pelletier, J., and Pelletier, J.P. (2010). Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklemler Hastalik Cerrahisi* 21, 2-14.
- Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., and Fahmi, H. (2003). Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 33, 155-167.
- Martel-Pelletier, J., Wildi, L.M., and Pelletier, J.P. (2011). Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone*.
- Martin, E., Nathan, C., and Xie, Q.W. (1994). Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 180, 977-984.
- Martinez-Ruiz, A., Cadenas, S., and Lamas, S. (2011). Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* 51, 17-29.
- Masini, E., Cianchi, F., Mastroianni, R., and Cuzzocrea, S. (2010). Nitric oxide expression in cancer., 59-82.
- Mastbergen, S.C., Bijlsma, J.W., and Lafeber, F.P. (2005). Selective COX-2 inhibition is favorable to human early and late-stage osteoarthritic cartilage: a human in vitro study. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 519-526.
- Mastbergen, S.C., Lafeber, F.P., and Bijlsma, J.W. (2002). Selective COX-2 inhibition prevents proinflammatory cytokine-induced cartilage damage. *Rheumatology (Oxford)* 41, 801-808.

- Mastbergen, S.C., Marijnissen, A.C., Vianen, M.E., Zoer, B., van Roermund, P.M., Bijlsma, J.W., and Lafeber, F.P. (2006). Inhibition of COX-2 by celecoxib in the canine groove model of osteoarthritis. *Rheumatology* 45, 405-413.
- Masuko-Hongo, K., Berenbaum, F., Humbert, L., Salvat, C., Goldring, M.B., and Thirion, S. (2004). Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis Rheum* 50, 2829-2838.
- Matsuo, M., Nishida, K., Yoshida, A., Murakami, T., and Inoue, H. (2001). Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 55, 333-340.
- Mbonye, U.R., Yuan, C., Harris, C.E., Sidhu, R.S., Song, I., Arakawa, T., and Smith, W.L. (2008). Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *J Biol Chem* 283, 8611-8623.
- McInnes, I.B., Leung, B.P., Field, M., Wei, X.Q., Huang, F.P., Sturrock, R.D., Kinninmonth, A., Weidner, J., Mumford, R., and Liew, F.Y. (1996). Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 184, 1519-1524.
- Mehindate, K., al-Daccak, R., Dayer, J.M., Kennedy, B.P., Kris, C., Borgeat, P., Poubelle, P.E., and Mourad, W. (1995). Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E2. Evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2. *J Immunol* 155, 3570-3577.
- Miller, T.A., Witter, D.J., and Belvedere, S. (2003). Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 46, 5097-5116.
- Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38-51.
- Mitchell, J.A., and Warner, T.D. (1999). Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 128, 1121-1132.
- Mitro, N., Godio, C., De Fabiani, E., Scotti, E., Galmozzi, A., Gilardi, F., Caruso, D., Vigil Chacon, A.B., and Crestani, M. (2007). Insights in the regulation of cholesterol 7alpha-

hydroxylase gene reveal a target for modulating bile acid synthesis. *Hepatology* 46, 885-897.

Miwa, M., Saura, R., Hirata, S., Hayashi, Y., Mizuno, K., and Itoh, H. (2000). Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 17-24.

Murakami, M. (2011). Lipid mediators in life science. *Exp Anim* 60, 7-20.

Mobasheri, A., Richardson, S., Mobasheri, R., Shakibaei, M., and Hoyland, J.A. (2005). Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol* 20, 1327-1338.

Montgomery, R.L., Davis, C.A., Potthoff, M.J., Haberland, M., Fielitz, J., Qi, X., Hill, J.A., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2007). Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 21, 1790-1802.

Montgomery, R.L., Hsieh, J., Barbosa, A.C., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2009). Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7876-7881.

Montgomery, R.L., Potthoff, M.J., Haberland, M., Qi, X., Matsuzaki, S., Humphries, K.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. *J Clin Invest* 118, 3588-3597.

Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 165-175.

Morita, I., Schindler, M., Regier, M.K., Otto, J.C., Hori, T., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270, 10902-10908.

Morteau, O., Morham, S.G., Sellon, R., Dieleman, L.A., Langenbach, R., Smithies, O., and Sartor, R.B. (2000). Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 105, 469-478.

Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K., and Kudo, I. (2003). Cellular prostaglandin E2 production by membrane-

bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 278, 37937-37947.

Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., *et al.* (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275, 32783-32792.

Murrell, G.A., Jang, D., and Williams, R.J. (1995). Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 15-21.

Nah, S.S., Choi, I.Y., Lee, C.K., Oh, J.S., Kim, Y.G., Moon, H.B., and Yoo, B. (2008). Effects of advanced glycation end products on the expression of COX-2, PGE2 and NO in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 47, 425-431.

Nakamura, T., Kukita, T., Shobuike, T., Nagata, K., Wu, Z., Ogawa, K., Hotokebuchi, T., Kohashi, O., and Kukita, A. (2005). Inhibition of histone deacetylase suppresses osteoclastogenesis and bone destruction by inducing IFN-beta production. *J Immunol* 175, 5809-5816.

Naraba, H., Yokoyama, C., Tago, N., Murakami, M., Kudo, I., Fueki, M., Oh-Ishi, S., and Tanabe, T. (2002). Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* 277, 28601-28608.

Nasu, Y., Nishida, K., Miyazawa, S., Komiyama, T., Kadota, Y., Abe, N., Yoshida, A., Hirohata, S., Ohtsuka, A., and Ozaki, T. (2008). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 723-732.

Nedelec, E., Abid, A., Cipolletta, C., Presle, N., Terlain, B., Netter, P., and Jouzeau, J. (2001). Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: lack of contribution to loss of cartilage anabolism. *Biochem Pharmacol* 61, 965-978.

Nelson, F., Dahlberg, L., Laverty, S., Reiner, A., Pidoux, I., Ionescu, M., Fraser, G.L., Brooks, E., Tanzer, M., Rosenberg, L.C., *et al.* (1998). Evidence for altered synthesis of

- type II collagen in patients with osteoarthritis. *The Journal of clinical investigation* *102*, 2115-2125.
- Nemeth, A., and Langst, G. (2004). Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. *Brief Funct Genomic Proteomic* *2*, 334-343.
- Nie, M., Corbett, L., Knox, A.J., and Pang, L. (2005). Differential regulation of chemokine expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists: interactions with glucocorticoids and beta2-agonists. *J Biol Chem* *280*, 2550-2561.
- Nishida, K., Komiyama, T., Miyazawa, S., Shen, Z.N., Furumatsu, T., Doi, H., Yoshida, A., Yamana, J., Yamamura, M., Ninomiya, Y., *et al.* (2004). Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum* *50*, 3365-3376.
- Norris, K.L., Lee, J.Y., and Yao, T.P. (2009). Acetylation goes global: the emergence of acetylation biology. *Sci Signal* *2*, pe76.
- Notoya, K., Jovanovic, D.V., Reboul, P., Martel-Pelletier, J., Mineau, F., and Pelletier, J.P. (2000). The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* *165*, 3402-3410.
- Nozawa-Inoue, K., Amizuka, N., Ikeda, N., Suzuki, A., Kawano, Y., and Maeda, T. (2003). Synovial membrane in the temporomandibular joint--its morphology, function and development. *Arch Histol Cytol* *66*, 289-306.
- Oehme, I., Deubzer, H.E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J.P., Hero, B., Kopp-Schneider, A., Westermann, F., Ulrich, S.M., von Deimling, A., *et al.* (2009). Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res* *15*, 91-99.
- Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. (2004). Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int J Cancer* *112*, 26-32.
- Otto, J.C., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1993). N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *268*, 18234-18242.

- Ouellet, M., Falgoutyret, J.P., Ear, P.H., Pen, A., Mancini, J.A., Riendeau, D., and Percival, M.D. (2002). Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. *Protein Expr Purif* 26, 489-495.
- Pan, L., Lu, J., Wang, X., Han, L., Zhang, Y., Han, S., and Huang, B. (2007). Histone deacetylase inhibitor trichostatin a potentiates doxorubicin-induced apoptosis by up-regulating PTEN expression. *Cancer* 109, 1676-1688.
- Pannu, R., and Singh, I. (2006). Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochemistry international* 49, 170-182.
- Park, G.Y., Joo, M., Pedchenko, T., Blackwell, T.S., and Christman, J.W. (2004). Regulation of macrophage cyclooxygenase-2 gene expression by modifications of histone H3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L956-962.
- Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 119, 229-240.
- Patrono, C., Patrignani, P., and Garcia Rodriguez, L.A. (2001). Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest* 108, 7-13.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23, 75-93.
- Peart, M.J., Smyth, G.K., van Laar, R.K., Bowtell, D.D., Richon, V.M., Marks, P.A., Holloway, A.J., and Johnstone, R.W. (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3697-3702.
- Pelletier, J.P., Jovanovic, D., Fernandes, J.C., Manning, P., Connor, J.R., Currie, M.G., Di Battista, J.A., and Martel-Pelletier, J. (1998). Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 41, 1275-1286.
- Pelletier, J.P., Jovanovic, D.V., Lascau-Coman, V., Fernandes, J.C., Manning, P.T., Connor, J.R., Currie, M.G., and Martel-Pelletier, J. (2000). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible

- link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis and Rheumatism* *43*, 1290-1299.
- Pelletier, J.P., Lascau-Coman, V., Jovanovic, D., Fernandes, J.C., Manning, P., Connor, J.R., Currie, M.G., and Martel-Pelletier, J. (1999). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *The Journal of rheumatology* *26*, 2002-2014.
- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., and Abramson, S.B. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* *44*, 1237-1247.
- Pelletier, J.P., Mineau, F., Ranger, P., Tardif, G., and Martel-Pelletier, J. (1996). The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* *4*, 77-84.
- Pelletier, J.P., Roughley, P.J., DiBattista, J.A., McCollum, R., and Martel-Pelletier, J. (1991). Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Seminars in arthritis and rheumatism* *20*, 12-25.
- Peng, G.S., Li, G., Tzeng, N.S., Chen, P.S., Chuang, D.M., Hsu, Y.D., Yang, S., and Hong, J.S. (2005). Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain research Molecular brain research* *134*, 162-169.
- Pero, R., Peluso, S., Angrisano, T., Tuccillo, C., Sacchetti, S., Keller, S., Tomaiuolo, R., Bruni, C.B., Lembo, F., and Chiariotti, L. (2011). Chromatin and DNA methylation dynamics of *Helicobacter pylori*-induced COX-2 activation. *Int J Med Microbiol* *301*, 140-149.
- Peserico, A., and Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* *2011*, 371832.
- Peskar, B.M. (2005). Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. *Inflammopharmacology* *13*, 15-26.
- Peterson, G.M., and Naunton, M. (2005). Valproate: a simple chemical with so much to offer. *J Clin Pharm Ther* *30*, 417-421.

- Pollard, T.C., Gwilym, S.E., and Carr, A.J. (2008). The assessment of early osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* *90*, 411-421.
- Poole, A.R., Guilak, F., and Abramson, S.B. (2007). Etiopathogenesis of Osteoarthritis. In: Wolters, K., Lippincott, W., and Wilkins. eds. *Osteoarthritis diagnosis and medical/surgical management*. 4th ed. Philadelphia, 27-49.
- Prince, H.M. (2010). The deacetylase inhibitors--here to stay! *Invest New Drugs* *28 Suppl 1*, S1-2.
- Pritzker, K.P., Gay, S., Jimenez, S.A., Ostergaard, K., Pelletier, J.P., Revell, P.A., Salter, D., and van den Berg, W.B. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* *14*, 13-29.
- Qidwai, T., and Jamal, F. (2010). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol* *72*, 375-387.
- Qiu, L., Burgess, A., Fairlie, D.P., Leonard, H., Parsons, P.G., and Gabrielli, B.G. (2000). Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell* *11*, 2069-2083.
- Rajakariar, R., Hilliard, M., Lawrence, T., Trivedi, S., Colville-Nash, P., Bellingan, G., Fitzgerald, D., Yaqoob, M.M., and Gilroy, D.W. (2007). Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20979-20984.
- Reddy, P., Sun, Y., Toubai, T., Duran-Struuck, R., Clouthier, S.G., Weisiger, E., Maeda, Y., Tawara, I., Krijanovski, O., Gatza, E., *et al.* (2008). Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *The Journal of clinical investigation* *118*, 2562-2573.
- Renoux, M., Hilliquin, P., Galoppin, L., Florentin, I., and Menkes, C.J. (1996). Release of mast cell mediators and nitrites into knee joint fluid in osteoarthritis--comparison with articular chondrocalcinosis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *4*, 175-179.
- Richette, P. (2011). [Pharmacological therapies for osteoarthritis]. *Therapie* *66*, 383-390.

- Riester, D., Hildmann, C., and Schwienhorst, A. (2007). Histone deacetylase inhibitors--turning epigenic mechanisms of gene regulation into tools of therapeutic intervention in malignant and other diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 499-514.
- Riggs, A.D., and Porter, T.N. (1996). Historical Overview of epigenetic mechanisms. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Rizzo, M.T. (2011). Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clin Chim Acta* 412, 671-687.
- Robins, J.C., Akeno, N., Mukherjee, A., Dalal, R.R., Aronow, B.J., Koopman, P., and Clemens, T.L. (2005). Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone* 37, 313-322.
- Roger, T., Lugrin, J., Le Roy, D., Goy, G., Mombelli, M., Koessler, T., Ding, X.C., Chanson, A.L., Reymond, M.K., Miconnet, I., *et al.* (2011). Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 117, 1205-1217.
- Rollin, R., Marco, F., Jover, J.A., Garcia-Asenjo, J.A., Rodriguez, L., Lopez-Duran, L., and Fernandez-Gutierrez, B. (2008). Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatology international* 28, 757-764.
- Roos, K.L., and Simmons, D.L. (2005). Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 62-69.
- Rosenthal, A.K. (2011). Crystals, inflammation, and osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 23, 170-173.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 70, 81-120.
- Roughley, P.J., and Lee, E.R. (1994). Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 28, 385-397.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25, 15-30.

- Sadouk, M.B., Pelletier, J.P., Tardif, G., Kiansa, K., Cloutier, J.M., and 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* 73, 347-355.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M., and Khochbin, S. (2008). Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* 90, 306-312.
- Samuelsson, B., Morgenstern, R., and Jakobsson, P.J. (2007). Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* 59, 207-224.
- Sanchez, R., and Zhou, M.M. (2009). The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12, 659-665.
- Sandell, L.J., Heinegard, D., and Hrerling, T.M. (2007). Cell biology, biochemistry, and molecular biology of articular cartilage in osteoarthritis. In: Wolters, K., Lippincott, W., and Wilkins. eds. *Osteoarthritis diagnosis and medical/surgical management*. 4th ed. Philadelphia, 73-106.
- Sareila, O., Hamalainen, M., Nissinen, E., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2008). Orazipone inhibits activation of inflammatory transcription factors nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription 1 and decreases inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in response to inflammatory stimuli. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 324, 858-866.
- Sasaki, K., Hattori, T., Fujisawa, T., Takahashi, K., Inoue, H., and Takigawa, M. (1998). Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem* 123, 431-439.
- Sauve, A.A. (2010). Sirtuin chemical mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804, 1591-1603.
- Scher, J.U., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2007). Nitric oxide synthases and osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 9, 9-15.
- Schmidt, N., Pautz, A., Art, J., Rauschkolb, P., Jung, M., Erkel, G., Goldring, M.B., and Kleinert, H. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 79, 722-732.

- Schneider, A., J.P., L., DEBY-DUPONT, G., and SERTEYN, D. (2007). Le rôle des synoviocytes dans l'articulation diarthrodiale enflammée. *Ann Méd Vét* 151, 24-43.
- Schroeder, R.A., and Kuo, P.C. (1995). Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesth Analg* 81, 1052-1059.
- Schrump, D.S., Fischette, M.R., Nguyen, D.M., Zhao, M., Li, X., Kunst, T.F., Hancox, A., Hong, J.A., Chen, G.A., Kruchin, E., *et al.* (2008). Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving Romidepsin. *Clin Cancer Res* 14, 188-198.
- Scroggins, B.T., Robzyk, K., Wang, D., Marcu, M.G., Tsutsumi, S., Beebe, K., Cotter, R.J., Felts, S., Toft, D., Karnitz, L., *et al.* (2007). An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell* 25, 151-159.
- Segain, J.P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H.M., and Galmiche, J.P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47, 397-403.
- Sellam, J., and Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 625-635.
- Selvi, R.B., and Kundu, T.K. (2009). Reversible acetylation of chromatin: implication in regulation of gene expression, disease and therapeutics. *Biotechnol J* 4, 375-390.
- Sengupta, N., and Seto, E. (2004). Regulation of histone deacetylase activities. *Journal of Cellular Biochemistry* 93, 57-67.
- Serhan, C.N., Yacoubian, S., and Yang, R. (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* 3, 279-312.
- Sha, Y., and Marshall, H.E. (2011). S-nitrosylation in the regulation of gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Shalom-Barak, T., Quach, J., and Lotz, M. (1998). Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 273, 27467-27473.
- Shibakawa, A., Aoki, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Tanaka, M., Nishioka, K., and Nakamura, H. (2003). Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its

- histological character. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society *11*, 133-140.
- Siegle, I., Klein, T., Backman, J.T., Saal, J.G., Nusing, R.M., and Fritz, P. (1998). Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum* *41*, 122-129.
- Singh, S., and Gupta, A.K. (2011). Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer chemotherapy and pharmacology* *67*, 1211-1224.
- Smikin, P.A., and Gardner, G.C. (2008). The musculoskeletal system and joint physiology. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH eds. *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, 33-43.
- Smith, M.A., and Walker, J.G. (2008). The synovium. In: Hochberg, M.C., Silman, A.J., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E., and Weisman, M.H. eds. *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, 73-78.
- Smith, M.D., Triantafillou, S., Parker, A., Youssef, P.P., and Coleman, M. (1997). Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* *24*, 365-371.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* *69*, 145-182.
- sSmyth, E.M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., and FitzGerald, G.A. (2009). Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res* *50 Suppl*, S423-428.
- Somoza, J.R., Skene, R.J., Katz, B.A., Mol, C., Ho, J.D., Jennings, A.J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J.J., Chi, E., *et al.* (2004). Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* *12*, 1325-1334.
- Souza, J.M., Peluffo, G., and Radi, R. (2008). Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free radical biology & medicine* *45*, 357-366.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., and Kramer, O.H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 185-198.

- Stadler, J., Stefanovic-Racic, M., Billiar, T.R., Curran, R.D., McIntyre, L.A., Georgescu, H.I., Simmons, R.L., and Evans, C.H. (1991). Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 147, 3915-3920.
- Stadler, K., Bonini, M.G., Dallas, S., Jiang, J., Radi, R., Mason, R.P., and Kadiiska, M.B. (2008). Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free radical biology & medicine* 45, 866-874.
- Stein, G.S., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S.K., Young, D.W., Choi, J.Y., and Pockwinse, S.M. (2004). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23, 4315-4329.
- Stempelj, M., Kedinger, M., Augenlicht, L., and Klampfer, L. (2007). Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate. *J Biol Chem* 282, 9797-9804.
- Stepkowski, S.M., Chen, W., Ross, J.A., Nagy, Z.S., and Kirken, R.A. (2008). STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. *Transplantation* 85, 1372-1377.
- Stichtenoth, D.O., Thoren, S., Bian, H., Peters-Golden, M., Jakobsson, P.J., and Crofford, L.J. (2001). Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 167, 469-474.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strahl, B.D., Huang, H.J., Sebastian, J., Ghosh, B.R., and Miller, W.L. (1998). Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by gonadotropin-releasing hormone: involvement of two activating protein-1-binding sites and protein kinase C. *Endocrinology* 139, 4455-4465.
- Studer, R.K., Georgescu, H.I., Miller, L.A., and Evans, C.H. (1999). Inhibition of transforming growth factor beta production by nitric oxide-treated chondrocytes: implications for matrix synthesis. *Arthritis Rheum* 42, 248-257.

- Studer, R.K., Levicoff, E., Georgescu, H., Miller, L., Jaffurs, D., and Evans, C.H. (2000). Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IRbeta tyrosine phosphorylation. *American journal of physiology Cell physiology* 279, C961-969.
- Su, S., Grover, J., Roughley, P.J., DiBattista, J.A., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., and Zafarullah, M. (1999). Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatology international* 18, 183-191.
- Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A.J. (2007). Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res* 67, 3976-3985.
- Subbaramaiah, K., Marmo, T.P., Dixon, D.A., and Dannenberg, A.J. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR. *J Biol Chem* 278, 37637-37647.
- Subbaramaiah, K., Yoshimatsu, K., Scherl, E., Das, K.M., Glazier, K.D., Golijanin, D., Soslow, R.A., Tanabe, T., Naraba, H., and Dannenberg, A.J. (2004). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* 279, 12647-12658.
- Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282, 11613-11617.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., and Mobasher, A. (2009). The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J* 179, 10-24.
- Suuronen, T., Huuskonen, J., Pihlaja, R., Kyrylenko, S., and Salminen, A. (2003). Regulation of microglial inflammatory response by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Neurochemistry* 87, 407-416.
- Sweeney, F.J., Wachtmann, T.S., Eskra, J.D., Verdries, K.A., Lambalot, R.H., Carty, T.J., Perez, J.R., and Audoly, L.P. (2003). Inhibition of IL-1beta-dependent prostaglandin E2 release by antisense microsomal prostaglandin E synthase 1 oligonucleotides in A549 cells. *Mol Cell Endocrinol* 205, 151-157.

- Swoboda, B., Pullig, O., Kirsch, T., Kladny, B., Steinhauser, B., and Weseloh, G. (1998). Increased content of type-VI collagen epitopes in human osteoarthritic cartilage: quantitation by inhibition ELISA. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 16, 96-99.
- Szerlong, H.J., and Hansen, J.C. (2011). Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 89, 24-34.
- Tai, H.H., Cho, H., Tong, M., and Ding, Y. (2006). NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions. *Curr Pharm Des* 12, 955-962.
- Takami, Y., and Nakayama, T. (2000). N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal, and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line. *J Biol Chem* 275, 16191-16201.
- Takayama, K., Ishida, K., Matsushita, T., Fujita, N., Hayashi, S., Sasaki, K., Tei, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Fujioka, H., *et al.* (2009). SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60, 2731-2740.
- Tanabe, T., and Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 95-114.
- Taskiran, D., Stefanovic-Racic, M., Georgescu, H., and Evans, C. (1994). Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200, 142-148.
- Tazawa, R., Xu, X.M., Wu, K.K., and Wang, L.H. (1994). Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 190-199.
- Tebib, J. (2006). Physiopathologie de l'arthrose. In : Bonnin, M., and Chambat, P. eds. *La gonarthrose traitement chirurgical : de l'arthroscopie a la prothèse*. Paris; New York : Springer, 13-23.
- Thomas, D.D., Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Flores-Santana, W., Switzer, C.H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., *et al.* (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45, 18-31.

- Thonar, E.J.M.A., Masuda, K., Manicourt, D.H., and Kuettner, K.E. (1999). Structure and function of normal human adult articular cartilage. In: Reginster, J.Y., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., and Henrotin, Y. eds. *Osteoarthritis. Clinical and Experimental Aspects*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1-19.
- Thoren, S., Weinander, R., Saha, S., Jegerschold, C., Pettersson, P.L., Samuelsson, B., Hebert, H., Hamberg, M., Morgenstern, R., and Jakobsson, P.J. (2003). Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J Biol Chem* 278, 22199-22209.
- Tong, X., Yin, L., Joshi, S., Rosenberg, D.W., and Giardina, C. (2005). Cyclooxygenase-2 regulation in colon cancer cells: modulation of RNA polymerase II elongation by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280, 15503-15509.
- Trebino, C.E., Stock, J.L., Gibbons, C.P., Naiman, B.M., Wachtmann, T.S., Umland, J.P., Pandher, K., Lapointe, J.M., Saha, S., Roach, M.L., *et al.* (2003). Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9044-9049.
- Troeberg, L., and Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824, 133-145.
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y., and Koizumi, K. (1976). A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)* 29, 1-6.
- Tsukiyama, T. (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 422-429.
- Tur, G., Georgieva, E.I., Gagete, A., Lopez-Rodas, G., Rodriguez, J.L., and Franco, L. (2010). Factor binding and chromatin modification in the promoter of murine Egr1 gene upon induction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 4065-4077.
- Valdes, A.M., and Spector, T.D. (2010). The clinical relevance of genetic susceptibility to osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24, 3-14.
- van den Berg, W.B., van de Loo, F., Joosten, L.A., and Arntz, O.J. (1999). Animal models of arthritis in NOS2-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 413-415.
- van Lent, P.L., Blom, A.B., van der Kraan, P., Holthuysen, A.E., Vitters, E., van Rooijen, N., Smeets, R.L., Nabbe, K.C., and van den Berg, W.B. (2004). Crucial role of synovial

lining macrophages in the promotion of transforming growth factor beta-mediated osteophyte formation. *Arthritis and Rheumatism* 50, 103-111.

Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E.C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., *et al.* (2004). Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15064-15069.

Vannini, A., Volpari, C., Gallinari, P., Jones, P., Mattu, M., Carfi, A., De Francesco, R., Steinkuhler, C., and Di Marco, S. (2007). Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex. *EMBO Rep* 8, 879-884.

Vanommeslaeghe, K., Loverix, S., Geerlings, P., and Tourwe, D. (2005). DFT-based ranking of zinc-binding groups in histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13, 6070-6082.

Vasan, N. (1980). Proteoglycans in normal and severely osteoarthritic human cartilage. *The Biochemical journal* 187, 781-787.

Vega, R.B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A.C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J.M., Richardson, J.A., *et al.* (2004). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119, 555-566.

Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H.G. (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in Genetics* 19, 286-293.

Ververis, K., and Karagiannis, T.C. (2011). Potential non-oncological applications of histone deacetylase inhibitors. *American journal of translational research* 3, 454-467.

Villagra, A., Cheng, F., Wang, H.W., Suarez, I., Glozak, M., Maurin, M., Nguyen, D., Wright, K.L., Atadja, P.W., Bhalla, K., *et al.* (2009). The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol* 10, 92-100.

Vlad, S.C., Neogi, T., Aliabadi, P., Fontes, J.D., and Felson, D.T. (2011). No association between markers of inflammation and osteoarthritis of the hands and knees. *The Journal of rheumatology* 38, 1665-1670.

Vojinovic, J., and Damjanov, N. (2011). HDAC inhibition in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Molecular medicine* 17, 397-403.

- Vojinovic, J., Damjanov, N., D'Urzo, C., Furlan, A., Susic, G., Pasic, S., Iagaru, N., Stefan, M., and Dinarello, C.A. (2011). Safety and efficacy of an oral histone deacetylase inhibitor in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism* *63*, 1452-1458.
- Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Al-Saffar, N., Knowles, R.G., and Moilanen, E. (2001). Regulation of the nitric oxide production resulting from the glucocorticoid-insensitive expression of iNOS in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* *9*, 597-605.
- Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Knowles, R.G., and Moilanen, E. (2007). The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* *36*, 247-258.
- Waltregny, D., De Leval, L., Glenisson, W., Ly Tran, S., North, B.J., Bellahcene, A., Weidle, U., Verdin, E., and Castronovo, V. (2004a). Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. *Am J Pathol* *165*, 553-564.
- Waltregny, D., Glenisson, W., Tran, S.L., North, B.J., Verdin, E., Colige, A., and Castronovo, V. (2005). Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB J* *19*, 966-968.
- Waltregny, D., North, B., Van Mellaert, F., de Leval, J., Verdin, E., and Castronovo, V. (2004b). Screening of histone deacetylases (HDAC) expression in human prostate cancer reveals distinct class I HDAC profiles between epithelial and stromal cells. *Eur J Histochem* *48*, 273-290.
- Wang, G.G., Allis, C.D., and Chi, P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* *13*, 363-372.
- Wang, H., Cheng, F., Woan, K., Sahakian, E., Merino, O., Rock-Klotz, J., Vicente-Suarez, I., Pinilla-Ibarz, J., Wright, K.L., Seto, E., *et al.* (2011). Histone deacetylase inhibitor LAQ824 augments inflammatory responses in macrophages through transcriptional regulation of IL-10. *J Immunol* *186*, 3986-3996.
- Wang, M., Zukas, A.M., Hui, Y., Ricciotti, E., Pure, E., and FitzGerald, G.A. (2006). Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 14507-14512.

- Wang, W.C. (2008). The pharmacotherapy of sickle cell disease. *Expert Opin Pharmacother* 9, 3069-3082.
- Wang, W.L., Lee, Y.C., Yang, W.M., Chang, W.C., and Wang, J.M. (2008). Sumoylation of LAP1 is involved in the HDAC4-mediated repression of COX-2 transcription. *Nucleic Acids Res* 36, 6066-6079.
- Wang, X., Song, Y., Jacobi, J.L., and Tuan, R.S. (2009). Inhibition of histone deacetylases antagonized FGF2 and IL-1beta effects on MMP expression in human articular chondrocytes. *Growth Factors* 27, 40-49.
- Wieland, H.A., Michaelis, M., Kirschbaum, B.J., and Rudolphi, K.A. (2005). Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov* 4, 331-344.
- Wiling, R.H., Yanover, E., Heideman, M.R., Jacobs, H., Horner, J., van der Torre, J., DePinho, R.A., and Dannenberg, J.H. (2010). Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO J* 29, 2586-2597.
- Wink, D.A., and Mitchell, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25, 434-456.
- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters* 277, 8-21.
- Wolffe, A.P., and Guschin, D. (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *Journal of Structural Biology* 129, 102-122.
- Wollheim, F.A., and Lohmander, L.S. (2008). Pathogenesis and pathology of osteoarthritis. In: Hochberg, M.C., Silman, A.J., Smolen, J.S, Weinblatt, M.E., and Weisman, M.H. eds. *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, 1711-1728.
- Workman, J.L., and Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual Review of Biochemistry* 67, 545-579.
- Wu, Y., and Guo, S.W. (2007). Suppression of IL-1beta-induced COX-2 expression by trichostatin A (TSA) in human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 135, 88-93.
- Xu, D., Rowland, S.E., Clark, P., Giroux, A., Cote, B., Guiral, S., Salem, M., Ducharme, Y., Friesen, R.W., Methot, N., *et al.* (2008). MF63 [2-(6-chloro-1H-phenanthro[9,10-

- d]imidazol-2-yl)-isophthalonitrile], a selective microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitor, relieves pyresis and pain in preclinical models of inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326, 754-763.
- Xu, W., Charles, I.G., Liu, L., Moncada, S., and Emson, P. (1996). Molecular cloning and structural organization of the human inducible nitric oxide synthase gene (NOS2). *Biochem Biophys Res Commun* 219, 784-788.
- Xu, W.S., Parmigiani, R.B., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26, 5541-5552.
- Yamaguchi, K., Lantowski, A., Dannenberg, A.J., and Subbaramaiah, K. (2005). Histone deacetylase inhibitors suppress the induction of c-Jun and its target genes including COX-2. *J Biol Chem* 280, 32569-32577.
- Yamakawa, K., Kamekura, S., Kawamura, N., Saegusa, M., Kamei, D., Murakami, M., Kudo, I., Uematsu, S., Akira, S., Chung, U.I., *et al.* (2008). Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis and Rheumatism* 58, 172-183.
- Yang, X.J., and Gregoire, S. (2005). Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* 25, 2873-2884.
- Yang, X.J., and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 206-218.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., and Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23, 2369-2380.
- Yin, L., Laevsky, G., and Giardina, C. (2001). Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem* 276, 44641-44646.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265, 17174-17179.
- Young, D.A., Lakey, R.L., Pennington, C.J., Jones, D., Kevorkian, L., Edwards, D.R., Cawston, T.E., and Clark, I.M. (2005). Histone deacetylase inhibitors modulate

- metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther* 7, R503-512.
- Yu, J., de Belle, I., Liang, H., and Adamson, E.D. (2004). Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses. *Mol Cell* 15, 83-94.
- Yu, Z., Zhang, W., and Kone, B.C. (2002). Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *Journal of the American Society of Nephrology* 13, 2009-2017.
- Yuan, C., Sidhu, R.S., Kuklev, D.V., Kado, Y., Wada, M., Song, I., and Smith, W.L. (2009). Cyclooxygenase Allosterism, Fatty Acid-mediated Cross-talk between Monomers of Cyclooxygenase Homodimers. *J Biol Chem* 284, 10046-10055.
- Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 307, 269-273.
- Zamli, Z., and Sharif, M. (2011). Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *Int J Rheum Dis* 14, 159-166.
- Zayed, N., El Mansouri, F.E., Chabane, N., Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Bendedour, M., Pelletier, J.P., Duval, N., and Fahmi, H. (2011). Valproic Acid Suppresses Interleukin-1 α -induced Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 Expression in Chondrocytes Through Upregulation of NAB1. *J Rheumatol* 38, 492-502.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Chang, S., Antos, C.L., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2002). Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110, 479-488.
- Zhang, W., Moskowitz, R.W., Nuki, G., Abramson, S., Altman, R.D., Arden, N., Bierma-Zeinstra, S., Brandt, K.D., Croft, P., Doherty, M., *et al.* (2008a). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 137-162.
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.L., Chua, K., *et al.* (2008b). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* 28, 1688-1701.

Zhang, Z.Y., Zhang, Z., and Schluesener, H.J. (2010). MS-275, an histone deacetylase inhibitor, reduces the inflammatory reaction in rat experimental autoimmune neuritis. *Neuroscience* *169*, 370-377.

Zhou, X., Hua, X., Ding, X., Bian, Y., and Wang, X. (2011). Trichostatin differentially regulates Th1 and Th2 responses and alleviates rheumatoid arthritis in mice. *J Clin Immunol* *31*, 395-405.

Zhou, X., Marks, P.A., Rifkind, R.A., and Richon, V.M. (2001). Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10572-10577.