



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I
2003

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTE, ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 Novembre 2003

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I
Mention : Biologie cellulaire

Par

Sandrine BOYAULT

Née le 1^{er} juin 1977

Titulaire du diplôme d'Etudes Approfondies de Pharmacologie

Modulation des effets et de la production de l'interleukine-1 β
par des ligands des récepteurs nucléaires : PPAR,
« peroxisome proliferator-activated receptor » et
ROR α « retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha »
dans les tissus de l'articulation

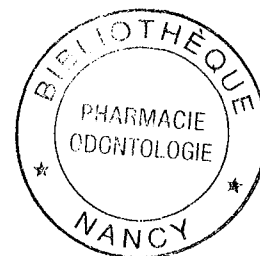
Directeur de thèse : P. NETTER, Professeur (Nancy)

DS 19321

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : M.T. CORVOL, Directeur de Recherche (Paris)
T. PINEAU, Directeur de Recherche (Toulouse)

Examineurs : P. NETTER, Professeur (Nancy)
K. BORDJI, Docteur (Lyon)
M. DAUÇA, Professeur (Nancy)
J.Y. JOUZEAU, Docteur (Nancy)



Je remercie Monsieur le Professeur Patrick Netter pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

J'adresse mes vifs remerciements et mon profond respect à Monsieur le Docteur Karim Bordji pour la confiance qu'il m'a témoignée, le soutien qu'il m'a apporté, pour son encadrement, ses nombreux conseils scientifiques, son dynamisme et sa sympathie.

Je remercie Monsieur le Docteur Bernard Terlain pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour ses conseils scientifiques. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je remercie Monsieur Le Docteur Jean-Yves Jouzeau pour ses conseils et ses connaissances pharmacologiques. Je lui témoigne ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie Madame le Professeur Marie Thérèse Corvol pour l'honneur qu'elle m'a fait de juger cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Thierry Pineau de m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde considération et ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Michel Dauça pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire ainsi que pour l'honneur qu'il me fait de juger cette thèse.

Je remercie Arnaud Bianchi (dit Nono) pour son aide scientifique, expérimentale, intellectuelle et amicale. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements à Marie-Agnès, Sylvie, Alex et David pour leur aide scientifique, expérimentale, intellectuelle et amicale.

Un grand merci à tous mes amis du Laboratoire, Claire, Carine, Mag, Mélanie, Meriem, Sandrine, Tony et Yann pour leur bonne humeur, leur aide, leur soutien et tous les bons moments passés ensemble.

Enfin, mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du Laboratoire.

A mes Parents,

A Aurélie,

A Guillaume,

A tous mes Amis,

Je dédie cette thèse.

Travaux publiés

Liste des articles publiés dans des revues avec comité de lecture :

BOYAULT S., SIMONIN M.A., BIANCHI A., COMPE E., LIAGRE B., MAINARD D., BECUWE P., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B., BORDJI K.

15-deoxy- Δ 12,14-PGJ₂ but not troglitazone, modulates IL-1 β effects in human chondrocytes by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation pathways
FEBS Letters, 2001, **501**, 24-30

SIMONIN MA., BORDJI K., BOYAULT S., BIANCHI A., GOUZE E., BECUWE P., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B.

PPAR- γ ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts
American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2002, **282**, C125-C133

BOYAULT S., BIANCHI A., MOULIN D., MORIN S., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B., BORDJI K.

Anti-inflammatory effect of 15d-PGJ₂ is PPAR γ independent in rat chondrocytes. Identification of intracellular target
Biochemical Journal, 2003, (soumis)

Liste des communications avec actes :

BOYAULT S., BORDJI K., SIMONIN M.A., BIANCHI A., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B.

Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ and retinoid Z receptor in human cartilage. Effect of specific agonists on IL-1 β -stimulated osteoarthritic cartilage
5th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International, Barcelona, 4-7 Octobre 2000. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2000, **8**, Suppl B, S2

SIMONIN M.A., BORDJI K., BOYAULT S., BIANCHI A., NETTER P., TERLAIN B.

Effects of specific ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ and retinoid Z receptor in IL1 β - and LPS-stimulated rat synovial fibroblasts
5th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International, Barcelona, 4-7 Octobre 2000. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2000, **8**, Suppl B, S54-S55

SIMONIN M.A., BORDJI K., BOYAULT S., BIANCHI A., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B.

Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in IL-1 β or LPS-stimulated rat synovial fibroblasts
64th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Philadelphia, 29 Octobre - 2 Novembre 2000. *Arthritis and Rheumatism*, 2000, **43**, suppl 9, S167

BOYAULT S., BORDJI K., SIMONIN M.A., BIANCHI A., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B.

Expression of nuclear receptors PPAR α and PPAR γ , and ROR α in human cartilage. Effect of PPAR γ specific ligands on IL-1- β -stimulated chondrocytes
64th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Philadelphia, 29 Octobre - 2 Novembre 2000. *Arthritis and Rheumatism*, 2000, **43**, suppl 9, 351

SIMONIN M.A., BORDJI K., **BOYVAULT S.**, BIANCHI A., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B.
Effect of specific ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in LPS-stimulated rat synovial fibroblasts. *PPARS 2001 Symposium*, Florence, Italie, 4-7 Avril 2001

BORDJI K., **BOYVAULT S.**, SIMONIN M.A., BIANCHI A., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B.
Characterization of PPAR-alpha and PPAR-gamma in human cartilage. Effects of specific agonists on IL-1beta-stimulated chondrocytes. *PPARS 2001 Symposium*, Florence, Italie, 4-7 Avril 2001

BOYVAULT S., SIMONIN M.A., BIANCHI A., BECUWE P., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B., BORDJI K.
Effects of PPAR γ ligands on NF- κ B and AP-1 activation pathways in IL-1 β -treated chondrocytes
5th World Congress on Inflammation 2001, Edinburgh, Scotland, 22-26 Septembre 2001. *Inflammation Research*, 2001, 50, suppl3, S166

BOYVAULT S., SIMONIN M.A., BIANCHI A., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B., BORDJI K.
In vitro study of PPAR γ ligands effects in the modulation of inflammatory arthropathies
12ème Journée de l'A.R.P., Paris, 12 Octobre 2001. *Revue du Rhumatisme (éd anglaise)*, 2001, 68, 6, 532

BOYVAULT S., BIANCHI A., SIMONIN M.A., DAUCA M., NETTER P., TERLAIN B., BORDJI K.
Implication potentielle de ROR α et de PPAR γ dans la régulation des effets de l'IL-1 β sur des chondrocytes de rat en culture
13ème Journée de l'A.R.P., Paris, 18 Octobre 2002. *Revue du Rhumatisme*, 2002

BIANCHI A., **BOYVAULT S.**, BORDJI K., TERLAIN B., JOUZEAU J.Y., LOEUILLE D., GILLET P., KINGSLEY D., NETTER P.
Growth factors and cytokines like IL-1beta and IL-4 modulate progressive ankylosis (ANK) gene expression in primary rat chondrocytes
66th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, New Orleans, USA, 24-29 Octobre 2002. *Arthritis and Rheumatism*, 2002, 46, suppl 9, S591

BIANCHI A., **BOYVAULT S.**, MOULIN D., MORIN S., NETTER P., JOUZEAU J.Y., TERLAIN B., BORDJI K.
Variable contribution of the NF- κ B signalling cascade to the anti-inflammatory potency of PPARgamma ligands in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes
67th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Orlando Florida, USA, 24-28 Octobre 2003. *Arthritis and Rheumatism*, 2003, (sous presse)



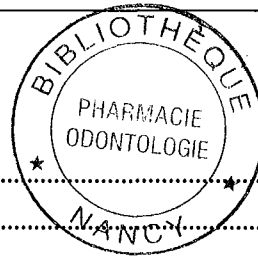
Liste des abréviations

ACO	AcylCoA oxydase
AP-1	Activator protein-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
bFGF	basic fibroblast growth factor
BCA	acide bicinchonique
BSA	Bovine serum albumin
CCLR	Cell culture lysis buffer
CD	Cluster of differentiation
COMP	cartilage oligo matrix protein
COX	Cyclooxygénase
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
dIdC	désoxy-inosine désoxy cytosine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	désoxynucléotides trisphosphates
DR-1	Direct repeat-1
DTT	dithiotréithol
EDTA	Ethylènediaminetétraacétate
EGTA	Ethylène-glycol-2(aminoéthyl)-tétraacétique acide
ELISA	Enzyme linked-immuno-sorbent assay
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GAG	Glycosaminoglycane
GAPDH	glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase
HDL	High density lipoprotein
ICE	IL-1 β converting enzyme
IGF	Insulin like-growth factor
IκBα	Inhibitor of NF- κ B alpha
IKK	I κ B kinase
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-1Ra	antagoniste du récepteur de l'IL-1

IL-1RacP	IL-1R accessory protein
IL-1RI	Récepteur à l'IL-1 de type I
IL-1RII	Récepteur à l'IL-1 de type II
IFNγ	Interféron γ
iNOS	NO synthase inductible
JNK	c-jun NH ₂ -terminal kinase
LB	Lennox Broth
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activating protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
M-MLV	Murine Moloney leukemia virus
MMP	Métalloprotéase matricielle
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Monoxyde d'azote
ONPG	Ortho-nitrophényl-galactoside
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEI	Polyéthylénimine
PG	Protéoglycane
PGE2	Prostaglandine E2
PMA	Phorbol myristate acétate
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator response element
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
ROR	retinoic acid receptor-related orphan receptor
RORE	ROR response element
Rosi	Rosiglitazone
RT-PCR	Reverse transcription- polymerase chain reaction
SP-1	Single protein-1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SVF	Sérum de veau foetal
TBE	Tris borate EDTA

TBS	Tris buffer saline
TBST	TBS tween
TGFβ	Transforming growth factor beta
TIMP	Inhibiteurs de métalloprotéases matricielles
TMB	3,3',5,5' tétraméthylbenzidine
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
Tro	Troglitazone
TZD	Thiazolidinedione
Wy	Wy 14,643
15d-PGJ₂	15 déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J ₂

Table des matières



TRAVAUX PUBLIES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	16
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
CHAPITRE I : L'ARTICULATION	19
<i>I Le cartilage articulaire.....</i>	<i>19</i>
1.1 Histologie / organisation du cartilage hyalin.....	21
1.2 Composition du cartilage hyalin	23
1.2.1 Les constituants de la matrice extracellulaire	23
1.2.1.1 L'eau	24
1.2.1.2 Les protéoglycanes	24
1.2.1.3 Les collagènes	28
1.2.1.4 Les protéines non collagéniques.....	29
1.2.2 Les chondrocytes	31
1.2.2.1 Morphologie cellulaire	32
1.2.2.2 Le chondron	32
1.2.2.3 Nutrition des chondrocytes.....	32
1.2.2.4 Le métabolisme chondrocytaire.....	33
1.3 Homéostasie du cartilage	34
<i>II Le liquide synovial</i>	<i>34</i>
<i>III La membrane synoviale</i>	<i>35</i>
<i>IV Les pathologies articulaires.....</i>	<i>37</i>
IV.1 Arthrite.....	37
IV.2 Arthrose	38
CHAPITRE II : L'INTERLEUKINE-1	47
<i>I Les différentes isoformes de l'interleukine -1</i>	<i>47</i>
<i>II Transduction du signal de l'interleukine-1</i>	<i>48</i>
<i>III Modulation des effets de l'IL-1</i>	<i>55</i>
III.1 IL-1Ra.....	55
III.2 IL-1RII	56
<i>IV IL-1 et pathologies articulaires.....</i>	<i>56</i>
IV.1 Site de production d'IL-1 dans l'articulation	57
IV.2 Implication de l'IL-1 dans la rupture de l'homéostasie du cartilage	57
IV.2.1 Modification de l'activité anabolique	57
IV.2.2 Modification de l'activité catabolique	58
IV.2.3 IL-1 et arthropathies	59
CHAPITRE III : LES RECEPTEURS NUCLEAIRES : PPAR, ROR	61
<i>I Structure des récepteurs nucléaires</i>	<i>61</i>
<i>II PPAR, « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor »</i>	<i>63</i>
II.1 Distribution tissulaire des différentes isoformes.....	63
II.2 Régulation transcriptionnelle dépendante de PPAR	64
II.2.1 Par fixation sur l'élément de réponse (PPRE)	64
II.2.2 Par interaction avec d'autres facteurs de transcription	65
II.2.3 Gènes régulés par les PPAR.....	65
II.3 Activation et régulation des PPAR	66
II.3.1 Activation par des ligands naturels et synthétiques des PPAR	66
II.3.2 Régulation des PPAR	67
II.3.2.1 Par phosphorylation	67
II.3.2.2 Par le partenaire RXR	68
II.3.2.3 Par liaison avec des cofacteurs.....	68
II.3.2.4 Interaction avec d'autres récepteurs nucléaires.....	70
II.4 Rôle des PPAR	71
II.4.1 Rôle physiologique.....	71
II.4.1.1 Rôle dans le développement.....	71
II.4.1.2 Rôle dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie énergétique	71
II.4.1.3 Rôle dans la différenciation cellulaire.....	72
II.4.1.4 Rôle dans la prolifération cellulaire	73
II.4.1.5 Rôle dans l'apoptose	73
II.4.2 Implication des PPAR dans certaines pathologies.....	75

II.4.2.1 PPAR, obésité et diabète de type II.....	75
II.4.2.2 PPAR et Cancer.....	76
II.4.2.3 PPAR et Inflammation.....	77
III ROR, « retinoid acid receptor-related orphan receptor ».....	79
III.1 Distribution tissulaire des différentes isoformes de ROR.....	79
III.2 Régulation transcriptionnelle ROR dépendante.....	80
III.2.1 Par fixation sur l'élément de réponse (RORE).....	80
III.2.2 Gènes régulés par ROR α	81
III.3 Activation et régulation de ROR.....	82
III.3.1 Activation par des ligands potentiels de ROR.....	82
III.3.2 Régulation par des cofacteurs.....	83
III.4 Rôles du récepteur nucléaire ROR α	84
III.4.1 Rôle physiologique.....	84
III.4.2 Rôle dans les pathologies.....	85
STRATEGIE DE L'ETUDE.....	87
MATERIELS ET METHODES.....	90
I Réactifs.....	91
I.1 Réactifs de Biologie cellulaire.....	91
I.2 Réactifs de Biologie moléculaire.....	91
II Culture cellulaire.....	92
II.1 Cultures primaires de chondrocytes humains ou de rat.....	92
II.1.1 Obtention des chondrocytes.....	92
II.1.2 Culture des chondrocytes en monocouche.....	92
II.1.3 Système de culture tridimensionnel en billes d'alginate.....	93
II.2 Culture primaire de synoviocytes de rat.....	93
II.2.1 Obtention de synoviocytes de type B.....	93
II.2.2 Culture de synoviocytes de type B.....	94
II.3 Traitement des cellules en culture.....	94
II.3.1 Traitement des cultures de chondrocytes.....	94
II.3.2 Traitement des cultures de synoviocytes.....	95
III Etude des effets des traitements sur différents paramètres de l'inflammation.....	95
III.1 Mesure de la synthèse des protéoglycanes (PG).....	95
III.2 Evaluation de la production de nitrites.....	96
III.3 Evaluation de la production de prostaglandines E2.....	96
III.4 Evaluation de la production d'interleukine-1 β	97
IV Etude de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel.....	97
IV.1 Extraction des ARN totaux.....	97
IV.2 RT-PCR quantitative multistandard et semi-quantitative.....	98
IV.2.1 Transcription inverse (RT).....	98
IV.2.2 Choix des amorces.....	99
IV.2.3 Réaction d'amplification en chaîne : PCR.....	100
IV.2.4 Analyse des fragments amplifiés.....	101
V Etude de l'expression des gènes au niveau de la protéine.....	102
V.1 Immunocytochimie.....	102
V.2 Analyse en western-blot.....	103
V.2.1 Extraction des protéines totales.....	103
V.2.2 Electrophorèse et Electrotransfert.....	103
V.2.3 Immunorévélation.....	104
VI Etude de l'activité transcriptionnelle de NF-κB et d'AP-1.....	105
VI.1 Analyse de leur fixation sur l'ADN par retard sur gel.....	105
VI.1.1 Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires.....	105
VI.1.2 Marquage des sondes.....	105
VI.1.3 Interaction protéine-ADN et analyse du complexe sur gel d'acrylamide.....	106
VI.2 Identification des sous-unités protéiques du complexe retardé : « super retard sur gel ».....	107
VI.3 Analyse de l'activité transcriptionnelle par une technique de "gene reporter".....	107
VI.3.1 Transformation de bactéries compétentes et préparation d'ADN plasmidique.....	107
VI.3.2 Transfection transitoire.....	108
VI.3.3 Dosage des activités luciférase et β -galactosidase.....	109
VII Induction d'une surexpression de PPARγ fonctionnel ou muté dans des chondrocytes de rat par transfection transitoire.....	109
VII.1 Transformation de bactéries compétentes et préparation d'ADN plasmidique.....	109
VII.2 Transfection transitoire.....	110
VII.3 Evaluation de la surexpression et de l'activité de PPAR γ par RT-PCR semi-quantitative et Western-blot.....	110

VII.4 Evaluation des effets de la surexpression de PPAR γ sur certains paramètres de l'inflammation par PCR quantitative et Western-blot	110
VII.5 Effet d'une surexpression de PPAR γ sur l'activité de NF- κ B	111
VIII Statistiques	112
RESULTATS	113
<i>I Effets de ligands spécifiques des récepteurs PPAR et ROR sur l'action de l'IL-1β dans des chondrocytes humains.....</i>	<i>114</i>
I.1 Mise en évidence de l'expression des récepteurs dans les cultures de chondrocytes	114
I.1.1 Mise en évidence de PPAR α , PPAR γ et ROR α dans des culture de chondrocytes humains issus de cartilages arthrosiques.....	114
I.1.2 Modulation de l'expression des récepteurs nucléaires par l'IL-1 β	115
I.2 Effets des ligands sur certains paramètres de l'inflammation	117
I.2.1 Effets sur l'expression de gènes précoces de l'inflammation	117
I.2.2 Effets des ligands de PPAR γ sur la production de nitrites et la synthèse des protéoglycanes.....	119
I.3 Interaction des ligands de PPAR γ avec la voie de signalisation de l'IL-1 β	120
I.3.1 Effets des ligands de PPAR γ sur la translocation des sous-unités de NF- κ B et d'AP-1 dans le noyau	120
I.3.2 Effets des ligands de PPAR γ sur la fixation de NF- κ B et d'AP-1 sur l'ADN	121
<i>II Etude de l'implication de PPARγ dans les effets anti-inflammatoires de la 15d-PGJ₂ dans les chondrocytes de rat.....</i>	<i>124</i>
II.1 Mise au point de la technique de transfection transitoire dans des cultures de chondrocytes de rat	124
II.1.1 Détermination des conditions de transfection et évaluation du rendement.....	124
II.1.2 Evaluation de la surexpression et de la fonctionnalité de PPAR γ	125
II.2 Effet d'une surexpression de PPAR γ sur certains paramètres de l'inflammation	127
II.2.1 Mesure de l'expression de l'ARNm de COX-2 et d'iNOS.....	127
II.2.2 Mesure de la production de nitrites et de prostaglandine E ₂	128
II.3 Effets d'une surexpression d'une forme mutée de PPAR γ dans des chondrocytes de rat traités à l'IL-1 β	130
II.4 Effet d'une surexpression de PPAR γ sur la voie de signalisation NF- κ B.....	131
II.4.1 Effet sur la translocation de p65 dans le noyau et sur l'activité de NF- κ B.....	131
II.4.2 Etude de l'activité du promoteur de NF- κ B	132
II.5 Recherche des cibles intracellulaires de la 15d-PGJ ₂	133
II.5.1 Effets de la 15d-PGJ ₂ sur la phosphorylation et la dégradation de la sous-unité inhibitrice I κ B α	133
II.5.2 Effet sur la phosphorylation des I κ B Kinases (IKK).....	135
<i>III Effets de ligands spécifiques de PPARs sur l'action du LPS sur des synoviocytes de type B de rat....</i>	<i>136</i>
III.1 Mise en évidence des récepteurs	136
III.2 Effets des ligands sur certains paramètres de l'inflammation.....	138
III.2.1 Effets sur l'expression de gènes précoces de l'inflammation.....	138
III.2.2 Effets sur la production de nitrites et d'IL-1 β	139
III.3 Interaction des ligands avec la voie de signalisation du LPS : Etude de la fixation de NF- κ B et d'AP-1 sur l'ADN	140
DISCUSSION	143
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
ANNEXES.....	184



Introduction

Les maladies rhumatismales, dégénératives ou inflammatoires, entraînent des handicaps mécaniques et douloureux, qui sont principalement liés à la perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle du cartilage. Ces pathologies peuvent toucher des populations jeunes (arthrite) ou plus âgées (arthrose). Ces arthropathies constituent une véritable préoccupation de santé publique dans les pays occidentaux du fait du vieillissement global de la population. A ce jour, seules des thérapeutiques symptomatiques existent mais elles sont sans effet réel sur les processus biologiques, qui conduisent à la chondrodestruction.

Au cours des pathologies inflammatoires et dégénératives, il existe un déséquilibre progressif entre les processus de synthèse des constituants matriciels et de leur dégradation jusqu'alors en équilibre pour assurer le maintien de l'intégrité du tissu cartilagineux. Ce déséquilibre est principalement dû à l'action de cytokines pro-inflammatoires, dont l'interleukine-1 (IL-1). Dans le cadre de notre stratégie visant à identifier de nouvelles cibles susceptibles de moduler à la fois la production et les effets de l'IL-1 β , nous nous sommes intéressés à trois facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires : PPAR α (« peroxisome proliferator-activated receptor alpha »), PPAR γ (« peroxisome proliferator-activated receptor gamma ») et ROR α (« retinoic acid-related orphan receptor alpha »).

De nombreux travaux effectués sur différents modèles cellulaires ou animaux indiquent qu'il est possible, par l'activation de ces récepteurs de réduire l'inflammation ou l'activation cellulaire. Néanmoins, il semblerait que leur implication soit très dépendante à la fois du type cellulaire ou du tissu, de la nature de l'agent de stimulation et de l'espèce. Ainsi, aucun lien avec le cartilage n'avait été établi.

Notre travail de thèse a donc pour objectif d'étudier la potentialité de ligands spécifiques de ces récepteurs à moduler les effets de l'IL-1 ou du LPS sur le cartilage. Au cours de ce travail, nous avons plus particulièrement cherché à mieux comprendre le mécanisme d'action de la 15d-PGJ₂, ligand naturel de PPAR γ .

Ce manuscrit rassemble, dans une première partie, une synthèse bibliographique concernant le cartilage articulaire, l'IL-1 ainsi que le rôle de ces facteurs de transcription et de leurs ligands. Après avoir présenté notre objectif et notre stratégie d'étude, nous développerons et discuterons le travail expérimental dans une troisième partie. Enfin, les conclusions et les perspectives de ce travail seront présentées dans une quatrième partie.

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : L'ARTICULATION

Les articulations synoviales sont les articulations des membres qui ont évolué pour permettre les mouvements. La capsule articulaire délimite l'articulation. Elle est tapissée sur sa face interne par la membrane synoviale. Les articulations sont composées de plusieurs tissus hautement spécialisés. Les extrémités osseuses sont recouvertes de cartilage hyalin (Figure 1). Une lame de cartilage calcifié permet de faire la jonction entre le cartilage articulaire et le tissu osseux spongieux. Du fait de la grande capacité de déformation liée à sa rigidité et à son élasticité, le cartilage articulaire permet de résister à la compression, d'amortir et de répartir les pressions exercées, et avec le liquide synovial, il assure un minimum de frictions entre les surfaces articulaires.

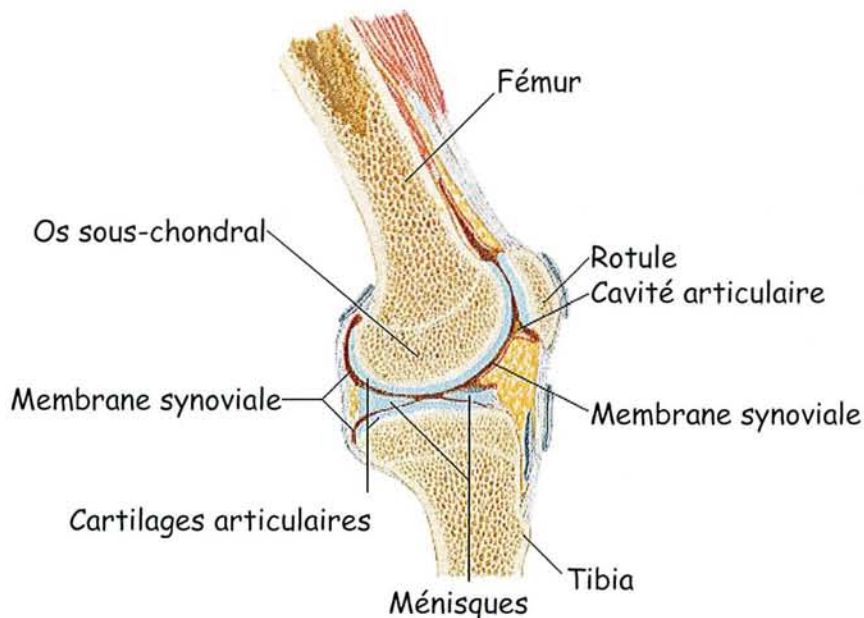


Figure 1 : Schéma de l'articulation du genou chez l'homme (coupe sagittale, d'après www.phys.virginia.edu/classes/304/pix.htm).

Les articulations synoviales sont les articulations des membres qui ont évolué pour permettre les mouvements. L'articulation synoviale du genou est constituée de différents tissus dont l'os sous-chondral, le cartilage articulaire et la membrane synoviale.

I Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé, de consistance dure, mais non minéralisé contrairement au tissu osseux. Le tissu cartilagineux est formé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, répartis dans une matrice extracellulaire abondante et complexe. Les

chondrocytes sont responsables de la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire (MEC).

On distingue trois types de cartilage qui diffèrent, entre autre, par la composition en fibres de collagène de leur matrice extracellulaire :

- le *cartilage fibreux ou fibrocartilage* possède les propriétés architecturales du tissu conjonctif fibreux et du cartilage hyalin. Il contient d'épais faisceaux de fibres de collagène de type I ou II. Ceux-ci sont orientés le long des lignes de force, définies par les contraintes mécaniques que subit le cartilage. Le fibrocartilage est très peu représenté dans l'organisme, il est retrouvé notamment dans les disques intervertébraux, la symphyse pubienne et les ménisques.
- le *cartilage élastique* se distingue par une densité cellulaire beaucoup plus importante que les autres types de cartilage et par la présence de nombreuses fibres élastiques et quelques fibres de collagène. Ces fibres élastiques sont disposées en réseau tridimensionnel permettant leur déformation et la restitution de leur forme initiale. Le cartilage élastique est présent dans le pavillon de l'oreille, la paroi de la trompe d'Eustache, l'épiglotte ainsi que dans le pavillon du larynx (associé au cartilage hyalin).
- le *cartilage hyalin* est constitué de microfibrilles de collagène, peu abondantes et de petit calibre, disposées en un réseau à mailles larges. Il possède également une densité chondrocytaire faible. Le cartilage hyalin est le plus répandu dans l'organisme et il est présent dans les ébauches osseuses du squelette fœtal avant l'ossification, les cartilages nasaux, trachéaux, bronchiques, certains cartilages laryngés et le cartilage articulaire. C'est un tissu hautement spécifique non innervé et non vascularisé. Il est localisé sélectivement au niveau des articulations synoviales, c'est-à-dire des articulations des membres qui ont évolué pour permettre les mouvements. Le cartilage hyalin représente d'une part la surface de contact entre les deux os et d'autre part, l'interface avec le liquide synovial. Ainsi, le cartilage articulaire permet, avec le liquide synovial, le glissement des surfaces osseuses entre elles.

I.1 Histologie / organisation du cartilage hyalin

Le cartilage articulaire est un tissu d'aspect brillant à la lumière et homogène, qui apparaît de couleur blanche ou jaunâtre. Son épaisseur varie d'une articulation à une autre, mais également d'une zone à une autre dans une même articulation : il est plus épais dans les zones où les contraintes mécaniques sont les plus importantes (zones portantes).

D'un point de vue histologique, le cartilage peut être divisé en quatre zones qui vont respectivement de la surface articulaire vers l'os sous-chondral : la zone tangentielle ou superficielle (zone I), la zone intermédiaire ou transitionnelle (zone II), la zone radiale (zone III) et la zone calcifiée (zone IV). Les chondrocytes des différentes zones présentent des activités métaboliques variables (Aydelotte M.B., 1988a et 1988b). Cette subdivision du cartilage est basée sur des différences structurales bien définies comme la densité et l'orientation cellulaire, la nature, le contenu et la distribution en protéoglycanes, l'organisation du réseau fibrillaire de collagène, qui décrit des arcades à travers les différentes couches du cartilage, appelées arcades de Benninghoff (Benninghof A., 1925). Ces arcades permettent d'amarrer le cartilage articulaire à la lame osseuse sous-chondrale.

L'épaisseur des différentes zones est variable en fonction de l'articulation et de l'espèce animale (Hunziker E.B., 1992). Ainsi, chez l'homme, les quatre zones du cartilage représentent une épaisseur totale de 2-3 mm alors que chez le lapin ou le rat, il faut diviser cette valeur par 10 (200-300 μm). L'organisation des quatre zones chez l'homme est la suivante (Figure 2) :

- La **zone superficielle ou tangentielle** est en contact avec le liquide synovial et constitue la surface de glissement dans la cavité articulaire. Elle représente 5 à 10% de la hauteur totale du cartilage et est la plus exposée aux contraintes mécaniques. Les chondrocytes sont deux à trois fois plus nombreux que dans les autres zones et synthétisent une grande quantité de collagène, notamment de type I et III et une plus faible quantité de protéoglycanes que les chondrocytes des autres zones. Les cellules apparaissent aplaties et sont généralement isolées. Les fibres de collagène sont orientées parallèlement à la surface articulaire contribuant ainsi de manière importante aux propriétés mécaniques du tissu en apportant une plus grande résistance aux tensions et aux pressions que dans les zones profondes.

- La **zone intermédiaire ou transitionnelle** représente 40 à 45% de la hauteur totale du cartilage. C'est la zone la plus riche en protéoglycanes. Elle est constituée de cellules arrondies, qui sont souvent groupées par deux ou trois, entourées d'une matrice abondante. Les chondrocytes sont également plus actifs que dans la zone superficielle, comme le montre la taille de leur appareil de Golgi et de leur réticulum endoplasmique. Le réseau de collagène est constitué de fibres de type II, IX et XI. Ce réseau apparaît non orienté et moins dense que celui de la zone supérieure.
- La **zone radiale** représente également 40 à 45% de l'épaisseur totale du cartilage. Les chondrocytes présents dans cette zone sont arrondis, plus volumineux et groupés pour former des colonnes, qui s'alignent de façon radiale par rapport au réseau de collagène orienté perpendiculairement à la surface. Comme dans la zone intermédiaire, le réseau de collagène est constitué de fibres de type II, IX et XI. Cette zone contient la plus faible quantité de cellules. La densité cellulaire augmente près de la zone calcifiée (Zone IV).
- La **zone calcifiée** est la zone de contact avec la plaque osseuse sous-chondrale. C'est la zone la plus profonde du cartilage dont elle représente 5 à 10% de l'épaisseur totale. Elle correspond à la zone d'ancrage des fibres de collagène dans l'os et à une zone où le cartilage est en voie de calcification. Les chondrocytes présents dans cette couche sont hypertrophiques et emprisonnés dans des logettes non calcifiées. Cette couche de cartilage est riche en fibres de collagène de type X et en ions calciques. En revanche, elle est quasiment dépourvue de protéoglycanes. La zone calcifiée est séparée de la zone profonde par une couche protéique basophile nommée « tide-mark » (Fawns H.T., 1953) visible en histologie. Cette zone correspond à un réseau extrêmement dense de fibres de collagène. Elle est également caractérisée par la présence de cristaux d'hydroxyapatite et d'amas calciques au contact des fibres de collagène. Des petits canaux permettant le passage des nutriments depuis l'os sous-chondral vers la zone profonde non-calcifiée sont également présents dans cette zone (Redler I., 1975).

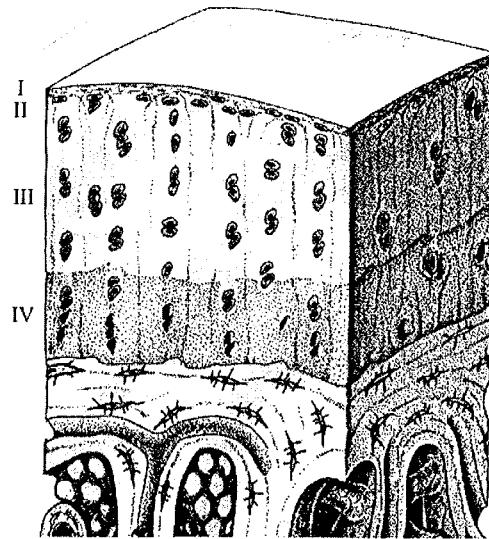


Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches du cartilage (D'après www.ukcte.org/images/cartilage.jpg).

Le cartilage est divisé en quatre zones allant respectivement de la surface articulaire vers l'os sous-chondral : zone I : zone superficielle, zone II : zone intermédiaire, zone III : zone radiale et zone IV : zone calcifiée. L'épaisseur des différentes zones est variable en fonction de l'articulation et de l'espèce animale. Les 4 zones représentent une épaisseur totale de 2-3 mm chez l'homme et de 200-300 μm chez le lapin ou le rat.

I.2 Composition du cartilage hyalin

I.2.1 Les constituants de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est constituée principalement d'eau (65-80%), de collagènes (10-30% du poids humide du cartilage), de protéoglycanes (5-10% du poids humide du cartilage), de hyaluronate, et en quantité moins importante, de protéines non-collagéniques et de lipides (Kuettner K.E., 1991). La composition, l'organisation ainsi que les interactions des macromolécules de la matrice extracellulaire confèrent au cartilage ses propriétés biomécaniques. On distingue une compartimentation de la matrice extracellulaire en région péricellulaire, territoriale et inter-territoriale. La matrice péricellulaire est une zone riche en protéoglycanes et en acide hyaluronique et pauvre en fibre de collagène. Cette matrice est entourée par la matrice territoriale, riche en fibres de collagène. La matrice inter-territoriale, riche en fibres de collagène et en protéoglycanes, représente la matrice la plus éloignée des chondrocytes (Hunziker E.B., 1992).

I.2.1.1 L'eau

L'*eau*, principal constituant de la MEC, représente environ 75% du poids de celle-ci. Les protéoglycanes, grâce à leur pouvoir hydrophile, retiennent l'eau au sein de la MEC conférant ainsi les propriétés élastiques du cartilage. L'eau libre permet le transport des substances nutritives et des produits de dégradation métabolique par compression et décompression résultant des mouvements du corps.

I.2.1.2 Les protéoglycanes

Les *Protéoglycanes (PG)* sont ubiquitaires dans l'organisme et sont très abondants dans la MEC des tissus conjonctifs, plus spécialement dans le cartilage. Les PG sont des macromolécules complexes constituées d'une protéine porteuse ou « core protein » sur laquelle est greffée au moins une chaîne de glycosaminoglycanes (GAG) (Muir H., 1978). Les GAG sont liés à un résidu sérine de la protéine porteuse par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide composé d'un acide glucuronique, de deux galactoses et d'un xylose. Les chaînes de GAG sont constituées de répétitions disaccharidiques possédant des groupements sulfatés et/ou carboxyliques. La longueur de la chaîne de GAG est variable. La structure des GAG va déterminer leurs propriétés physiques. Le disaccharide de base se compose généralement d'un acide uronique (par exemple, acide glucuronique) et d'un sucre aminé (par exemple, la N-acétylglucosamine ou la galactosamine).

Cinq types de GAG sont présents dans le cartilage en concentration variable en fonction de la zone du cartilage considérée :

Les *chondroïtines sulfates* sont constitués de 25 à 30 unités disaccharidiques à base d'acide glucuronique et de N-acétylgalactosamine. Le groupement sulfate de chaque disaccharide est porté par le carbone 4 ou 6 du résidu galactose, ce qui leur confère l'appellation de chondroïtine 4-sulfate ou chondroïtine 6-sulfates. En général, les chondroïtines 4- et 6-sulfate coexistent dans les molécules de PG avec un ratio variable selon l'âge, l'origine tissulaire et l'espèce.

Les *kératanes sulfates* sont formés par une répétition de disaccharides composés de N-acétylglucosamine et d'un résidu galactose. Le groupement sulfate est porté par le carbone 6 des résidus galactose ou glucosamine.

Les *dermatanes sulfates* sont constitués d'un enchaînement de disaccharides composés de N-acétylgalactosamine et d'un acide D-glucuronique ou iduronique.

Les *héparanes sulfates* sont constitués par une répétition de disaccharides composés de D-glucosamine et d'un acide D-glucuronique ou iduronique.

L'*acide hyaluronique* est le seul GAG synthétisé dans la membrane cytoplasmique, qui ne soit pas sulfaté et pas lié à une protéine porteuse. Il est formé d'unités disaccharidiques composées d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine.

Les PG présents dans le cartilage articulaire sont classés en deux grandes catégories :

- Les PG de haut poids moléculaire, qui forment de larges agrégats tels que l'**agrécan**.
- Les PG de faible poids moléculaire tels que la **décorine**, le **biglycane** et la **fibromoduline**.

L'**agrécan** est le PG prédominant dans le cartilage puisqu'il représente environ 90% de la masse des PG dans le tissu. L'agrécan est composé d'une protéine porteuse de 210 kDa sur laquelle se fixe de manière covalente, via des résidus sérine ou asparagine, plus d'une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate, 20 à 50 chaînes de kératane sulfate, et quelques oligosaccharides liés au niveau d'un atome d'azote ou d'oxygène. Plusieurs centaines d'agrécanes peuvent se lier de façon non covalente, par l'intermédiaire de protéines de liaison, à une chaîne d'acide hyaluronique. Ils forment alors des agrégats de très haut poids moléculaire (Hardingam T.E. et Fosang A.J., 1995, Hascall V.C. et Heinegard D., 1974, Muir H., 1978). Ces larges agrégats hydrodynamiques sont maintenus dans le réseau de fibres de collagène (Figure 3).

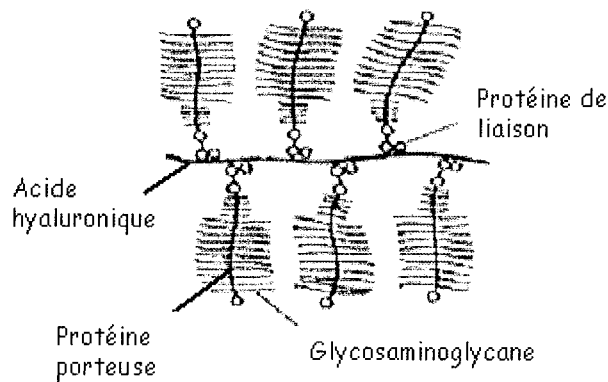


Figure 3 : Structure schématique d'un protéoglycane de haut poids moléculaire tel que l'agrécane (D'après Muir H., 1995).

L'agrécane est constitué d'une protéine porteuse de 210 kDa, sur laquelle se fixe plus d'une centaine de chaînes glycosaminoglycaniques (chondroïtine et kératane sulfate) et quelques oligosaccharides. Des molécules d'agrécane peuvent se lier par l'intermédiaire de protéine de liaison à une chaîne d'acide hyaluronique formant ainsi des PG de haut poids moléculaire.

La protéine porteuse de l'agrécane comporte plusieurs domaines globulaires et inter-globulaires. La partie N-terminale comporte deux domaines globulaires, G1 et G2, séparés par un domaine inter-globulaire, qui constitue un site d'hydrolyse pour les protéases lors de la dégradation de la matrice extracellulaire (Sandy J.D., 1991). Le domaine G1 établit des relations étroites avec la protéine de liaison qui stabilise l'agrégat. Le troisième domaine globulaire est situé dans la région C-terminale et encadre, avec le domaine G2, une région riche en glycosaminoglycanes (Hardigan T.E. et Fosang A.J., 1992 et 1995) (Figure 4).

Le cartilage contient également des PG non agrégés qui ressemblent à l'agrécane en structure et en composition. Ces molécules représentent moins de 10% de la masse des PG et pourraient correspondre à des agrégats dégradés (Buckwalter J.A., 1994).

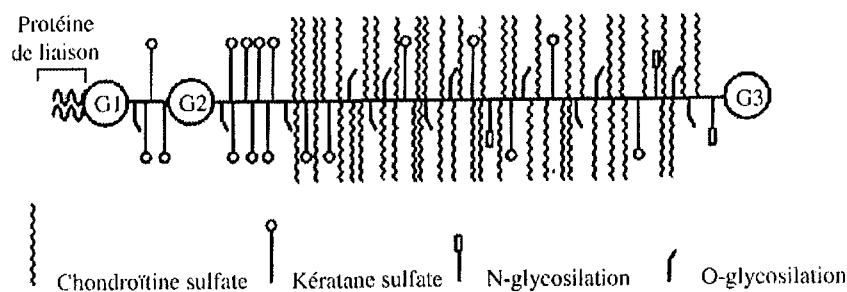


Figure 4 : Structure d'une molécule d'agrécane (D'après Muir H., 1995).

L'agrécane est composé d'une protéine porteuse de 210 kDa, de plus d'une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate, de 20 à 50 chaînes de kératane sulfate et de quelques oligosaccharides (N- et O-glycosylation). La protéine porteuse est constituée de 3 domaines globulaires (G1, G2, G3). Le domaine interglobulaire G1-G2 constitue un site d'hydrolyse pour les métalloprotéases de la MEC tandis que celui entre G2-G3 est une région riche en GAG.

Les **PG de faible poids moléculaire** représentent environ 3% du tissu cartilagineux (Huber M., 2000). Ils sont constitués d'une protéine porteuse riche en résidus leucine sur laquelle viennent se fixer des chaînes de glycosaminoglycanes et quelques chaînes oligosaccharidiques. Parmi les PG de faible poids moléculaire, on retrouve la **décorine**, le **biglycane** et la **fibromoduline**.

La **décorine** contient une chaîne de chondroïtine ou dermatane sulfate sur son extrémité N-terminale. Elle est localisée à la surface des fibres de collagène de type I et II dont elle inhibe la fibrillogénèse et réduit ainsi le diamètre de ces fibres (Vogel K.G., 1984). La décorine possède aussi un site de liaison spécifique avec un facteur de croissance : le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) (Yamaguchi Y., 1990) lui permettant ainsi de contrôler le métabolisme et la prolifération chondrocytaires. Elle joue également un rôle dans l'organisation de la MEC (Pulkkinen L., 1990).

La **fibromoduline** est composée d'au moins une chaîne de kératane sulfate. Elle est localisée également à la surface des fibres de collagène. Comme la décorine, la fibromoduline contrôle le diamètre des fibres de collagène en inhibant la fibrillogénèse (Plaas A.F., 1992).

Le **biglycane** contient deux chaînes de dermatane sulfate. Il est localisé dans les régions péricellulaires et à la surface des chondrocytes. Sa fonction reste encore méconnue. Contrairement à la décorine et à la fibromoduline, le biglycane n'est pas associé aux fibres de collagène.

En résumé, ces PG de faible poids moléculaire sont liés aux autres macromolécules de la matrice extracellulaire et peuvent intervenir ainsi dans la régulation du métabolisme des chondrocytes (Svensson L., 2001). Ils modulent également la taille du réseau des fibres de collagène et les interactions entre les différents types de collagène.

Le rôle des PG est de retenir l'eau dans le cartilage, conférant ainsi l'élasticité nécessaire aux propriétés mécaniques du tissu. La résistance aux forces de compression du cartilage est liée directement au contenu en PG. En effet, les PG possèdent de nombreuses charges négatives portées par les chaînes de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate. Ces charges négatives attirent les molécules d'eau chargées positivement et confèrent ainsi au cartilage ses propriétés de déformation réversible. L'eau attirée dans le tissu crée une forte pression osmotique et augmente le volume des fibres de collagène (Maroudas A., 1986). Lors d'une charge de compression, l'eau est expulsée du tissu et un équilibre s'établit entre la charge appliquée et la pression osmotique. Une fois la charge supprimée, la réhydratation des PG est

contrebalancée par la résistance du réseau fibrillaire de collagène. En effet, le réseau de fibres de collagène empêche l'hydrophilie des PG d'être satisfaite de 50% au moins.

I.2.1.3 Les collagènes

Les collagènes forment les éléments fibreux et sont les structures moléculaires les plus ubiquitaires présentes dans les espaces extracellulaires de la plupart des tissus conjonctifs. Dans le cartilage articulaire, les collagènes sont les éléments structuraux essentiels aux propriétés biochimiques du tissu. Ils représentent environ 10 à 20% du poids humide du cartilage. Les principaux collagènes rencontrés dans le cartilage articulaire sont les collagènes de type II, qui représente environ 90% du collagène total, ainsi que les types IX, X, XI et VI (Huber M., 2000). Parmi ces collagènes, certains sont fibrillaires comme les collagènes de type II et XI et d'autres sont non fibrillaires (les collagènes de type IX, X et VI).

Le collagène est synthétisé sous forme d'une molécule précurseur, le procollagène. Il est constitué en grande partie par une triple hélice de trois chaînes α polypeptidiques de procollagène, qui s'assemblent spontanément et sont stabilisées par des liaisons hydrogène. Les extrémités N- et C-terminales non hélicoïdales sont clivées par des protéases après la sécrétion dans l'espace extracellulaire. Les chaînes polypeptidiques de procollagène se caractérisent par la répétition d'un triplet d'acides aminés ayant la composition Gly-Xaa-Yaa. La présence de proline et d'hydroxyproline respectivement dans les positions Xaa et Yaa est importante pour la stabilité de l'hélice et la flexibilité des diverses zones le long de la molécule paraît dépendre de la distribution de ces acides aminés qui occupent approximativement 30% de ces positions (Cremer M.A., 1998). Les collagènes non fibrillaires, quant à eux, sont constitués de petits domaines hélicoïdaux interrompus par des séquences non collagéniques, nommées FACIT pour « fibril associated collagens with interrupted triple helices » (Gordon M.K., 1991). Ces domaines permettent de lier les fibres de collagène de type II avec les collagènes non fibrillaires et d'autres composants matriciels (Bruckner P., 1985, Eyre D.R., 1987).

Diverses fonctions sont assurées par les différents types de collagènes présents dans le cartilage articulaire :

- Le *collagène de type II* représente 90% des collagènes présents dans le cartilage articulaire adulte. En effet, dans le cartilage adulte, le collagène de type II forme des arcades composées de fibres plus épaisses dans les couches profondes du tissu et des fibrilles plus fines arrangées horizontalement en surface (Aydelote M.B. et

Kuettner K.E., 1988, Clark J.M, 1990). Ce type de collagène forme un réseau dense dont les mailles emprisonnent les agrégats de protéoglycanes limitant ainsi l'entrée d'eau dans le tissu. Le réseau de fibres de collagène de type II est responsable de la résistance à la traction et à la compression du cartilage ainsi que du maintien de la forme et du volume tissulaires. Cette résistance est renforcée par des liaisons intermoléculaires covalentes, appelées « cross-link », entre les fibres de collagènes de type II (Eyre D.R., 1988). Les résidus lysine ou hydroxylysine sont les principaux résidus participant aux « cross-link » et permettent l'union de 2 unités de collagène pour former la fibrille puis la fibre de collagène. Ces liens intermoléculaires sont formés lors de réactions enzymatiques, mettant en jeu notamment une lysyl-oxydase, durant l'assemblage des fibres de collagène.

- Le *collagène de type IX* représente environ 1% des protéines collagéniques du cartilage articulaire adulte. Il se lie de façon covalente à la surface des fibres de collagènes de type II avec une orientation parallèle limitant ainsi leur croissance latérale (Eyre D.R., 1987). Sa présence à la surface des fibres de collagène de type II pourrait être un facteur important de régulation de l'agrégation fibrillaire, contrôlant le diamètre des fibres (Mayne R., 1989). Le collagène de type IX est localisé majoritairement dans la matrice péricellulaire, alors qu'il n'est pas détecté dans la matrice inter-territoriale.
- Le *collagène de type X* est synthétisé, dans le cartilage articulaire, par les chondrocytes hypertrophiques de la zone calcifiée à un taux relativement constant. Il joue un rôle important dans le développement du cartilage de croissance et dans la calcification du cartilage (Eyre D.R., 1992, Mayne R., 1993).
- Le *collagène de type XI* est présent à l'intérieur des fibres de collagène de type II, où il module le diamètre de ses fibrilles.
- Le *collagène de type VI* est présent en faible quantité dans le cartilage (Eyre D.R., 1991, Mayne R., 1989). Il est localisé dans la matrice capsulaire entourant les chondrocytes (Poole C.A., 1988). Il se lie aux autres collagènes et stabilise les interactions entre les collagènes et les PG.

I.2.1.4 Les protéines non collagéniques

Le cartilage articulaire est composé majoritairement d'eau, de PG et de collagène. Il renferme également des glycoprotéines qui ne sont ni collagéniques ni protéoglycaniques. Ces

protéines appartiennent à la famille des protéines d'adhésion et jouent un rôle essentiel dans les interactions entre les chondrocytes et la matrice (Okimura A., 1997) et donc dans les phénomènes d'adhésion et de migration des chondrocytes (Figure 5). Dans un cartilage normal, le taux de synthèse de ces protéines est relativement faible mais il peut augmenter dans diverses situations pathologiques. Ces protéines non collagéniques possèdent des propriétés distinctes (Heinegard D. et Oldberg A., 1989 et 1992, Peyron J. et Stanescu V., 1994).

- *l'anchorine CII* est présente à la surface des chondrocytes et agit comme un mécanorécepteur (Mollenhauer J., 1984). En effet, sa liaison au collagène de type II lui permet de transmettre les variations de compression du cartilage au chondrocyte.
- *La protéine de liaison* stabilise la fixation de l'agrécan sur l'acide hyaluronique.
- *La chondrocalcine* se fixe aux cristaux d'hydroxyapatite et intervient dans le processus de minéralisation du cartilage.
- *La thrombospondine et la fibronectine* possèdent un site de fixation aux intégrines et jouent donc un rôle important dans les relations entre les cellules et la matrice.
- *La COMP (cartilage oligo matrix protein)* constitue un marqueur du renouvellement et de la dégénérescence de la matrice extracellulaire.

On trouve également dans le cartilage des protéines telles que la tétranectine et la ténascine (Buckwalter J.A., 1998, Huber M., 2000).

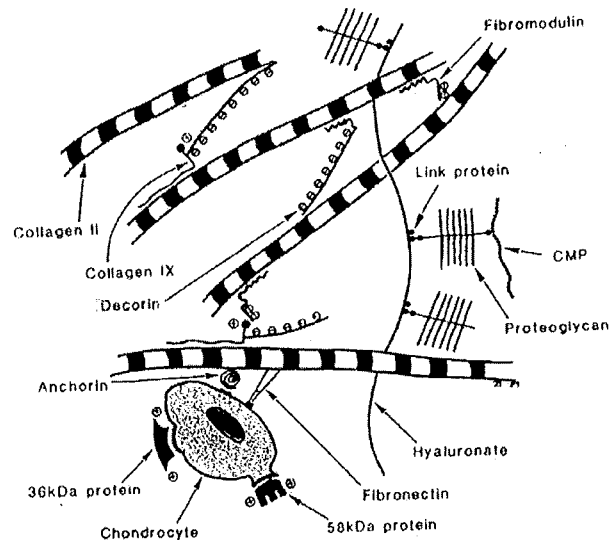


Figure 5 : Schéma illustrant les interactions possibles entre les chondrocytes et les constituants de la MEC et entre les constituants eux-mêmes (D'après Mallein-Gerin F. & van der Rest M., 1996).

Les constituants de la MEC et leurs interactions sont responsables des propriétés du cartilage. Ainsi, le réseau de collagène permet la résistance à la traction et à la compression du cartilage ainsi que le maintien de la forme et du volume tissulaires. L'élasticité du cartilage est directement liée au contenu en PG. De plus, les protéines non collagéniques jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de migration et d'adhésion des chondrocytes.

I.2.2 Les chondrocytes

Les chondrocytes, seule population cellulaire présente dans le cartilage, sont des cellules hautement différenciées et spécialisées. Ces cellules occupent environ 5% du volume du tissu dans le cartilage articulaire adulte humain (Stockwell R.A., 1967) et leur densité décroît depuis la périphérie jusqu'au centre du cartilage. Elles jouent un rôle important dans l'organisation du tissu car elles régulent la synthèse et la dégradation des éléments de la matrice extracellulaire. Ainsi les chondrocytes sont responsables de l'homéostasie du cartilage.

Ces cellules se divisent par mitose lorsqu'elles sont mises en culture, dans certaines conditions pathologiques mais également dans le cartilage immature, c'est-à-dire pendant la croissance chez l'enfant. Le pourcentage de cellules en mitose diminue dans le cartilage mature. D'autre part, l'activité métabolique devient globalement faible dans le cartilage mature alors qu'elle est importante dans le cartilage immature. De plus, l'activité métabolique est modulée par les modifications mécaniques et biochimiques de la matrice. Elle est donc liée à une activité physique ou à un état pathologique.

I.2.2.1 Morphologie cellulaire

Les chondrocytes sont des cellules ovoïdes ou sphériques de 10 à 30 µm de diamètre suivant le type de cartilage (Stockwell R.A. et Meachin G., 1973). Leur noyau est central, volumineux et sphérique et renferme des nucléoles. Les organites prédominants des chondrocytes sont le réticulum endoplasmique granuleux et l'appareil de Golgi, qui sont tous les deux impliqués dans la synthèse et la sécrétion du collagène et des PG (Horwitz A.L. et Dorfman A., 1968, Revell J.P. et Hay E.D., 1963). On retrouve également des lysosomes qui jouent un rôle dans le renouvellement des composants de la matrice extracellulaire (Dingle J.T., 1975). Les mitochondries sont peu nombreuses, de petite taille, ce qui est en accord avec la faible activité respiratoire des chondrocytes (Stockwell R.A., 1978). On trouve également dans les chondrocytes des vacuoles de glycogène, de lipide ainsi que des fins filaments intracytoplasmiques. La membrane plasmique est irrégulière, formée de nombreuses microvacuoles et de nombreux prolongements lui permettant de s'ancrer à la matrice péricellulaire.

I.2.2.2 Le chondron

Les chondrocytes sont des cellules d'origine mésenchymateuse, enfermées dans des cavités, les chondroplastes. Les chondrocytes sont entourés d'une matrice péricellulaire spécialisée, riche en PG et d'une capsule péricellulaire contenant des fibres de collagène et des petits agrégats de PG (Poole C.A., 1984, 1985 et 1987). L'ensemble « chondrocytes et matrice péricellulaire » représente une unité appelée « chondron » par Benninghoff en 1925. Le chondron peut être composé d'une ou plusieurs cellules. Il constitue une unité fonctionnelle et métabolique du cartilage hyalin et serait donc la base de l'homéostasie du cartilage (Poole C.A., 1992). La matrice péricellulaire protège le chondrocyte des chocs mécaniques.

I.2.2.3 Nutrition des chondrocytes

L'absence de vaisseaux lymphatiques et vasculaires dans le cartilage nécessite l'apport des nutriments et l'élimination des déchets par diffusion à travers la MEC. L'apport nutritionnel des chondrocytes est assuré par les microvaisseaux synoviaux. Ainsi, l'alternance de compression et de décompression lors des mouvements articulaires permet la circulation du liquide synovial au sein du cartilage et assure l'apport des nutriments vers les chondrocytes

et l'élimination des déchets vers la circulation sanguine. Le système de nutrition des chondrocytes est un système d'imbibition.

I.2.2.4 Le métabolisme chondrocytaire

Les chondrocytes produisent les éléments de la matrice (PG, collagènes, lipides, protéines non collagéniques) pendant la croissance puis assurent leur renouvellement malgré une densité cellulaire faible. Il existe donc une balance équilibrée permettant une synthèse et une dégradation continue de ces constituants matriciels, c'est ce qu'on appelle l'homéostasie du cartilage. Du fait d'une tension d'oxygène relativement faible qui diminue de la surface vers les couches profondes du cartilage, les chondrocytes ont un métabolisme principalement anaérobie (Aydelotte M.B., 1998). Ils utilisent essentiellement le glucose, comme substrat énergétique et privilégient la voie de la glycolyse anaérobie. L'activité de synthèse des chondrocytes de la couche superficielle est plus forte que celle observée dans les zones profondes du cartilage. De plus, en surface, où la teneur en oxygène est plus faible, les chondrocytes auraient un métabolisme énergétique mixte faisant intervenir à la fois la voie de la glycolyse anaérobie et celle de la phosphorylation oxydative.

Le taux de renouvellement des PG est relativement rapide (1/2 vie de 500 jours environ) comparé à celui des collagènes (1/2 vie supérieure à 100 ans) qui est très lent (Maroudas A., 1979). Les chondrocytes assurent le renouvellement des éléments de la matrice en synthétisant les facteurs de croissance et les cytokines nécessaires ainsi que les enzymes protéolytiques qui vont dégrader certains constituants du cartilage. Il s'agit des métalloprotéases (Shlopov B.V., 1997), des hyaluronidases (Flannery C.R., 1998) et des agrécanases. Les interactions entre les éléments de la MEC et les chondrocytes jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme chondrocytaire. En effet, en fonction des modifications physico-chimiques de l'environnement cellulaire (teneur en ions, pression osmotique, pH, facteurs solubles) et des contraintes mécaniques exercées sur le cartilage, les chondrocytes adaptent leur métabolisme (Hing W.A., 2002, Lotz M., 1995). Ces changements se traduisent par une altération de la composition biochimique de la MEC et par conséquent, des réponses cellulaires (Guilak F., 1999, Millward-Sadler S.J., 2000, Poole C.A., 1991). Dans certaines conditions pathologiques, les cellules vont synthétiser une quantité excessive de cytokines pro-inflammatoires, ce qui peut aboutir à une perte progressive de l'homéostasie. Différents types de récepteurs, tels que le CD-44 (Heinegard D., 1992), l'anchoring II (récepteur du collagène de type II) et les intégrines (Loeser R.F., 2000, Millward-Sadler S.J.,

2000) sont présents à la surface des chondrocytes et permettent la transmission des signaux extracellulaires.

I.3 Homéostasie du cartilage

Dans le cartilage sain, il existe un équilibre subtil entre la synthèse et la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire. Cet équilibre est réalisé grâce aux effets antagonistes de différents facteurs de croissance, de cytokines anti-inflammatoires et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF α).

Les facteurs de croissance synthétisés par les chondrocytes favorisent leur activité anabolique (Franchimont P. et Bassleer C., 1991). Il s'agit principalement du « basic Fibroblast Growth Factor » (bFGF), de l'« Insulin-like Growth Factor » (IGF-1 et IGF-2) et du TGF β (Trippel S.B., 1995). Ces facteurs sont localisés dans la MEC avec laquelle ils s'associent, constituant ainsi une forme de stockage. Ils n'agissent pas indépendamment et, en fonction de leur combinaison et de l'état de la cellule, ils offrent une régulation plus fine de la différenciation et de l'activité chondrocytaires (Trippel S.B., 1995).

Les enzymes protéolytiques, jouant un rôle essentiel dans le catabolisme du cartilage, sont les métalloprotéases matricielles ou MMPs. Ces enzymes sont sécrétées dans le milieu extracellulaire sous forme inactive de proMMP et agissent à pH neutre (Martel-Pelletier J., 1998). Les MMPs sont contrôlées physiologiquement par leurs inhibiteurs tissulaires non spécifiques, les TIMPs (« Tissue Inhibitor of MMP »). Il existe trois grandes familles de MMPs :

- Les gélatinases qui clivent les collagènes dénaturés
- Les stromélysines qui hydrolysent les PG
- Les collagénases qui sont responsables de la dégradation du collagène dans le cartilage.

II Le liquide synovial

Le liquide synovial est visqueux, jaune pâle et transparent. Il est présent normalement en faible quantité dans l'articulation. Le liquide synovial est un ultra filtrat de plasma composé d'eau, de nutriments, d'électrolytes (chlorure, sodium, potassium), d'urée et de

protéines. Enfin, le liquide synovial contient également de l'acide hyaluronique qui est responsable de sa viscosité. Le hyaluronate est un polysaccharide linéaire, formé de 10 000 à 20 000 doublets d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine. Il est fortement hydraté et replié en une pelote déformable d'environ 0,5 μm de diamètre. L'acide hyaluronique agit comme un tamis ne laissant passer que les petites protéines dans le liquide synovial et contrôle ainsi la composition protéique de ce liquide.

Le liquide synovial possède des propriétés rhéologiques uniques. Il permet de lubrifier les surfaces articulaires et, grâce à son coefficient de friction très bas, il protège la zone superficielle du cartilage en assurant un frottement harmonieux des surfaces articulaires (Buckwalter J.A., 1997). Ce liquide est également le liquide nourricier du cartilage. Il est sécrété par la membrane synoviale qui est la membrane qui tapisse la face interne de la capsule des articulations mobiles (Figure 6).

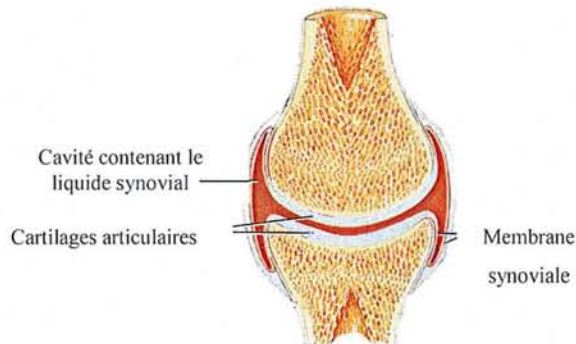


Figure 6 : Représentation schématique de l'articulation (coupe frontale de l'articulation du genou, d'après www.bmb.psu.edu/courses/bisci004a/bone/fig81.jpg).

L'articulation est constituée de différents tissus dont le cartilage articulaire et la membrane synoviale. Celle-ci est responsable de la production du liquide synovial présent dans la cavité articulaire. Le liquide synovial visqueux est un ultra filtrat de plasma et possède des propriétés rhéologiques uniques.

III La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu conjonctif lâche, hautement spécialisé, qui est composé essentiellement de fibres élastiques, de tissu adipeux et de cellules. Sa face interne est constituée de « franges synoviales » qui offrent une grande surface d'échanges avec le liquide synovial dont elle assure la sécrétion. Cette membrane est organisée en deux couches :

- Une couche qui délimite la cavité articulaire. Cette couche est divisée en deux parties : l'*intima*, qui est la couche bordante, composée d'une ou de deux assises cellulaires et

la *sub-intima*, qui est la couche profonde, contenant de nombreux capillaires, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques.

- Une couche de revêtement qui tapisse la capsule articulaire. C'est un tissu non spécialisé plus ou moins lâche dans lequel se trouve des vaisseaux de plus grande taille.

La membrane synoviale est bordée par des cellules hautement spécialisées, les synoviocytes qui sont de deux types, A et B (FitzGerald O., 1995) :

Les *synoviocytes de type A* sont de « type macrophagique » et dérivent des monocytes. Ils ont une fonction phagocytaire qui permet d'éliminer les débris de l'espace articulaire et synovial.

Les *synoviocytes de type B* sont de « type fibroblastique » et sont riches en réticulum endoplasmique rugueux. Ils ont également des dendrites qui leur permettent de former un réseau à la surface de la membrane synoviale. Ils synthétisent en majeure partie les constituants du liquide synovial tels que l'acide hyaluronique, le collagène et la fibronectine. En réponse à différents stimuli, ces cellules synthétisent également, des enzymes qui dégradent la membrane synoviale, le cartilage et l'os comme la collagénase, la stromélysine, la cathepsine ou l'élastase.

Il existe un troisième type de cellules de « type dendritique » qui représente moins de 1% du total des cellules dont le rôle est assez mal connu (Gadher S.J. et Woolley D.E., 1987). Elles sont appelées mastocytes ou « mast cells ».

La membrane synoviale assure diverses fonctions. Grâce aux synoviocytes de type B, elle sécrète l'acide hyaluronique qui confère au liquide synovial ses propriétés viscoélastiques. Grâce à la fonction macrophagique des synoviocytes de type A, elle possède également une fonction de résorption des débris cellulaires et des fragments cartilagineux. Elle sert enfin de membrane d'échange et de filtration entre le liquide synovial et le sang. Contrairement au cartilage, la membrane synoviale est richement vascularisée et innervée. Elle participe donc activement aux phénomènes douloureux dans le contexte de maladies articulaires, de nature inflammatoire ou dégénérative.

IV Les pathologies articulaires

Les pathologies articulaires sont caractérisées par une modification et une altération progressives de la structure de la membrane synoviale et du cartilage. Ceci entraîne avec le temps une perte de la fonction articulaire. Ces pathologies sont classées en deux grandes catégories :

- Les arthropathies dégénératives, telle que l'arthrose, dont la destruction du cartilage est un phénomène clé.
- Les arthropathies inflammatoires, telle que la polyarthrite rhumatoïde (PR), dont la destruction du cartilage n'est qu'un facteur secondaire par rapport à l'inflammation.

En effet, la PR a pour mécanisme primaire une atteinte de la membrane synoviale alors que dans l'arthrose celle-ci intervient secondairement après l'atteinte du cartilage. Mais il semblerait que la membrane synoviale joue un rôle important dans les différentes arthropathies, en sécrétant certains médiateurs inflammatoires responsables de la dégradation du cartilage (Martel-Pelletier J., 1999).

IV.1 Arthrite

La PR est caractérisée par une inflammation chronique de la membrane synoviale et une érosion progressive du cartilage et de l'os. Elle touche toutes les articulations synoviales et des prédispositions génétiques la favorisent. Cette pathologie, qui débute généralement entre 35 et 55 ans, concerne 1% de la population et affecte plus particulièrement les femmes (quatre femmes pour un homme).

La PR est considérée comme une pathologie auto-immune, la composante immunologique étant fondamentale dans l'initiation et le développement de la maladie. Les lymphocytes T jouent un rôle important dans la réaction immunitaire puisqu'ils sont activés initialement après une reconnaissance antigénique. Dans les polyarthrites expérimentales, on retrouve une dysrégulation immunitaire reflétant un déséquilibre entre les populations lymphocytaires Th1 et Th2 et associé à une surexpression de cytokines pro-inflammatoires (Th1). La PR implique également l'activation et l'infiltration d'autres populations cellulaires tels que les

neutrophiles, les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes. Les lymphocytes T, les cellules de type macrophagique et fibroblastique sont capables de synthétiser un grand nombre de médiateurs de l'inflammation, des enzymes de dégradation, des facteurs de croissance et leurs inhibiteurs et des molécules d'adhésion. Cependant, les cellules impliquées plus particulièrement dans la destruction du cartilage sont les synoviocytes de type A (macrophages) et B (fibroblastes) (Burmester G.R., 1997, Firestein G.S., 1996, Harris E.D., 1990). Les macrophages entretiennent le phénomène inflammatoire par la production de cytokines pro-inflammatoires tandis que les fibroblastes agissent en tant qu'effecteurs dans la dégradation du cartilage et de l'os en sécrétant des enzymes protéolytiques. En effet, il existe un déséquilibre entre la production de MMPs et celle de leurs inhibiteurs, les TIMPs. La production de ces deux molécules est contrôlée notamment par des cytokines anti-inflammatoires et immunorégulatrices que sont l'interleukine-10 et le TGF β . Ces dernières sont capables de diminuer l'expression des cytokines pro-inflammatoires, de contrôler la production de MMPs et d'augmenter la synthèse des TIMPs (Wright J.K., 1991).

La PR est caractérisée par la formation d'un panus synovial, du à l'épaississement de l'*intima* de la membrane synoviale. Ce panus va se propager dans la cavité articulaire et en recouvrir les surfaces (Schiff M.H., 2000, Van Den Berg W.B. et Bresnihan B., 1999). En effet, l'*intima* passe de 1 ou 2 couches cellulaires à 6 ou 8 couches par infiltration cellulaire mais également par prolifération des synoviocytes de type A et B. Cette prolifération cellulaire s'accompagne d'une angiogénèse synoviale importante, également favorisée par l'activation macrophagique (Koch A.E., 1992 et 1995). Les macrophages sont présents en quantité importante dans l'*intima*, la *subintima* et en particulier dans la jonction entre le cartilage et le panus inflammatoire.

La douleur est également une composante importante de la PR, notamment lors des poussées inflammatoires plus ou moins espacées.

IV.2 Arthrose

La définition de l'arthrose, donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé, est la suivante : "l'arthrose est la résultante de phénomènes dégénératifs mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral". Cette maladie dégénérative multifactorielle touche environ 10% de la population mondiale. Elle atteint surtout les grosses articulations comme la hanche (coxarthrose), le

genou (gonarthrose) mais peut aussi concerner les mains. L'arthrose peut toucher indifféremment les hommes et les femmes, avec une fréquence plus importante chez la femme pour l'arthrose des mains. La pathologie se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques du cartilage. Elles conduisent à un ramollissement (chondromalacie), une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire ainsi qu'à une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de géodes sous-chondrales. Les facteurs étiologiques sont divers : prédisposition génétique, facteurs métaboliques, mécaniques, traumatiques, dysrégulation immunitaire, hormonale, la sénescence et l'obésité. Quelle que soit l'étiologie, l'arthrose entraîne des douleurs et des raideurs articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale.

L'arthrose se caractérise par une dégénérescence du cartilage due à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des constituants matriciels, entraînant une perte de l'homéostasie. Les premières modifications observées sont le résultat d'une réaction hypertrophique, avec augmentation de la synthèse des éléments matriciels. Elles sont suivies d'une augmentation du "turn-over" matriciel, aboutissant progressivement à une déplétion des composants de la matrice. Les PG semblent être les premiers affectés. On note une diminution de leur contenu, de leur agrégation et de leur longueur (Mankin H.J. et Treadwell B.V., 1986). Dans les stades précoces de la maladie, le contenu en collagène reste stable. Cependant, le stade hypertrophique conduit à une altération et à une perte du réseau collagénique et précède le stade lésionnel. De plus, en se désagrégeant, le cartilage libère des fragments qui peuvent déclencher des réactions inflammatoires de la membrane synoviale, provoquant ainsi une inflammation douloureuse et une sécrétion de médiateurs inflammatoires en quantité élevée dans le liquide synovial. Les acteurs de la dégradation sont multiples. On trouve notamment les MMPs, les radicaux libres, les prostaglandines, les cytokines et les facteurs de croissance (Westacott C.I. et Sharif M., 1996). En parallèle, dans les régions non portantes du cartilage, des ostéophytes se développent. Ils correspondent à une néoformation d'une épiphyse articulaire avec un os sous-chondral et un tissu cartilagineux de revêtement. Ils ont pour conséquence d'augmenter les surfaces articulaires et de bloquer l'articulation, apportant ainsi une meilleure stabilité articulaire.

Les métalloprotéases

L'activité biologique des MMPs est contrôlée physiologiquement par les TIMP ou par leur propre activation. Des études ont montré que les TIMP étaient moins exprimés dans le cartilage arthrosique que dans le cartilage sain (Dean D.D. et Woessner J.F., 1984). Ceci explique une baisse de l'inhibition des MMPs au cours de l'arthrose. Un certain nombre de travaux ont montré la présence de MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11 et -13, ainsi que de MMPs membranaires de type 1 dans le cartilage. En fonction du stade de l'arthrose, diverses MMPs vont être plus ou moins exprimées dans les différentes couches du cartilage (Freemont A.J., 1997).

En réponse à des médiateurs de l'inflammation, tels que des cytokines pro-inflammatoires, l'ensemble des cellules articulaires est capable d'augmenter la synthèse et l'activité de nombreuses protéases (gélatinases, collagénases, stromélysines et élastases) (Cunnane G., 1999). Certains fragments générés sous l'action des protéases, peuvent être reconnus par des récepteurs membranaires présents sur les chondrocytes, qui ainsi stimulés produisent à leur tour des protéases et des médiateurs de l'inflammation. Des modèles d'étude ont montré que les fragments de fibronectine, retrouvés chez des patients arthritiques et arthrosiques, activent le catabolisme et accélèrent la dégénérescence du cartilage (Homandberg G.A. et Hui F., 1994). Dans l'arthrose, la fixation des fragments de fibronectine sur des récepteurs membranaires des chondrocytes conduit à la synthèse de la MMP-13 et de la MMP-3 (Stanton H., 2002).

Les radicaux libres

Les effets délétères des radicaux libres, notamment du monoxyde d'azote radicalaire (couramment appelé NO), sur les constituants matriciels et sur le métabolisme chondrocytaire sont multiples. Dans l'arthrose, la production de NO est augmentée en réponse aux cytokines produites au cours de la pathologie (Pelletier J.P., 1996). Le rôle du NO est complexe, car il peut agir au niveau de la prolifération, de la mort cellulaire, de la dégradation et de la synthèse de la matrice cartilagineuse. En effet, le NO est impliqué dans l'effet anti-prolifératif de l'IL-1 (Blanco F.J. et Lotz M., 1995, Blanco F.J., 1995a et 1995b) mais également dans l'apoptose chondrocytaire (Hashimoto S., 1998a, 1998b et 1999). De plus, différentes études ont montré, qu'en présence d'un inhibiteur de la NO synthase inductible (iNOS), la baisse de la synthèse des PG induite par l'IL-1 était diminuée dans des chondrocytes en culture mais également dans des explants de cartilage (Bird J.L., 1997, Cipolletta C., 1998, Häuselmann H.J., 1994, Taskiran D., 1994). En plus de l'effet anti-anabolique observé, le NO possède une activité

catabolique. Il est capable d'induire l'expression des MMPs, notamment la collagénase et la stromélysine (Murrell G.A., 1995).

D'autres radicaux libres participent aux effets délétères des cytokines pro-inflammatoires sur le cartilage. Ainsi, des expériences réalisées sur des cultures primaires de chondrocytes ont montré que le peroxyde d'hydrogène est impliqué dans la dégradation des agrécanes (Tiku M.L., 1999). De plus, l'anion superoxyde participe à la dégradation du cartilage induite par l'IL-1 β (Shingu M., 1994) et peut se combiner avec le NO pour former le peroxyde nitrite. Ce dernier agit en synergie avec le NO pour inhiber la synthèse des PG induite par l'IL-1 β (Pacquelet S., 2002).

Les prostaglandines

L'enzyme clé de la biosynthèse des prostaglandines est la cyclooxygénase (COX). Deux isoenzymes de la COX ont été identifiées : l'une ubiquitaire et constitutive, COX-1 et l'autre exprimée seulement dans certains organes comme la prostate, le rein et le cerveau mais inductible dans le plupart des tissus sous l'action des médiateurs de l'inflammation, COX-2. Les modèles cellulaires ou animaux d'inflammation ont montré que l'augmentation de l'expression de la COX-2 est responsable de la production accrue de prostaglandines en situation inflammatoire (Seibert K., 1994, Vane J.R., 1994). Les deux isoformes de la COX sont exprimées dans le tissu synovial humain, les cellules endothéliales ou les leucocytes mais seule la COX-2 est induite lors d'un traitement par de l'IL-1 ou du PMA (Crofford L.J., 1994, Hulkower K.I., 1994). De plus, la COX-2 est exprimée dans la membrane synoviale de patients atteints d'arthrite ou d'arthrose (Siegle I., 1998) et pourrait être surexprimée dans le cartilage arthrosique (Amin A.R., 1997).

La contribution des prostaglandines dans l'homéostasie du cartilage est peu connue et semble ambiguë. En effet, certains travaux montrent que les prostaglandines inhibent la synthèse des kératanes sulfates (Fukuda K., 1995), des agrécanes (Fulkerson J.P. et Damiano P., 1983, Mitrovic D., 1981) et des collagènes (O'Keefe R.J., 1992). Elles moduleraient également l'équilibre entre les protéases et leurs inhibiteurs (Yamada H., 1996) et réduiraient la prolifération chondrocytaire (Blanco F.J. et Lotz M., 1995). En revanche, d'autres expériences montrent qu'elles diminueraient la dégradation des constituants de la MEC, en inhibant l'expression des MMPs (Di Battista J.A., 1994, Steinberg J.J. et Sledge C.B., 1991). Elles pourraient également stimuler la prolifération chondrocytaire, la synthèse des PG et des collagènes (Di Battista J.A., 1996), ce qui leur conférerait des propriétés bénéfiques sur le cartilage.

Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance favorisent l'activité anabolique du chondrocyte mais jouent également un rôle dans la destruction progressive du cartilage. Parmi les facteurs de croissance synthétisés dans les chondrocytes, le bFGF (« basic Fibroblast Growth Factor »), l'IGF (« Insulin-like Growth Factor ») et le TGF (« Transforming Growth Factor ») sont les plus importants (Trippel S.B., 1995).

Le bFGF représente un puissant mitogène vis à vis des chondrocytes et constitue un signal en faveur d'une synthèse des PG (Mankin H.J., 1991). Cependant, la dualité d'action du bFGF au sein du cartilage arthrosique suggère des mécanismes d'action complexes de régulation. Il stimule à la fois le catabolisme du tissu cartilagineux en potentialisant les effets de l'IL-1, et son anabolisme en stimulant la synthèse de protéines matricielles (Sah R.L., 1994).

Deux isoformes d'IGF ont été identifiées, l'IGF1 et l'IGF2. L'IGF1 est le principal facteur responsable de l'induction de la synthèse des composants de la matrice (Mankin H.J., 1991) : il stimule la synthèse et la sécrétion du collagène de type II et des agrécanes (Tyler J.A., 1989). L'IGF2 joue un rôle dans la régulation du métabolisme du glucose et intervient surtout dans les chondrocytes fœtaux (Bhaumik B. et Bala R.M., 1991). Bien que l'IGF soit capable de réduire la dégradation du cartilage induite par l'IL-1 (Tyler J.A., 1989), les chondrocytes arthrosiques répondent peu à l'IGF en terme de synthèse des PG. Cette diminution de la réponse des cellules à l'IGF contribue ainsi au processus arthrosique (Verschure P.J., 1996).

Le TGF β est sécrété sous forme d'un précurseur qui nécessite un clivage pour être activé. Il stimule la synthèse des constituants matriciels tels que les collagènes, l'agrécane et les protéines non collagéniques (Van der Kraan P.M., 1997, Yaeger P.C., 1997). Il induit également la synthèse des TIMPs et de l'II-1Ra (Verschure P.J., 1996) et s'oppose à l'induction des MMPs (Scharstuhl A., 2002). Cependant, ce facteur de croissance semble être un facteur clé dans les phases initiales de l'arthrose, car bien qu'il s'oppose à la perte des constituants matriciels il est directement impliqué dans la formation des ostéophytes (Scharstuhl A., 2002, Van Beuningen H.M., 2000).

Les cytokines

Les cytokines sont des protéines ou des glycoprotéines et le nombre de cytokines identifiées croît très régulièrement depuis une vingtaine d'années. Leurs rôles physiopathologiques respectifs, les voies de régulation ou de signalisation sont de plus en plus complexes. En pathologie ostéoarticulaire, elles se comportent le plus souvent comme des médiateurs paracrines ou autocrines, voire parfois endocrines, qui participent aux

coopérations cellulaires et modulent les interactions cellules-MEC et les processus humoraux (Dinarello C.A., 2000). Elles jouent donc un rôle important dans la genèse ou l'amplification des phénomènes inflammatoires, hyperalgiques, immunitaires, mais également dégénératifs, qui peuvent affecter les articulations.

Dans la plupart des arthropathies, les cytokines se répartissent en trois catégories qui s'opposent d'un point de vue fonctionnel : les cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines -1, -6, -17, -18 ou le TNF α , les cytokines anti-inflammatoires telles que le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra), l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13, les cytokines modulatrices telles que l'IL-13, IL-12 ou l'interféron- γ (IFN γ). Dans l'arthrose, il existe au sein du cartilage un déséquilibre entre des cytokines favorisant la dégradation des constituants matriciels (pro-catabolique) et limitant leur biosynthèse (anti-anabolique), comme l'IL-1, et leur antagonistes (IL-1Ra par exemple) ou des cytokines favorisant la réparation du cartilage comme les facteurs de croissance (IGF1 ou TGF β par exemple).

L'IL-1 est probablement une cytokine essentielle dans la compréhension des mécanismes de dégradation du cartilage puisqu'on soupçonne sa contribution aussi bien dans les processus arthritiques, bien qu'à un degré moindre que le TNF α , et dans des processus dégénératifs. En effet, des études réalisées *in vitro* ont montré que l'IL-1 et le TNF α inhibent la synthèse de la matrice extracellulaire (Campbell I.K., 1990, Malfait A.M., 1994) et augmente celle des MMPs (Martel-Pelletier J., 1994, Pelletier J.P., 1995). De plus, dans certains modèles expérimentaux chez l'animal, il a été montré que l'inhibition de la synthèse ou de l'activation de l'IL-1 prévient la destruction du cartilage (Van de Loo F.A., 1995), tandis que celle du TNF α diminue le développement de l'inflammation (Plows D., 1995). Ces deux cytokines sont retrouvées en quantité importante dans le cartilage, la membrane et le liquide synovial de patients arthrosiques et arthritiques.

L'IL-1 est détectée de façon précoce dans les articulations inflammatoires et favorise sa propre production ainsi que celle d'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-6 par exemple). L'IL-6 est produite par de nombreuses cellules, notamment par les fibroblastes et les chondrocytes et sa synthèse est stimulée par l'IL-1 et le TNF α dans les chondrocytes humains (Nietfeld J.J., 1990). Cependant, l'IL-6 diminue la dégradation des PG en stimulant la synthèse des TIMPs (Lotz M. et Guerne P.A., 1991). Finalement, la balance entre les effets anaboliques et cataboliques de l'IL-6 conduit plutôt à un ralentissement du renouvellement des PG. L'IL-6 est également un facteur systémique de l'inflammation.

D'autres cytokines pro-inflammatoires interviennent de manière importante dans les processus qui aboutissent à la destruction du cartilage. Il s'agit principalement de l'IL-17 et de l'IL-18. L'IL-17 est une cytokine importante du système immunitaire impliquée dans les processus hématopoïétiques et inflammatoires (Fossiez F., 1996, Scharzenberger P., 1998). Les propriétés inflammatoires de l'IL-17 se traduisent par sa capacité à stimuler le recrutement des neutrophiles, notamment lors des maladies respiratoires (Laan M., 1999). En effet, l'IL-17 contribue à initier et à maintenir un processus inflammatoire en stimulant l'expression de gènes inductibles (Broxmeyer H.E., 1996). L'IL-17 module ainsi l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF α et l'IL-1 β par les synoviocytes (Chabaud M., 1998) et les macrophages humains (Jovanovic D., 1998b). L'IL-17 contribue ainsi à l'inflammation de la membrane synoviale en stimulant la production d'IL-6. En effet, l'utilisation d'un anticorps spécifique capable de neutraliser l'IL-17 permet de diminuer de 50% la libération d'IL-6 par des membranes synoviales prélevées chez des patients arthritiques (Chabaud M., 1998). Elle stimule également la production de NO et de PGE₂, en induisant l'expression de la NO synthase inductible et de la cyclo-oxygénase de type 2 dans les chondrocytes humains (Shalom-Barak T., 1998). Des études récentes ont montré que l'IL-17 reproduit certains des effets de l'IL-1 sur le cartilage, notamment la baisse de la synthèse des PG et la production de NO. Cependant, l'IL-17 se différencie de l'IL-1 par une induction plus modérée de la synthèse des PG tout en stimulant fortement la production de NO (Pacquelet S., 2002). L'IL-17 induit également l'expression de l'IL-1 β dans des chondrocytes issus de patients arthrosiques (Honorati M.C., 2002).

Les effets de l'IL-17 sur le catabolisme du cartilage sont assez bien documentés. Les effets pro-cataboliques de l'IL-17 ont été mis en évidence dans plusieurs travaux réalisés *in vitro* et *in vivo*. L'IL-17 induit l'expression de la stromélysine dans les chondrocytes humains (Shalom-Barak T., 1998) et de la collagénase 3 dans des chondrocytes issus de patients arthrosiques, Benderdour M., 2002). L'IL-17 est également capable d'augmenter la production de la MMP-1 et du TIMP-1 dans les synoviocytes (Chabaud M., 2000). Néanmoins, la quantité de TIMP produite reste inférieure à celle des MMPs, conduisant à un déséquilibre MMPs /TIMPs dans l'articulation.

L'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire appartenant à la famille de l'IL-1 et dont les propriétés biologiques sont similaires. L'IL-18 est retrouvée en quantité plus importante dans le liquide synovial de patients souffrants d'arthrite rhumatoïde que dans celui de patients souffrants d'arthrose (Tanaka M., 2001). Cette cytokine joue le rôle d'inducteur de la production de PGE₂ *in vitro* et *in vivo*, pouvant ainsi conduire à la dégradation du cartilage

(Futani H., 2002). De plus, dans un modèle d'arthrose chez le chien, la synthèse de l'IL-18 par les chondrocytes est augmentée et semble dépendre de la production de NO (Boileau C., 2002). La stimulation de chondrocytes humains en culture par de l'IL-18 entraîne l'induction de l'expression de différents gènes précoces comme COX-2, iNOS, IL-6 et la stromélysine, augmentant ainsi la libération de glycosaminoglycanes contribuant ainsi à la dégradation du cartilage (Olee T., 1999). Cette cytokine est également capable d'induire *in vitro* l'expression de l'IFN γ dans des explants de membrane synoviale (Gracie J.A., 1999).

L'une des cytokines anti-inflammatoires importantes dans les pathologies articulaires est l'IL-1Ra, qui est un antagoniste spécifique du récepteur à l'IL-1 incapable d'induire la transduction du signal de l'IL-1 (Dayer J.M. et Burger D., 1994). Elle est produite majoritairement par les monocytes et est détectée, entre autre, dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite (Roux-Lombard P., 1989 et 1992). De plus, dans des modèles d'arthrose chez le chien, l'injection intra-articulaire d'IL-1Ra a un effet protecteur vis à vis du développement des ostéophytes, des lésions cartilagineuses et inhibe l'expression de la collagénase-1 (Caron J.P., 1996).

Un autre mécanisme de modulation des effets de l'IL-1 et du TNF α faisant intervenir des récepteurs solubles a été mis en évidence. Les récepteurs solubles à l'IL-1 et au TNF α , qui sont des formes tronquées des récepteurs, agissent comme des inhibiteurs en piégeant l'IL-1 ou le TNF α . Le récepteur soluble de type II à l'IL-1 a été identifié dans les liquides synoviaux de patients ayant une inflammation (Arend W.P., 1994). De même, les deux types de récepteurs solubles au TNF α sont produits par les chondrocytes et les synoviocytes arthrosiques (Alaaeddine N., 1997).

Enfin, l'IL-4, -10, -13 ont pour action principale de diminuer la production et/ou l'activité des cytokines pro-inflammatoires (Dayer J. et Burger D., 1994). Leurs propriétés anti-inflammatoires s'expliquent par l'induction d'une augmentation de la synthèse d'IL-1Ra et du TIMP-1 (Jovanovic D., 1998a, Vannier E., 1992). L'IL-4 inhibe la production de protéases et d'IL-1 (Lacraz S., 1992) mais augmente l'expression des deux récepteurs du TNF α (Cope A.P., 1993). L'IL-10 stimule la production de TIMPs et de récepteurs solubles au TNF α (Chernoff A.E., 1995, Fuchs A.C., 1996). L'IL-13 est très proche fonctionnellement de l'IL-4. En effet, elle augmente la production d'IL-1Ra et supprime la production de cytokines (Vannier E., 1996). Ces cytokines sont présentes dans le liquide synovial des articulations arthrosiques (Schlaak J.F., 1996) mais également dans la membrane synoviale arthritique

(Isomäki P., 1996, Katsikis P.D., 1994, Ulfgren A.K., 1995, Wagner S., 1997) en quantité cependant insuffisante pour inhiber les effets des cytokines pro-inflammatoires.

CHAPITRE II : L'INTERLEUKINE-1

L'IL-1 est une cytokine impliquée dans la prolifération cellulaire, le chimiotactisme mais est également un médiateur clé de l'inflammation articulaire (Cavaillon J.M., 1986). L'IL-1, seule ou en synergie avec le TNF α , joue également un rôle central dans la destruction progressive de la matrice cartilagineuse au cours des pathologies articulaires (Pelletier J.P., 1993).

I Les différentes isoformes de l'interleukine -1

Il existe trois membres dans la famille génique de l'IL-1 : les isoformes α et β de l'IL-1 et l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra). Ces trois gènes comportent de fortes homologies et sont portés par le bras long du chromosome 2 chez l'homme et la souris (Carter D.B., 1990, Eisenberg S.P., 1990, March C.J., 1985). Tous les membres de cette famille sont synthétisés sous forme de précurseurs. Les précurseurs de l'IL-1 α : proIL-1 α et de l'IL-1 β : proIL-1 β ont une masse moléculaire de 31 kDa. La proIL-1 α et la forme mature de 17 kDa sont biologiquement actives. En revanche, le clivage de la proIL-1 β est indispensable pour une activité biologique optimale ainsi que pour sa sécrétion. L'IL-1Ra possède un peptide signal qui est clivé permettant sa sécrétion sous forme mature.

Le clivage de la proIL-1 α est assuré par une enzyme peu spécifique, la calpaïne. Cette enzyme est une protéase à cystéine, dépendante du calcium et associée à la membrane (Kobayashi Y., 1990). En revanche, le clivage de la proIL-1 β est réalisé par l'enzyme de conversion de l'IL-1 β , appelée plus communément l'ICE ou caspase-1, « IL-1 β converting enzyme » (Wilson K.P., 1994). L'ICE est une enzyme spécifique, appartenant à la famille des protéases à cystéine. Il s'agit d'une endopeptidase cytosolique fonctionnellement apparentée à la cathepsine G. L'ICE est initialement synthétisée sous forme d'une pro-enzyme de 45 kDa. L'activation de cette enzyme nécessite deux clivages : le premier supprime un peptide de 15 kDa et le deuxième aboutit à la formation de l'hétérodimère actif composé de deux chaînes de 10 et 20 acides aminés. L'enzyme active de l'ICE forme un tétramère composé de deux hétérodimères matures sur lesquels viennent se fixer deux molécules de proIL-1 β , où elles seront clivées (Walker N.P., 1994, Wilson K.P., 1994). L'ICE est produite à la fois dans la

membrane synoviale et le cartilage humain normal et elle est surexprimée durant l'arthrose (Saha N., 1999).

L'IL-1 α semble agir comme un messenger intracellulaire : elle n'est pas retrouvée dans la circulation ou les liquides inflammatoires, mais elle reste essentiellement cytosolique (Schiff M.H., 2000). Elle peut également être présente à la surface de la cellule, alors appelée IL-1 membranaire. Contrairement à l'IL-1 α , l'IL-1 β n'est pas associée à la membrane mais est libérée dans le milieu extracellulaire. Divers mécanismes de transport interviennent, parmi lesquels l'exocytose à partir de vésicules, ou le transport actif par l'intermédiaire de protéines membranaires des MRD (« multi drug resistance »).

Bien que ces deux formes d'IL-1 soient capables de se fixer sur les mêmes récepteurs et d'exercer des activités biologiques similaires, elles possèdent des différences importantes au niveau de la régulation de leur expression, de la stabilité de leur ARNm, de leur maturation et de leur sécrétion.

II Transduction du signal de l'interleukine-1

La famille des récepteurs à l'IL-1 comporte trois membres : le récepteur à l'IL-1 de type I (IL-1RI) et de type II (IL-1RII) et l'IL-1RacP pour IL-1R accessory protein. Ces récepteurs peuvent tous fixer l'IL-1 mais le récepteur de type II se lie préférentiellement à l'IL-1 β . L'affinité du récepteur de type I pour l'IL-1 β est augmentée lorsque l'IL-1RacP s'associe avec l'IL-1RI. Seul l'IL-1RI est capable de transmettre un signal en réponse à l'IL-1, ceci grâce à son domaine intracellulaire de 215 acides aminés (Sims J.E., 1993). Cette transduction est efficace et amplifiée, du fait que très peu de récepteurs de type I sont présents à la surface de la cellule et que seulement un petit nombre de récepteurs sont occupés pour obtenir une réponse biologique (5% des récepteurs occupés sont nécessaires pour obtenir une réponse optimale) (Dinarello C.A., 1994b).

Dans un premier temps, l'IL-1 se fixe sur le récepteur de type I avec une faible affinité. Après fixation de l'IL-1, un changement conformationnel a lieu et permet ainsi la fixation de l'IL-1RacP, augmentant ainsi l'affinité du complexe pour l'IL-1 (Greenfeder S.A., 1995, Wesche H., 1998). Le complexe ainsi formé recrute une protéine adaptatrice, MyD88 (« myeloid differentiation factor 88 »), qui phosphoryle les chaînes cytoplasmiques du complexe et permet également le recrutement et l'activation des protéines kinases associées

au récepteur de l'IL-1 (IRAK) (Figure 7) (Janssens, S., 2002, Wesche H., 1997). Cette kinase va ensuite interagir avec un autre facteur, TRAF6 (TNF-receptor associated protein). Cette étape va induire l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire des kinases NIK (NF- κ B-inducing kinase) et IKK (I κ B kinase), et de l'activation d'AP-1 par l'intermédiaire des MAPKK (MAPK kinase) (Ninomiya-Tsuji J., 1999).

La grande diversité des effets et des événements intracellulaires résultant de la fixation de l'IL-1 à l'IL-1RI, varie en fonction du type cellulaire et résulte de l'activation de différentes voies de transduction du signal (Bankers-Fulbright J.L., 1996, Brooks J.W. et Mizel S.B., 1994). La réponse du chondrocyte à l'IL-1 est complexe et fait intervenir différentes voies de signalisation postréceptoriales dans les 15 premières minutes qui suivent sa fixation au récepteur. Les voies de signalisation impliquées sont : la voie des protéines kinases C et AMPc dépendante, la guanylate cyclase, la voie de la phospholipase A2 (libération de phospholipides, d'acide arachidonique) et de la sphingomyélinase (libération de sphingomyéline). Les médiateurs lipidiques ainsi libérés agissent comme seconds messagers. L'IL-1 induit également, dans les chondrocytes, les synoviocytes et d'autres types cellulaires, l'activation des MAPK, « mitogen-activated protein kinases » : ERK-1 et -2 (« extracellular signal-regulated kinases »), p38 et JNK (« Jun NH2-terminal Kinase ») (Geng Y., 1996, Han Z., 1998, Kumar S., 2001). Dans les synoviocytes stimulés par de l'IL-1, les voies ERK et JNK sont activées rapidement et p38 est peu activée (Han Z., 1998). En revanche, dans les chondrocytes, les 3 MAPK sont activées et la kinase majoritaire est ERK (Geng Y., 1996). Les cascades d'événements intracellulaires déclenchées par l'IL-1 conduisent à l'activation de facteurs de transcription, tels que NF- κ B (Bondeson J., 1999) ou la famille des AP-1 (« activated protein-1 ») (Barchowsky A., 2000). En se fixant sur leurs éléments de réponse présents dans le promoteur de gènes cibles de l'IL-1, ces facteurs de transcription induisent la transcription de gènes précoces de l'inflammation comme iNOS ou COX-2 ainsi que des facteurs de transcription indispensables à l'expression d'autres gènes caractéristiques de l'IL-1 (Vincenti M.P. et Brinckerhoff C.E., 2001).

L'IL-1 est capable d'augmenter et/ou de réprimer simultanément, dans la même cellule, une grande variété de gènes impliqués notamment dans l'inflammation : elle module l'expression de cytokines, de facteurs de croissance, de molécules d'adhésion, de protéases et de l'ensemble de la famille des chimiokines. Elle peut également jouer un rôle dans la

stabilisation et la prolongation de la demi-vie de l'ARNm de certains gènes (Dinarello C.A., 1992).

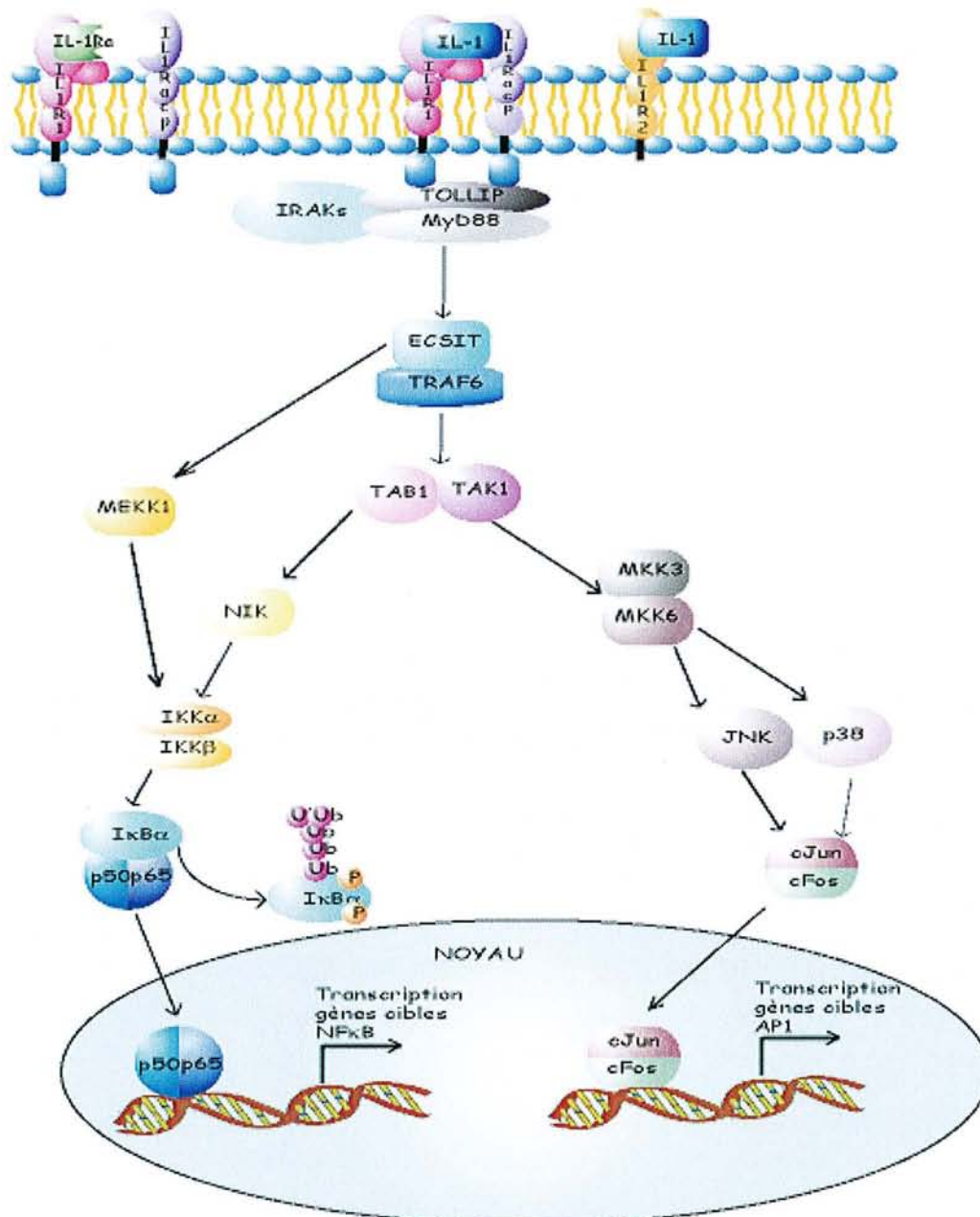


Figure 7 : Transduction du signal de l'IL-1 (D'après www.biocarta.com/pathfiles/).

La transduction du signal de l'IL-1 débute par la fixation de l'IL-1 sur le récepteur de type I et de la formation d'un complexe avec l'IL-1Racp. Après recrutement des protéines adaptatrices (TOLLIP, MyD88 et IRAK), l'activation par phosphorylations successives de différentes protéines conduit à l'activation de voies transcriptionnelles telles que NF-κB et AP-1. Ces deux facteurs de transcription vont ainsi réguler l'expression de différents gènes cibles.

IL-1 : interleukine-1, IL-1RI : récepteur à l'IL-1 de type I, IRAK : IL-1R associated kinase, IL-1Racp : IL-1 receptor accessory protein, IL-1Ra : antagoniste du récepteur à l'IL-1, TOLLIP : Toll-interacting protein, MyD88 : myeloid differentiation factor 88, MEKK1 : MAPK kinase kinase 1, ECSIT : evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways, TRAF6 : TNF receptor associated factor 6, NIK : NF-κB inducing kinase, MKK5, 6 : MAP kinase kinase, TAB1 : TGFβ-activated kinase 1 binding protein 1, TAK1 : TGFβ-activated kinase 1, JNK : jun N-terminal kinases, IKKα, IκB Kinase alpha, IKKβ : IκB Kinase bêta.

NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B intervient dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires (Sha W.C., 1998). Le complexe NF- κ B est constitué d'un dimère de protéines, qui possèdent toutes du côté N-terminal une région homologe de 300 acides aminés appelée Rel, qui permet la dimérisation, la translocation vers le noyau et la liaison à l'ADN. Ces protéines sont regroupées en deux classes en fonction de leur caractéristiques structurales et fonctionnelles (Baeuerle P.A. et Baltimore D., 1996, O'Neill L.A et Kaltschmidt C., 1997). Les protéines p50 et p52 (protéines de classe I) dérivent des précurseurs cytoplasmiques p100 (NF- κ B2) et p105 (NF- κ B1) après clivage du côté C-terminal. Ces précurseurs renferment des motifs ankyrines répétés dans les domaines carboxy-terminaux. Les protéines p65 (RelA), RelB et cRel (p75) (protéines de classe II) renferment un ou deux sites d'activation de la transcription dans leurs domaines carboxy-terminaux. Les dimères NF- κ B sont formés le plus souvent d'une protéine de classe I et d'une protéine de classe II. Mais il existe des homodimères p50/p50 ou p52/p52, qui n'engendrent pas d'activation de la transcription. La protéine p65 est en fait indispensable car elle contient le domaine de transactivation (Schmitz M.L. et Bauerle P.A., 1991) alors que les protéines p50 et p52 possèdent le domaine de liaison à l'ADN. C'est pourquoi l'hétérodimère p65/p50 peut induire la transcription contrairement aux homodimères p50/p50 ou p52/p52. Enfin, la région C de la sous-unité p65 contient la séquence d'adressage nucléaire masquée par I κ B α dans le complexe que cette protéine forme avec NF- κ B (Phelps C.B., 2000).

Dans la cellule, le complexe NF- κ B existe sous forme inactive cytoplasmique, liée à une protéine inhibitrice I κ B α (Baldwin A.S., 1996). L'activation du complexe NF- κ B résulte d'une cascade d'activation de différentes kinases lorsque les cellules sont stimulées par de l'IL-1 ou du TNF α par exemple. Une première kinase à sérine-thréonine, appelée NIK pour « NF- κ B inducing kinase » est activée, puis à son tour elle va phosphoryler un complexe nommé IKK pour « I κ B Kinase » (Ling L., 1998, Nakano H., 1998). Ce complexe IKK est constitué de trois sous-unités : IKK α , IKK β , qui sont des unités catalytiques et NEMO ou IKK γ , qui correspond à la sous-unité régulatrice. Associé à NIK, il forme un complexe de haut poids moléculaire, appelé signalosome. Le complexe IKK activé phosphoryle les sérines 32 et 36 d'I κ B α (DiDonato J.A., 1997, Regnier C.H., 1997, Woronicz J.D., 1997, Zandi E., 1997). Cette phosphorylation est suivie du recrutement d'une ubiquitine ligase responsable de la polyubiquitinylation d'I κ B α sur les lysines 21 et 22. Sous cette forme, I κ B α est ensuite

dégradée par un complexe enzymatique, le protéasome (Karin M., 1999) et libère ainsi la séquence de localisation nucléaire de NF- κ B. Par conséquent, il rentre rapidement dans le noyau et régule la transcription de gènes cibles possédant un élément de réponse dans leur région promotrice (Figure 8).

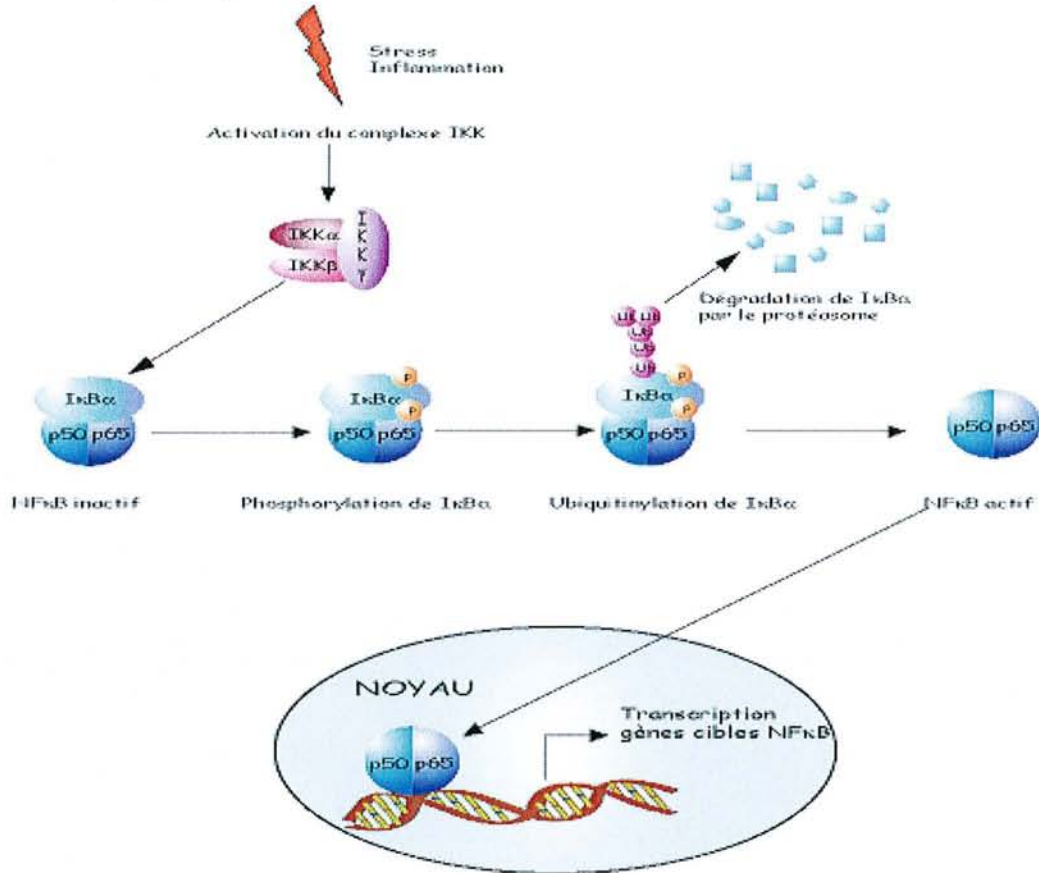


Figure 8: schéma représentant le mécanisme d'activation de NF- κ B (D'après Karin M., 1999).

L'activation du complexe IKK conduit à la phosphorylation de I κ B α , sous-unité inhibitrice de NF- κ B. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitinylation de cette sous-unité puis sa dégradation par le protéasome. Le facteur de transcription NF- κ B ainsi libéré migre dans le noyau, où il va se fixer dans la région promotrice de gènes cibles.

IKK α : I κ B Kinase alpha, IKK β : I κ B Kinase beta, P : phosphorylation, Ub : ubiquitinylation

De nombreux facteurs régulent l'activation de NF- κ B, en particulier de nombreuses kinases capables de phosphoryler IKK comme MEKK1 (Karin M et Delhase M., 1998, Lee F.S., 1998, Nakano H., 1998), MEKK2 et 3 (Zhao Q. et Lee F.S., 1999), les PKC (Lallena M.J., 1999) et enfin NAK (I κ B kinase activating kinase) (Tojima Y., 2000). L'activité de NF- κ B peut aussi être modulée par le biais soit de la phosphorylation de p50 et de p65 augmentant la capacité de fixation de NF- κ B sur l'ADN (Hayashi T., 1993, Naumann M. et Scheidereit C., 1994), soit de la phosphorylation de p65 par PAK1 (kinase activée par la protéine p21)

permettant sa translocation dans le noyau en absence d'activation de I κ B (Frost J.A., 2000). Il est à noter que la caspase 3 peut couper l'extrémité N-terminale de I κ B α laquelle reste attachée à NF- κ B et devient insensible à la dégradation (Reuther J.Y. et Baldwin A.S., 1999). Enfin, la prostaglandine J2 est capable d'inhiber directement l'activité des IKK de façon très importante et de bloquer ainsi l'activation de NF- κ B (Rossi A., 2000).

AP-1

Le complexe AP-1 correspond à un complexe de protéines codées par des proto-oncogènes de la famille Jun, Fos et ATF, « activating transcription factor ». La famille Jun comprend les protéines c-Jun, Jun-B, Jun-D et v-Jun (Vogt P.K. et Bos T.J., 1990). La famille Fos inclue les protéines c-Fos, Fra-1 et-2 (Fos related Antigen), Fos-B et v-Fos et la famille ATF, ATF2, ATF3, B-ATF (Angel P. et Karin M., 1991). Le complexe AP-1 peut être formé d'homodimères d'ATF, d'un homodimère de protéines jun, d'hétérodimères (jun/fos ou jun/ATF), capables de se lier à l'ADN ou d'hétérodimères de protéines fos, qui forment des complexes stables avec les protéines jun. En effet, les membres de la famille fos ne forment pas d'homodimère. c-Fos et c-Jun ont des rôles bien distincts ; ainsi c-fos génère l'initiation de l'activité transcriptionnelle tandis que c-Jun est responsable du maintien de l'activité du facteur AP-1 (Sen C.K. et Parker L., 1996). Les dimères Jun-Jun et Jun-Fos se fixent préférentiellement sur des éléments de réponse TRE (« TPA responsive element ») au phorbol 12-O-tetradecanoate-13 acétate tandis que les dimères Jun-ATF ou ATF-ATF se lient sur des éléments CRE, « cAMP-responsive element » (Hai T. et Curran T., 1991). Ces complexes contrôlent ainsi l'expression de nombreux gènes cibles comme ceux des MMPs, de certaines cytokines et du TGF β (Angel P. et Karin M., 1991, Firestein G.S., 1999). Ils régulent également la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire (Karin M., 1997).

Le complexe AP-1 est localisé préférentiellement dans le noyau plutôt que dans le cytoplasme des cellules, suggérant qu'il est actif et lié à l'ADN. La régulation d'AP-1 est complexe et est effectuée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (Karin M., 1997). Les MAPK : p38, ERK et JNK, peuvent augmenter la transcription du gène *c-fos* par activation d'Elk-1, facteur de transcription appartenant à la famille Ets, et de SAP-1, « stress-activated protein-1 » (Whitmarsh A.J. et Davis R.J., 1996). La transcription du gène *c-jun* est régulée par c-jun lui-même dans une boucle d'autorégulation positive (Angel P., 1988). En effet, la phosphorylation des sérines 63 et 73 de c-jun par JNK augmente son activité transcriptionnelle. De plus, cette modification post-traductionnelle permet de diminuer l'ubiquitination de cette protéine augmentant ainsi sa stabilité (Musti A.M., 1997).

L'expression d'ATF2 est constitutive, seule son activité est régulée de façon post-traductionnelle après phosphorylation (Figure 9).

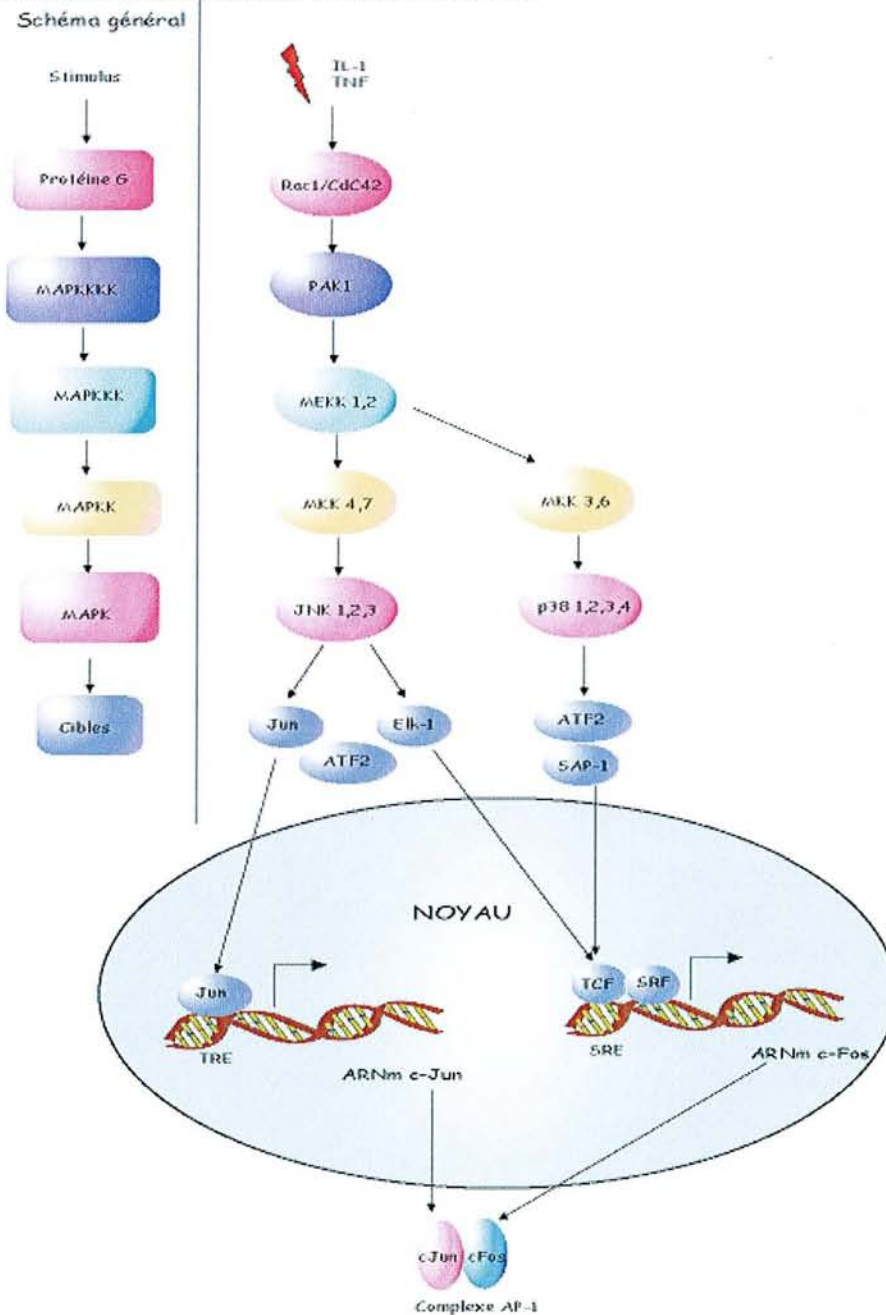


Figure 9 : Activation et régulation des sous-unités c-jun et c-fos (D'après Firestein G.S., 1999).

La régulation d'AP-1 est complexe et a lieu au niveau post-traductionnel et transcriptionnel. L'augmentation de la transcription du gène c-fos est sous contrôle de deux facteurs de transcription Elk-1 et SAP-1. La transcription du gène c-jun est régulée par c-jun lui-même mais également au niveau post-traductionnel après phosphorylation par JNK.

PAK1 : p42-associated kinase, MEKK1, 2 : MAPK kinase kinase 1, 2, MKK 4, 7 : MAP kinase kinase, JNK : Jun N-terminal Kinase, ATF2 : Activating Transcription Factor 2, TRE : TPA Response Element, SRE : serum response element, SAP : Stress-Activated Protein, TCF : ternary complex factor, SRF : serum response factor.

L'IL-1 joue un rôle central dans l'inflammation et la destruction du cartilage, via l'augmentation ou la répression de l'expression de gènes cibles, tels que de multiples facteurs de transcription, des cytokines, des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des molécules d'adhésion et des protéases (Vincenti M.P. et Brinckerhoff C.E., 2001). Le processus pathologique mis en place, induit par l'IL-1, est complexe et fait intervenir de nombreuses voies de signalisation. La régulation des effets de l'IL-1, par le récepteur antagoniste, soluble ou le récepteur de type II, permet de prévenir le développement ou la progression de certaines pathologies.

III Modulation des effets de l'IL-1

III.1 IL-1Ra

La famille des antagonistes du récepteur à l'IL-1 comprend quatre isoformes : une forme soluble appelée sIL-1Ra et trois formes intracellulaires, icIL-1Ra1, 2 et 3. Comme pour l'IL-1, ces protéines sont synthétisées sous forme de précurseurs de la forme mature de 15-17 kDa suivant les isoformes (Arend W.P et Guthridge C.J., 2000). La fonction première de sIL-1Ra est d'inhiber de façon compétitive la fixation de l'IL-1 sur son récepteur, permettant ainsi de réguler les effets pléiotropiques de l'IL-1 (Arend W.P., 1998). Le rôle des icIL-1Ra est encore assez mal connu mais ceux-ci sont des inhibiteurs spécifiques de l'IL-1 au même titre que le sIL-1Ra.

L'IL-1Ra se fixe sur le récepteur de type I à l'IL-1 puis, du fait de sa structure tertiaire, inhibe le recrutement de l'IL-1RacP et donc empêche la transduction du signal (Dinarello C.A., 1998). L'occupation des sites de fixation à l'IL-1 par l'IL-1Ra prévient efficacement la transduction du signal de l'IL-1.

La production d'IL-1Ra est importante car elle limite l'inflammation et la dégradation des tissus dans des modèles animaux caractérisés par une production excessive d'IL-1 (Fukumoto T., 1996, Shanley T.P., 1996). De plus, il a été démontré dans des modèles expérimentaux d'arthrite ou de choc septique chez l'animal qu'une administration d'IL-1Ra exerce un effet anti-inflammatoire (Arend W.P., 1998, Dayer J.M., 2001). Plus récemment, le FDA (« Food and Drugs Administration ») a autorisé la commercialisation d'IL-1Ra recombinante

humaine, anakinra (Kineret®, Amgen Thasad ooks) pour le traitement de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Dayer J.M., 2003).

III.2 IL-1RII

Le récepteur de type II est également appelé récepteur leurre ou « decoy », car il ne permet pas la transduction du signal de l'IL-1 malgré une bonne affinité pour l'IL-1. En effet, ce récepteur est pourvu d'un domaine cytoplasmique plus court que celui du récepteur de type I (29 contre 215 acides aminés chez l'homme) ne permettant pas la transduction du signal (Bristulf J., 1994, Dinarello C.A., 1994a). L'IL-1RII régule les effets de l'IL-1, notamment l'IL-1 β , en entrant en compétition avec le récepteur de type I mais également en interagissant avec l'IL-1RacP (Lang D., 1998, Malinowsky D., 1998).

Les effets de l'IL-1 peuvent également être régulés par des récepteurs solubles de type I et II (IL-1sRI et IL-1sRII), qui correspondent au clivage protéolytique du domaine extracellulaire des récepteurs à l'IL-1 de type I et II. Ces récepteurs sont présents dans la circulation de patients sains mais également dans les membranes synoviales inflammatoires (Arend W.P., 1994, Sims J.E., 1994). L'affinité de ces récepteurs pour les trois membres de la famille de l'IL-1 est très différente. Ainsi, l'IL-1sRI a une meilleure affinité pour l'IL-1Ra que pour l'IL-1 α et l'IL-1 β . En revanche, l'IL-1 β se fixe à l'IL-1sRII avec une meilleure affinité que l'IL-1 α , elle-même ayant une plus forte affinité que l'IL-1Ra (Dinarello C.A., 1998). On peut donc conclure que l'IL-1sRI agit plutôt comme une molécule inflammatoire tandis que l'IL-1sRII comme une molécule anti-inflammatoire.

IV IL-1 et pathologies articulaires

Le rôle de l'IL-1 dans les pathologies articulaires a été bien étudié grâce à des modèles expérimentaux animaux ou humains qui ont montré que l'IL-1 est un médiateur important dans le développement de l'inflammation ainsi que l'érosion du cartilage et de l'os au cours des pathologies articulaires (Arend W.P. et Dayer J.M., 1990, Schiff, M.H., 2000). Au cours de ces pathologies, l'IL-1 peut agir seule mais également en synergie avec d'autres cytokines, notamment avec le TNF α (Dinarello C.A., 2000).

IV.1 Site de production d'IL-1 dans l'articulation

L'IL-1 est produite par de nombreux types cellulaires, principalement les monocytes/macrophages mais elle peut également être synthétisée par les chondrocytes et les synoviocytes (Dinarello C.A., 1988 et 1992). L'IL-1 est peu ou pas exprimée par les chondrocytes provenant de cartilage sain. En revanche, la production d'IL-1 est importante dans des chondrocytes de cartilage arthrosique et il en est de même pour d'autres cytokines impliquées dans le métabolisme chondrocytaire comme le TNF α (Henderson B., 1989, Moos V., 1999). Il a également été observé que les chondrocytes arthrosiques produisent plus d'IL-1 que les chondrocytes arthritiques (Melchiorri C., 1998). Une augmentation des récepteurs à l'IL-1 est également observée dans le cartilage de patients arthrosiques (Martel-Pelletier J., 1992, Westacott C.I., 1994), ce qui est corrélé avec une augmentation de la sensibilité du cartilage arthrosique vis-à-vis de l'IL-1 (Ismail S., 1992).

L'IL-1 est retrouvée dans le liquide synovial de patients atteints d'arthropathies inflammatoires et dégénératives (Nouri A.M., 1984). Cependant, de nombreuses études ont montré que la concentration d'IL-1 était plus importante dans le liquide synovial de patients arthritiques que de patients arthrosiques (Kahle P., 1992, Westacott C.I., 1990).

IV.2 Implication de l'IL-1 dans la rupture de l'homéostasie du cartilage

Au cours des pathologies articulaires, l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire est rompu. L'IL-1 ainsi que d'autres cytokines participent à ce déséquilibre. L'IL-1 initie un grand nombre d'évènements conduisant à la dégradation du cartilage, notamment en inhibant la synthèse et en augmentant la dégradation des constituants matriciels. Ainsi l'IL-1 inhibe la capacité du cartilage à résister aux forces de compression et compromet donc la fonction articulaire normale.

IV.2.1 Modification de l'activité anabolique

Les capacités de l'IL-1 à inhiber *in vivo* et *in vitro* la synthèse des constituants matriciels sont aujourd'hui bien établies (Pelletier J.P., 1993, Verschure P.J. et Van Noorden C.J., 1990). Cependant, peu de cibles pharmacologiques ont été identifiées. En effet, l'IL-1 est capable d'inhiber la synthèse de collagène, notamment le collagène de type II (Nelson F., 1998, Pujol J.P., 1991). Récemment, une étude *in vitro* a montré que les effets délétères de

l'IL-1 sur l'anabolisme des PG pouvaient impliquer l'inhibition de l'expression de la glycosaminotransférase-I, enzyme clé de la biosynthèse des glycosaminoglycanes (Gouze J.N., 2001).

Il est à noter que la diminution de la synthèse des PG induite par l'IL-1 varie selon les couches du cartilage (Häuselmann H.J., 1996). Ainsi la baisse d'anabolisme est plus importante dans les cellules de la couche superficielle que dans les cellules de la couche profonde. De plus, des études ont montré que l'IL-1 β induit une plus grande baisse de la synthèse des PG que l'IL-1 α (Häuselmann H.J., 1994 et 1996). L'IL-1 α interviendrait majoritairement dans les phases précoces de la pathologie alors que l'IL-1 β aurait un rôle prédominant dans les stades avancés de la maladie (Moos V., 1999, Van Den Berg W.A. et Bresnihan B., 1999, Van den Berg W.A., 2000).

En plus de la baisse d'anabolisme, l'IL-1 induit aussi des modifications de phénotype chondrocytaire, entraînant, dans des conditions de réparation tissulaire après action prolongée de l'IL-1, la formation d'un tissu de réparation, de type fibreux, fonctionnellement inadéquat.

IV.2.2 Modification de l'activité catabolique

La dégénérescence du cartilage induite par l'IL-1 résulte de la baisse d'anabolisme mais également de l'augmentation du catabolisme des constituants matriciels. La capacité de l'IL-1 à promouvoir la dégradation est assimilée à sa capacité à stimuler la synthèse et la libération de protéases par les chondrocytes et les synoviocytes. En effet, l'IL-1 stimule la synthèse et l'activation, par les cellules de l'articulation, de nombreuses métalloprotéases, telles que la stromélysine-1 (ou MMP-3), la collagénase-1 (ou MMP-1), la collagénase-3 (MMP-13), MMP-8 et la matrilysine (ou MMP-7) (Murphy G., 1985, Ohta S., 1998, Shlopov B.V., 1997). La stromélysine-1 et la collagénase-1 sont retrouvées à des taux élevés dans le cartilage arthrosique. De plus, le taux de stromélysine dans le liquide synovial de patients est corrélé à la sévérité de l'arthrose (Pelletier J.P., 1993).

L'IL-1 est également capable de stimuler la synthèse de l'agrécane (Arner E.C., 2002), de la hyaluronidase (Flannery C.R., 1998) et de l'hexoaminidase, glycosidase lysosomale impliquée dans la dégradation des glycosaminoglycanes (Shikhman A.R., 2000, Stephens R.W., 1975). De plus, l'IL-1 stimule les protéases à sérines, comme la plasmine, qui activent les MMPs (Campbell I.K., 1994).

L'augmentation du catabolisme par l'IL-1 résulte également de la diminution de la sécrétion des inhibiteurs des MMPs : les TIMPs, par des explants de cartilage. En effet, après traitement à l'IL-1, le rapport TIMP-1/stromélysine est diminué de 26 fois dans la couche superficielle de cartilage arthrosique et de 9 fois dans la couche profonde comparé au cartilage sain (Haüselmann H.J., 1996). Ce rapport est similaire à celui observé dans le liquide synovial de patients ayant subi un traumatisme articulaire comparé au liquide synovial de patients sains (Lohmander L.S., 1994).

IV.2.3 IL-1 et arthropathies

L'expression d'IL-1 ainsi que les processus cataboliques qu'elle engendre suggèrent que cette cytokine joue un rôle important dans l'initiation et la progression des pathologies articulaires. Les effets de l'IL-1 sur le cartilage ont été observés *in vitro* mais également *in vivo*, grâce à des modèles expérimentaux. Ainsi, il a été montré qu'une injection intra-articulaire ou un transfert du gène de l'IL-1 induit la dégradation des PG, l'infiltration leucocytaire de la membrane synoviale ainsi que l'expression d'IL-1 et de TNF- α dans le liquide synovial (Ghivizzani S.C, 1997, Hom J.T., 1988, Pettipher E.R., 1986, Van De Loo A.A. et van den Berg W.B., 1990). Dans des explants de cartilage humain arthrosique, une production spontanée d'IL-1 β a été observée en concentration suffisante pour induire la synthèse de monoxyde d'azote, de prostaglandines E2 et d'interleukine-6 (Attur M.G., 1998), qui sont des médiateurs de l'inflammation impliqués dans la dégradation du cartilage (Pelletier J.P. et Martel-Pelletier J., 1989).

Les modèles expérimentaux d'arthropathies permettent de mieux comprendre le rôle et les effets de l'IL-1 sur le cartilage. La modulation de l'expression et des effets délétères de l'IL-1 *in vitro* ou *in vivo*, dans des modèles d'arthrose ou d'arthrite permet d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles. En effet, un traitement effectué avec un anticorps anti-IL-1, anti-CD44 ou avec de l'IL-1Ra, inhibe la dégradation de la matrice cartilagineuse induite par l'IL-1 dans des chondrocytes encapsulés dans des éponges (Neidhart M., 2000).

De même, dans des modèles expérimentaux d'arthrite, l'injection en intraveineuse ou par diffusion continue (pompe) d'IL-1Ra empêche la baisse de synthèse des PG ainsi que l'infiltration de leucocytes dans la cavité articulaire et la membrane synoviale (Henderson B., 1991, Schiff M.H., 2000, Van Lent P.L., 1995). Dans des modèles d'arthrose chez le chien, l'injection intra-articulaire d'IL-1Ra a un effet protecteur vis à vis du développement des ostéophytes et des lésions cartilagineuses et inhibe l'expression de la collagénase-1 (Caron

J.P., 1996). L'étude de souris déficientes en IL-1Ra, développant spontanément des polyarthrites montre la contribution importante de l'IL-1 dans les arthropathies (Hraï.R., 2000).

Une amélioration de la pathologie est observée dans des modèles d'arthrite grâce à l'utilisation d'anticorps anti-IL-1. Ainsi, il a été montré que ce traitement inhibe la baisse de synthèse des PG, l'activité des MMPs, l'inflammation et l'érosion de l'os et du cartilage (Joosten L.A., 1999a, Van Meurs J.B., 1998, Van de Loo F.A., 1998). Une diminution de la COMP présente dans le sérum et de l'érosion de l'os et du cartilage a également été observée lors d'un traitement systémique à l'IL-4 dans un modèle d'arthrite au collagène chez la souris (Joosten L.A., 1999b).

Les nouvelles techniques de transfert de gène permettent également de mettre en évidence le rôle de l'IL-1 dans les arthropathies. En effet, le transfert de gène de l'IL-1 dans l'articulation mime la pathologie arthritique (Ghivizzani S.C., 1997). Dans des modèles d'arthrose, la surexpression d'IL-1Ra dans le genou diminue la progression des lésions expérimentales et induit sa propre expression dans la membrane synoviale (Fernandes J., 1999, Pelletier J.P., 1997). L'infection de synoviocytes arthritiques en culture par un adénovirus codant I κ B α , qui bloque l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1, diminue la production de cytokines et celle de la MMP-1 et MMP-3 (Bondeson J., 1999).

Les effets bénéfiques de l'inhibition de l'IL-1, observés lors des études expérimentales ont été confirmés par des études cliniques récentes. Ainsi, l'administration de récepteur soluble de type I à l'IL-1 chez des patients arthritiques améliore l'état clinique des patients (Drevlow B.E., 1996). De même, l'injection sous cutanée quotidienne d'IL-1Ra diminue l'érosion du cartilage et de l'os de patients arthritiques, suggérant qu'au cours de la maladie un déséquilibre existe entre la production d'IL-1 et celle de l'IL-1Ra (Schiff M.H., 2000, Bresnihan B., 1998).

CHAPITRE III : LES RECEPTEURS NUCLEAIRES : PPAR, ROR

Les facteurs de transcription, PPAR et ROR appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, au même titre que les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, à l'acide rétinoïque, à la vitamine D, aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes. Cette superfamille de régulateurs transcriptionnels comprend à la fois des récepteurs hormonaux classiques et des récepteurs orphelins, qui n'ont pas de ligands endogènes identifiés et sont actifs de façon constitutive en dehors de tout signal extérieur. Les récepteurs nucléaires régulent de nombreuses fonctions biologiques, comme le développement, l'homéostasie mais interviennent également dans les dérèglements pathologiques.

I Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires possèdent 4 domaines structuraux fonctionnels communs. Ainsi ces récepteurs sont constitués d'un **domaine N-terminal variable**, un **domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD)**, d'un **domaine charnière** et enfin d'un **domaine C-terminal de liaison aux ligands (Ligand Binding Domain ou LBD)**, important dans les interactions protéine/protéine et dans l'activation transcriptionnelle (Kumar R. et Thompson E.B., 1999) (Figure 10).

Comme le montre la figure 10, le **domaine N-terminal** ou domaine de régulation (domaine A/B) possède une région AF-1, qui correspond au domaine de transactivation indépendante du ligand (TAF-1). Cette région est la plus variable en terme de longueur et de séquence primaire, ce qui permet l'obtention de différentes isoformes de récepteurs à partir d'un seul gène ancestral commun.

Le **DBD** ou **domaine C** est le domaine le plus conservé entre les différents récepteurs nucléaires. Cette région joue un rôle crucial dans la reconnaissance de séquence spécifique de l'ADN, appelé élément de réponse, ainsi que dans les interactions protéine/protéine. Le domaine C est constitué de deux régions en « doigts de zinc », correspondant à 66-70 acides aminés et d'une extension en C-terminal d'environ 25 acides aminés. Le premier « doigt de zinc » comporte une région impliquée directement dans la reconnaissance de l'élément de réponse sur l'ADN, appelée boîte P ou « P-box ». Le domaine C contient également un autre

sous domaine appelé boîte D ou « D-box », qui permet la reconnaissance de l'espacement entre les deux demi-sites de l'élément de réponse. Ce sous domaine, constitué généralement de 5 acides aminés n'en comporte que trois pour PPAR.

Le **domaine D** ou « **hinge domain** » a pour fonction principale de servir de charnière entre le DBD et le LBD. En effet, cette région permet au DBD de faire une rotation de 180° permettant aux récepteurs dimériques de se fixer à l'ADN (Glass C.K., 1994). Cette région est très variable en longueur et en séquence primaire. Elle possède des éléments constitutifs du signal de localisation nucléaire (également trouvé dans le deuxième doigt de zinc du DBD, Milgrom E., 1999) et permet également la fixation de corépresseur (Chen J.D., 1995, Horlein A.J., 1995).

Le **domaine LBD** ou **domaine E/F** possèdent de multiples fonctions : liaison des ligands, dimérisation, fonction d'activation transcriptionnelle (AF-2) et d'interaction avec des protéines de choc thermique et des coactivateurs. Cette région est constituée de 11-13 hélices α , qui contribuent à former une poche hydrophobe dans laquelle pénètre le ligand. La fixation du ligand induit des modifications conformationnelles, qui permettent au domaine AF-2 d'interagir avec des coactivateurs et ainsi d'induire la transcription de gènes cibles (Bourguet W., 1995, Brzozowski A.M., 1997, Renaud J.P., 1995, Wagner R.L., 1995).

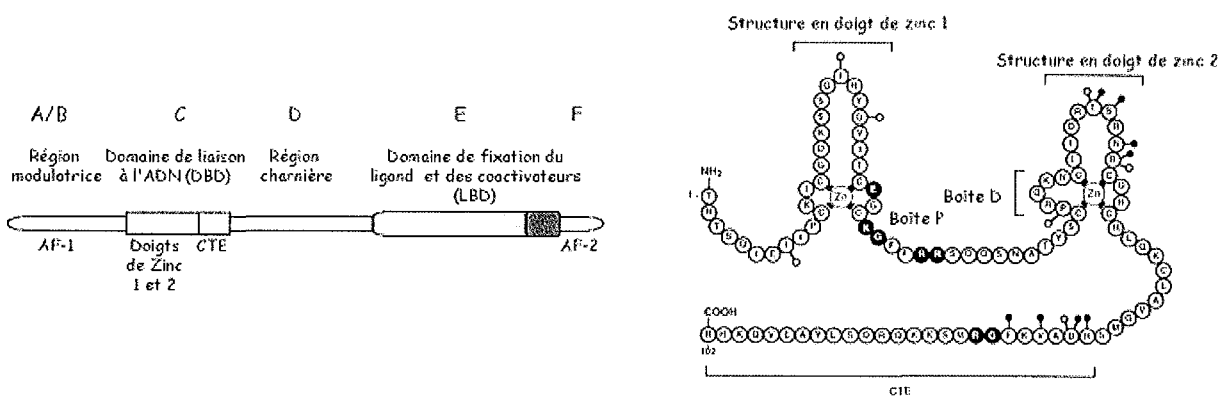


Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines des récepteurs nucléaires et structure en doigts de zinc du domaine DBD (D'après Giguère V., 1999).

Les récepteurs possèdent quatre domaines structuraux fonctionnels communs que sont le domaine A/B, C (ou DBD), D et E/F (ou LBD). Les domaines A/B et D sont variables en longueur et en séquence primaire tandis que les deux autres domaines sont conservés. Les domaines A/B et E/F possèdent une région AF-1 et AF-2 correspondant respectivement au domaine de transactivation indépendante du ligand. Les domaines C et E/F sont constitués de deux régions en "doigt de zinc" et de 11-13 hélices α respectivement.

La suite de ce chapitre est consacrée à l'étude bibliographique des récepteurs nucléaires, PPAR et ROR α . Nous verrons successivement la distribution tissulaire de ces récepteurs, leur

mécanisme d'action ainsi que leur mode d'activation et de régulation. Nous terminerons par leurs rôles physiologiques et pathologiques.

II PPAR, « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor »

Le premier récepteur nucléaire de la famille des PPAR, « peroxisome proliferator-activated receptor » a été cloné en 1990 par Issemann et Green chez la souris, suite à des expériences menées sur les proliférateurs de peroxyssome. Trois isoformes de PPAR ont été ensuite identifiées chez les vertébrés, notamment le xénope, la souris, le rat, le hamster et l'homme. Ces trois isoformes sont appelées PPAR α , PPAR γ et PPAR β (Desvergne B., 1999) et sont codées par trois gènes différents localisés respectivement sur le chromosome 22, 3 et 6 chez l'homme et sur le chromosome 15, 6 et 17 chez la souris (Greene M.E., 1995, Jones P.S., 1995, Sher T., 1993, Yoshikawa T., 1996). PPAR γ existe sous trois formes : γ 1, γ 2 et γ 3 qui résultent d'épissages alternatifs différents pour l'ARNm et du choix différentiel entre deux promoteurs (Fajas L., 1997, Zhu Y., 1995).

II.1 Distribution tissulaire des différentes isoformes

Chaque isoforme de PPAR possède un profil d'expression distinct et tissu dépendant, qui varie au cours du développement.

L'isoforme PPAR α est fortement exprimée dans le cœur, le foie, les reins, l'intestin et le tissu adipeux brun, qui sont des tissus possédant un niveau d'activité catabolique des acides gras important (β -oxydation) (Braissant O., 1996).

En ce qui concerne l'expression de PPAR γ , elle est plus importante dans la rate, l'intestin et le tissu adipeux blanc pour PPAR γ 1 tandis que l'isotype gamma 2 est préférentiellement exprimé dans le tissu adipeux blanc et brun (Braissant O., 1996).

Contrairement à PPAR α et PPAR γ , qui sont exprimés abondamment dans quelques tissus, PPAR β a un niveau d'expression similaire dans tous les tissus. Cependant, des taux élevés de ce récepteur sont retrouvés dans le cerveau, les reins, le petit intestin et les cellules de Sertoli (Amri E.Z., 1995, Braissant O., 1996).

II.2 Régulation transcriptionnelle dépendante de PPAR

II.2.1 Par fixation sur l'élément de réponse (PPRE)

Après activation de PPAR par un ligand endogène ou synthétique, le récepteur forme un hétérodimère avec le facteur de transcription RXR lui-même activé par l'acide-9-cis rétinolique. L'hétérodimère PPAR/RXR ainsi formé se fixe sur un élément de réponse présent dans le promoteur de gènes cibles, entraînant ainsi une modification de leur expression. La séquence consensus reconnue, appelée PPRE (« Proliferator Peroxisome Response Element ») est constituée de deux motifs répétés et séparés par un nucléotide, DR-1 pour « direct repeat one » (Kliwer S.A., 1992). La séquence consensus est la suivante : 5'-AG(G/T)TCA N AG(G/T)TCA-3' et peut varier suivant le gène régulé par les PPAR et l'espèce animale considérée. Le récepteur nucléaire PPAR est fixé en 5' des PPRE tandis que RXR est fixé en 3' (Ijpenberg A., 1997). La séquence de la région 5' flanquante du DR-1 détermine la spécificité de fixation des PPAR sur leur élément de réponse (Hsu M.H., 1998). Ainsi, PPAR α est très spécifique de la région 5' flanquante alors que PPAR γ se fixe au DR-1 indépendamment de cette région (Juge-Aubry C., 1997) (Figure 11).

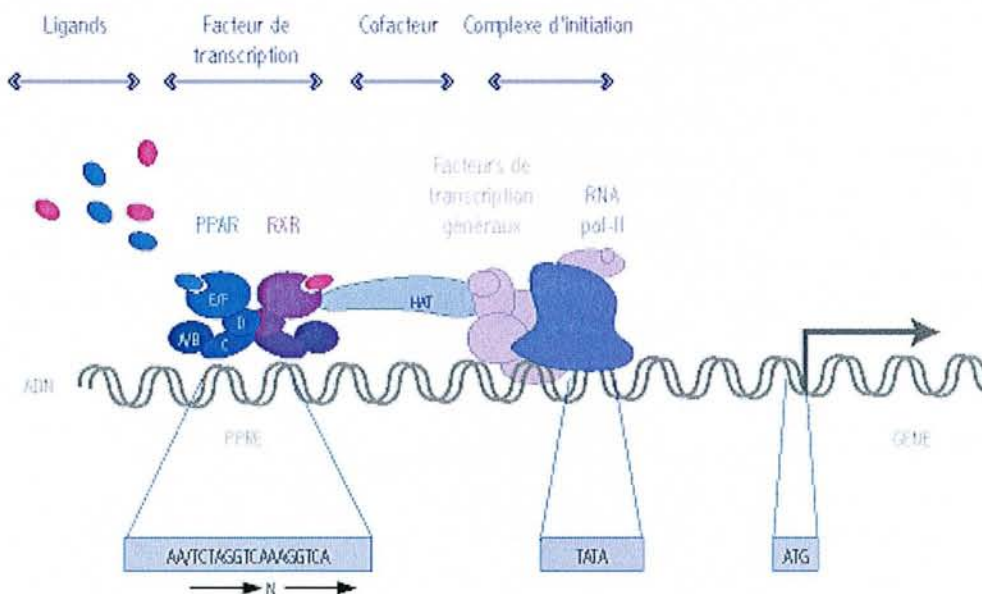


Figure 11 : Représentation schématique de la fixation des PPAR sur leur élément de réponse.

L'hétérodimère PPAR/RXR se fixe sur une séquence consensus 5'-AG(G/T)TCA (N)AGG(G/T)TCA-3', appelé PPRE pour peroxisome proliferator response element. Le récepteur nucléaire PPAR se fixe en 5' des PPRE tandis que RXR se fixe en 3'. Le complexe PPAR/RXR et ses cofacteurs vont interagir avec le complexe d'initiation de la transcription, ce qui va permettre la régulation transcriptionnelle de gènes cibles.

II.2.2 Par interaction avec d'autres facteurs de transcription

Les PPAR peuvent également interagir avec d'autres voies de signalisation dépendante de facteurs de transcription et ainsi réprimer la transcription de gènes cibles de ces facteurs. Il a été montré que les fibrates inhibaient la réponse inflammatoire vasculaire par interaction directe entre PPAR α et les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. En effet, PPAR α est capable d'interagir avec la partie N-terminale de c-Jun, avec le domaine Rel de p65 et avec les domaines C- et N-terminaux de CBP (Delerive P., 1999). De même, PPAR α est capable d'interagir avec le facteur de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Chinetti G., 2000, Zhou Y.C., 1999). Dans des cellules musculaires lisses, la suppression de la transcription du gène codant le récepteur au thromboxane est due à une interaction protéine/protéine entre PPAR γ et Sp1 (Sugawara A., 2002). PPAR γ est capable de se lier à Pax6 et NF- κ B conduisant ainsi à une répression de la transcription du gène du glucagon (Schinner S., 2002) et de l'interleukine-12 respectivement (Chung S.W., 2000).

II.2.3 Gènes régulés par les PPAR

De nombreux gènes, possédant un élément de réponse de type DR-1 sont régulés par les PPAR. Le tableau I présente une liste non exhaustive de gènes régulés positivement ou négativement par les PPAR ainsi que leur fonction. L'un des premiers gènes identifiés comme étant régulé par les PPAR fut l'acyl-CoA-oxydase, une enzyme peroxysomale, qui intervient dans la dégradation des acides gras à longue chaîne (Osumi T., 1991). Les gènes régulés par les PPAR codent des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique et énergétique, comme le stockage de lipides, le transport, l' ω -hydroxylation ou la synthèse des acides gras, la β -oxydation ou la glucogénèse. Ceci confère aux PPAR un rôle important de régulation du métabolisme lipidique et énergétique basal des cellules (Tableau I).

Du fait de la distribution tissulaire des récepteurs PPAR, il a été constaté que PPAR α était impliqué dans la régulation de la β - et ω -oxydation peroxysomale (Dreyer C., 1992), que PPAR γ régulait la différenciation adipocytaire et le stockage lipidique (Tontonoz P., 1994) et que PPAR β jouait un rôle dans le développement et dans les fonctions cérébrales (Peters J.M., 2000). Si l'augmentation d'expression de gènes cibles par les PPAR est bien connue, l'inhibition de l'expression de gènes est peu étudiée.

Gènes cibles	Fonctions	Références
<u>Gènes induits</u>		
<i>Acyl-CoA synthétase</i>	Activation des acides gras	Schoonjans <i>et al</i> , 1995
<i>Acyl-CoA oxidase</i>	β -oxydation peroxysomale	Osumi <i>et al</i> , 1991
<i>Apolipoprotéine A-II</i>	Transport des acides gras	Vu-Dac <i>et al</i> , 1995
<i>aAP2 adipocyte lipid binding protein</i>	Fixation des acides gras	Tontonoz <i>et al</i> , 1994
<i>Enzyme bifonctionnelle peroxysomale</i>	β -oxydation peroxysomale	Zhang <i>et al</i> , 1992
<i>Carnitine palmitoyl transferase I</i>	Transport des acides gras	Mascaro <i>et al</i> , 1998
<i>Cytochrome P450 A1</i>	ω -oxydation	Aldridge <i>et al</i> , 1995
<i>Cytochrome P450 A6</i>	ω -oxydation	Muerhoff <i>et al</i> , 1992
<i>Fatty acid transport protein</i>	Transport des acides gras	Frohnert <i>et al</i> , 1999
<i>Lipoprotéine lipase</i>	Hydrolyse des triglycérides	Schoonjans <i>et al</i> , 1996
<i>Liver Fatty Acid Binding Protein L FABP</i>	Transport des acides gras	Issemann <i>et al</i> , 1992
<i>Enzyme malique</i>	Synthèse des acides gras/production de NADPH	Castelein <i>et al</i> , 1994
<i>Acyl-CoA déshydrogénase</i>	β -oxydation mitochondriale	Gulick <i>et al</i> , 1994
<i>3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase</i>	cétogénèse et synthèse des stéroïdes	Rodriguez <i>et al</i> , 1994
<i>Phosphoénolpyruvate carboxykinase</i>	glucogénèse et néoglucogénèse	Tontonoz <i>et al</i> , 1995
<i>Adipocyte lipid binding protein</i>	Transport des lipides	Tontonoz <i>et al</i> , 1994
<i>Stearoyl-CoA desaturase 1</i>	Désaturation des acides gras	Miller <i>et al</i> , 1996
<i>UCP-1</i>	Thermogénèse	Sears <i>et al</i> , 1996
<u>Gènes réprimés</u>		
<i>Apolipoprotéine AI hépatique</i>	Transport des acides gras	Vu-Dac <i>et al</i> , 1994
<i>Apolipoprotéine CIII hépatique</i>	Transport des acides gras	Hertz <i>et al</i> , 1995
<i>Liver fatty acid synthase</i>	Synthèse des acides gras	Motojima <i>et al</i> , 1992

Tableau I : Gènes régulés par les PPAR.

II.3 Activation et régulation des PPAR

II.3.1 Activation par des ligands naturels et synthétiques des PPAR

Les acides gras insaturés ont été les premiers **ligands naturels** identifiés pour les PPAR (Bocos C., 1995). Ils sont capables d'activer les trois isoformes de PPAR mais avec une affinité plus importante pour PPAR α . Parmi les acides gras insaturés capables d'activer les PPAR, on trouve l'acide palmitique, oléique, linoléique et arachidonique (Banner C.D., 1993). Comparé aux acides gras insaturés, les acides gras saturés activent les PPARs mais ont en général une moins bonne affinité et une faible efficacité (Forman B.M., 1997, Kliewer S.A., 1997, Krey G., 1997). Il est à noter que PPAR α interagit efficacement avec les acides gras saturés et insaturés de même que PPAR β mais avec une plus faible affinité. En revanche, PPAR γ semble plus sélectif et n'est activé efficacement qu'avec quelques acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique et l'acide éicosapentaénoïque (EPA).

Les éicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique, sont également de puissants et sélectifs ligands naturels des PPAR (Forman B.M., 1995). Ainsi la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂

(15d-PGJ₂), dérivé de la prostaglandine D₂, active sélectivement PPAR γ (Forman B.M., 1995, Kliewer S.A., 1995, Yu K., 1995) et l'acide 8(S)-hydroxyeicosatétraénoïque (8(S)-HETE) interagit préférentiellement avec PPAR α (Forman B.M., 1997, Kliewer S.A., 1997, Krey G., 1997). Récemment, il a été montré que des acides gras oxydés tels que des dérivés de phospholipides sont aussi de puissants ligands physiologiques des PPAR (Davies S.S., 2001).

Du fait de l'importance de ces récepteurs dans le métabolisme basal, des ligands spécifiques des PPAR ont été synthétisés afin de les utiliser pour moduler des désordres métaboliques. Ces **ligands synthétiques** incluent notamment des molécules hypolipémiantes, telles que les fibrates. En effet, le clofibrate et le Wy-14,643 activent spécifiquement PPAR α . Les thiazolidinediones, comme la troglitazone, la pioglitazone et la rosiglitazone, sont des agents antidiabétiques, qui activent sélectivement PPAR γ (Berger J., 1996, Lehmann J.M., 1995). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'indométhacine et l'ibuprofène, ainsi que l'ETYA, analogue de l'acide arachidonique sont également capables de se fixer aux PPAR (Dreyer C., 1993, Lehmann J.M., 1997). Peu de ligands spécifiques de PPAR β ont été identifiés. Récemment, des ligands de PPAR β (L 165041), qui sont des dérivés des fibrates ont été synthétisés. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de ce récepteur (Berger J., 1999). Des antagonistes de PPAR α et PPAR γ ont également été produits ce qui a permis d'évaluer le rôle de ces récepteurs et d'ouvrir de nouvelles perspectives pour le traitement de certaines pathologies comme l'obésité et le diabète (Camp H.S., 2001, Kehrer J.P., 2001, Rieusset J., 2002, Wright H.M., 2000).

II.3.2 Régulation des PPAR

II.3.2.1 Par phosphorylation

La régulation de l'activation d'un grand nombre de récepteurs nucléaires, dont les PPAR, est effectuée d'une part lors de la fixation de ligands et d'autre part par phosphorylation. En effet, le traitement à l'insuline d'adipocytes de rat en culture induit la phosphorylation de PPAR α ainsi que l'activité transcriptionnelle de PPAR α et PPAR γ (Shalev A., 1996). Cette phosphorylation s'effectue dans le domaine A/B de PPAR α en position 12 et 21 chez l'homme (Juge-Aubry C.E., 1999) et résulte de l'activation de MAPK

(Mitogen-Activated Protein Kinase) p42/44 (Juge-Aubry C.E., 1999) ou p38 (Barger P.M., 2001).

En ce qui concerne PPAR γ , des études ont montré que ce récepteur est également une phosphoprotéine. La phosphorylation est portée sur la sérine 112 présente dans le domaine A/B du récepteur et régule l'affinité de PPAR γ pour ses ligands (Shao D., 1998). Les MAPK responsables de la phosphorylation de PPAR γ sont essentiellement p42/44 MAPK, p38 MAPK et JNK (Camp H.S. et Tafuri R.S., 1997, Diep Q.N., 2000). Dans la lignée cellulaire CHO, il a été observé un effet synergique d'un traitement à l'insuline et de l'activation de PPAR γ par un ligand. Cet effet synergique est diminué après traitement par des inhibiteurs de MAPK et par conséquent l'effet synergique observé provient de la phosphorylation de PPAR γ induite par l'insuline (Zhang B., 1996).

En outre, la phosphorylation de PPAR n'est pas toujours corrélée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ce facteur. En effet, l'EGF, « Epidermal Growth Factor » et le PDGF, « Platelet-Derived Growth Factor », diminuent l'activité transcriptionnelle de PPAR γ alors que sa phosphorylation est augmentée (Camp H.S., 1999, Hu E., 1996).

II.3.2.2 Par le partenaire RXR

Le complexe fonctionnel de PPAR nécessite l'hétérodimérisation avec le récepteur RXR, qui est activé par l'acide-9-cis rétinoïque.

Des co-traitements avec des ligands spécifiques de ces récepteurs entraînent une induction plus importante des gènes régulés par le complexe PPAR/RXR, que celle observée par les traitements avec les ligands seuls soit de PPAR soit de RXR (Gearing K.L., 1993, Keller H., 1993, Kliewer S.A., 1992).

Le récepteur RXR est également le partenaire d'hétérodimérisation d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR). Ainsi, PPAR et TR peuvent entrer en compétition pour RXR conduisant à une modulation de l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs (Chu R., 1995).

II.3.2.3 Par liaison avec des cofacteurs

Les cofacteurs interagissent directement avec les récepteurs nucléaires et répriment (co-répresseur) ou induisent (co-activateurs) leur activité transcriptionnelle. Ces molécules font le lien entre le facteur de transcription lié à l'ADN et la machinerie d'initiation de la

transcription (Glass C.K., 1997, Horwitz K.B., 1996). Mais ils possèdent également des fonctions enzymatiques.

Deux **co-répresseurs** ont été identifiés, N-CoR (Nuclear Receptor Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor). Ils interagissent avec les récepteurs nucléaires en absence de ligand spécifique et conduisent ainsi à la répression de la transcription. Ces co-répresseurs possèdent une activité enzymatique au sein d'un complexe ayant une activité d'histone déacétylase (Pazin M.J. et Kadonaga J.T., 1997).

Des **co-activateurs** se liant aux PPAR et modulant leur activité transcriptionnelle ont été identifiés. Parmi ces co-activateurs, on retrouve le cofacteur SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1) et CBP/p300 (cAMP-responsive Binding Protein), qui se lient au domaine LBD de PPAR en présence de ligand (Krey G., 1997, Mizukami J. et Taniguchi T., 1997). D'autres co-activateurs sont capables de se lier aux PPAR mais cette fois en absence de ligand. C'est le cas du PBP, PPAR binding protein, qui active modestement la transcription de PPAR γ et qui ne semble pas spécifique de PPAR (Zhu Y., 1997). Le co-activateur, PPAR γ co-activator 1 ou PGC1, est retrouvé dans les mêmes tissus que PPAR γ mais il n'est pas spécifique de ce récepteur (Puigserver P., 1998). Enfin, le co-activateur RIP140, pour Receptor-Interacting Protein 140, se lie au domaine LBD de PPAR et semble être un compétiteur de SRC1 (Treuter E., 1998). Ces co-activateurs ne sont pas spécifiques des récepteurs nucléaires PPAR. Le fait que ces cofacteurs puissent se lier à différents facteurs de transcription ou récepteurs nucléaires indiquent qu'ils jouent un rôle important dans le développement et la différenciation cellulaire en contribuant au choix des voies de signalisation.

Le modèle d'activation de la transcription par les PPAR ainsi que ses interactions avec les cofacteurs est représenté dans la figure 12. Classiquement, il est suggéré qu'en absence de ligand, les récepteurs nucléaires sont liés à leurs co-répresseurs, ce qui mène à une diminution de leur activité transcriptionnelle. La fixation d'un ligand induit un changement de conformation du récepteur nucléaire qui entraîne une dissociation du co-répresseur et la liaison à des co-activateurs. Le complexe récepteur/co-activateurs peut ainsi induire la transcription (Glass C.K., 1997, Moras D. et Gronemeyer H., 1998).

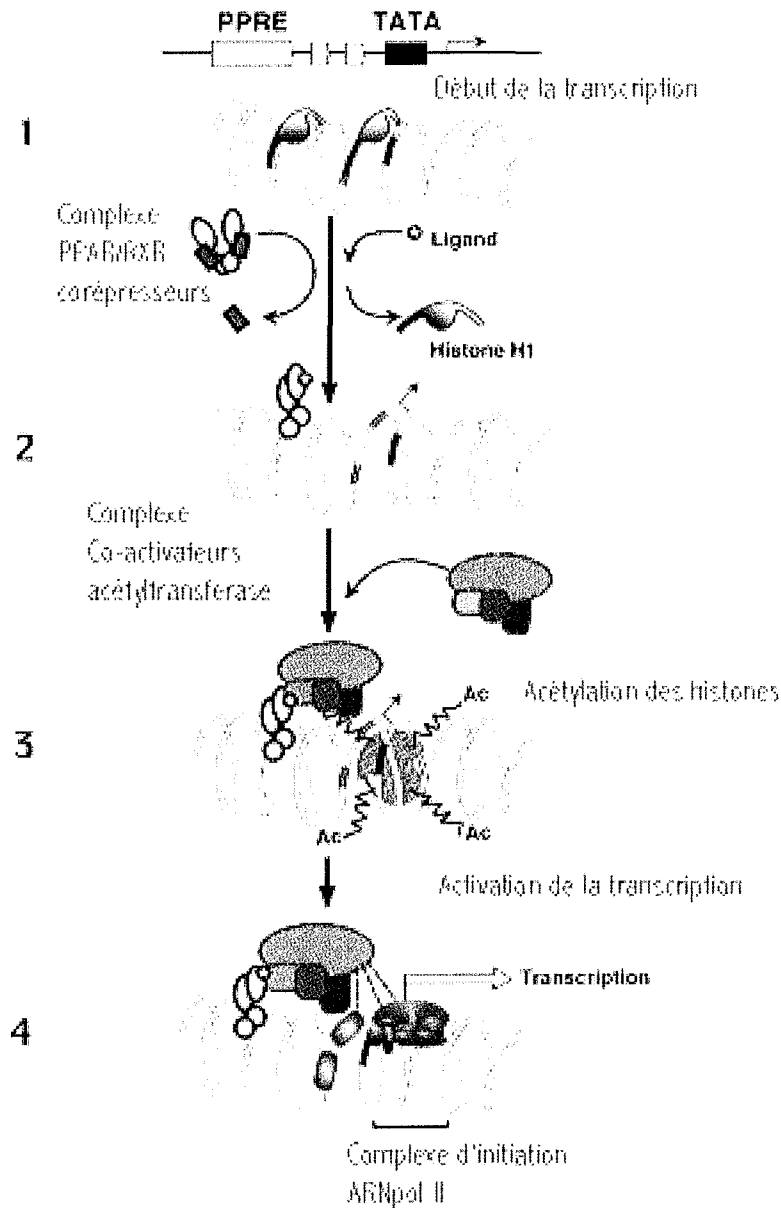


Figure 12 : Interactions PPAR et cofacteurs (D'après Desvergne B. et Wahli W., 1999).

En général, les récepteurs nucléaires en l'absence de ligand sont liés à leurs co-répresseurs. La fixation d'un ligand conduit à un changement de conformation du récepteur nucléaire, ce qui entraîne une dissociation des co-répresseurs et la liaison des co-activateurs. Le complexe récepteur/co-activateurs, lié à l'ADN, peut ainsi moduler la transcription de gènes cibles.

II.3.2.4 Interaction avec d'autres récepteurs nucléaires

Des phénomènes de compétition entre les PPAR et d'autres récepteurs nucléaires ont été observés. Notamment, l'hétérodimère PPAR/RXR peut se lier à un élément de réponse aux oestrogènes (ERE) conduisant à une compétition entre PPAR/RXR et le récepteur aux oestrogènes (Keller H., 1995). De même, la suppression de la transcription du gène apoC-III induite par des hypolipémiants résulte d'une compétition entre PPAR/RXR et HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor) pour le même élément de réponse (Hertz R., 1995). Enfin, le

récepteur nucléaire RevErb α est capable de diminuer la transactivation PPAR α dépendante de l'enzyme bifonctionnelle peroxysomale (Kassam A., 1999).

II.4 Rôle des PPAR

II.4.1 Rôle physiologique

II.4.1.1 Rôle dans le développement

L'expression et la distribution des trois isoformes de PPAR ont été étudiées au cours du développement embryonnaire du xénope (Dreyer C., 1992), de la souris (Beck F., 1992), du rat (Braissant O. et Wahli W., 1998) et de l'homme (Huin C., 2000). Chaque PPAR présente une expression spatio-temporelle, qui lui est propre, suggérant une implication spécifique de ces récepteurs au cours des différentes étapes de l'ontogenèse des organismes. Ainsi il a été montré que PPAR γ et PPAR β jouaient un rôle essentiel dans l'implantation embryonnaire et la différenciation du placenta chez la souris (Barak Y., 1999, Kubota N., 1999). PPAR β participe également au développement, à la régulation du métabolisme lipidique du cerveau (Basu-Modak S., 1999) et à la différenciation de l'épiderme au même titre que PPAR α (Wahli W., 2002). PPAR α est surtout exprimé dans les cellules qui se différencient en rapport probablement avec la mise en œuvre progressive de la β -oxydation des acides gras.

II.4.1.2 Rôle dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie énergétique

Les PPARs régulent un grand nombre de voies associées au métabolisme lipidique. Un équilibre existe entre l'oxydation des acides gras dans le foie par PPAR α et le stockage des lipides dans le tissu adipeux par PPAR γ .

PPAR α est fortement exprimé dans le foie, où il contrôle un ensemble de gènes impliqués dans le catabolisme lipidique. Il joue un rôle dans le transport des acides gras dans la circulation, leur prise en charge par les hépatocytes, l'activation de l'acyl-CoA synthétase ainsi que dans la β -oxydation peroxysomale, mitochondriale et par la ω -oxydation microsomale (Desvergnès B. et Wahli W., 1999). Le rôle de régulation du métabolisme lipidique de PPAR α a été confirmé par la génération de souris pour lesquelles le gène de ce récepteur a été invalidé. Ces souris sont viables et présentent quelques modifications

phénotypiques (la taille) (Lee S.S., 1995). Cependant, lorsqu'elles sont soumises à une période de jeûne, elles ne sont pas capables d'augmenter l'oxydation des lipides et souffrent rapidement d'hypocétonémie, d'hypothermie et hypoglycémie (Kersten S., 1999, Leone T.C., 1999). PPAR α joue également un rôle dans le métabolisme des acides aminés en diminuant leur dégradation (Kersten S., 2001). PPAR α peut ainsi être considéré comme un régulateur du métabolisme énergétique dans le foie, qui coordonne l'utilisation des substrats énergétiques en relation avec l'apport nutritionnel.

Contrairement à PPAR α , PPAR γ est impliqué dans la différenciation adipocytaire et dans le stockage des lipides (Rosen E.D., 2000). PPAR γ a pour gènes cibles : aP2 pour adipocyte fatty acid binding protein, la lipoprotéine lipase, l'acyl-CoA synthase et la FABP pour Fatty Acid Binding Protein. Les souris, pour lesquelles le gène de PPAR γ a été invalidé, ne sont pas viables mais l'étude de souris hétérozygotes pour PPAR γ soumise à un régime riche en lipides a révélé une prédisposition à développer une résistance à l'insuline (Kubota N., 1999). Ceci suggère un rôle de PPAR γ dans le diabète de type 2 (voir I.5.2 PPAR et pathologies).

II.4.1.3 Rôle dans la différenciation cellulaire

Les trois isoformes de PPAR interviennent dans la différenciation de nombreux types cellulaires. En effet, l'activation de PPAR α par des ligands naturels comme les acides gras, induit la différenciation des kératinocytes mais inhibe leur prolifération (Hanley K., 1998). PPAR α serait également impliqué dans la maturation des peroxysomes des cellules HepG2, cellules différenciées provenant d'un hépatocarcinome humain (Stier H., 1998). La différenciation et la croissance des cellules tubulaires et interstitielles des testicules sont contrôlées par PPAR α (Schultz R., 1999)

La différenciation des adipocytes à partir des adipoblastes implique trois facteurs de transcription dont PPAR γ (Auwerx J., 1996). Des études ont montré que PPAR γ modulait la différenciation des cellules musculaires (Hunter J.G., 2001), des monocytes (Tontonoz P., 1998), des cellules des glandes sébacées (Rosenfield R.L., 1999) et des NIH3T3, lignée cellulaire fibroblastique, en adipocytes (Zuo X., 2001). Dans des modèles de cancers du poumon (Mueller E., 1998), du rein (Inoue K., 2001), du colon (Kitamura S., 1999, Sarraf P., 1998) et de la prostate (Kubota T., 1998), la différenciation et la croissance des cellules malignes sont modulées par des ligands de PPAR γ .

En ce qui concerne PPAR β , il a été montré que ce récepteur est fortement exprimé dans les oligodendrocytes différenciés (Granneman J., 1998), dans les cellules épithéliales bronchiques (Matsuura H., 1999) et dans les cellules des glandes sébacées au cours de leur différenciation (Rosenfield R.L., 1999).

II.4.1.4 Rôle dans la prolifération cellulaire

Les proliférateurs de peroxytosome induisent la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire, conduisant à des tumeurs hépatiques chez le rongeur (Marsman D.S., 1988). Ces effets mitogènes s'expliquent en partie par l'induction par PPAR de gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire comme c-myc, cHa-ras, c-fos et c-jun, (Cherkaoui Malki M., 1990, Ledwith B.J., 1993) ou encore des gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire comme les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (Chevalier S. et Roberts R.A., 1999). Ces effets peuvent aussi être dus à la surproduction d'H₂O₂ par suite de l'augmentation de l'activité de l'acyl-CoA oxydase, première enzyme de la β -oxydation des acides gras (Nemali M.R., 1988, Reddy J.K., 1983). Cependant, les effets mitogènes engendrés par les proliférateurs de peroxytosome ne dépendent pas uniquement de l'activité de l'acyl-CoA oxydase car les rats dont les cellules n'expriment plus cette enzyme développent encore des tumeurs hépatiques lors de traitements par les proliférateurs de peroxytosome (Fan C.Y., 1998, Yeldandi A.V., 2000).

Par ailleurs, le rôle de PPAR α dans la prolifération cellulaire a été confirmé par l'étude de souris knock-out pour ce récepteur. Ces souris ne présentent pas d'hépatomégalie ni de prolifération cellulaire lors d'un traitement par des proliférateurs de peroxytosome (Lee S.S., 1995) comparé aux souris qui expriment PPAR α .

Il a également été montré que PPAR β joue un rôle dans la prolifération des kératinocytes (Peters J.M., 2000) et dans la cicatrisation de l'épiderme. En effet, PPAR β est exprimé dans les kératinocytes présents au site de la lésion cutanée et ceci jusqu'à la cicatrisation (Michalik L., 2001).

II.4.1.5 Rôle dans l'apoptose

Les proliférateurs de peroxytomes, qui sont des agents non génotoxiques, inhibent, chez les rongeurs, l'apoptose en induisant la prolifération cellulaire conduisant ainsi au développement de tumeurs (Roberts R.A., 1995) mais également en modulant la synthèse de

protéines telles que bcl2 et Bax, qui sont importantes dans le contrôle de la mort cellulaire programmée (Christensen J.G., 1998). De plus, la transfection transitoire d'hépatocytes de rat en culture primaire, par un variant de PPAR α , incapable de fixer son ligand, diminue l'inhibition exercée par les proliférateurs de peroxyosome sur l'apoptose (Roberts R.A., 1998). Par ailleurs, un proliférateur de peroxyosome, le nafenopine est capable d'inhiber l'apoptose d'hépatocytes en culture induite par le TGF β (Transforming Growth Factor beta) (Bayly A.C., 1994).

En revanche, dans des lignées humaines ou murines de cancer du poumon, l'activation de PPAR γ par des ligands synthétiques ou naturels induit l'apoptose et diminue fortement l'expression de bcl2 (Elstner E., 1998). Des effets similaires, ont été observés dans des lymphocytes B normaux ou malins (Padilla J., 2000), les astrocytes (Chattopadhyay N., 2000), les cellules musculaires lisses (Okura T., 2000), les trophoblastes humains (Schaiff W.T., 2000), les synoviocytes arthritiques (Kawahito Y., 2000) et les lymphocytes T murins (Harris S.G. et Phipps R.P., 2001). Des ligands de PPAR γ et de PPAR α déclenchent l'apoptose dans les macrophages à la suite d'interactions négatives entre PPAR et le facteur anti-apoptotique NF- κ B (Chinetti G., 1998). L'activation de PPAR α induit également l'apoptose de cellules musculaires lisses via la stimulation de la p38 MAPK (Diep Q.N., 2000). Cependant, les mécanismes qui conduisent à l'apoptose induite par PPAR restent très peu connus (Kucharova S. et Farkas R., 2002).

Ces différents résultats montrent que PPAR peut à la fois jouer un rôle anti-apoptotique et pro-apoptotique, et que son action dépend de l'isoforme de ce récepteur nucléaire ainsi que de la nature de la cellule étudiée.

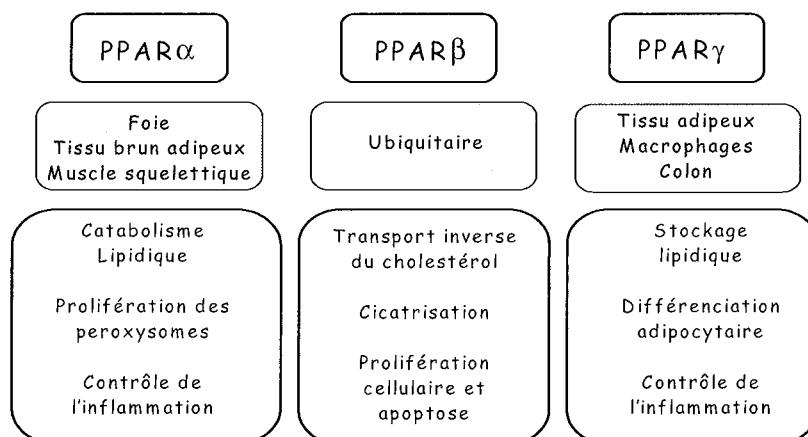


Figure 13 : Distribution tissulaire et rôles des PPAR (D'après Wahli W., 2002).

Les trois isotypes ont une distribution différente dans l'organisme, qui est corrélée avec leurs rôles physiologiques. Les récepteurs nucléaires PPAR jouent un rôle dans le métabolisme lipidique, l'homéostasie du glucose, la différenciation et la prolifération cellulaires ainsi que dans le contrôle de l'inflammation.

II.4.2 Implication des PPAR dans certaines pathologies

II.4.2.1 PPAR, obésité et diabète de type II

Des études ont montré que les fibrates, ligands de PPAR α , sont capables de diminuer l'incidence des maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de diabète de type II (Huttunen J., 1991). De plus, l'administration de fibrates à des rongeurs obèses diminue l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et augmente l'action de l'insuline sur l'utilisation du glucose, en induisant la β -oxydation hépatique (Pineda Torra I., 1999). Une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la masse corporelle chez les rats obèses Zucker a également été observé après administration d'une hormone stéroïdienne, la déhydroépiandrostérone, qui agit en partie via PPAR α . Ces effets résultent d'une diminution de la production de TNF α , qui interfère négativement avec la voie de signalisation de l'insuline (Hotamisligil G.S., 1993, Kimura M., 1998).

Le rôle de PPAR γ dans le diabète de type II est clairement établi par l'efficacité des thiazolidinediones (TZD), ligands spécifiques de PPAR γ , qui améliorent la résistance à l'insuline (Mudaliar S. et Henry R.R., 1999). De nouveaux ligands synthétisés afin de posséder une meilleure affinité pour PPAR γ , sont des modulateurs puissants de l'insuline *in vivo*, confirmant le rôle important de PPAR dans les effets des TZD (Brown K.K., 1999). Cependant, les mécanismes par lesquels PPAR γ module la sensibilité à l'insuline ainsi que les tissus cibles des TZD restent très peu connus. Dans le tissu adipeux, l'activation de PPAR γ par les TZD augmente l'expression de la GlutA, responsable du transport du glucose stimulé par l'insuline (Wu Z., 1998) ainsi que celle d'autres gènes importants impliqués dans l'homéostasie du glucose. En effet, une étude récente a montré que l'administration de rosiglitazone à des patients atteints de diabète de type 2 permettait d'augmenter la concentration plasmatique d'adiponectine, protéine qui augmente l'oxydation des acides gras et diminue la production de glucose par le foie (Yang W.S., 2002). Les TZD permettent également le transport et le stockage dans le tissu adipeux des triglycérides et des acides gras présents dans le foie et les muscles (Way J.M., 2001) (Figure 14). Par ailleurs, les effets des TZD via PPAR γ peuvent aussi être expliqués par la répression de gènes impliqués dans la résistance à l'insuline. En effet, l'activation de PPAR γ réduit, dans le tissu adipeux, le taux de TNF α et de l'IL-6, cytokines impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline associé à l'obésité. (Kern P.A., 2001, Singh Ahuja H., 2001). De même, les TZD répriment

l'expression de la résistine, protéine présente dans le tissu adipeux et induisant la résistance systémique à l'insuline (Steppan C.M., 2001).

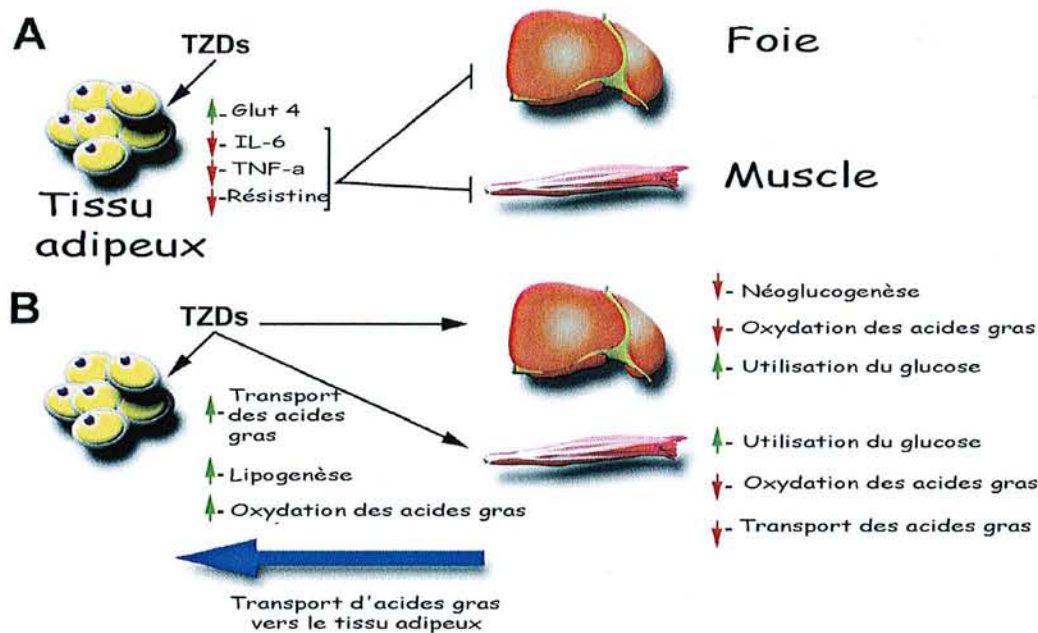


Figure 14 : Action des TZD sur les différents tissus (A) et la redistribution des acides gras (B) (D'après Rosen E.D. et Spiegelman B.M., 2001).

Dans le tissu adipeux, l'activation de PPAR γ par les TZD réduit le taux de TNF α , d'IL-6 et de la résistine, protéines impliquées dans la résistance systémique à l'insuline. Par ailleurs, les TZD augmentent l'expression de la Glut4, protéine responsable du transport du glucose stimulé par l'insuline. Enfin, ces molécules anti-diabétiques permettent le transport et le stockage dans le tissu adipeux des TG et des acides gras présents dans le foie et les muscles.

II.4.2.2 PPAR et Cancer

Un lien entre PPAR et cancer a été établi par le fait que les proliférateurs de peroxydase augmentent considérablement l'incidence des tumeurs hépatiques chez la souris et le rat. Cependant, aucune relation n'a été établie entre les activateurs de PPAR et l'hépatocarcinogénèse humaine (Gariot P., 1983).

De nombreuses études suggèrent un rôle de PPAR γ dans l'arrêt de la croissance cellulaire. En effet, des ligands de PPAR γ sont capables d'induire l'apoptose et d'inhiber la croissance de différentes lignées cellulaires provenant de liposarcome (Tontonoz P., 1997), de cancer humain du poumon (Elstner E., 1998 Mueller E., 1998) et de la prostate (Kubota T., 1998). Selon le type cellulaire étudié, l'inhibition de la croissance peut également être accompagnée d'une accumulation de lipides, d'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire ainsi que d'une inhibition de protéines anti-apoptotiques. En

revanche, dans le cas des tumeurs coliques, PPAR γ induit ou inhibe leur développement selon les cas. L'administration de ligands de PPAR γ cause une augmentation de la taille et de la fréquence de tumeurs du colon chez des souris « min », dont le gène APC («Adenomatous Polyposis Coli») a été invalidé (Lefebvre A.M., 1998, Saez E., 1998). En revanche, des résultats récents montrent que l'activation de PPAR γ réduit l'inflammation colique (Su C.G., 1999) et diminue la prolifération des cellules coliques tumorales en favorisant leur différenciation (Brockman J.A., 1998, Kitamura S., 1999, Sarraf P., 1999). Ces derniers résultats sont confirmés par le fait que des mutations dans le gène de PPAR γ conduisant à la perte de son activité sont souvent associées à l'apparition de tumeurs coliques chez l'homme (Sarraf P., 1999). Ainsi, l'action de PPAR γ sur le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose semble être dépendante du type cellulaire et /ou de la prédisposition génétique à développer un cancer.

L'effet anti-apoptotique de PPAR α a été démontré par des expériences utilisant des souris déficientes en PPAR α et traitées par un puissant proliférateur de peroxyosome, le Wy-14,643. Ces souris ne présentent pas de prolifération cellulaire et ne développent pas de tumeurs hépatiques (Peters J.M., 1997). De plus, PPAR α est impliqué dans le développement des tumeurs dans les cancers du foie, du pancréas et des testicules (Lee S.S., 1995, Schoonjans K., 1996). Ainsi, la nafenopine, ligand de PPAR α , peut supprimer l'apoptose dans le foie *in vitro* (Bayly A.C., 1994). Ces données expérimentales prouvent le rôle de PPAR α dans la formation des tumeurs chez les rongeurs traités par les proliférateurs de peroxyosome.

Dans le cas de PPAR β , l'inhibition de son activité par des anti-inflammatoires non stéroïdiens a pour conséquence une action anti-cancéreuse (He T.C., 1999).

II.4.2.3 PPAR et Inflammation

Le rôle de PPAR dans le contrôle de l'inflammation a tout d'abord été montré par l'étude du leucotriène B4 (LTB4), un eicosanoïde synthétisé par la voie des lipooxygénase à partir de l'acide arachidonique. Le LTB4 est un médiateur de l'inflammation produit rapidement et qui est un ligand de PPAR α . En activant ce facteur de transcription, le LTB4 limite la durée de la réponse inflammatoire, par un mécanisme de rétro-contrôle (Devchand

P.R., 1996, Yokomizo T., 1997). Ainsi, des souris déficientes en PPAR α présentent une réponse inflammatoire prolongée lorsqu'elles sont traitées au LTB₄ (Devchand P.R., 1996).

D'autres travaux ont montré que l'administration de proliférateurs de peroxydase à des souris diminue le statut oxydo-réducteur, la production de cytokines et inhibe la transactivation du facteur nucléaire NF- κ B (Poynter M.E. et Daynes R.A., 1998). En effet, des agonistes de PPAR α inhibent la synthèse d'interleukine-6 et de prostaglandines induite par l'IL-1 β dans des cellules musculaires lisses en interférant avec les voies de NF- κ B, de AP-1 et de STAT (Staels B., 1998). Ces résultats confirment ainsi le rôle de PPAR α dans le contrôle de l'inflammation.

Les PPAR sont également impliqués dans l'athérosclérose. L'activation de PPAR α par des fibrates diminue l'athérosclérose en activant notamment les lipoprotéines lipases et en réprimant l'expression de l'apolipoprotéine CIII (Fruchart J.C., 1999).

Des études récentes ont démontré que PPAR γ participait également au contrôle de l'inflammation, mais son rôle reste controversé et dépend du type cellulaire. L'activation de PPAR γ inhibe l'expression de la MMP-9, enzyme impliquée dans les lésions athérosclérotiques (Marx N., 1998). Ce récepteur active également le récepteur « scavenger » ou CD36 présent dans la membrane des monocytes, ce qui favorise la capture par ces cellules de LDL oxydés et leur transformation en cellules spumeuses (Nagy L., 1998, Tontonoz P., 1998). De même, l'inhibition de l'activation de macrophages par des lipoprotéines de faible poids moléculaire oxydées (oxLDL), comme l'acide 9-hydroxyoctadécadiénique (9-HODE) et le 13-HODE, a été observée (Nagy L., 1998).

L'activation de PPAR γ par la 15d-PGJ₂, dans des macrophages activés, inhibe l'expression de la NO-synthase inductible, de la gélatinase B, ainsi que la production de nitrites et du récepteur scavenger A (Ricote M., 1998). Cette inhibition est due à une activité antagoniste de PPAR γ directe vis à vis de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, d'AP-1 et de STAT. De plus, dans des monocytes humains, l'expression du TNF α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β induite par de l'ester de phorbol est inhibée par un traitement avec des ligands de PPAR γ , comme la 15d-PGJ₂ et la troglitazone (Jiang, C., 1998). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), tels que l'indométhacine possède une activité adipogénique à des concentrations 100 à 1000 fois plus forte que celles nécessaires pour inhiber l'activité des cyclooxygénases. A ces concentrations, les AINS sont des activateurs efficaces de PPAR γ et PPAR α (Lehman J.M., 1997). Ainsi, l'inhibition de la production de cytokines par PPAR peut expliquer l'effet bénéfique des AINS à forte concentration.

Des études récentes ont montré que des ligands de PPAR γ diminuent la production de NO, de cytokines, de MMPs ainsi que la baisse de synthèse des PG dans des chondrocytes et des synoviocytes traités par de l'IL-1 β (Fahmi H., 2001 et 2002, Sabatini M., 2002, Bordji K., 2000). Des résultats similaires ont été observés dans des modèles d'arthrite à l'adjuvant chez la souris ou le rat (Ji J.D., 2001, Kawahito Y., 2000, Shiojiri T., 2002).

Cependant, l'implication de PPAR γ dans les effets anti-inflammatoires observés avec la 15d-PGJ₂ reste controversée. En effet, certaines études montrent que la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation tels que COX-2, l'IL-1, IL-6 ou le TNF α , via un mécanisme indépendant de PPAR γ (Hinz B., 2003, Thieringer R., 2000). Il a également été montré que cette cyclopentenone peut interagir directement avec la voie transcriptionnelle de NF- κ B pour diminuer certains paramètres de l'inflammation (Rossi A., 2000, Straus D.S., 2000). Enfin nombre d'études ont mis en avant l'absence d'effet de ligands synthétiques de PPAR γ comme la troglitazone ou la rosiglitazone (Castrillo A., 2000, Rossi A., 2000, Straus D.S., 2000).

III ROR, « retinoid acid receptor-related orphan receptor »

La famille des récepteurs orphelins apparentés au récepteur de l'acide rétinoïque (ROR) est composée de trois gènes codant trois isoformes de ROR : ROR α , ROR β et ROR γ (Becker-André M., 1993, Carlberg C., 1994, Giguère V., 1994, Hirose T., 1994). Le gène de ROR α chez l'homme codent quatre isotypes (ROR α 1, -2, -3, -4), qui diffèrent par leur extrémité N-terminale (Carlberg C., 1994, Giguère V., 1994). Les trois protéines ROR présentent des structures proches notamment au niveau de leur DBD et LBD, bien que ROR γ soit plus éloigné phylogénétiquement. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'isoforme alpha, ROR α .

III.1 Distribution tissulaire des différentes isoformes de ROR

De manière générale, l'isoforme ROR α est exprimée de manière ubiquitaire. Cependant, des taux plus élevés de cette protéine ont été observés dans les cellules de Purkinje du cervelet, dans la rétine, la rate, les muscles squelettiques et les testicules (Koibuchi N., 1998, Nakagawa S., 1997, Matsui T., 1995, Sashihara S., 1996). Les 4 isoformes de ROR α ont un profil d'expression différent, ainsi ROR α 1 est la seule isoforme

présente dans le thalamus, ROR α 2 et ROR α 3 sont exclusivement détectés dans les testicules tandis que ROR α 4 est présent abondamment dans les leucocytes et la peau (Becker-André M., 1994).

L'isoforme ROR β est retrouvée préférentiellement dans le cerveau, notamment dans l'hypophyse, l'hypothalamus et le thalamus (Becker-André M., 1994). ROR β est également exprimé dans la rétine et la rate (André E., 1998, Baler R., 1996, Chow L., 1998, Schaeren-Wiemers N., 1997).

Le gène de ROR γ est exprimé abondamment dans les muscles squelettiques, mais ce récepteur est retrouvé dans le thymus et à de plus faible taux, dans le pancréas, la prostate, les testicules, le cœur et le foie (He Y.W., 1998, Hirose T., 1994).

III.2 Régulation transcriptionnelle ROR dépendante

III.2.1 Par fixation sur l'élément de réponse (RORE)

Contrairement aux récepteurs nucléaires classiques, comme les récepteurs aux hormones ou PPAR, qui se lient à l'ADN sous forme de dimère, les récepteurs orphelins ROR se lient à leur élément de réponse sous forme de monomère. Cependant, un unique motif de liaison hexamérique n'est pas suffisant pour obtenir une affinité optimale et une spécificité d'interaction protéine/ADN. C'est pourquoi les récepteurs se fixant sous forme de monomère utilisent la partie C-terminale du domaine de liaison à l'ADN pour interagir avec les nucléotides placés en amont du site de l'élément de réponse (Laudet V. et Adelmant G., 1995).

L'élément de réponse sur lequel se fixe le monomère ROR contient au moins un motif AGGTCA et une séquence riche en A/T en amont. De plus, la position -1 en amont de l'élément de réponse est préférentiellement une thymidine tandis que la position -2 n'est pas spécifique (Carlberg C., 1994). Les isoformes ROR α et ROR β peuvent également se fixer sous forme d'homodimères sur un élément de réponse contenant deux motifs de liaison ainsi que la région optimale en amont. Cet élément de réponse est constitué de deux motifs arrangés soit en palindrome sans nucléotide espaceur soit en répétitions directes séparées par 8 nucléotides (Carlberg C., 1994). Ainsi ROR est le seul exemple de récepteur orphelin qui peut se lier à l'ADN sous forme de monomère et d'homodimère.

Les isoformes de ROR α présente des spécificités de liaison à l'ADN différentes bien qu'elles possèdent le même domaine de liaison à l'ADN (DBD). Les différences de spécificité observées entre les isoformes de ROR α sont dues aux interactions distinctes entre la partie riche en A/T en amont de l'élément de réponse et la partie N-terminale du DBD (McBroom L.D., 1995).

III.2.2 Gènes régulés par ROR α

ROR α semble impliqué dans la physiologie et/ou la pathologie hépatique. En effet, ROR α stimule l'expression du gène codant l'alpha-fétoprotéine, protéine plasmatique principalement produite par le foie fœtal et le sac vitellin et dans la régénération ou la carcinogénèse du foie adulte (Chauvet Bois-Joyeux B., 2000). Ces résultats ont été confirmés par des études récentes montrant dans le foie que ROR α contrôle la transcription du gène codant l'apolipoprotéine C-III, glycoprotéine jouant un rôle dans le métabolisme plasmatique des triglycérides (Raspé E., 2001), l'ApoAI (Vu Dac N., 1997) ainsi que celle de l'enzyme bifonctionnelle peroxysomale, impliquée dans la β -oxydation (Winrow C.J., 1998). De même, il a été montré que ROR α peut interagir avec les protéines Sp pour réguler la transcription des prosaposines, molécule précurseur des protéines activant les sphingolipides (SAP, « Sphingolipid-Activating Protein ») (Jin P., 1998).

ROR α module également l'expression de N-myc, qui est un protooncogène (Dussault I. et Giguère V., 1997), de p21 waf/cip-1, régulateur négatif du cycle cellulaire (Schräder M., 1996) et interagit directement avec Nm23, qui est un suppresseur de tumeurs (Paravicini G., 1996). Ceci suggérant un rôle de ROR α dans le contrôle du cycle cellulaire et dans le développement des tumeurs.

L'expression de la 5-lipoxygénase, enzyme clé de la synthèse des leucotriènes, présente un élément de réponse spécifique de ROR α et est régulée négativement par ce récepteur (Steinhilber D., 1995). De même, le gène γ F-crystalline est sous contrôle de deux récepteurs nucléaires, ROR α et le récepteur à l'acide rétinoïque, en compétition pour le même élément de réponse (Tini M., 1995). La surexpression de ROR α 4 dans des cellules HepG2 stimule l'activité de l'enhancer du gène de l'alpha-fétoprotéine (Bois-Joyeux B., 2000).

Des études récentes ont montré que le gène Rev-erb α , récepteur nucléaire orphelin, est un gène cible de ROR α 1. En effet, il possède un élément de réponse pour ROR dans sa région promotrice (Delerive P., 2002, Raspé E., 2002). L'expression de ces récepteurs est induite au

cours de la différenciation des cellules myoblastiques de rat, suggérant ainsi que ces récepteurs possèdent une fonction biologique dans les muscles squelettiques (Delerive P., 2002, Raspé E., 2002).

III.3 Activation et régulation de ROR

III.3.1 Activation par des ligands potentiels de ROR

Le premier **ligand naturel** proposé pour ROR fut la mélatonine, cependant son rôle reste controversé. En effet, une étude a montré que dans l'hypophyse l'ARNm de ROR β et les sites de fixation de la mélatonine ont une distribution tissulaire similaire, suggérant un lien entre ce récepteur nucléaire et la mélatonine (Becker-André M., 1994). De plus, la transactivation de ROR α et ROR β par la mélatonine a été évaluée montrant ainsi un effet dose et concentration efficace (EC50) de 1,1 nM pour ROR α et 3 nM pour ROR β (Becker-André M., 1994, Wiesenberg I., 1995). Les études d'affinité de liaison montrent que les constantes d'affinité de ces récepteurs pour la mélatonine sont similaires à celle observée pour le récepteur à l'acide rétinoïque (Allenby G., 1993, Becker-André M., 1994, Wiesenberg I., 1995). Cependant, la mélatonine possède également ses propres récepteurs membranaires de haute affinité (Dubocovich M.L. et Takahashi J.S., 1987, Reppert S.M., 1988). La répression de la transcription du gène du récepteur aux oestrogènes par la mélatonine dans la lignée cellulaire MCF-7 a été observée (Molis T.M., 1994) suggérant que le gène codant ce récepteur est une cible de la mélatonine. Cependant, ce gène ne possède pas d'élément de réponse pour ROR, ce qui suggère que la réponse de la mélatonine n'est pas dépendante de ROR mais passe par son récepteur membranaire. La question se pose de savoir comment le récepteur à la mélatonine et ROR sont liés d'un point de vue fonctionnel et comment ils rentrent en compétition pour le même ligand.

Une étude récente de cristallographie aux rayons X a montré que le cholestérol pouvait se lier à ROR α . De plus, dans ce même travail les auteurs ont prouvé que le cholestérol ainsi que certains de ses dérivés induisent l'activité transcriptionnelle de ROR α , suggérant un rôle de ROR α dans l'homéostasie du cholestérol (Kallen J.A., 2002).

Comme pour le récepteur nucléaire PPAR, certaines thiazolidinediones, molécules appartenant à la classe des antidiabétiques, ont été décrites comme étant des **ligands synthétiques** de ROR α . Ainsi, le CGP 52608 est capable de se lier et d'activer le récepteur

nucléaire à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Wiesenberg I., 1995). Des analogues du CGP 52608 sont également capables d'activer la transcription d'un gène rapporteur possédant un élément de réponse pour ROR α dans son promoteur (Missbach M., 1996).

Des études de modélisation moléculaire et de mutagenèse dirigée du LBD de ROR α montrent que ce domaine en absence de ligand est dans une conformation spatiale proche de celle déterminée pour les récepteurs de la même famille en présence de ligand. En effet, des résidus hydrophobes volumineux remplissent la poche de liaison au ligand et mime ainsi la présence d'un ligand (Harris J.M., 2002). Ces résultats pourraient expliquer l'activité constitutive de ROR α , qui reste à ce jour un récepteur orphelin.

III.3.2 Régulation par des cofacteurs

Comme nous l'avons précédemment décrit pour les récepteurs PPAR, les récepteurs nucléaires peuvent être liés à des corépresseurs ou des coactivateurs, qui jouent un rôle important dans la régulation de la transcription. ROR α est capable de se lier avec des coactivateurs potentiels connus, comme la protéine interagissant avec le récepteur aux glucocorticoïdes (GRIP-1) et la protéine de liaison aux PPARs (PBP). La cotransfection de GRIP-1 avec un plasmide rapporteur contenant un élément de réponse pour ROR potentialise l'activité transcriptionnelle induite par ROR α , montrant ainsi que GRIP-1 est réellement un coactivateur de ROR α . En revanche, une expérience similaire a été réalisée avec PBP et a montré que PBP ne potentialise pas l'activité transcriptionnelle de ROR α bien qu'il se lie à ce récepteur (Atkins G.B., 1999). Ces résultats montrent que des complexes protéiques contenant GRIP-1 et PBP peuvent se lier avec ROR α , même en l'absence de ligand contrairement aux autres récepteurs nucléaires.

Comme pour PPAR, les protéines N-CoR et SMRT sont des corépresseurs de ROR α *in vitro*. La liaison de ROR α à l'ADN entraîne une modification de la conformation libérant ainsi le corépresseur, N-CoR (Harding H.P., 1997). La protéine Hr codée par le gène *hairless* est également un corépresseur du récepteur aux hormones thyroïdiennes en absence de ligand (Potter G.B., 2001). Récemment il a été montré que cette protéine était également un corépresseur de ROR α (Moraitis A.N., 2002). Contrairement aux autres interactions entre les récepteurs nucléaires et les corépresseurs, Hr se lie à ROR α par deux motifs LXXLL présents dans le domaine de liaison aux ligands, impliqués généralement dans les interactions des

récepteurs et des coactivateurs. Des expériences de mutagenèse ont montré que l'action du corépresseur est maintenue en présence de ligand et que Hr ne rentre pas en compétition avec les mêmes sites de liaison que les coactivateurs présents à la surface du LBD de ROR α .

III.4 Rôles du récepteur nucléaire ROR α

III.4.1 Rôle physiologique

Des études de souris mutante ou knock-out pour ROR α ont permis de déterminer les fonctions physiologiques de ce récepteur. En effet, les souris *staggerer*, exprimant une forme tronquée de ROR α au niveau de son domaine de liaison au ligand, présentent une ataxie, une neurodégénérescence (Herrup K. et Mullen R.J., 1979, Sidman R.L., 1962, Zanjani H.S., 1994) ainsi qu'une immunité anormale (Trenkner E. et Hoffmann M.K., 1986) incluant une hyperproduction de cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) comparées aux souris sauvages (C57BL6 +/+) (Kopmels B., 1992). Ces souris sont également de petite taille, souffrent de tremblements, ont des pertes d'équilibre et meurent peu de temps après le sevrage (Sidman R.L., 1962). Ces résultats montrent que ROR α , et plus particulièrement les isoformes 1 et 4 affectées par la mutation (Matysiak-Scholze U. et Nehls M., 1997), jouent un rôle important dans le développement du système nerveux central. Des souris knock-out pour ROR α présentent les mêmes symptômes que les souris *staggerer* montrant que les déficiences observées impliquent réellement ce récepteur nucléaire (Steinmayr M., 1998). L'absence de ROR α chez ces souris provoque une perte massive des cellules de Purkinje conduisant à un développement cérébral anormal. Ceci suggère que ROR α est nécessaire à la maturation de ces cellules.

L'étude de souris *staggerer* a également permis de mettre en évidence d'autres rôles physiologiques de ROR α . Ainsi, des souris *staggerer* nourries avec un régime riche en lipides, développent une sévère athérosclérose et une hypoalphalipoprotéïnémie, associée à une diminution du taux plasmatique des HDL majoritaires, ApoA-I et ApoA-II. Cette diminution du taux de ApoA-I chez ces souris résulte d'une diminution de l'expression de ce gène dans l'intestin (Mamontova A., 1998). Ceci suggère que ROR α joue un rôle dans le contrôle du métabolisme lipidique.

ROR α est impliqué dans le développement et le métabolisme osseux. En effet, les souris *staggerer* présentent des os de diamètre réduit de même qu'une densité minérale osseuse

réduite au niveau du tibia en comparaison aux souris sauvages. Ces résultats montrent que ROR α possède un rôle de régulateur du métabolisme osseux. Cependant, l'ostéopénie observée chez ces souris n'est pas la conséquence unique de l'absence de ROR α , car ces souris présentent de fort taux de cytokines qui stimulent la résorption osseuse (Meyer T., 2000). En conclusion, ROR α est nécessaire pour le développement normal des os. De plus, l'implication de ce récepteur dans le métabolisme osseux a également été démontrée par des expériences réalisées *in vitro*. L'expression de ROR α est augmentée pendant la différenciation des cellules de la moelle osseuse humaine en ostéoblastes. Les expériences de surexpression de ROR α montrent également que ce récepteur est capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle du promoteur de la sialoprotéine osseuse (BSP) de souris, protéine modulant la minéralisation. En revanche, il diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'ostéocalcine (OC), qui est un marqueur de la formation de l'os activé par la vitamine D (Meyer T., 2000).

ROR α est exprimé de manière constitutive dans les muscles squelettiques et intervient dans la différenciation des myoblastes. La transfection de cellules issues d'une lignée de myoblastes par un dominant-négatif de ROR α diminue l'expression de MyoD, activateur musculaire spécifique de la différenciation, qui réprime la prolifération cellulaire. Ceci suggère ainsi une fonction de régulateur positif de ROR α sur la prolifération cellulaire. Le mécanisme d'action de ROR α interagit directement avec MyoD et le cofacteur p300 (Lau P., 1999).

III.4.2 Rôle dans les pathologies

ROR α peut également jouer un rôle dans le contrôle de certaines pathologies comme le cancer et les pathologies inflammatoires. Des études réalisées *in vitro* sur des cultures de cellules cancéreuses de la prostate androgène indépendante (DU 145) ont montré que l'activation de ROR α diminue la prolifération cellulaire et affecte la progression du cycle cellulaire par modulation de gènes. De plus, l'utilisation de CGP 52608, agoniste de ROR α , diminue les capacités d'invasion et de migration des cellules DU 145 par modification d'expression de certaines intégrines (alpha V bêta 3 intégrine et bêta 4 intégrine) (Moretti R.M., 2002).

La surexpression de ROR α dans des cellules musculaires lisses aortiques humaines inhibe l'expression de l'IL-6, IL-8 et de COX-2 induite par le TNF α . ROR α régule la réponse inflammatoire induite par ces cytokines en interagissant directement sur la voie de

signalisation de NF- κ B. En effet, ROR α augmente l'expression d'I κ B α , sous-unité inhibitrice de NF- κ B, grâce à un élément de réponse (RORE) présent dans le promoteur de ce gène et diminue ainsi la translocation de p65 dans le noyau (Delerive P., 2001). Ces résultats suggèrent que ROR α est une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de pathologies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose et l'arthrite rhumatoïde.

La potentialité de ROR α à moduler l'inflammation a été testée dans un modèle d'arthrite à l'adjuvant complet de Freund chez le rat. Pour cela, le CGP 52608, molécule appartenant à la classe des thiazolidinediones, a été utilisé pour ses capacités à se lier et à activer ROR α (Wiesenberg I., 1995). Dans ce modèle, l'administration quotidienne *per os* de CGP 52608 ou d'analogues diminue de manière dose dépendante l'œdème des pattes postérieures (Missbach M., 1996, Wiesenberg I., 1998). De plus, l'étude des membres inférieurs par radiographie montre que le traitement diminue la dégradation du cartilage (Missbach M., 1996). Cependant, les mécanismes intracellulaires suivant l'activation de ROR α et aboutissant aux effets anti-arthritiques observés avec le CGP 52608 restent à explorer.

Stratégie de l'étude

Au cours des pathologies articulaires inflammatoires (arthrite) ou dégénératives (arthrose), un rôle majeur est attribué aux cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , qui favorise l'atteinte cartilagineuse en diminuant la biosynthèse des constituants matriciels et en augmentant leur dégradation. Ainsi, un grand intérêt est porté pour la modulation des effets de l'IL-1 afin de prévenir la destruction du cartilage au cours de ces arthropathies.

Pour cela, nous avons étudié trois facteurs de transcription, PPAR α , PPAR γ et ROR α , qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires comme les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et à l'acide rétinoïque. Ces facteurs de transcription régulent l'expression de gènes en réponse à des ligands endogènes ou exogènes. Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie du glucose, le métabolisme lipidique et la différenciation adipocytaire. Plus récemment, il a été démontré que ces récepteurs pouvaient moduler l'inflammation en régulant l'expression de certaines cytokines comme l'IL-1, le TNF α et l'IL-6. Compte tenu du rôle anti-inflammatoire décrit pour certains ligands dans de nombreux types cellulaires, nous formulons l'hypothèse que ces mêmes ligands sont susceptibles de moduler les effets de l'IL-1 β sur le cartilage.

Notre travail de thèse a donc pour objectif d'étudier la potentialité de ligands spécifiques de ces récepteurs à moduler les effets de l'IL-1 β ou du LPS sur les tissus de l'articulation. Au cours de ce travail, nous avons plus particulièrement cherché à mieux comprendre le mécanisme d'action de la 15d-PGJ₂, ligand naturel de PPAR γ

Pour répondre à notre objectif, notre travail de recherche s'est déroulé en trois grands axes :

- Le premier axe a consisté à mettre en évidence la présence de PPAR α , PPAR γ et ROR α , dans des cultures de chondrocytes humains et de synoviocytes de type B de rat. Nous avons également étudié la modulation de leur expression après traitement des chondrocytes à l'IL-1 β et des synoviocytes au LPS.
- Le deuxième axe a consisté à évaluer les effets de ligands spécifiques de ces récepteurs sur certains paramètres de l'inflammation induits par l'IL-1 β ou par le LPS ainsi que sur la voie de signalisation de l'IL-1 β et du LPS.

- Au cours de la troisième phase du travail, nous avons cherché à montrer si les effets observés avec la 15d-PGJ₂ sont dépendants de PPAR γ . De plus, nous avons tenté d'explorer et d'identifier les cibles intracellulaires potentielles de la 15d-PGJ₂ dans la voie de signalisation de NF- κ B.

Matériels et Méthodes

I Réactifs

I.1 Réactifs de Biologie cellulaire

Le milieu DMEM/Ham's F12, la glutamine, le sérum de veau fœtal, la solution de pénicilline-streptomycine, le PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} , la dispase/collagénase ainsi que la solution de trypsine-EDTA proviennent de Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

L'alginate de calcium, la pronase, l'interleukine-1 β recombinante de rat (IL-1 β) et le lipopolysaccharide *E.coli* 0111:B4 (LPS) proviennent de Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). L'interleukine-1 β recombinante humaine provient de Peprotech, Tebu (Le Perray en Yvelines, France). La collagénase B provient de Roche Diagnostics (Meylan, France).

La 15 déoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandine J2 (15d-PGJ₂) et le Wy 14,643 proviennent de Calbiochem, VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Le CGP 52608 a été fourni par Novartis Pharma AG, Basel, Suisse. La troglitazone et la rosiglitazone ont été fournies par le Laboratoire Servier, Suresnes, France.

I.2 Réactifs de Biologie moléculaire

La solution de Trizol®, la M-MLV reverse transcriptase, les désoxynucléotides triphosphates (dNTP), les hexanucléotides, le DTT et le tampon Tris/Borate/EDTA proviennent de Invitrogen. La Taq polymérase, le tampon de PCR, la solution de MgCl_2 proviennent de Eurobio (Les Ulis, France). La polymérase de Klenow et le tampon de lyse passive CCLR 1X proviennent de Promega (Charbonnières les Bains, France). Le kit de PCR quantitative en temps réel provient de Qiagen (Courtaboeuf, France). Le mélange d'inhibiteurs de protéases est fourni par Roche Diagnostics.

Les milieux de culture de bactéries : LB et LB agar sont fournis par Sigma Aldrich, de même que la membrane de polyvinylidenedifluoride (PVDF), la luciférine, le O-nitrophényl β -D-galactopyranoside (ONPG) et le dIdC.

L'agent de transfection utilisé est le polyéthylénimine (PEI) fourni par Euromedex (Souffelweyersheim, France).

Les anticorps anti-I κ B α phopshorylé, I κ B α , IKK α , IKK β , IKK α/β phopshorylé proviennent de Cell Signaling (St Quentin en Yvelines, France). Les anticorps anti-p65, c-jun, c-fos, p50, β -actine, ROR α , PPAR α et PPAR γ proviennent de Santa Cruz, Tebu (Le Perray

en Yvelines, France). Le système de révélation de western-blot contenant le substrat ainsi que l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est fourni par Cell Signaling.

II Culture cellulaire

II.1 Cultures primaires de chondrocytes humains ou de rat

II.1.1 Obtention des chondrocytes

Les chondrocytes humains sont obtenus à partir de cartilage articulaire provenant de pièces opératoires prélevées lors d'interventions chirurgicales (mise en place de prothèse de hanche ou de genou). Les chondrocytes de rat sont obtenus à partir de têtes fémorales prélevées dans des conditions stériles immédiatement après sacrifice des animaux. Les fragments de cartilage ainsi obtenus sont rincés dans du sérum physiologique contenant 1% (v/v) d'une solution de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (100 µg/ml). Les chondrocytes sont isolés de la matrice cartilagineuse après deux digestions successives à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Dans un premier temps, les explants sont placés pendant 2 heures dans une solution de pronase à 2mg/ml reconstituée dans du sérum physiologique en présence d'une solution de pénicilline-streptomycine (100 U/ml-100 µg/ml). Les fragments sont ensuite digérés pendant une nuit par une solution de collagénase B à 1,5 mg/ml reconstituée dans du milieu DMEM/Ham's F12 supplémenté en glutamine (2 mM) et pénicilline-streptomycine (100 U/ml-100 µg/ml). Cette dernière digestion permet de dégrader les fibres de collagène et ainsi de libérer les chondrocytes. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de milieu complet : milieu DMEM/Ham's F12 complémenté avec de la glutamine (2mM), de la pénicilline-streptomycine (100 U/ml-100 µg/ml) et 10% de sérum veau fœtal (SVF). Le culot cellulaire est récupéré après centrifugation à 1200 tours/min pendant 10 min puis les cellules sont mises en culture dans des flacons de culture de 75 cm².

II.1.2 Culture des chondrocytes en monocouche

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de Pétri ou des flacons de 75 cm² en présence de milieu DMEM/Ham's F12 contenant 10% de SVF, 1% de glutamine (2 mM) et de 1% pénicilline-streptomycine (100 U/ml-100 µg/ml) (milieu complet). Les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. A confluence, le tapis cellulaire est rincé par du PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ et mis en présence d'une solution de

trypsine (0,05%)-EDTA (0,02%) pendant 5-10 minutes à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de milieu complet et la suspension cellulaire obtenue est centrifugée à 1200 tours/min pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans du milieu complet, les cellules sont comptées sur cellule de Malassez avant d'être mises en culture dans de nouvelles boîtes. Toutes les études ont été réalisées sur des cultures primaires, de premier ou de second passage.

II.1.3 Système de culture tridimensionnel en billes d'alginate

Les cultures en billes d'alginate sont réalisées pour les études de la synthèse des PG par mesure de l'incorporation de sulfate radiomarqué. L'alginate va ainsi constituer une matrice tridimensionnelle conférant aux cellules un environnement plus proche de celui du cartilage. La mise en culture est réalisée selon la méthode d'Haüselmann et *coll*, 1992. Après action de la trypsine sur des chondrocytes cultivés en monocouche, le culot cellulaire est mis en suspension dans une solution filtrée d'alginate extrait de *Macrocystis pyrifera* de faible viscosité (1,2% p/v dans du sérum physiologique) à raison de 5 millions de cellules par ml. La suspension cellulaire est alors versée goutte à goutte à l'aide d'une seringue dans une solution stérile de CaCl₂ à 100 mM. Les cellules sont encapsulées au sein du polymère d'alginate qui gélifie en présence de Ca²⁺. Après formation et incubation pendant 15 minutes dans la solution calcique, les billes sont rincées deux fois dans une solution de NaCl 0,15 M, puis une dernière fois dans du milieu complet. Les billes sont ensuite réparties à raison de 5 billes par puits de plaques 24 puits et maintenues en culture pendant une semaine à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

II.2 Culture primaire de synoviocytes de rat

II.2.1 Obtention de synoviocytes de type B

Les synoviocytes B de rat sont obtenus à partir de membranes synoviales prélevées dans des conditions stériles après sacrifice des animaux. Les tissus sont rincés avec du sérum physiologique complété par 1% de pénicilline-streptomycine. Les synoviocytes de type A et B sont isolés après digestion des membranes pendant 12 heures par une solution de collagénase-dispase (1,5 mg/ml), reconstituée dans du milieu DMEM/Ham's F12 contenant

1% de pénicilline-streptomycine et 1% de glutamine. Cette digestion est réalisée à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Après arrêt de la digestion par ajout de milieu complet, les cellules sont centrifugées à 1200 tours/min pendant 5 minutes. Les synoviocytes sont ensuite mis en culture dans des flacons de 75 cm² dans du milieu complet. Les cellules sont cultivées pendant 3 passages afin de sélectionner les synoviocytes de type B, les synoviocytes de type A macrophagiques étant éliminés au cours de ces passages. Pour toutes nos études, les synoviocytes de type B sont utilisés entre le passage 3 et 6, où ils expriment un phénotype fibroblastique.

II.2.2 Culture de synoviocytes de type B

Les synoviocytes sont mis en culture dans des flacons de 75 cm² et cultivés à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. A confluence, les cellules sont rincées au PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ puis détachées à l'aide d'une solution de trypsine (0,05%)-EDTA (0,02%) après une incubation de 5 minutes à 37°C. Après comptage, les cellules sont mises en culture à raison de 1 million par flacon de 75 cm².

II.3 Traitement des cellules en culture

12 heures avant tout traitement, les cellules sont cultivées dans du milieu complet contenant 1% de SVF. La même concentration de SVF est maintenue pendant les traitements.

II.3.1 Traitement des cultures de chondrocytes

Les chondrocytes humains et de rat ont été traités respectivement avec de l'interleukine-1 β recombinante humaine et de rat (IL-1 β). Afin d'évaluer les effets de l'IL-1 β humaine sur l'expression des récepteurs nucléaires, les chondrocytes humains ont été stimulés par des concentrations croissantes d'IL-1 β (2,5 à 250 unités /ml) pendant 1 ou 12 heures. Pour les études suivantes, la concentration d'IL-1 β utilisée est de 50 unités /ml pour le traitement des chondrocytes humains. Les chondrocytes de rat sont traités par 10 ng/ml d'IL-1 β de rat. Le temps d'incubation de ces cultures avec l'IL-1 β est adapté aux différentes expériences réalisées.

L'incubation en présence des ligands spécifiques des récepteurs nucléaires, PPAR alpha, gamma et ROR alpha, ou leur véhicule (0,1% de DMSO en concentration finale) est effectué 1 heure avant le traitement par l'IL-1 β . Les ligands testés sont : la 15 déoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandine J2 (15d-PGJ₂), la troglitazone (Tro) et la rosiglitazone (Rosi), qui appartiennent à la famille des thiazolidinediones pour PPAR γ , le Wy 14,643 (Wy) pour PPAR α et le CGP52608 (CGP) pour ROR α . Après des expériences préliminaires d'effets/doses, les ligands ont été utilisés à une concentration de 10 μ M sauf le Wy 14,643 qui a été utilisé à une concentration de 250 μ M. Tous ces ligands ont été mis en solution dans du DMSO.

II.3.2 Traitement des cultures de synoviocytes

Les synoviocytes B sont traités par du lipopolysaccharide provenant d'*Escherichia Coli 0111*(LPS) à une concentration de 10 μ g/ml pendant différents temps selon les expériences réalisées. Comme pour les cultures de chondrocytes, les synoviocytes sont mis en présence des ligands 1 heure avant le traitement au LPS dans du milieu complet contenant 1% de SVF. Les ligands testés sont la 15d-PGJ₂ et la troglitazone aux mêmes concentrations que celles utilisées précédemment pour le traitement des chondrocytes.

III Etude des effets des traitements sur différents paramètres de l'inflammation

III.1 Mesure de la synthèse des protéoglycanes (PG)

L'étude de la synthèse des PG repose sur une estimation de l'incorporation de sulfate radiomarqué (SO_4^{2-}) dans les PG néosynthétisés *in vitro* par des chondrocytes encapsulés dans des billes d'alginate. Après 24 heures de traitement avec l'IL-1 β , les surnageants sont récupérés afin d'évaluer la quantité de nitrites produits. Les chondrocytes encapsulés dans les billes sont alors incubés à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 3 heures dans du milieu complet contenant 1% de SVF et 10 μ Ci/ml de sulfate de sodium radiomarqué ($\text{Na}^{35}\text{SO}_4^{2-}$, NEN, Les Ulis, France). La radioactivité non incorporée est éliminée par lavage des billes dans des solutions de NaCl (0,15 M). Les billes sont ensuite transférées dans des tubes de comptage, où elles vont être solubilisées par addition de 0,5 ml/tube de soluène 350 (Packard, Rungis,

France) pendant 24 heures à 40°C. Après ajout de liquide de scintillation (Hionic-Fluor, Packard), l'incorporation d'élément radiomarqué est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb 2100TR, Packard).

III.2 Evaluation de la production de nitrites

Le monoxyde d'azote ayant une demi-vie très courte, son dosage se fait par une méthode indirecte qui consiste à doser la quantité de nitrites, un de ses produits d'oxydation stables. Les nitrites accumulés dans les milieux de culture sont dosés selon la méthode de Griess (Green et coll., 1982). A 100 µl de surnageant sont ajoutés 100 µl de réactif de Griess, qui est composé d'un mélange volume/volume de deux solutions (la solution A : 0,1% de dihydrochlorhydrate de N-(1-naphtyl) éthylène diamine reconstituée dans de l'eau bidistillée; la solution B : 1% de sulfanilamide préparé dans une solution d'acide phosphorique à 5%). La densité optique à 550 nm est directement lue sur un lecteur de microplaques (MIR5000, Dynatech, France). La concentration de nitrites est déterminée à l'aide d'une gamme étalon de nitrites de sodium variant de 0 à 50 µM réalisée dans les mêmes conditions.

III.3 Evaluation de la production de prostaglandines E2

Les concentrations de prostaglandines E2 (PGE2) accumulées dans les milieux de culture sont déterminées par une méthode enzymatique en microplaque 96 puits, de type ELISA par compétition (Oxford Biomedical, Euromedex). 50 µl de milieu sont incubés pendant 1 heure à température ambiante en présence d'un conjugué PGE2 marqué à la peroxydase de raifort dans les puits des plaques recouverts par un anticorps monoclonal de souris anti-PGE2. Après lavage, le conjugué fixé est révélé par addition d'un mélange de 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (TMB) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Après incubation de 30 minutes à température ambiante, la réaction est arrêtée par addition de 75µl d'une solution d'HCl 1 M.

Une gamme étalon de PGE2 comprise entre 0,1 et 4 ng/ml est réalisée dans les mêmes conditions. La densité optique est lue à 450 nm contre le blanc à l'aide d'un lecteur de plaques. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'absorbance (B) par rapport à l'absorbance maximale obtenue avec le traceur seul (Bo). La courbe d'étalonnage est

exprimée après transformation logarithmique $\text{Log } \%B/B_0=f(\text{Log}[PGE2])$ et la concentration en PGE2 est ainsi déterminée.

III.4 Evaluation de la production d'interleukine-1 β

Les concentrations d'interleukine-1 β accumulées dans les milieux de culture sont déterminées par une méthode enzymatique en microplaque 96 puits, de type ELISA (Biosource International, Montrouge, France). 50 μ l de milieu sont incubés pendant 2 heures à température ambiante en présence d'un anticorps anti-IL-1 β biotinylé dans les puits des plaques recouverts pas un anticorps anti-IL-1 β . Après lavage, l'anticorps biotinylé fixé est révélé, après une incubation de 30 minutes en présence d'enzyme streptavidine-peroxydase, par addition d'un mélange de 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (TMB). Après incubation à l'obscurité de 25 minutes à température ambiante, la réaction est arrêtée par addition de 100 μ l d'une solution d'HCl 1 M.

Une gamme étalon d'IL-1 β comprise entre 3,9 et 250 pg/ml est réalisée dans les mêmes conditions afin de déterminer la concentration d'IL-1 β produite. La densité optique est lue à 450 nm contre le blanc à l'aide d'un lecteur de plaques.

IV Etude de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel

IV.1 Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN sont effectuées à partir des cultures de chondrocytes humains, de rat et de synoviocytes B de rat en monocouche à l'issue de chaque série de traitement. Les ARN totaux sont extraits selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). Les cultures sont rincées dans du PBS froid sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ avant d'être incubées dans une solution de Trizol®. Le Trizol® contient principalement du phénol et de l'isothiocyanate de guanidium, destiné à dissocier les protéines. Les extraits cellulaires sont récupérés et les protéines sont précipitées par ajout de chloroforme (1/5^{ème} du volume total). Après agitation rapide au vortex et une incubation de 5 minutes dans la glace, les échantillons sont centrifugés pendant 20 minutes à 16000 g et à 4°C. Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont recueillies et sont précipités par ajout d'un volume d'isopropanol. Après homogénéisation et incubation à -80°C pendant 30 minutes, les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes à 16000 g et à 4°C.

Les culots d'ARN sont ensuite lavés à l'éthanol 70% (v/v), puis séchés à l'air avant d'être repris dans 20-40 µl d'eau ultra pure. La concentration des ARN totaux est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm, en tenant compte du facteur de dilution et du fait qu'une unité de DO équivaut à 40 µg/ml d'ARN. La pureté des ARN totaux est évaluée par une double mesure à 260 et 280 nm. Les expériences ont été réalisées avec des ARN totaux pour lesquels le rapport de DO 260/280 nm était supérieur à 1,6 signifiant une pureté satisfaisante. Les ARN totaux sont conservés à -80°C.

IV.2 RT-PCR quantitative multistandard et semi-quantitative

La technique de RT-PCR quantitative prend en compte la similitude de séquence du gène d'intérêt et d'un gène de référence (β -actine) entre deux espèces, ici l'homme et le rat. Elle est basée sur la réalisation d'une transcription inverse (RT) à partir d'un mélange d'ARN de deux espèces différentes : ARN de chondrocytes humains sur lesquels sont réalisés les expériences et ARN de chondrocytes de rat servant de standard interne à la réaction. Les PCR sont normalement réalisées avec les ADNc obtenus à partir du mélange des 2 populations d'ARN (2 espèces). Les produits de PCR spécifiques des 2 espèces seront ensuite séparés sur un gel d'agarose grâce à un polymorphisme de restriction. Les 2 produits de PCR pourront ainsi être quantifiés par densitométrie. Cette quantification repose sur la formule :

$$R = (\text{gène intérêt humain/gène intérêt rat}) * (\beta\text{-actine rat}/\beta\text{-actine humain})$$

IV.2.1 Transcription inverse (RT)

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir de 1 ou 2 µg d'ARN totaux ou d'un mélange d'ARN (RT-PCR quantitative multistandard) grâce à l'action de la reverse transcriptase (M-MLV). Dans le cas de la RT-PCR quantitative multistandard, un mélange d'ARN humain et de rat est réalisé dans les proportions adéquates à savoir : 1 µg humain/2 µg rat pour les gènes d'iNOS, de COX-2 et de PPAR α et 2 µg humain/2 µg rat pour les gènes de PPAR γ et de ROR α . Le milieu réactionnel (20 µl) est constitué d'un tampon d'incubation de RT (tampon Tris/HCl 25 mM, pH 8,3, contenant 37,5 mM de KCl et 15 mM de MgCl₂), d'un mélange de dNTP (0,5 mM), d'amorces aléatoires (0,4 µM), de DTT (10 mM) et de l'enzyme (200 U) ainsi que des ARN totaux. Le mélange réactionnel est incubé

pendant 60 minutes à 37°C puis 5 minutes à 95°C, ce qui permet d'inactiver l'enzyme et de dégrader les ARNm. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

IV.2.2 Choix des amorces

Le choix des amorces pour un gène spécifique s'effectue à partir des séquences d'ADNc disponibles dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les amorces ont une longueur d'environ 20 nucléotides et encadrent une zone de 200 à 500 pb de la séquence codante. La spécificité des amorces (longueur et nombre de fragments obtenus, formation de dimères) est évaluée grâce au logiciel Amplify 1.2 et au logiciel BLAST (Basic Alignment Search Tool). Dans la mesure du possible, nous avons également choisi des couples d'amorces de part et d'autre d'un intron afin de pouvoir distinguer une co-amplification potentielle d'ADN génomique. Pour chaque couple d'amorces, les conditions de PCR (la température d'hybridation et le nombre de cycles) ont été optimisées. Les caractéristiques des amorces et les conditions de PCR sont indiquées dans le tableau II et III.

<i>Gène étudié</i>	<i>Longueur</i>	<i>Température (°C)</i>	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Enzyme de restriction (Espèce)</i>
<i>PPARγ</i>	524	64	30	AluI (R)
<i>PPARα</i>	344	61	29	StuI (H)
<i>RORα</i>	176	56	29	BstNI (R)
<i>COX-2</i>	443	59	28	AvaI (R)
<i>iNOS</i>	433	62	27	StuI (H)
<i>β Actine</i>	569	65	27	AvaI (R)
<i>ACO</i>	362	58	30	
<i>IL-1β</i>	366	61	27	
<i>TNF α</i>	530	61	31	
<i>L27</i>	224	62	27	

Tableau II : Conditions optimales de PCR : température d'hybridation des amorces, nombre de cycles, longueur des fragments et enzymes de restriction.

Gène étudié	Séquence	Numéro d'accèsion GenBank Humain	Numéro d'accèsion GenBank Rat
<i>PPARγ</i>	S: 5'-ATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAAGC-3'	U79012	AB011365
	AS: 5'-CGGTCTCCACTGAGAATAATGACAGC-3'		
<i>PPARα</i>	S: 5'-ACGAATGCCAAGATCTGAGAAAGC-3'	NM005036	M88592
	AS: 5'-ATTCCGTGAGCTCGGTGACG-3'		
<i>RORα</i>	S: 5'-ATATGTGACTACACACCAGC-3'	U04897	AW917619
	AS: 5'-GTCTGCCACGTTATCTCG-3'		
<i>COX-2</i>	S: 5'-TCCAGATCACATTTGATTGACAG-3'	M90100	L20085
	AS: 5'-TGTGGGAGGATACATCTCTCC-3'		
<i>iNOS</i>	S: 5'-AGCAGAATGTGACCATCATGGACC-3'	L09210	D44591
	AS: 5'-ATGCAGACAACCTTGGTGTGAAGG-3'		
<i>L27</i>	S: 5'-TCCTGGCTGGACGCTACTC-3'	L05094	
	AS: 5'-CCACAGAGTACCTTGTGGGC-3'		
<i>IL-1β</i>	S: 5'-TATGTGCACGATGCACCTGTACGA-3'		M98820
	AS: 5'-AACACGCAGGACAGGTACAGATT-3'		
<i>TNFα</i>	S: 5'-TCTGGCCCAGGCAGTCAGA-3'		X66539
	AS: 5'-GATCTCAGCGCTGAGTCGGT-3'		
<i>β Actine</i>	S: 5'-CATGCCATCCTGCGTCTGGACC-3'	X00351	X52815
	AS: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'		
<i>ACO</i>	S: 5'-CCAATCACGCAATAGTTCTGG-3'		J02752
	AS: 5'CGCTGTATCGTATGGCGAT-3'		

Tableau III : Amorces spécifiques et numéro d'accèsion des différents gènes étudiés GenBank.

IV.2.3 Réaction d'amplification en chaîne : PCR

La PCR est effectuée sur 2 μ l de solution d'ADNc obtenue après la réaction de transcription inverse. La PCR est effectuée dans un volume total de 50 μ l séparé initialement

en deux phases par de la paraffine (AmpliEase, Eurobio) afin de démarrer la réaction à haute température (Hot Start) et d'éviter ainsi une hybridation et une amplification aspécifique. Ceci permet ainsi de retarder la mise en contact des amorces situées dans la phase supérieure et de l'ADNc présent dans la phase inférieure, qui s'effectuera seulement au moment de la première phase de dénaturation du premier cycle. La phase inférieure est constituée de 5 µl de tampon de PCR concentré 10 fois (tampon Tris/HCl 67mM, pH 8,8, contenant 16 mM de (NH₄)SO₄ et 0,1% de Tween 20), 2 µl de dNTP (0,2 mM), 1,5 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µl de Taq polymérase (2,5 U) et de 25 µl d'eau ultra pure. La phase supérieure contient le couple d'amorces spécifiques de la réaction dans 14 µl d'eau ultra pure. Le milieu réactionnel est placé dans un thermocycleur et est soumis à un nombre variable de cycles suivant le gène étudié (voir Tableau II). Chaque cycle comprend trois phases : une phase de dénaturation à 94°C, une phase d'hybridation des amorces réalisée à une température optimale spécifique et une phase d'élongation à 72°C, chaque phase durant 45 secondes.

IV.2.4 Analyse des fragments amplifiés

○ RT-PCR semi-quantitative

Les produits d'amplification obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (p/v) préparé dans du tampon TBE (1X) (90 mM Tris, 90 mM Borate (pH 8), 2 mM EDTA) contenant 0,3 µg/ml de bromure d'éthidium. Avant d'être déposés, les échantillons sont repris par une solution comportant 50 % de glycérol, 50 % de TBE (1X) et du bleu de bromophénol. La séparation électrophorétique s'opère à 80V en voltage constant pendant 30 minutes environ. Les fragments amplifiés sont visualisés sous rayonnement ultra-violet grâce à la fluorescence émise par le bromure d'éthidium, agent intercalant de l'ADN. Un marqueur de tailles connues est déposé sur le même gel que les échantillons afin de pouvoir vérifier la taille des fragments amplifiés. L'analyse informatique par un logiciel de traitement d'images (Geldoc 2000, BioRad) permet de déterminer l'intensité des fragments d'ADNc par densitométrie. La quantification est exprimée en unités arbitraires d'après la formule :

$$R = \text{Gène d'intérêt} / \text{Gène de référence}$$

Dans notre cas, le gène de référence utilisé est le gène codant la L27 (protéine ribosomale). Des expériences préliminaires nous ont permis en effet de montrer que l'expression de la L27 était beaucoup moins modifiée par les différents traitements que celle de la β-actine ou la GAPDH.

○ RT-PCR quantitative multistandard

Les produits de PCR obtenus sont ensuite séparés grâce à un polymorphisme de restriction existant entre les amplicons de chaque espèce. Le choix d'une enzyme de restriction permettra donc de digérer les produits de PCR d'une espèce en laissant ceux de l'autre intacts. Cette digestion est réalisée à 37 °C pendant 2h environ. Les produits d'amplification obtenus après digestion sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (p/v) dans un tampon (TBE) contenant du bromure d'éthidium et l'analyse est ensuite effectuée comme précédemment.

V Etude de l'expression des gènes au niveau de la protéine

V.1 Immunocytochimie

Les chondrocytes ou les synoviocytes sont mis en culture sur des lamelles de verre dans des puits de plaques 24 puits, dans les mêmes conditions que celles indiquées précédemment. Après traitement à l'IL-1 β pour les chondrocytes ou au LPS pour les synoviocytes, les cellules sont fixées dans une solution de PBS contenant 3% de formaldéhyde pendant 10 minutes. La perméabilisation des cellules est favorisée par une incubation dans du méthanol pendant 20 minutes à 4°C. Après 1 heure d'incubation dans une solution de bloquant (0,8% de BSA, 0,1% de gélatine de poisson, 0,02% de Tween 20), les préparations sont mises en présence du premier anticorps dilué dans du PBS : 1 :500 pour PPAR α et 1 :2000 pour PPAR γ pendant 30 minutes à 37°C. Après deux lavages au PBS, les cellules sont incubées en présence du deuxième anticorps couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) pendant 30 minutes à 37°C (1 :100, anticorps de chèvre anti-lapin, Interchim). Un témoin négatif est effectué en remplaçant la première solution d'anticorps par du sérum préimmun. Après montage (vectashield), les lames sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope Polyvar (Reichert-Jung, Vienne, Autriche).

V.2 Analyse en western-blot

V.2.1 Extraction des protéines totales

Les tapis cellulaires sont rincés deux fois par du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} avant d'être grattés dans un tampon de lyse stérile : Tris 10 mM contenant 1% de Triton et des antiprotéases (pastille commerciale à dissoudre extemporanément dans la solution de lyse). Les lysats sont ensuite incubés dans la glace, en vortexant régulièrement avant d'être centrifugés à 16000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les protéines présentes dans le surnageant sont dosées selon la méthode BCA (solution d'acide bicinchoninique contenant du CuSO_4 dans un rapport 50 :1) en plaque 96 puits. La concentration protéique est déterminée par une lecture spectrophotométrique à 540 nm contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (comprise entre 0,1 et 1mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions. Les extraits protéiques ainsi obtenus sont utilisés pour les western-blot spécifiques de PPAR γ , de PPAR α et ROR α .

Une extraction directe dans le bleu Laemmli 1X est réalisée pour les extraits protéiques qui servent à la détection des protéines suivantes : $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylé, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ et $\text{IKK}\alpha/\beta$ phosphorylé. Après 2 lavages au PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} , les tapis cellulaires sont grattés dans 500 μl de bleu Laemmli. Le lysat cellulaire est ensuite soniqué 5 fois 5 secondes puis centrifugé. La concentration protéique est déterminée dans le surnageant comme précédemment.

V.2.2 Electrophorèse et Electrotransfert

La séparation des protéines est réalisée en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (Laemmli U.K., 1970). Les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon Tris/HCl 0,5 M contenant 8% de saccharose, 8% de SDS et 0,04% de bleu de bromophénol. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel de concentration, qui est composée de 5% de polyacrylamide préparé dans du tampon Tris/HCl 0,25M (pH 6,8) contenant 0,1% de SDS. Les protéines sont ensuite séparées selon leur taille dans un gel de séparation, composée de 8%, 10% ou 15% de polyacrylamide selon les protéines étudiées. Ce gel est préparé dans un tampon Tris/HCl à 0,375 M (pH 8,8) contenant 0,1% de SDS. L'électrophorèse est réalisée à une intensité constante de 40 mA/gel pendant 1 heure dans du tampon de migration : Tris/HCl 25 mM / Glycine 0,192 M pH 8,5. Pour chaque électrophorèse effectuée, des marqueurs de poids moléculaires sont déposés afin de vérifier la

masse des protéines révélées. Les protéines sont transférées, à l'aide d'un appareil de transfert (BioRad), sur une membrane de polyvinylidenedifluoride (PVDF) activée 1 minute par du méthanol. La membrane et le gel sont placés entre deux feuilles de papier Whatman, le tout ayant été imbibé dans du tampon Tris/HCl 48 mM/Glycine 39 mM pH 7,9 contenant 0,037% de SDS et 20% de méthanol. Le transfert est effectué pendant 1 heure à une intensité constante de 80 mA/gel (Towbin H., 1979).

V.2.3 Immunorévélation

Les protéines étudiées sont détectées immunologiquement à l'aide d'anticorps appropriés en utilisant un kit commercial de révélation par chimioluminescence. Après transfert, la membrane est saturée dans une solution de lait écrémé diluée dans du tampon TBST (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 contenant 0,1% de Tween 20) afin d'éviter toute révélation aspécifique. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, la membrane est lavée 3 fois 5 minutes par du TBST. Elle est ensuite incubée une nuit à 4°C dans la solution d'anticorps primaire. L'anticorps primaire est dilué dans du tampon TBST contenant 5% (p/v) de BSA (agent bloquant). Pour chaque anticorps, la dilution optimale a été déterminée, à savoir, 1 :100 pour IKK α / β phosphorylé, 1 :250 pour l'anticorps anti-I κ B α phosphorylé, I κ B α , p65, c-jun et β -actine, 1 :500 pour l'anticorps anti-PPAR γ , IKK α et IKK β , 1 :1000 pour l'anticorps PPAR α et 1 :2000 pour l'anticorps anti-ROR α . Ces anticorps ont été obtenus chez le lapin sauf l'anticorps ROR α qui est un anticorps de chèvre. Après 3 lavages de 5 minutes dans du TBST, la membrane est incubée pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire anti-lapin fournis dans le kit (Cell signalling) dilués au 1 :2000 ou avec les anticorps anti-chèvre dilués au 1 :2000 couplés à la peroxydase. Ces anticorps sont dilués dans une solution de TBST contenant 5% (p/v) de lait écrémé. Après 3 lavages de 5 minutes avec du TBST, l'activité de la peroxydase est révélée à l'aide du substrat chimioluminescent fourni dans le kit (Cell signaling). La bande correspondant à la protéine spécifique reconnue par le premier anticorps est visualisée après exposition de la membrane sur un film autoradiographique (X-OMat, Kodak). L'analyse densitométrique est finalement réalisée au moyen d'un système d'analyse d'images GelDoc 2000 (BioRad).

VI Etude de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et d'AP-1

VI.1 Analyse de leur fixation sur l'ADN par retard sur gel

L'effet des ligands de PPAR γ sur l'activation de NF- κ B et AP-1 induite par l'IL-1 β ou le LPS est évalué par une technique de retard sur gel. Son principe repose sur l'utilisation d'oligonucléotides marqués au 32 P contenant l'élément de réponse spécifique du facteur de transcription étudié (NF- κ B ou AP-1). Ces sondes marquées sont incubées en présence des protéines nucléaires et la fixation du facteur de transcription sur l'ADN est mise en évidence par autoradiographie après séparation des complexes formés par électrophorèse en condition native.

VI.1.1 Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires

Après chaque série de traitement, les tapis cellulaires sont rincés 2 fois par du PBS sans Ca $^{2+}$ ni Mg $^{2+}$ puis grattés dans une solution saline de faible concentration (Tampon Hepes 10 mM, pH 7,9, 10 mM KCl, 1 mM DTT) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Après une incubation de 15 minutes dans la glace, 25 μ l d'une solution d'Igepal à 10% sont ajoutés ; les lysats sont vortexés et incubés 5 minutes dans la glace. Le surnageant correspondant à l'extrait cytosolique est récupéré après une centrifugation à 1500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot de noyaux ainsi obtenu est alors repris par 50 μ l d'une solution saline de forte concentration (Tampon Hepes 10 mM, pH 7,9 contenant 420 mM NaCl, 1 mM DTT et un mélange d'inhibiteurs de protéases). Après une incubation de 30 minutes sur la glace avec agitation intermittente, les débris nucléaires sont éliminés par centrifugation à 13000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les extraits nucléaires obtenus ainsi que les extraits cytosoliques sont stockés à -80°C avant d'être utilisés.

VI.1.2 Marquage des sondes

Les sondes oligonucléotidiques, dont les séquences contiennent les éléments de réponse reconnus par les différentes protéines nucléaires étudiées sont synthétisées dans le commerce (MWG Biotech, Courtaboeuf, France) et sont les suivantes :

- pour NF- κ B (Baeuerle P.A. et Baltimore D., 1996):

5' AGTTGAGGGGACTTTCC 3'

3'CCCTGAAAGGGTCCG 5'

- pour AP-1 (Hai T. et Curran T., 1991) :

5' CGCTTGATGAGTCA 3'

3'TACTCAGTCGGCCTT 5'

10 ng de chaque oligonucléotide simple brin sont mélangés et chauffés à 65°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante afin d'hybrider leur séquence complémentaire.

L'élongation des extrémités simple brin des duplex formés utilise le fragment de Klenow de l'ADN polymérase, qui va intégrer les dNTP complémentaires de la matrice mono-brin des sondes, et en particulier le α -³²P dCTP (Amersham Pharmacia Biotech). La réaction de marquage est réalisée pendant 30 minutes à 37 °C dans un tampon d'incubation en présence de la sonde hybridée (10 ng), de 10 unités d'enzyme de Klenow, de 0,5 mM de dNTP-dCTP et de 2 μ l de α -³²P dCTP (2 μ l à 3000 Ci/mmol). La purification des sondes double brin formées est effectuée par précipitation avec 2,5 volumes d'éthanol absolu et 1/10ème de volume d'une solution d'acétate de sodium à 3 M, pH 6 pendant 1 heure à -20°C. Après une centrifugation de 10 minutes à 10000 g à 4°C, le culot est repris par de l'eau ultrapure et la radioactivité est évaluée à l'aide d'un compteur Geiger. Le volume d'eau est ensuite ajusté de manière à avoir une concentration finale de 2 cps/ μ l. La sonde marquée peut être conservée à -20°C pendant 5 jours.

VI.1.3 Interaction protéine-ADN et analyse du complexe sur gel d'acrylamide

5 μ g d'extrait nucléaire sont incubés pendant 10 minutes dans la glace dans un tampon de fixation (Tampon Tris/HCl 100 mM pH 7,4 contenant 10mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 50% glycérol (v/v), 500 mM NaCl, 5 mM DTT) en présence de 1 μ g de dIdC. La sonde radiomarquée (2 μ l) est ensuite ajoutée ainsi que 10 μ l d'eau ultrapure. Après 30 minutes d'incubation dans la glace, la solution de dépôt, correspondant au tampon de fixation additionné de bleu de bromophénol, est incorporée au mélange réactionnel. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 5% en condition native dans un tampon TBE. La migration est effectuée à un voltage constant de 150 V dans un tampon TBE

5X. Le gel est ensuite séché sous vide pendant 45 minutes à -80°C puis exposé sur un film photographique et révélé comme indiqué au paragraphe V.2.4.

VI.2 Identification des sous-unités protéiques du complexe retardé : « super retard sur gel »

La technique d'étude est la même que celle décrite précédemment. Un anticorps reconnaissant une protéine spécifique fixée sur l'élément de réponse est simplement ajouté après incubation des extraits nucléaires avec la sonde oligonucléotidique radiomarquée. 1 µl d'anticorps dirigé contre p65 ou p50 pour l'élément de réponse de NF-κB et c-jun ou c-fos pour l'élément de réponse d'AP-1, est ajouté au complexe ADN-protéine pendant 30 minutes à 4°C. Le complexe super-retardé ainsi obtenu est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide 5% comme précédemment.

VI.3 Analyse de l'activité transcriptionnelle par une technique de "gene reporter"

VI.3.1 Transformation de bactéries compétentes et préparation d'ADN plasmidique

La transformation des bactéries compétentes (TOP 10F', Invitrogen) s'effectue avec 2 µl de plasmide. L'ensemble est placé dans la glace pendant 30 minutes avant un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes. Après 2 minutes d'incubation dans la glace, 950 µl de milieu SOC (2 g Bacto®-Tryptone, 0,5 g Bacto®-Yeast Extract, NaCl 1 M, MgCl₂ 2 M, Glucose 2 M) sont ajoutés au mélange réactionnel. L'ensemble est ensuite placé pendant 2 heures à 37°C sous agitation. 100 µl ou 50 µl de bactéries transformées sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB agar (10 g Bacto®-Tryptone, 5 g Bacto®-Yeast Extract, 5 g NaCl, 15 g agar, pH 7) et de l'ampicilline (50 µg/ml). La culture est réalisée pendant une nuit dans un incubateur à 37°C.

Une maxipréparation permet l'obtention d'une grande quantité de plasmide, dont la pureté permet soit le séquençage soit la transfection de cellules eucaryotes. Des colonies bactériennes obtenues sont prélevées stérilement par piquage dans les boîtes de Pétri et sont mises en culture dans 500 ml de milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline. Après une incubation pendant une nuit à 37°C, le plasmide est extrait de la culture selon la méthode de lyse alcaline (Birnboim H.C. et Doly J., 1979) et purifié sur une résine échangeuse d'ions à

l'aide d'un kit commercial (Qiagen). Après élution, l'ADN plasmidique est précipité par de l'isopropanol. Une centrifugation à 15000g pendant 15 minutes à 4°C permet de récupérer le culot d'ADN qui va être ensuite lavé à l'éthanol puis séché et repris dans 200 µl de NaCl (150 mM). La concentration et la pureté du plasmide sont évaluées par un dosage spectrophotométrique à 260 nm et 280 nm sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin.

Les plasmides que nous avons ainsi amplifiés sont :

- ✓ vecteur reporter NF-κB luc : pGL3-NF-κB Luc
- ✓ vecteur codant la β-Galactosidase : CMV β-Gal
- ✓ vecteur codant PPARγ : pcDNA3.1 PPARγ (don de Johanne Martel-Pelletier, Université de Montréal, Hôpital Notre Dame, Montréal, Canada)
- ✓ vecteur dominant-négatif de PPARγ, muté en position Leu 468 et Glu 471 dans le LBD : pSG5 dnPPARγ (Pr Marie Thérèse Corvol, Unité INSERM 530, Université de Paris 5, Paris, France)

Les plasmides portent tous un gène de résistance à l'ampicilline.

VI.3.2 Transfection transitoire

Toutes les expériences de gène rapporteur ont été réalisées sur des chondrocytes de rat et des cellules HeLa en plaque 6 puits. Les cellules sont cotransfectées avec 1 µg de pGL3-Luc et 0,6 µg de plasmide codant la β-galactosidase qui permet d'estimer l'efficacité de transfection et 0,5 µg de plasmide codant PPARγ.

Les cellules sont transfectées par lipofection avec le PEI en présence de 150 mM de NaCl afin de saturer les sites électrostatiques présents sur les tubes. L'ADN plasmidique et le PEI sont dilués chacun au cinquième dans une solution de NaCl 150 mM. Le PEI est ensuite mélangé à l'ADN plasmidique et incubé 15 minutes à température ambiante. 100 µl du mélange réactionnel ainsi que 900 µl de milieu complet contenant 10% de SVF sont ajoutés aux cellules préalablement lavées au PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺. Après 2 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère humide, le milieu est remplacé par 2 ml de milieu complet contenant 10% de SVF. Les cellules transfectées sont soumises aux différents traitements 36 heures après la transfection.

VI.3.3 Dosage des activités luciférase et β -galactosidase

Après chaque série de traitement, les tapis cellulaires sont rincés par du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} avant d'être lysés pendant 15 minutes à température ambiante dans une solution commerciale CCLR1X. Les cellules sont ensuite grattées puis les lysats sont transférés dans des tubes et placés dans la glace. Après une agitation au vortex, les tubes sont centrifugés et les surnageants sont collectés. Ils sont stockés à -80°C pendant 2 mois maximum ou utilisés directement pour le dosage de l'activité luciférase et β -galactosidase.

○ Dosage de l'activité luciférase

Le dosage est effectué sur 40 μl de lysat cellulaire additionné de 90 μl de tampon d'incubation (25 mM glycylglycine, 15 mM tampon phosphate de potassium pH 7,8 contenant 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, 2 mM dATP et 10 mM de DTT ajouté extemporanément) et 25 μl de luciférine à 1 mM diluée dans du tampon glycylglycine contenant 10mM de DTT. La lecture est effectuée à l'aide d'un luminomètre à tube (Berthold)

○ Dosage de l'activité β -galactosidase

Le dosage est réalisé sur 100 μl de surnageant dilué avec 50 μl de tampon de lyse CCLR1X auxquels sont ajoutés 150 μl de tampon d'essai contenant 200 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,3, 2 mM de MgCl_2 , 100 mM de β -mercaptoéthanol et 1,33 mg/ml d'ONPG ajouté extemporanément. Après une incubation de 1 heure à 37°C , la réaction est arrêtée par l'addition de 500 μl de Tris base 1 M. La lecture spectrophotométrique est effectuée à 420 nm.

Un contrôle négatif est préparé dans les mêmes conditions, pour les deux dosages sur des surnageants provenant de cellules non transfectées.

VII Induction d'une surexpression de $\text{PPAR}\gamma$ fonctionnel ou muté dans des chondrocytes de rat par transfection transitoire

VII.1 Transformation de bactéries compétentes et préparation d'ADN plasmidique

La transformation des bactéries compétentes ainsi que la maxipréparation de plasmides ont été réalisées suivant le protocole décrit précédemment. Après amplification et

purification, l'ADN plasmidique codant pour le gène PPAR γ fonctionnel ou muté a été dosé afin d'être utilisé pour les expériences de surexpression sur des chondrocytes de rat en culture.

VII.2 Transfection transitoire

Les chondrocytes de rat sont mis en culture dans des plaques 6 puits et la transfection est réalisée lorsque la culture atteint 70-80% de la confluence. Les cellules sont transfectées transitoirement par la méthode de lipofection utilisant le PEI comme décrit précédemment pour les expériences de "gene reporter" (voir VI.3.2). Elles ont été transfectées avec 0,5 μ g de plasmide PPAR γ ou de plasmide codant la forme dominant-négative de PPAR γ pour les expériences de dominant-négatif. 24 heures après la transfection, les cellules sont traitées comme précédemment pendant 6 ou 24 heures par de l'IL-1 β en présence ou en absence de ligands de PPAR γ .

VII.3 Evaluation de la surexpression et de l'activité de PPAR γ par RT-PCR semi-quantitative et Western-blot

La surexpression de PPAR γ au niveau de l'ARNm après transfection transitoire a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative selon le protocole décrit précédemment. L'ACO étant un des principaux gènes cibles de PPAR α/γ , l'expression du message de cette enzyme a également été étudiée afin d'avoir une indication de l'activité du récepteur PPAR surexprimé. Une analyse en western-blot a permis d'estimer la surexpression de PPAR γ au niveau protéique.

VII.4 Evaluation des effets de la surexpression de PPAR γ sur certains paramètres de l'inflammation par PCR quantitative et Western-blot

Les effets d'une surexpression d'une protéine fonctionnelle ou mutée PPAR γ ou du dominant-négatif sur l'expression d'iNOS et de COX-2 ont été évalués par PCR quantitative en temps réel. La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur de type Lightcycler (Roche Diagnostics). Elle est effectuée dans un volume total de 20 μ l. Le mélange réactionnel est composé de 10 μ l de tampon 2X (Qiagen), contenant la Taq polymérase, le MgCl₂, les

dNTPs et le SYBR Green, de 2 µl d'ADNc (ou d'eau RNase free pour le témoin négatif), de 1 µl de chaque amorce (10 µM) et de 6 µl d'eau RNase free. La PCR en temps réel est effectuée dans un capillaire en verre. Ces capillaires sont placés dans le thermocycleur et sont soumis après une étape initiale d'activation à 40 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend trois phases : une phase de dénaturation à 94°C (15 secondes), une phase d'hybridation des amorces réalisée à une température optimale spécifique (20 secondes) et une phase d'élongation à 72°C (10 secondes + 5 secondes supplémentaires par 100 pb). A chaque fin de cycle, la fluorescence émise par le SYBR Green est mesurée.

Une fois la phase d'amplification terminée, les échantillons sont soumis à une augmentation continue de la température (5°C au dessus de la température d'hybridation jusqu'à 95°C, à raison de 0,1°C/s). La courbe de fusion a été effectuée afin de déterminer la température de fusion de chaque produit de PCR.

Chaque expérience comporte un témoin négatif et un témoin positif. La quantification est exprimée en unités arbitraires d'après la formule :

$$R = \text{signal du gène d'intérêt} / \text{signal du gène de référence}$$

Dans notre cas, le gène de référence utilisé est le gène codant une protéine ribosomale, la RP29 (Tableau III).

Gène étudié	Séquences des amorces	Température (°C)	Longueur (pb)
INOS	sens 5'-AATGCGGAAGGTCATGGC-3' antisens 5'-CGACTTTCCTGTCTCAGTAGCAAA-3'	60	65
COX-2	sens 5'-TACAAGCAGTGGCAAAGGCC-3' antisens 5'-CAGTATTGAGGAGAACAGATGGG-3'	60	301
RP29	sens 5'-AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG-3' antisens 5'-AGACGCGCAAGAGCGAGAA-3'	59	67

Tableau III : Amorces spécifiques des différents gènes étudiés, température d'hybridation des amorces et longueur des fragments amplifiés.

VII.5 Effet d'une surexpression de PPAR γ sur l'activité de NF- κ B

La fixation du facteur NF- κ B sur l'ADN est déterminée par un kit ELISA : kit TransAM (Active Motif). Cette technique est une alternative à la technique de retard sur gel. Elle a l'avantage d'être plus sensible et de ne pas nécessiter l'utilisation de radioisotopes. A l'issue des traitements, les tapis cellulaires sont rincés par du PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ contenant un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (fourni dans le kit). Les

cellules sont ensuite grattées dans 1 ml de tampon PBS et centrifugées brièvement. Le culot cellulaire est repris par une solution hypotonique (fournie dans le kit) et maintenu dans la glace pendant 15 minutes. Après addition du détergent fourni, les lysats sont vortexés et centrifugés à 14000 g pendant 30 secondes. Les surnageants (extrait cytosolique) sont collectés et stockés à -80°C . Les culots sont alors resuspendus dans une solution de lyse complète fournie dans le kit et agités vigoureusement. Après une incubation d'une heure dans la glace, les lysats sont centrifugés à 14000 g pendant 10 minutes à 4°C . Les surnageants ainsi collectés (extraits nucléaires) sont stockés à -80°C . Les concentrations protéiques sont déterminées à l'aide de la technique BCA.

VIII Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Chaque valeur étant la moyenne d'au moins trois échantillons de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont analysés par ANOVA suivis d'un test t de Student. Les différences ayant un $p < 0,05$ sont considérées comme significatives.

Résultats

I Effets de ligands spécifiques des récepteurs PPAR et ROR sur l'action de l'IL-1 β dans des chondrocytes humains

I.1 Mise en évidence de l'expression des récepteurs dans les cultures de chondrocytes

I.1.1 Mise en évidence de PPAR α , PPAR γ et ROR α dans des culture de chondrocytes humains issus de cartilages arthrosiques

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence la présence de PPAR α , PPAR γ et ROR α dans des chondrocytes humains. Les résultats de RT-PCR quantitative multistandard montrent une expression constitutive de ces 3 récepteurs dans les chondrocytes provenant de cartilage arthrosique (Figure 16).

Une analyse par western-blot a permis également de mettre en évidence l'expression de ces récepteurs au niveau protéique dans les chondrocytes arthrosiques. La distribution cellulaire de PPAR α et PPAR γ a été déterminée par une technique d'immunocytochimie. Ainsi, PPAR α et PPAR γ sont localisés majoritairement dans le noyau, site d'action de ces récepteurs (Figure 15). Cependant ils sont absents du nucléole mais présents en faible quantité dans le compartiment cytoplasmique. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pu déterminer la localisation de ROR α , l'anticorps utilisé pour le western-blot n'ayant pu être utilisé avec succès dans les expériences d'immunocytochimie.

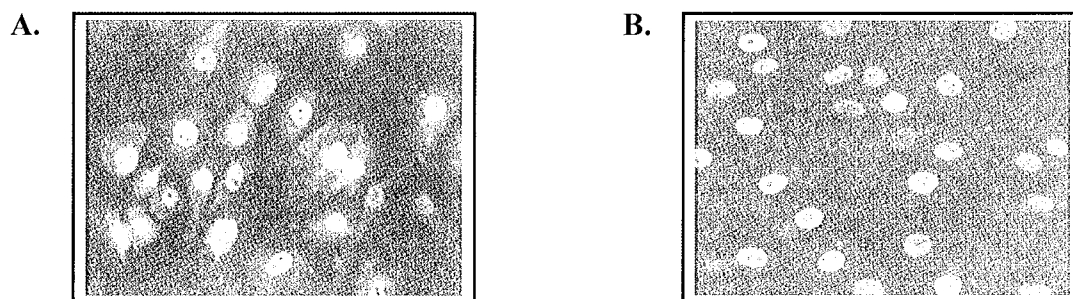


Figure 15 : Localisation intracellulaire de PPAR α (A) et PPAR γ (B) par immunocytochimie sur des cultures de chondrocytes humains.

Après fixation des cellules par du formaldéhyde 3%, celles-ci sont perméabilisées par du méthanol et incubées dans une solution de bloquant pendant 1 heure. Les préparations sont ensuite mises en présence de l'anticorps primaire dilué au 1:500 et au 1:2000 pour PPAR α et PPAR γ respectivement. La localisation est déterminée par fluorescence à l'aide d'un anticorps secondaire couplé au FITC.

I.1.2 Modulation de l'expression des récepteurs nucléaires par l'IL-1 β

o Au niveau de l'expression de l'ARN messenger

Des chondrocytes humains obtenus à partir de cartilage arthrosique ont été stimulés par des concentrations croissantes d'IL-1 β recombinante humaine (2,5 à 250U/ml) pendant 12 heures. L'analyse par RT-PCR quantitative a montré des modifications d'expression très différentes de PPAR α , PPAR γ et ROR α dans les chondrocytes humains arthrosiques (Figure 16). Nous avons tout d'abord observé que l'expression du messenger de PPAR α est inchangée quelle que soit la durée du traitement ou la concentration de l'IL-1 β (Figure 16A). En revanche, nous avons observé une diminution significative et dose-dépendante de l'expression de l'ARNm de PPAR γ jusqu'à 25 U/ml d'IL-1 β (Figure 16B). Enfin, nous avons mis en évidence une forte augmentation de l'expression de ROR α après traitement par 25 U/ml (+166%, $p < 0,01$) et 250 U/ml d'IL-1 β (+250%, $p < 0,01$) (Figure 16C).

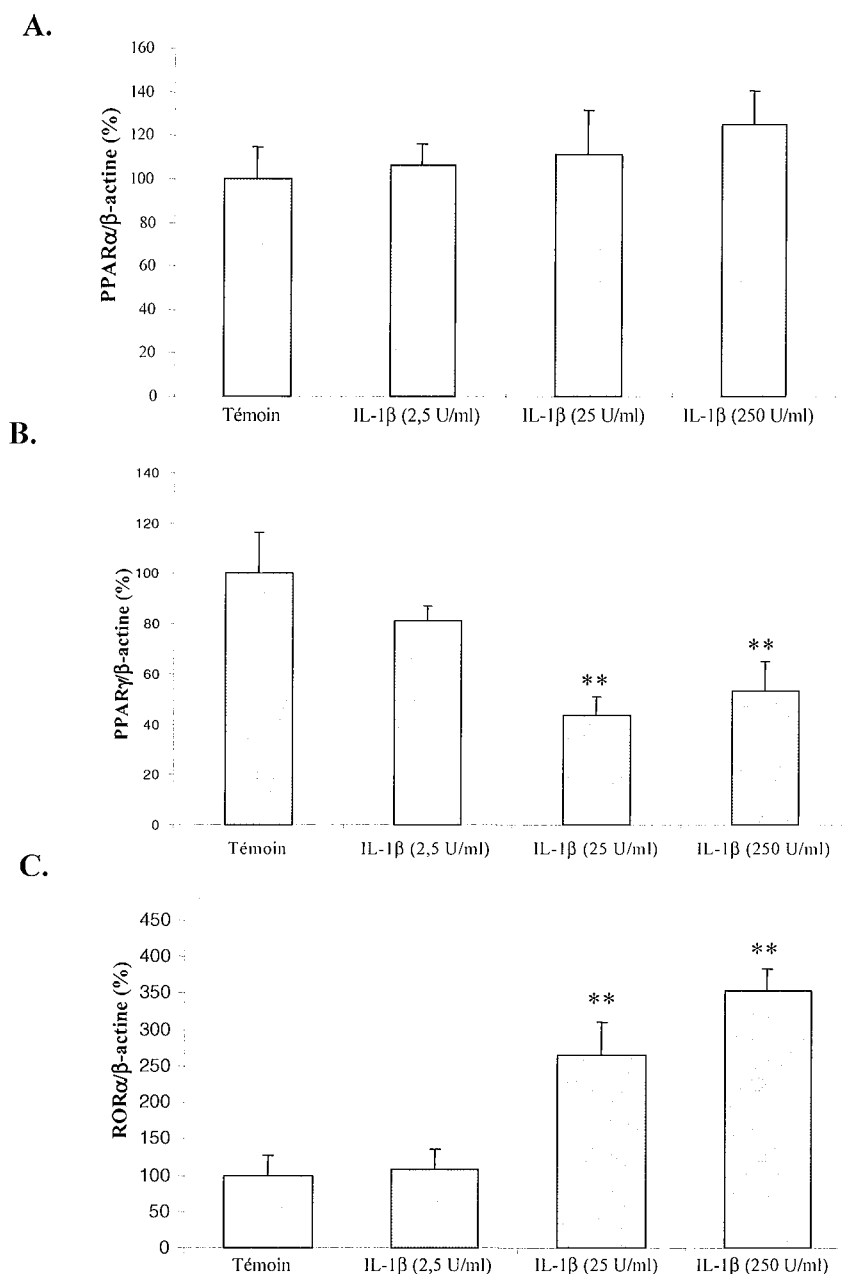


Figure 16 : Effets de l'IL-1β sur l'expression de l'ARNm de PPARα (A), PPARγ (B) et RORα (C).

Les ARN totaux ont été extraits à partir de chondrocytes humains exposés à différentes concentrations d'IL-1β pendant 12 heures, puis soumis à une analyse par RT-PCR quantitative. La quantité relative des messagers codant ces trois récepteurs a été normalisée par le signal correspondant à l'expression de la β-actine. Les résultats présentés sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins (base 100%). Les différences significatives sont indiquées par ** p < 0,01 par rapport au témoin.

Ces résultats suggèrent dans un premier temps que PPARα, PPARγ et RORα sont impliqués de manière différente dans les effets de l'IL-1β sur le cartilage.

○ Au niveau protéique

L'expression de ces trois récepteurs au niveau protéique a été évaluée après analyse en western-blot sur des chondrocytes humains arthrosiques. La figure 17 confirme les modifications d'expression observées au niveau du messenger pour ROR α et PPAR γ , même si pour ROR α la variation est plus faible (+10%, $p < 0,05$). Cependant, l'expression de la protéine de PPAR α est augmentée (+45%, $p < 0,05$), ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus en RT-PCR où nous n'avons mesuré aucune différence significative.

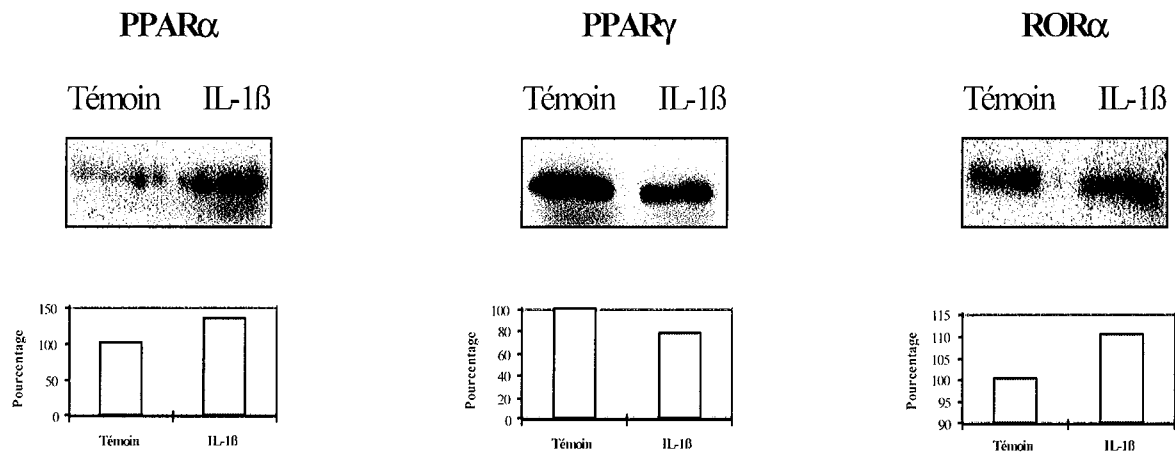


Figure 17 : Effets de l'IL-1 β sur l'expression protéique de PPAR α , PPAR γ et ROR α dans les chondrocytes humains.

Les protéines totales ont été extraites après traitement à l'IL-1 β 50 U/ml pendant 12 heures. Elles ont ensuite été soumises à une analyse par western blot en utilisant des anticorps polyclonaux anti-PPAR α , anti-PPAR γ et anti-ROR α . L'intensité des bandes a été mesurée par densitométrie. Les résultats présentés sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins et sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

I.2 Effets des ligands sur certains paramètres de l'inflammation

I.2.1 Effets sur l'expression de gènes précoces de l'inflammation

L'IL-1 β est bien connue pour induire rapidement l'expression de différents gènes impliqués dans le développement de l'inflammation, tels que COX-2 et iNOS. Nous avons ainsi observé une forte induction de l'expression du messenger d'iNOS et de COX-2 dans des cultures de chondrocytes humains après 6 heures de traitement par 50 U/ml d'IL-1 β . La potentialité de différents ligands des récepteurs PPAR et ROR α à moduler l'expression des messagers d'iNOS et de COX-2 induite par l'IL-1 β a été évaluée par RT-PCR quantitative.

Les chondrocytes ont été cultivés en présence des ligands 1 heure avant la stimulation à l'IL-1 β (50 U/ml pendant 6 heures).

Les résultats montrent que les ligands de PPAR α (Wy-14,643, 250 μ M) et de ROR α (CGP 52608, 10 μ M) n'ont aucun effet sur l'expression de COX-2 ou d'iNOS induite par l'IL-1 β . Concernant les ligands PPAR γ , la troglitazone à une concentration de 10 μ M inhibe faiblement (18%, $p < 0,05$) l'induction de l'expression du messenger d'iNOS mais n'a aucun effet sur l'expression de COX-2. En revanche, une pré-incubation en présence de 15d-PGJ $_2$ à une concentration de 10 μ M inhibe totalement l'expression du messenger d'iNOS et entraîne une baisse de 65% ($p < 0,01$) de COX-2 (Figure 18). Par ailleurs, des cultures de chondrocytes ont été traitées pendant 1 heure par des ligands seuls, afin d'évaluer leurs effets propres potentiels. Seule une faible induction de l'expression de l'ARNm de la COX-2 a été observée après traitement par de la 15d-PGJ $_2$. Par contre, aucun effet n'a été noté sur l'expression du messenger d'iNOS, et les 3 autres ligands n'ont présenté aucun effet propre.

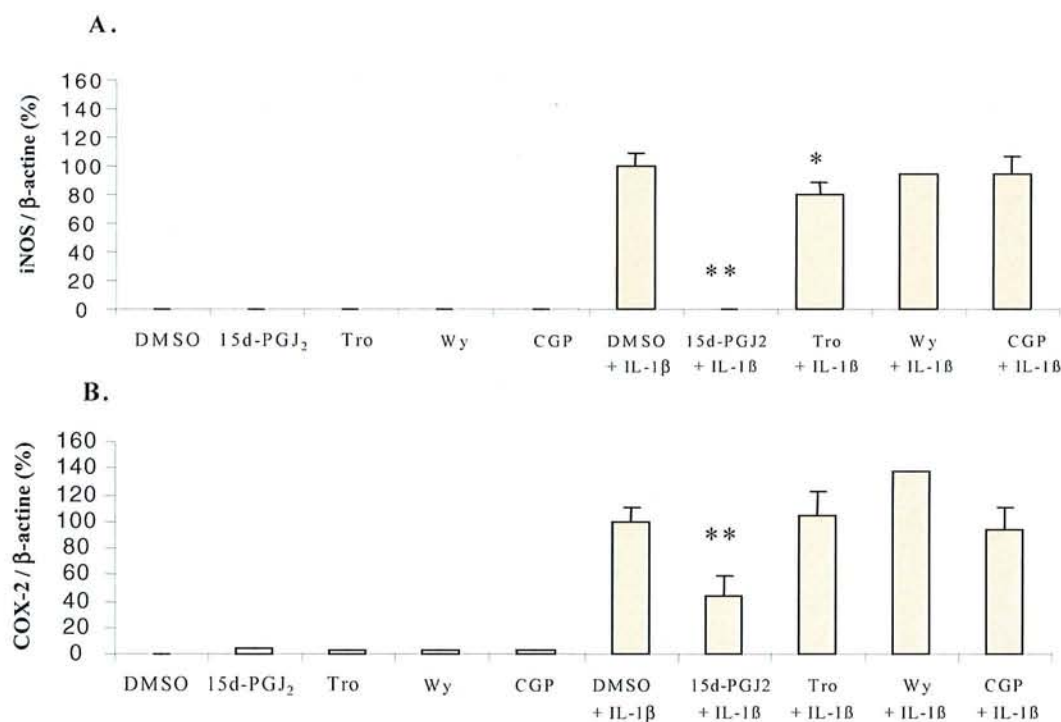


Figure 18 : Effets de ligands de PPAR α (Wy 14,643), de PPAR γ (15d-PGJ $_2$ et Troglitazone) et de ROR α (CGP 54,608) sur l'expression de iNOS (A) et de COX-2 (B).

Les ARN totaux ont été isolés à partir de chondrocytes humains pré-traités pendant 1 heure avec les ligands puis pendant 6 heures par de l'IL-1 β (50 U/ml). Ils ont ensuite été soumis à une analyse en RT-PCR quantitative. La quantité relative de messagers codant iNOS et COX-2 a été normalisée par rapport à celle des ARNm codant la β -actine. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules traitées par de l'IL-1 β . Les différences significatives sont indiquées par ** $p < 0,01$ et * $p < 0,05$ par rapport au traitement à l'IL-1 β .

I.2.2 Effets des ligands de PPAR γ sur la production de nitrites et la synthèse des protéoglycanes

Afin d'évaluer les propriétés chondroprotectrices éventuelles des ligands de PPAR γ , nous avons testé leurs effets sur la baisse de synthèse des PG et sur la production de nitrites induites par l'IL-1 β . La production de nitrites induite par l'IL-1 β a été mesurée dans le milieu de culture de chondrocytes encapsulés dans des billes d'alginate. Seuls les ligands de PPAR γ ont été testés en raison de l'absence d'effet des ligands de PPAR α et de ROR α observés auparavant. Le traitement des chondrocytes par de l'IL-1 β à 50 U/ml pendant 24 heures entraîne une augmentation de la production de NO de 180% ($p < 0,01$) et une diminution de 40% ($p < 0,01$) de la synthèse des PG (Figure 19).

Nous avons observé qu'une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ inhibe totalement la production de nitrites et permet une restauration de 50% ($p < 0,01$) de la synthèse des PG (Figure 19). Par contre, une pré-incubation des cellules en présence de troglitazone inhibe la production de nitrites de 36% ($p < 0,01$) seulement et n'a aucun effet sur la perte de synthèse des PG. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en RT-PCR, qui avaient notamment montré une inhibition totale de l'expression du messenger d'iNOS par la 15d-PGJ₂.

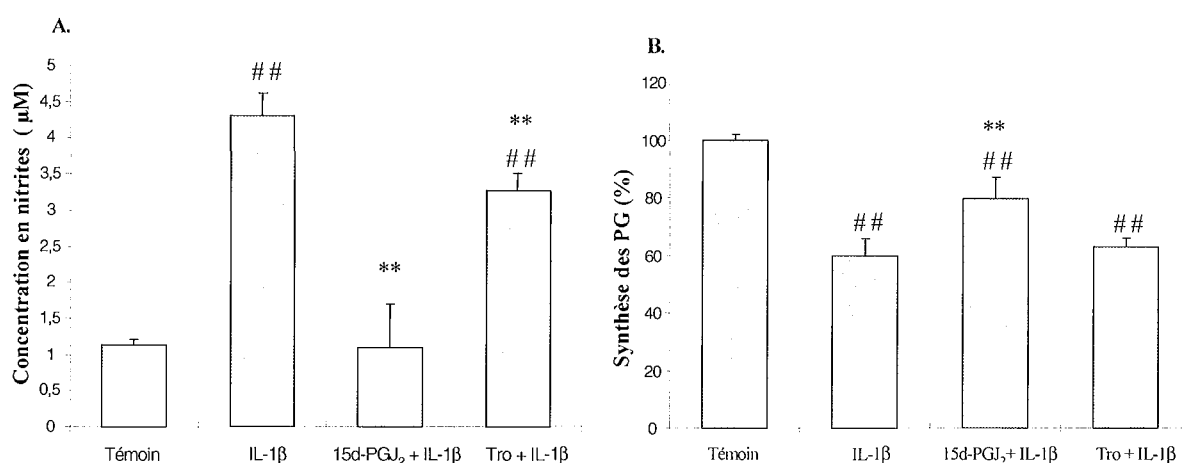


Figure 19 : Effets de ligands spécifiques de PPAR γ sur la production de nitrites (A) et sur la baisse de synthèse des protéoglycanes (B) induite par l'IL-1 β .

Les chondrocytes sont encapsulés dans des billes d'alginate puis traités par les ligands de PPAR γ (10 μ M) pendant une heure avant d'être stimulés pendant 24 heures par de l'IL-1 β . La concentration de nitrites dans les milieux de culture est évaluée selon la méthode de Griess et la synthèse des PG est mesurée par incorporation de ³⁵S. Les différences significatives sont indiquées par ## $p < 0,01$ par rapport au témoin et ** $p < 0,01$ par rapport au traitement à l'IL-1 β .

I.3 Interaction des ligands de PPAR γ avec la voie de signalisation de l'IL-1 β

NF- κ B et AP-1 sont deux voies transcriptionnelles activées, entre autres, par l'IL-1 β . Elles contrôlent l'expression de nombreux gènes cibles participant au développement de l'inflammation ou à la dégradation du cartilage, c'est le cas de iNOS, de COX-2, l'IL-1 β , le TNF α et les MMPs. Nous avons étudié la potentialité des ligands de PPAR γ à inhiber l'activation des voies transcriptionnelles NF- κ B et AP-1 dans des chondrocytes traités par de l'IL-1 β . Pour cela, nous avons évalué dans un premier temps l'effet de ces ligands sur la translocation dans le noyau de p65 et de c-jun. Dans un deuxième temps, nous avons étudié leur effet sur la fixation de NF- κ B et AP-1 sur l'ADN.

I.3.1 Effets des ligands de PPAR γ sur la translocation des sous-unités de NF- κ B et d'AP-1 dans le noyau

Les résultats obtenus par western-blot sur des extraits nucléaires montrent qu'une stimulation des chondrocytes pendant 1 heure par 50 U/ml l'IL-1 β entraîne une translocation rapide de p65 et c-jun dans le noyau (Figure 20). Une pré-incubation des cellules pendant 1 heure en présence de 15d-PGJ₂ (10 μ M) inhibe de manière importante (-40%) la translocation de p65. Par contre, nous avons observé une potentialisation par la 15d-PGJ₂ des effets de l'IL-1 β puisqu'elle augmente la translocation de c-jun (+51%). Pour les deux sous-unités, p65 et c-jun, aucun effet n'a été observé lors d'un prétraitement en présence de troglitazone à 10 μ M (Figure 20).

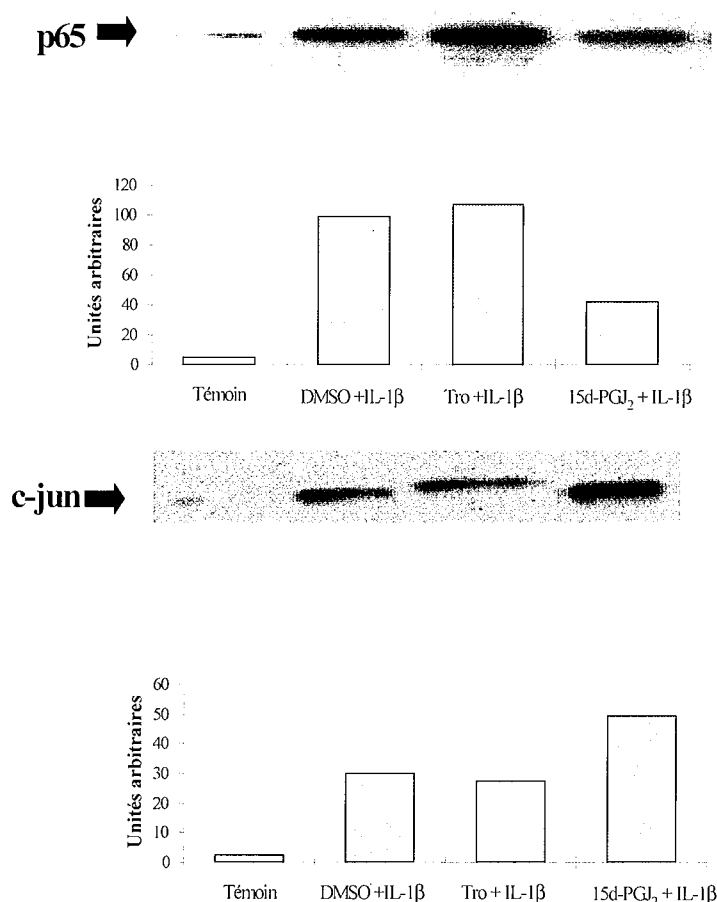


Figure 20 : Analyse par western-blot des effets de ligands de PPAR γ sur la translocation de p65 et c-jun dans le noyau induite par l'IL-1 β .

Les protéines nucléaires issues de chondrocytes humains sont isolées après un pré-traitement avec la 15d-PGJ₂ ou la troglitazone pendant une heure suivi par un traitement d'une heure à l'IL-1 β . La quantification est réalisée par densitométrie et exprimée en unités arbitraires. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

I.3.2 Effets des ligands de PPAR γ sur la fixation de NF- κ B et d'AP-1 sur l'ADN

Une analyse en retard sur gel nous a permis d'étudier la fixation de NF- κ B et d'AP-1 sur un oligonucléotide marqué au ³²P et contenant un élément de réponse spécifique. Les études ont été réalisées sur des extraits nucléaires provenant de chondrocytes traités par de l'IL-1 β en présence ou en absence de ligands. La figure 21 montre qu'un traitement à l'IL-1 β pendant 30 minutes entraîne la fixation de NF- κ B ou AP-1 sur leur oligonucléotide respectif. La formation du complexe NF- κ B/ADN ou AP-1/ADN est fortement diminuée après une pré-incubation de 1 heure des cellules en présence de 15d-PGJ₂ à 10 μ M. Cependant, une pré-incubation en présence de troglitazone (10 μ M) n'entraîne aucune modification de l'intensité du retard sur gel d'AP-1 et de NF- κ B (Figure 21). Une incubation des protéines nucléaires

avec une sonde non radiomarquée et 100 fois concentrée entraîne la disparition du retard sur le gel (figure 21). Ceci indique la spécificité de fixation de NF- κ B ou d'AP-1 sur l'ADN.

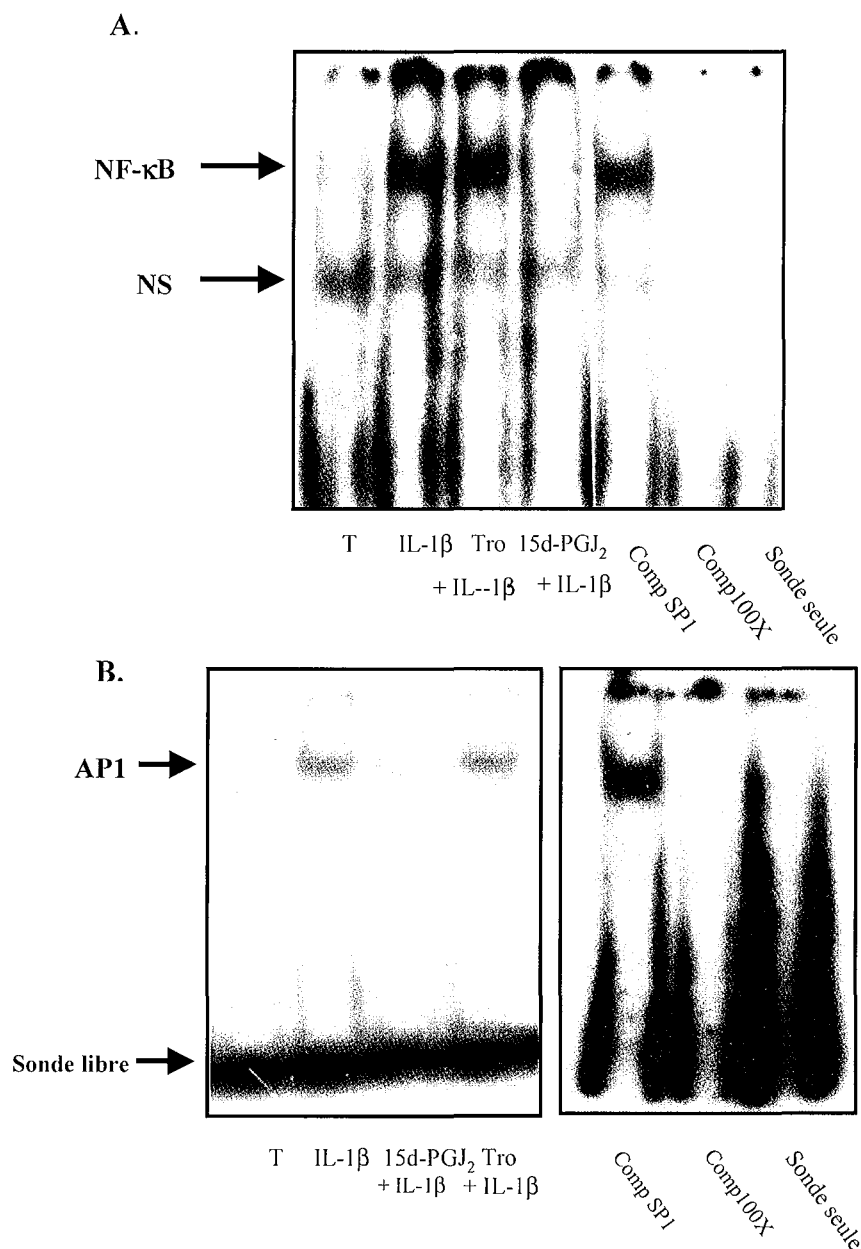


Figure 21 : Effets des ligands de PPAR γ sur la fixation de NF- κ B (A) et d'AP-1(B) induite par l'IL-1 β .

Les chondrocytes humains ont été pré-incubés en présence de 15d-PGJ₂ ou troglitazone (10 μ M) avant d'être stimulés par de l'IL-1 β (50 U/ml) pendant une heure. Les protéines nucléaires ont été extraites et analysées en retard sur gel utilisant les sondes radiomarquées pour NF- κ B et AP-1. Les complexes sont visualisés par autoradiographie. NS : non spécifique, Comp SP1 : compétition avec une sonde spécifique du facteur de transcription SP1, Comp 100X : compétition avec une sonde froide concentrée 100 fois. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

En outre, une étude de super retard sur gel par l'utilisation d'anticorps spécifiques nous a permis d'identifier les sous unités formant les complexes NF- κ B et AP-1, qui se sont fixés sur l'ADN. Ainsi, nous avons mis en évidence que l'hétérodimère NF- κ B est composé des sous-unités p65 et p50 et que l'hétérodimère AP-1 est composé des sous-unités c-jun et c-fos (figure 22).

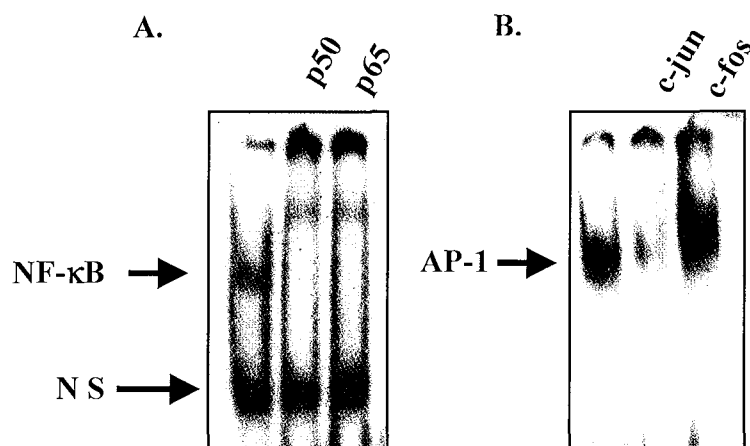


Figure 22 : Identification des sous-unités de NF- κ B(A) et d'AP-1(B) par analyse de super retard sur gel.

Les complexes ADN-protéines nucléaires correspondant aux complexes NF- κ B et AP-1 ont été séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide natif. La réaction de super retard sur gel a été réalisée en incubant avant la migration pendant 30 minutes à 4°C les complexes avec les anticorps anti-p65, anti-p50, anti-c-fos et anti-c-jun. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

II Etude de l'implication de PPAR γ dans les effets anti-inflammatoires de la 15d-PGJ $_2$ dans les chondrocytes de rat

II.1 Mise au point de la technique de transfection transitoire dans des cultures de chondrocytes de rat

II.1.1 Détermination des conditions de transfection et évaluation du rendement

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de transfection du PEI, l'agent de transfection utilisé dans ce travail. Pour cela, des cultures de chondrocytes de rat ont été cultivées sur des lamelles stériles et transfectées par différentes quantités de plasmide codant la β -galactosidase (300, 400, 500 ng et 1 μ g). 24 heures après la transfection, nous avons observé que le meilleur rendement de transfection était obtenu pour une quantité de plasmide de 500 ng (25% de cellules transfectées). Il en est de même pour un temps d'incubation de 48 heures après la transfection (Figure 23).

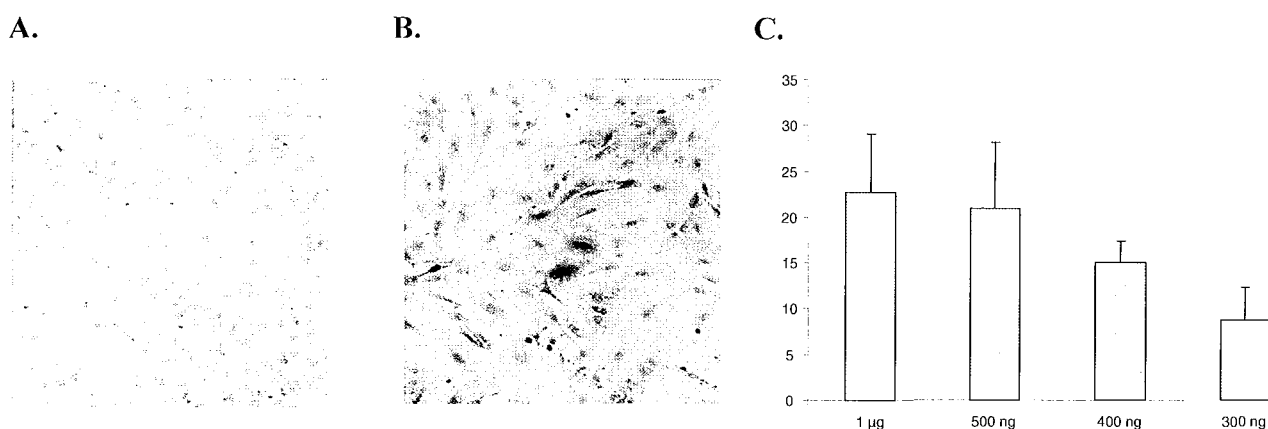


Figure 23 : Détermination des conditions de transfection par immunocytochimie.

Les chondrocytes sont cultivés sur des lamelles puis transfectés par un plasmide codant la β -galactosidase. Différentes concentrations de plasmides ont été utilisées 1 μ g, 500 ng, 400 ng et 300 ng. La révélation a été effectuée 24 heures ou 48 heures après transfection. La photo A correspond aux cellules non transfectées, la photo B aux cellules après 48 heures de transfection par 500 ng de plasmide. L'histogramme (C) représente le nombre de cellules positives sur le nombre de cellules totales comptées dans le champ du microscope.

La quantité de plasmide nécessaire à l'obtention d'une surexpression de PPAR γ optimale ainsi que le temps d'incubation après transfection ont été déterminés par RT-PCR semi-

quantitative. Les cultures de chondrocytes de rat ont été transfectées par 100 ou 500 ng de vecteur d'expression codant pour PPAR γ et incubées pendant 24, 48 ou 72 heures. La figure 24 montre qu'après 24 heures de transfection, l'expression du messager de PPAR γ est augmentée de 7 fois par rapport au témoin et ce pour les deux quantités de plasmide utilisées. Nous observons également une augmentation de l'expression de l'ARNm de PPAR γ après 48 heures (+80%, pour 500 ng de plasmide) et 72 heures (+106%, pour 500 ng de plasmide) d'incubation. Ainsi, pour toutes les expériences réalisées, nous avons choisi d'utiliser 500 ng de plasmide et d'incuber les cultures pendant 36 heures avant d'effectuer les traitements spécifiques.

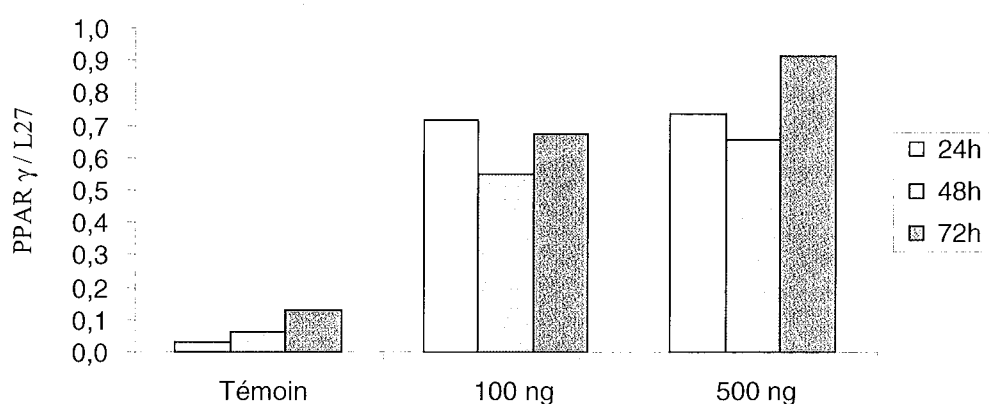


Figure 24 : Evaluation de la surexpression de PPAR γ en fonction du temps et de la quantité de plasmide par RT-PCR semi-quantitative dans des chondrocytes de rat.

Les cultures ont été transfectées par différentes quantités de plasmide : 100 et 500 ng. Les ARN totaux ont ensuite été isolés 24, 48 et 72 heures après transfection puis analysés par RT-PCR semi-quantitative. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

II.1.2 Evaluation de la surexpression et de la fonctionnalité de PPAR γ

Pour chaque étude de transfection réalisée, la surexpression de PPAR γ a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative après 48 heures de transfection. Ainsi, la figure 25 montre que le taux d'ARNm de PPAR γ dans les cellules transfectées est augmenté de 5 fois par rapport aux cellules non transfectées. Nous observons également une diminution importante de l'expression du messager de PPAR γ dans les cellules non transfectées qui ont été stimulées par l'IL-1 β , ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment. Cependant, la surexpression de PPAR γ observée dans les cellules transfectées n'est pas modifiée par un traitement à l'IL-1 β . De même, la pré-incubation par les ligands seuls ne modifie pas

significativement la surexpression de PPAR γ (Figure 25A). Cette surexpression a été vérifiée au niveau protéique (+ 144%, $p < 0,05$) (Figure 25 B)

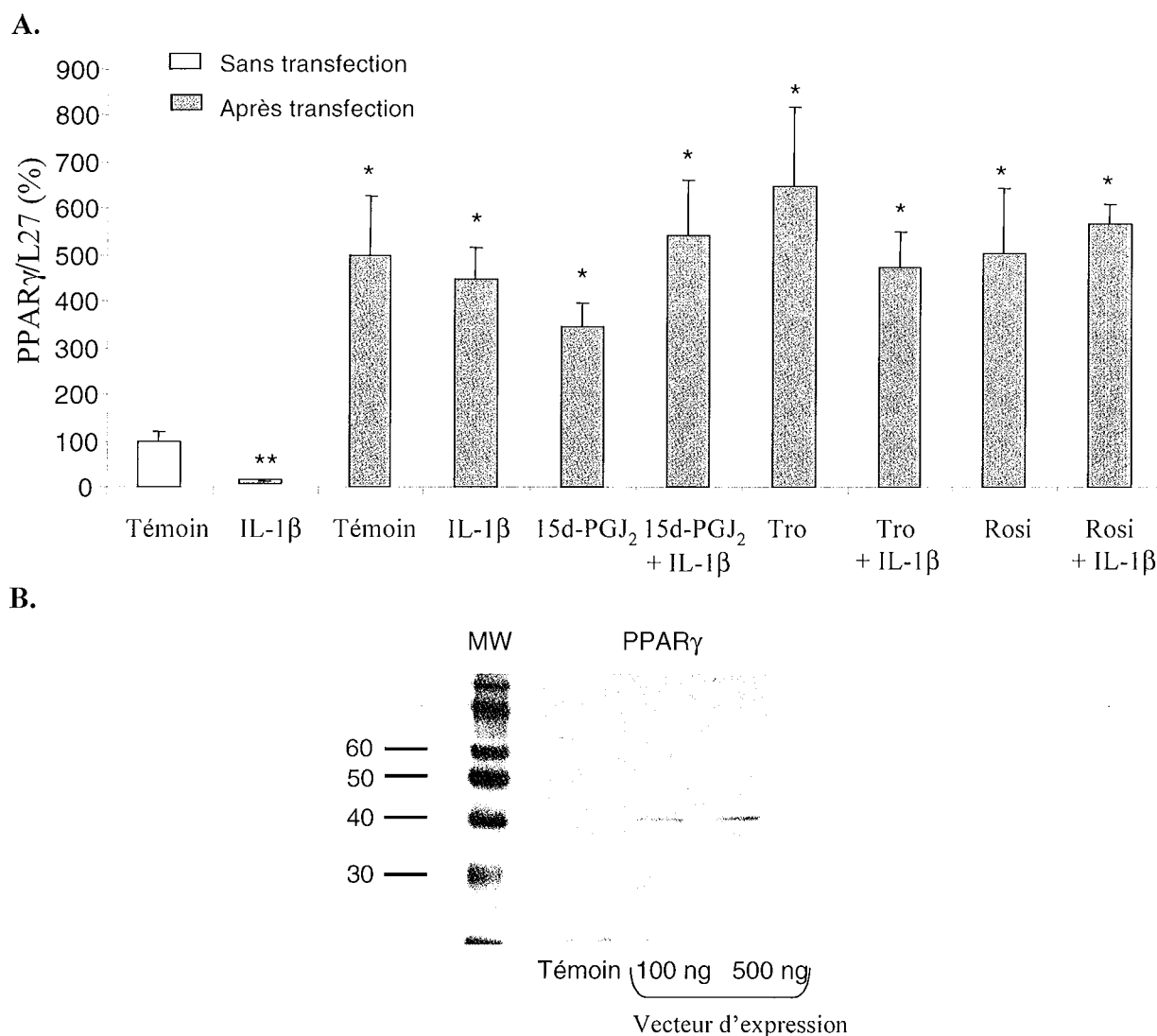


Figure 25 : Vérification de la surexpression de PPAR γ au niveau de l'ARNm (A) et de la protéine (B).

24 heures après la transfection avec le plasmide d'expression de PPAR γ , les cellules sont pré-incubées en présence de ligands (10 μ M) pendant 1 heure avant d'être stimulées par de l'IL-1 β (10 ng/ml) pendant 6 heures. Les ARN totaux ont ensuite été extraits puis analysés en RT-PCR semi-quantitative pour PPAR γ . L'histogramme présente le rapport entre PPAR γ /L27 et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins.

Nous avons également évalué l'effet d'une surexpression de PPAR γ sur l'expression de l'acylCoA oxydase (ACO), gène régulé par PPAR γ . Les résultats montrent que l'expression de l'ARNm de l'ACO est augmentée de manière significative (+ 62%, $p < 0,01$) après surexpression de PPAR γ dans les chondrocytes (Figure 26). Cette augmentation est très peu modifiée quel que soit le traitement que nous avons effectué avec les ligands et/ou l'IL-1 β .

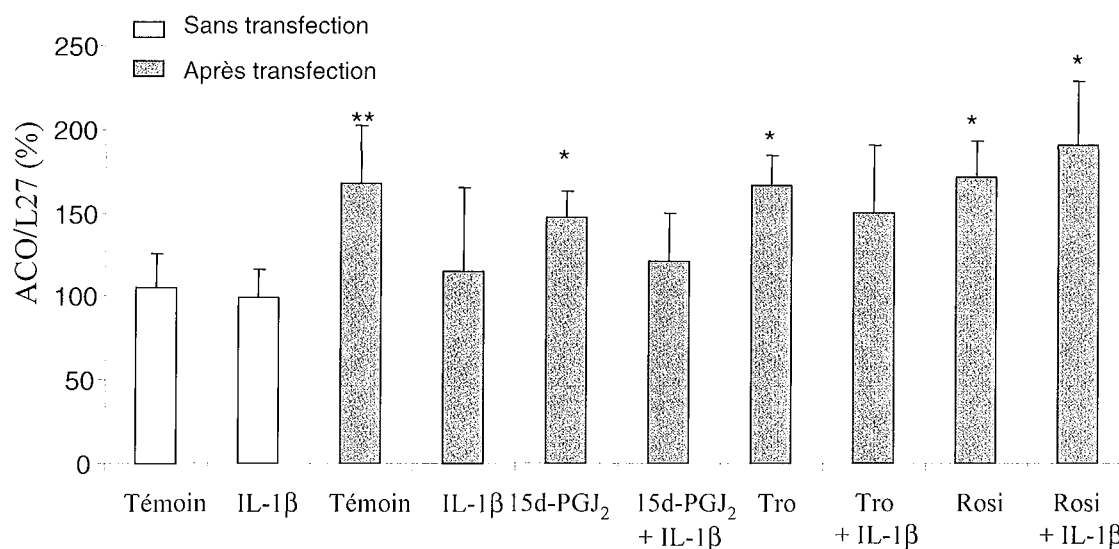


Figure 26 : Vérification de la fonctionnalité de PPAR γ par mesure de l'ARNm de l'ACO.

24 heures après la transfection avec le plasmide d'expression de PPAR γ , les cellules sont pré-incubées en présence de ligands (10 μ M) pendant 1 heure avant d'être stimulées par de l'IL-1 β (10 ng/ml) pendant 6 heures. Les ARN totaux ont ensuite été extraits puis analysés en RT-PCR semi-quantitative pour l'ACO. L'histogramme présente le rapport entre ACO/L27 et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport au témoin.

II.2 Effet d'une surexpression de PPAR γ sur certains paramètres de l'inflammation

II.2.1 Mesure de l'expression de l'ARNm de COX-2 et d'iNOS

Les chondrocytes de rat ont été transfectés, selon le protocole précédent, incubés 1 heure en présence des ligands, puis pendant 6 heures en présence d'IL-1 β . Des études de RT-PCR semi-quantitative ont ensuite été réalisées afin de déterminer l'effet d'une surexpression de PPAR γ sur l'expression des messagers de COX-2 et d'iNOS. Le traitement à l'IL-1 β induit normalement une forte expression de l'ARNm de COX-2 et d'iNOS dans les cellules transfectées. Nous avons observé qu'une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ (10 μ M) diminue de 90% ($p < 0,01$) l'expression d'iNOS induite par l'IL-1 β et de 50% ($p < 0,01$) celle de COX-2 (Figure 27A et B). En revanche, une pré-incubation des chondrocytes en présence de troglitazone ou de rosiglitazone ne permet pas de moduler l'induction de l'expression du messager d'iNOS ni de COX-2. Ces résultats semblent confirmer que les effets de la 15d-PGJ₂ sur l'expression d'iNOS et de COX-2 sont indépendants de PPAR γ dans les chondrocytes de rat.

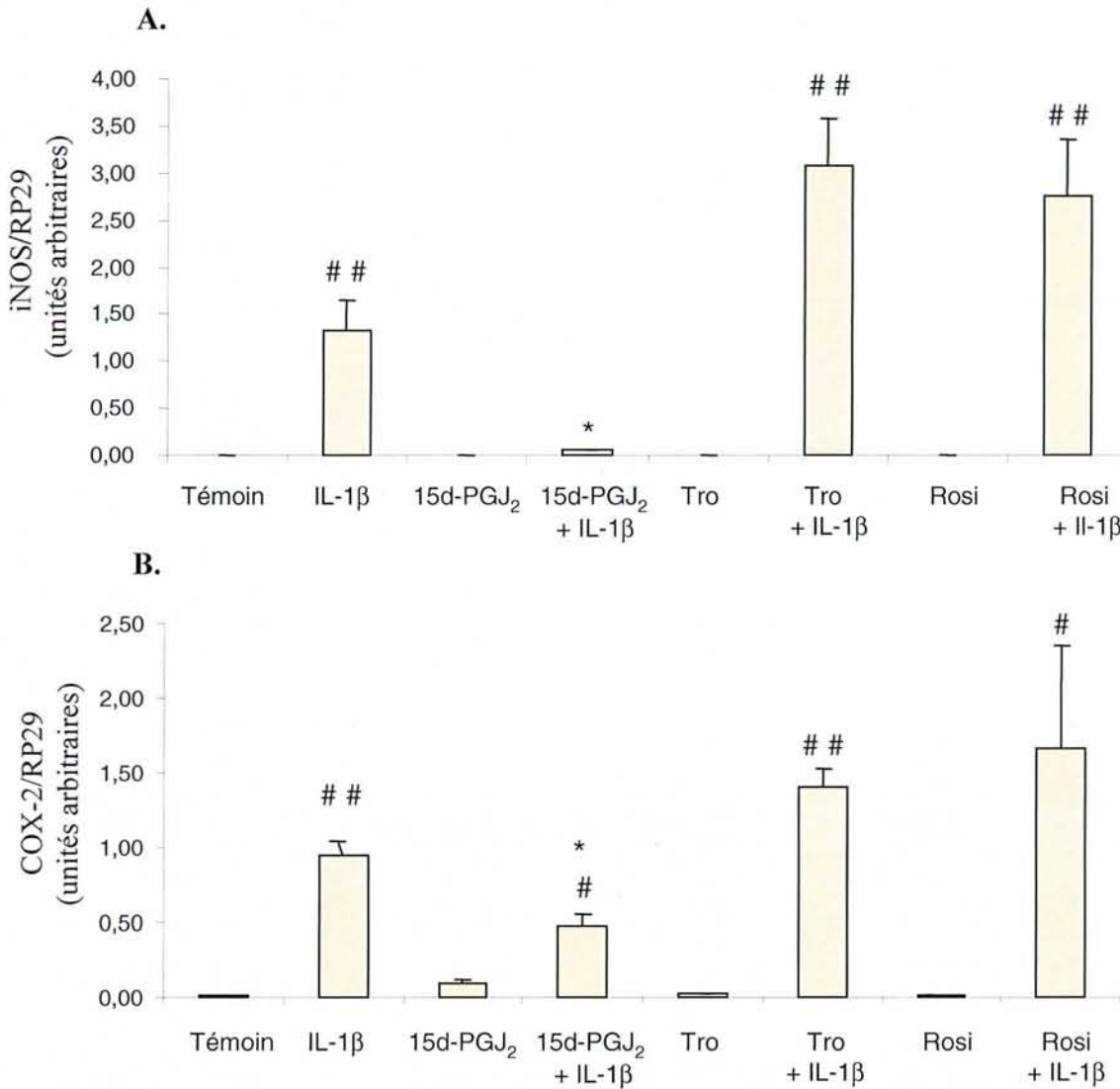


Figure 27 : Effets d'une surexpression de PPARγ sur l'expression de iNOS (A) et de COX-2 (B) induites par l'IL-1β

Les ARN totaux ont été isolés à partir de chondrocytes de rat transfectés par le plasmide d'expression de PPARγ, pré-traités pendant 1 heure avec les ligands de PPARγ (10 μM) puis pendant 6 heures par de l'IL-1β (10 ng/ml). Ils ont ensuite été soumis à une analyse en RT-PCR quantitative en temps réel. La quantité relative de messagers codant iNOS et COX-2 a été normalisée par rapport à celle des ARNm de la RP29. Les différences significatives sont indiquées par * p<0,05 et ** p<0,01 par rapport au traitement à l'IL-1β et par # p<0,05 et ## p<0,01 par rapport au témoin.

II.2.2 Mesure de la production de nitrites et de prostaglandine E2

Comme précédemment, les chondrocytes ont été transfectés et traités en présence des ligands de PPARγ avant d'être stimulés par de l'IL-1β pendant 24h. Les dosages des nitrites et des prostaglandines ont été effectués sur les surnageants de culture. Le traitement à

l'IL-1 β entraîne une forte production de nitrites et de PGE2 par les chondrocytes transfectés. Une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ diminue de 95% (p<0,01) la production de nitrites et de 82% (p<0,01) celle de PGE2 (Figure 28A et B).

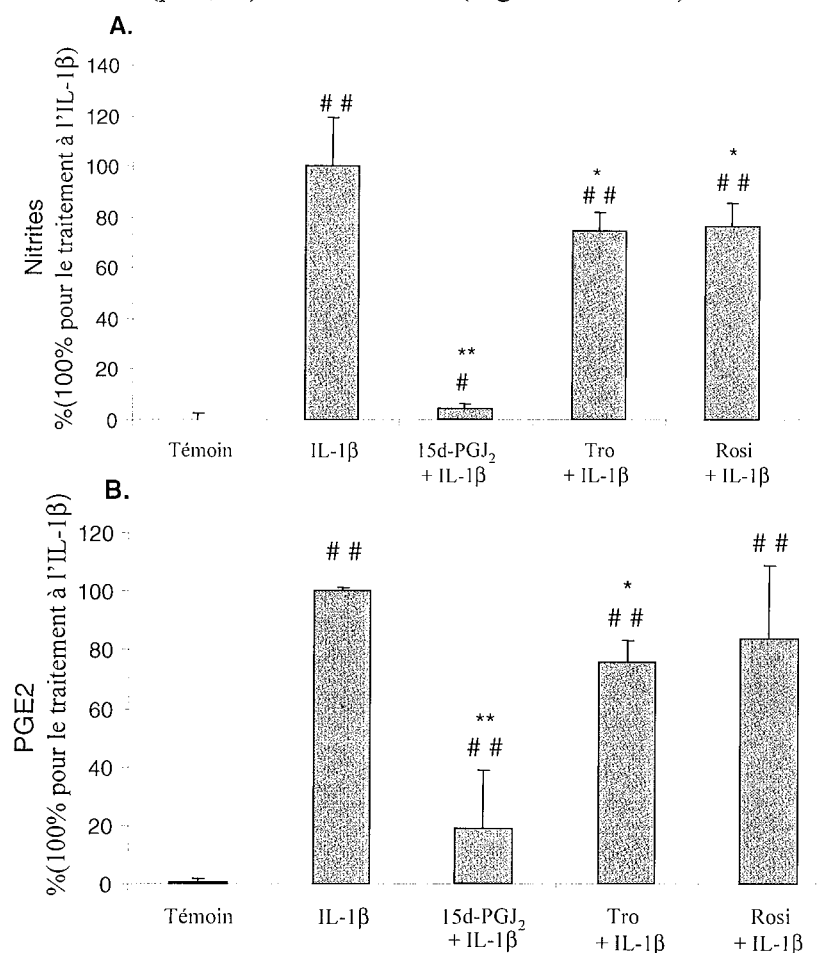


Figure 28 : Effets d'une surexpression de PPAR γ sur les productions de nitrites (A) et de PGE2 (B) induites par l'IL-1 β .

Après 36 heures de transfection, les chondrocytes sont traités par les ligands de PPAR γ (10 μ M) pendant une heure avant d'être stimulés pendant 24 heures par de l'IL-1 β (10 ng/ml). La concentration de nitrites dans les milieux de culture est évaluée selon la méthode de Griess et celle des PGE2 à l'aide d'un kit ELISA. Les différences significatives sont indiquées par * p<0,05 et ** p<0,01 par rapport au traitement à l'IL-1 β et par ## p<0,01 par rapport au témoin.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus au niveau de l'ARNm d'iNOS et de COX-2. Cependant, une pré-incubation en présence de troglitazone diminue de manière significative la production de nitrites (-26%) et de PGE2 (-24%) induite par l'IL-1 β alors qu'aucune modification de l'expression de l'ARNm d'iNOS et de COX-2 n'avait été observée en RT-PCR. Nous observons également une diminution de la production de nitrites (-24%, p<0,05) induite par l'IL-1 β lors d'une pré-incubation en présence de rosiglitazone.

II.3 Effets d'une surexpression d'une forme mutée de PPAR γ dans des chondrocytes de rat traités à l'IL-1 β

Afin de vérifier l'hypothèse d'implication de PPAR γ dans les effets anti-inflammatoires de la 15d-PGJ₂, les chondrocytes ont été transfectés par un vecteur dominant-négatif de PPAR γ . Ainsi, nous avons observé que l'expression des ARNm de iNOS et de COX-2 induite par l'IL-1 β est diminuée par un pré-traitement en présence de 15d-PGJ₂, même après surexpression d'une forme dominant-négative de PPAR γ . De plus, les productions de NO et de PGE2 par les mêmes cellules transfectées sont également diminuées par la 15d-PGJ₂. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un mécanisme indépendant de PPAR γ pour les effets de la 15d-PGJ₂.

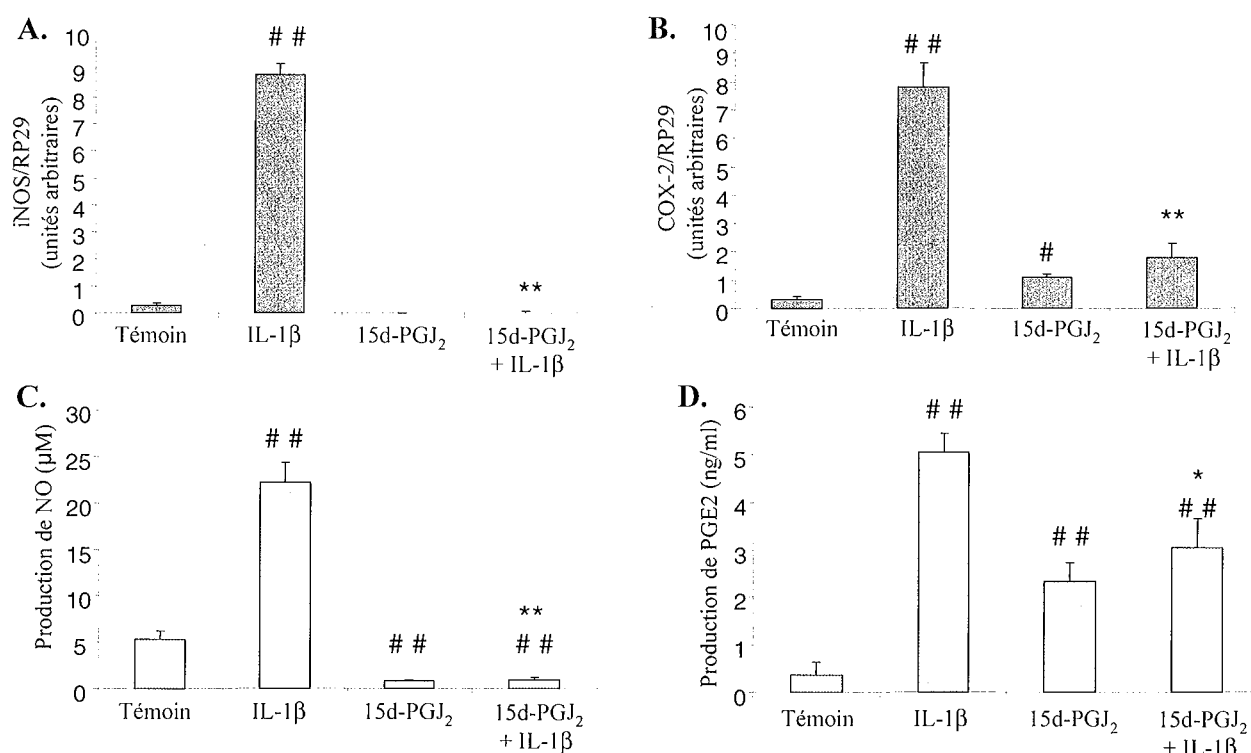


Figure 29 : Effet d'une surexpression d'un dominant-négatif de PPAR γ sur l'expression de iNOS (A), de COX-2 (B) et sur la production de NO (C) et de PGE2(D).

Après transfection, les chondrocytes sont prétraités en présence de 15d-PGJ₂ (10 μ M) pendant 1 heure puis par de l'IL-1 β (10ng/ml) pendant 24 heures. Les ARN totaux sont extraits puis analysés par PCR quantitative en temps réel utilisant des amorces spécifiques pour iNOS et COX-2. Les concentrations de nitrites et de PGE2 ont été mesurées dans les milieux de culture selon la méthode de Griess et par un kit ELISA respectivement. Les différences significatives sont indiquées par * p<0,05 par rapport au traitement à l'IL-1 β et par # p<0,05 et ## p<0,01 par rapport au témoin.

II.4 Effet d'une surexpression de PPAR γ sur la voie de signalisation NF- κ B

II.4.1 Effet sur la translocation de p65 dans le noyau et sur l'activité de NF- κ B

Dans divers types cellulaires, il a été démontré que la 15d-PGJ₂ pouvait moduler l'inflammation par un mécanisme indépendant de PPAR γ . En effet, des cibles intracellulaires de la 15d-PGJ₂ ont été identifiées, plus particulièrement dans la voie de signalisation de NF- κ B. Au cours de ce travail, nous avons étudié les effets des ligands de PPAR γ sur la translocation de p65 dans les noyaux de chondrocytes de rat transfectés. Les cellules ont été traitées par les ligands pendant 1 heure avant d'être stimulées par de l'IL-1 β pendant 30 minutes. Les extraits nucléaires ont ensuite été réalisés puis analysés par western-blot. La figure 30 montre qu'un traitement à l'IL-1 β , pendant 30 minutes induit une translocation importante de p65 dans le noyau. Comme nous l'avons précédemment montré dans les chondrocytes humains, une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ (10 μ M) inhibe partiellement (-32%, p<0,05) la translocation de p65 dans les noyaux de chondrocytes de rat. En revanche, aucun effet inhibiteur de la troglitazone ou de la rosiglitazone n'a été observé.

p65

T	IL-1 β	15d-PGJ ₂	15d-PGJ ₂ +IL-1 β	Tro	Tro + IL-1 β	Rosi	Rosi + IL-1 β
---	--------------	----------------------	---------------------------------------	-----	-----------------------	------	------------------------

Figure 30 : Analyse par western-blot des effets d'une surexpression de PPAR γ sur la translocation de p65 dans le noyau induite par l'IL-1 β .

Les protéines nucléaires issues de chondrocytes de rat transfectés par le plasmide d'expression sont isolées après un pré-traitement de 1 heure avec la 15d-PGJ₂ ou la troglitazone suivi d'un traitement de 30 minutes à l'IL-1 β . Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Les extraits nucléaires des mêmes cellules transfectées nous ont également servi à étudier la fixation de NF- κ B sur des régions cibles de l'ADN. La figure 31 montre qu'un traitement des chondrocytes transfectés par de l'IL-1 β pendant 30 minutes est suffisant pour entraîner la formation du complexe NF- κ B/ADN. Une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ inhibe partiellement (50%, p<0,05) la fixation de NF- κ B sur l'ADN. Comme nous l'avons montré

pour la translocation de p65 dans le noyau, une pré-incubation en présence de troglitazone ou de rosiglitazone n'a aucun effet sur l'activation de NF- κ B.

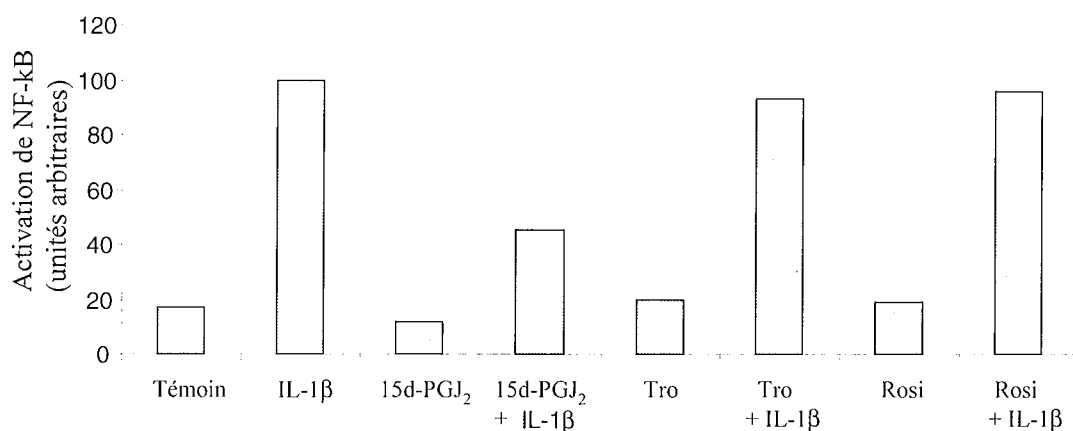


Figure 31 : Effets d'une surexpression de PPAR γ sur l'activité de NF- κ B induite par l'IL-1 β .

Les protéines nucléaires issues de chondrocytes de rat, transfectés par le plasmide d'expression, sont isolées après un pré-traitement de 1 heure avec la 15d-PGJ₂ ou la troglitazone suivi d'un traitement de 30 minutes à l'IL-1 β . L'activité de NF- κ B a été évaluée à l'aide d'un kit ELISA (TransAM). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

II.4.2 Etude de l'activité du promoteur de NF- κ B

Par une technique de gène rapporteur, nous avons étudié l'activité du promoteur de NF- κ B après traitement par l'IL-1 β en présence de ligands de PPAR γ . Des cultures de cellules HeLa ont été transfectées par le plasmide NF- κ B-Luc, le plasmide codant la β -galactosidase et par le plasmide d'expression de PPAR γ . Les cultures ont ensuite été incubées en présence des ligands pendant 1 heure avant un traitement à l'IL-1 β pendant une nuit. Ces expériences de gène rapporteur ont été réalisées sur des cultures de cellules HeLa du fait de problèmes de reproductibilité rencontrés dans les chondrocytes de rat.

La figure 32 montre qu'une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ diminue l'activité du promoteur de NF- κ B induite par l'IL-1 β (70%, $p < 0,05$) tandis que la troglitazone n'a pas d'effet. On observe cependant une diminution de l'activité de NF- κ B après une pré-incubation avec la rosiglitazone (Figure 32).

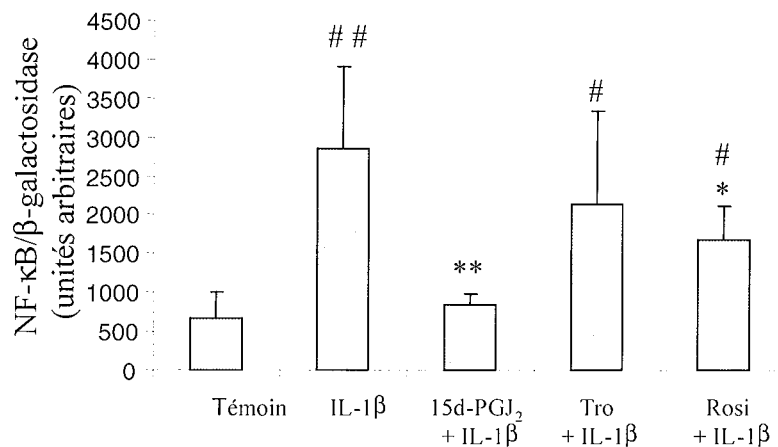


Figure 32 : Etude de l'activité du promoteur de NF- κB par une technique de gène rapporteur.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les différents plasmides puis elles ont été pré-incubées en présence de 15d-PGJ₂ ou de troglitazone (10 μM) pendant 1 heure avant d'être traitées par de l'IL-1β (10 ng/ml) pendant une nuit. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires par le rapport de l'activité luciférase sur l'activité β-galactosidase. Les différences significatives sont représentées par et* p< 0,05 et ** p<0,01 par rapport au traitement à l'IL-1β et par # p<0,05 et ## p<0,01 par rapport au témoin.

II.5 Recherche des cibles intracellulaires de la 15d-PGJ₂

II.5.1 Effets de la 15d-PGJ₂ sur la phosphorylation et la dégradation de la sous-unité inhibitrice IκBα

Dans ce travail, nous avons cherché à identifier des cibles potentielles de la 15d-PGJ₂ dans la voie de signalisation de NF-κB. Nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de la sous-unité inhibitrice de NF-κB, IκBα, qui est un signal qui entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Cela conduit à la libération de NF-κB dans le cytoplasme puis à sa translocation dans le noyau et donc à sa fixation sur son élément de réponse présent dans la région promotrice de gènes cibles.

Dans cette étude, nous avons étudié la phosphorylation de IκBα ainsi que sa dégradation par une technique de western-blot. Les extraits protéiques totaux sont réalisés à partir de cultures de chondrocytes de rat incubées en présence des ligands pendant 1 heure puis traités par de l'IL-1β pendant 5 minutes. Les analyses en western-blot montrent qu'un traitement à l'IL-1β entraîne une phosphorylation importante de IκBα, accompagnée d'une disparition rapide de

sa forme non phosphorylée (Figure 33A). Nous pouvons observer qu'une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂, de troglitazone ou de rosiglitazone n'a aucun effet sur cette phosphorylation (Figure 33A). En revanche, une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ inhibe partiellement la dégradation de IκBα induite par l'IL-1β (-55%, p<0,05). Les pré-traitements avec la troglitazone ou la rosiglitazone n'empêchent pas la dégradation d'IκBα induite par l'IL-1β (Figure 33B).

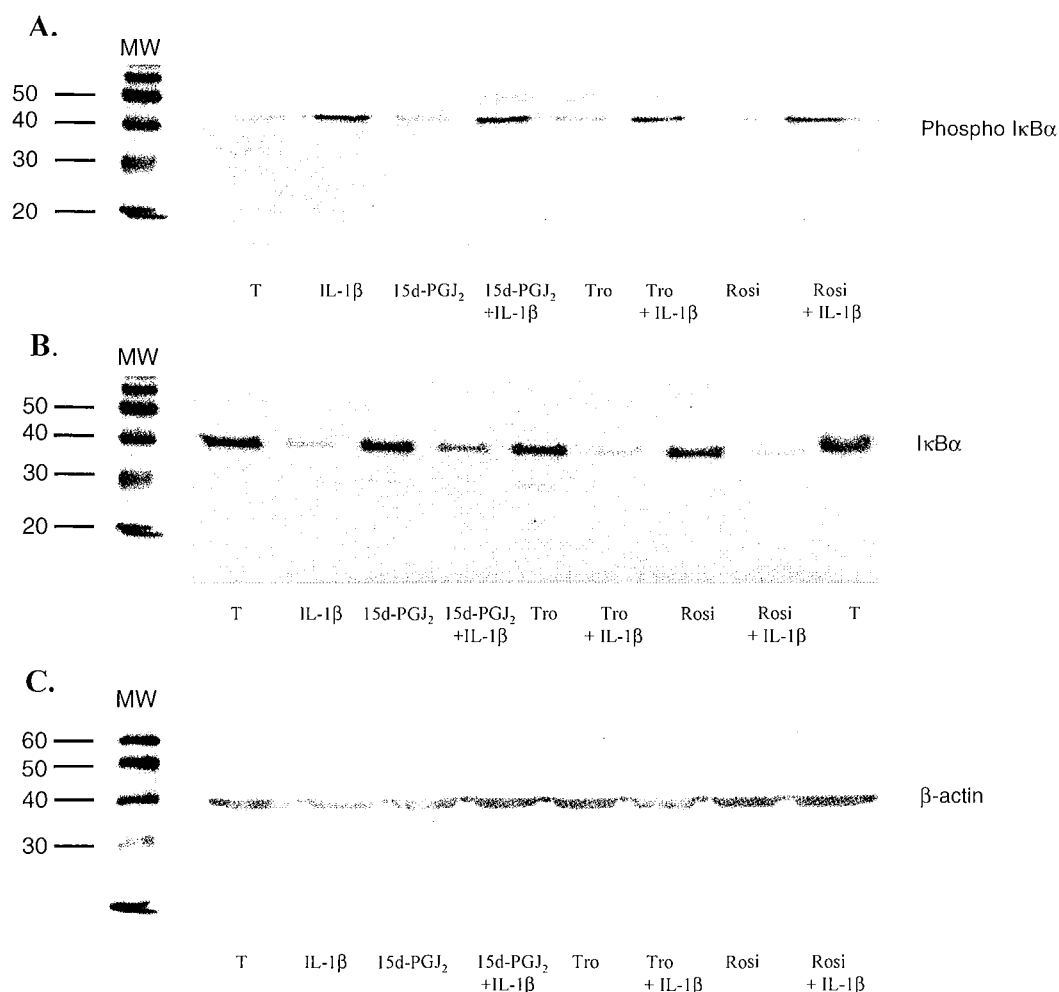


Figure 33 : Analyse par western-blot des effets de la 15d-PGJ₂ sur la phosphorylation et la dégradation de IκBα.

Les protéines totales ont été isolées à partir de chondrocytes de rat pré-incubés en présence ou non de ligands de PPARγ avant d'être traités par de l'IL-1β pendant 5 minutes. L'analyse par western-blot a été réalisée à l'aide des anticorps polyclonaux anti-IκBα phosphorylé (A), anti-IκBα (B) et anti-β-actine (C). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

II.5.2 Effet sur la phosphorylation des IκB Kinases (IKK)

La phosphorylation d'IκB est directement sous le contrôle de l'activation enzymatique du complexe IKK. Dans certaines lignées cellulaires, cette enzyme a été identifiée comme cible de l'action de la 15d-PGJ₂. Afin d'étudier la phosphorylation de IKKα/β, des extraits protéiques totaux ont été réalisés à partir de cultures de chondrocytes de rat stimulés par de l'IL-1β pendant 5 minutes en présence des ligands de PPARγ.

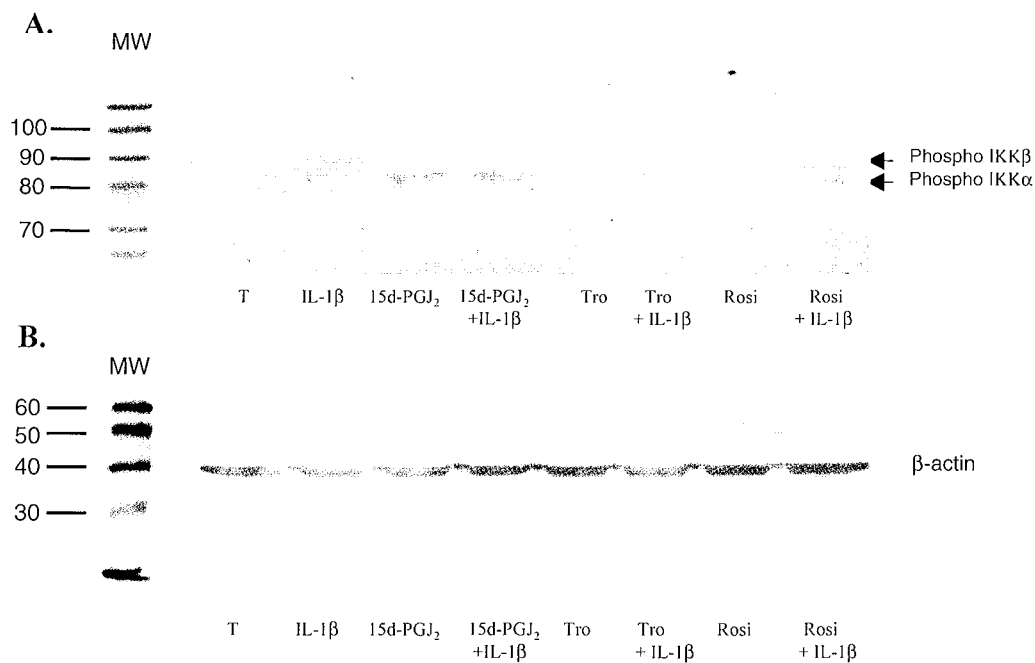


Figure 34 : Analyse par western-blot des effets de la 15d-PGJ₂ sur la phosphorylation du complexe IKKα/β.

Les protéines totales ont été isolées à partir de chondrocytes de rat pré-incubés en présence ou non de ligands de PPARγ avant d'être traités par de l'IL-1β pendant 5 minutes. L'analyse par western-blot a été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-IKKα/β phosphorylé. L'intensité des bandes a été mesurée par densitométrie. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La figure 34 montre qu'un traitement à l'IL-1β pendant 5 minutes entraîne une phosphorylation des formes alpha et bêta du complexe IKK. Une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ permet d'inhiber totalement la phosphorylation d'IKKβ mais n'a aucun effet sur celle d'IKKα. Une pré-incubation en présence de troglitazone ou de rosiglitazone n'a aucun effet sur la phosphorylation d'IKKα/β induite par l'IL-1β.

III Effets de ligands spécifiques de PPARs sur l'action du LPS sur des synoviocytes de type B de rat

III.1 Mise en évidence des récepteurs

Par une technique de RT-PCR quantitative, nous avons mis en évidence une expression constitutive au niveau de l'ARNm de PPAR α et PPAR γ dans des synoviocytes de type B de rat en culture (Figure 35).

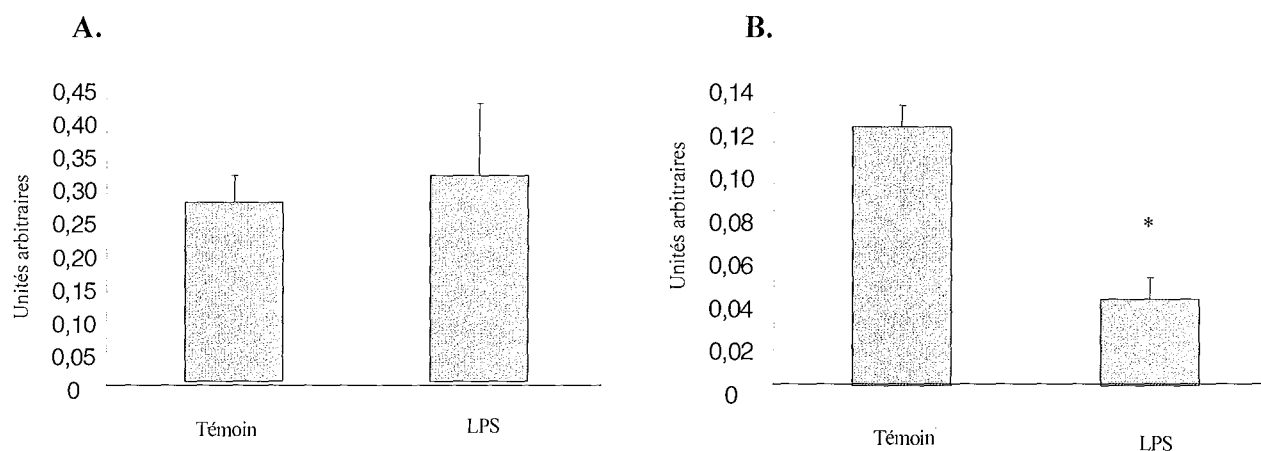


Figure 35 : Effets du LPS sur l'expression de l'ARNm de PPAR α (A) et PPAR γ (B).

Les ARN totaux ont été extraits à partir de synoviocytes B de rat traités ou non par du LPS (10 μ g/ml) pendant 12 heures, puis soumis à une analyse par RT-PCR quantitative. La quantité relative des messagers codant ces trois récepteurs a été normalisée par mesure de l'expression de la protéine ribosomale L27. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ par rapport au témoin.

Une analyse en western-blot et une étude immunocytoologique nous ont permis de montrer leur présence au niveau de la protéine mais également de déterminer leur localisation intracellulaire. Ainsi, PPAR α et PPAR γ sont localisés principalement dans le noyau et peu dans le cytoplasme (Figure 36).

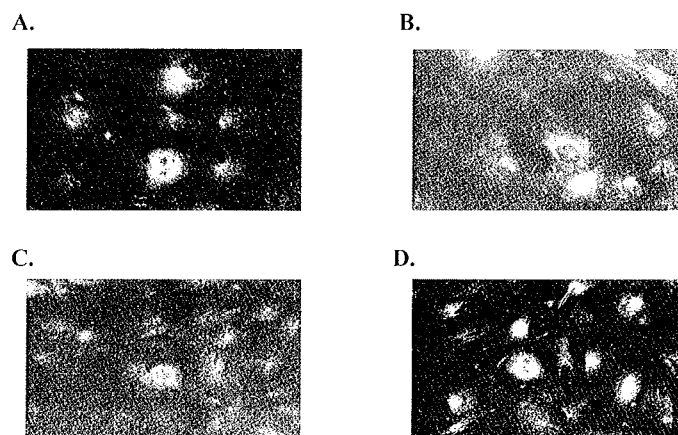


Figure 36 : Localisation intracellulaire de PPAR γ (A et B) et PPAR α (C et D) par immunocytochimie dans des cultures de synoviocytes de rat.

Les photos A et C correspondent aux cultures témoins et les photos B et D aux cultures de cellules traitées au LPS pendant 12 heures à 10 μ g/ml.

Nous avons ensuite étudié la modulation de l'expression de ces récepteurs par un traitement au LPS à 10 μ g/ml au niveau transcriptionnel (Figure 35) et protéique (Figure 36 et 37). L'expression du messager de PPAR γ est diminuée de manière significative par un traitement au LPS pendant 12h. En revanche, l'expression de l'ARNm de PPAR α n'est pas modifiée par un traitement au LPS. Les résultats obtenus en western-blot montrent que les variations d'expression observées au niveau protéique confirment les résultats obtenus en RT-PCR (Figure 37).

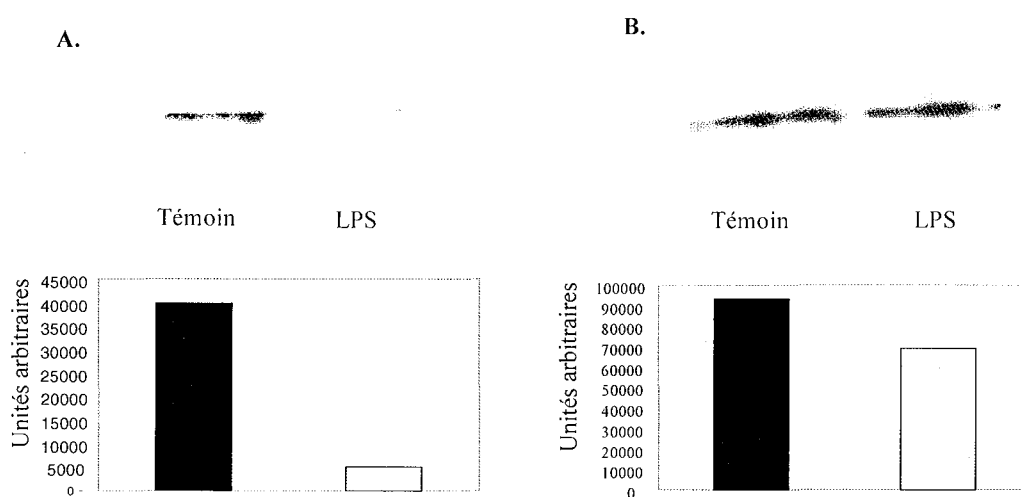


Figure 37 : Effets du LPS sur l'expression protéique de PPAR γ (A) et PPAR α (B) dans les synoviocytes de rat.

Les protéines totales ont été extraites après traitement au LPS 10 μ g/ml pendant 12 heures. Elles ont ensuite été soumises à une analyse par western-blot en utilisant des anticorps polyclonaux anti-PPAR α et anti-PPAR γ . L'intensité des bandes a été mesurée par densitométrie. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

III.2 Effets des ligands sur certains paramètres de l'inflammation

III.2.1 Effets sur l'expression de gènes précoces de l'inflammation

Le traitement de synoviocytes en culture par du LPS est connu pour induire l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, tels que COX-2, iNOS, IL-1 β et TNF α . Nous avons étudié la capacité de ligands spécifiques de PPAR γ à moduler l'expression de ces gènes. Pour cela, des cultures de synoviocytes ont été pré-incubées en présence de ligands ou de leur véhicule pendant 1 heure avant un traitement au LPS (10 μ g/ml) pendant 12 heures. Les ligands que nous avons testés sont la 15d-PGJ₂ et la troglitazone à des concentrations de 1 et 10 μ M. La figure 38 montre qu'un pré-traitement par la 15d-PGJ₂ diminue de manière dose-dépendante l'expression de COX-2 et d'iNOS. Cependant, nous observons que la troglitazone à une concentration de 10 μ M, n'a aucun effet sur l'expression de l'ARNm de COX-2 et inhibe de 50% ($p < 0,05$) celle d'iNOS.

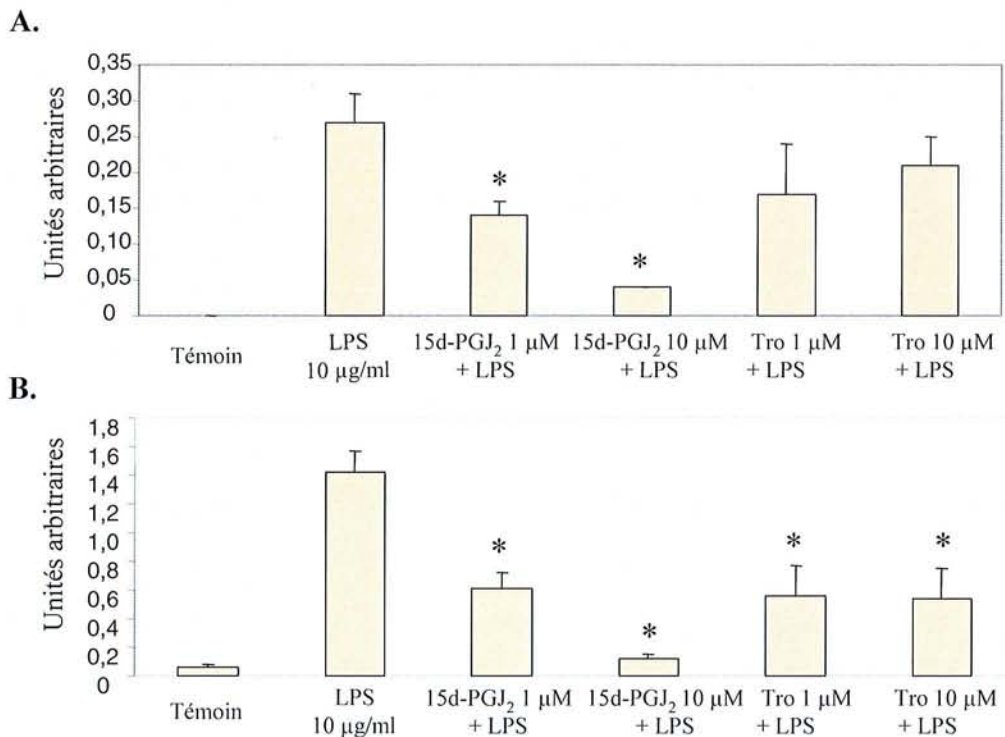
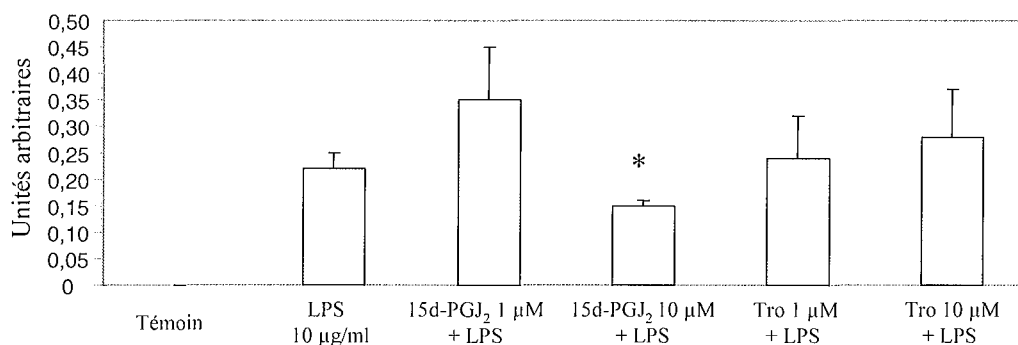


Figure 38 : Effets de ligands de PPAR γ (15d-PGJ₂ et Troglitazone) sur l'expression de COX-2 (A) et de iNOS (B) induite par le LPS.

Les ARN totaux ont été isolés à partir de synoviocytes de rat pré-traités pendant 1 heure avec les ligands à une concentration de 1 ou 10 μ M puis pendant 12 heures par du LPS (10 μ g/ml). Ils ont ensuite été soumis à une analyse en RT-PCR quantitative. La quantité relative de messagers codant iNOS et COX-2 a été normalisée par rapport à celle des ARNm de la L27. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ par rapport au traitement au LPS.

La figure 39 montre les effets des ligands sur l'expression des cytokines (IL-1 β et TNF α) dans des synoviocytes de type B traités par du LPS pendant 12 heures. Une pré-incubation en présence de 15d-PGJ₂ entraîne une diminution de 25% (p<0,05) de l'expression du messager de l'IL-1 β et de 40% (p<0,05) pour celle du TNF α . De plus, nous avons observé une action importante de la troglitazone à 10 μ M sur l'expression de l'ARNm du TNF α (50%, p<0,05) alors que ce pré-traitement n'a aucun effet sur l'expression de l'IL-1 β .

A.



B.

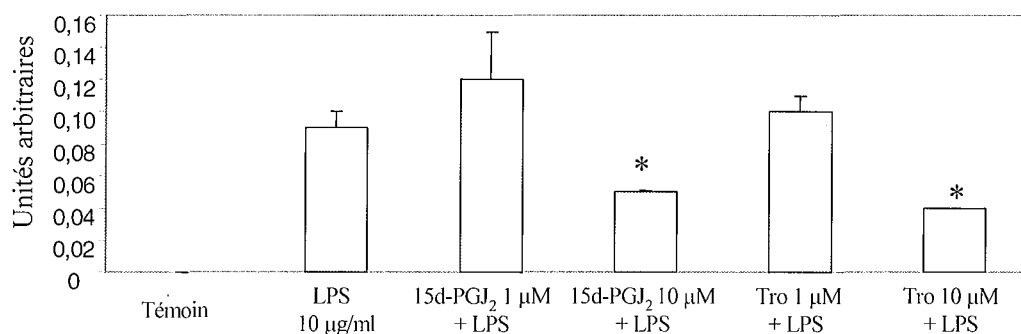


Figure 39 : Effets de ligands de PPAR γ (15d-PGJ₂ et Troglitazone) sur l'expression de l'IL-1 β (A) et du TNF α (B) induite par le LPS.

Les ARN totaux ont été isolés à partir de synoviocytes de rat pré-traités pendant 1 heure avec les ligands à une concentration de 1 ou 10 μ M puis pendant 12 heures par du LPS (10 μ g/ml). Ils ont ensuite été soumis à une analyse en RT-PCR quantitative. La quantité relative de messagers codant l'IL-1 β et le TNF α a été normalisée par rapport à celle des ARNm de la L27. Les différences significatives sont indiquées par * p<0,05 par rapport au traitement au LPS.

III.2.2 Effets sur la production de nitrites et d'IL-1 β

La quantité de nitrites produite est évaluée dans le surnageant des cultures de synoviocytes par la méthode de Griess. Les résultats du tableau IV montrent que la production de nitrites induite par le LPS est inhibée à la fois par la troglitazone et par la 15d-PGJ₂. En

effet, un pré-traitement en présence de 15d-PGJ₂ à 10 µM diminue de 67% (p<0,05) la production de nitrites alors que la troglitazone l'inhibe de 38%.

En ce qui concerne la production d'IL-1β induite par le LPS, un pré-traitement en présence de 15d-PGJ₂ à 10 µM inhibe de 50% la production d'IL-1β alors que la troglitazone n'a pas d'effet (Tableau IV)

	Nitrites (nmoles / 10 ⁵ cells)	IL-1β (pg.ml ⁻¹)
Témoin	192 +/- 25	251 +/- 35
LPS (10 µg/ml)	955 +/- 182	5626 +/- 895
15d-PGJ ₂ (1 µM) + LPS	607 +/- 73 (*)	5325 +/- 529
15d-PGJ ₂ (10 µM) +LPS	312 +/- 84 (*)	2521 +/- 386 (*)
Troglitazone (1 µM) +LPS	552 +/- 71 (*)	4807 +/- 715
Troglitazone (10 µM) +LPS	591 +/- 65 (*)	4992 +/- 819

Tableau IV : Effets de ligands spécifiques de PPARγ sur la production de nitrites et d'IL-1β induite par le LPS.

Les synoviocytes sont traités par les ligands de PPARγ (1 ou 10 µM) pendant une heure avant d'être stimulés pendant 24 heures par du LPS (10 µg/ml). La concentration de nitrites dans les milieux de culture est évaluée selon la méthode de Griess et celle de l'IL-1β à l'aide d'un kit ELISA. Les différences significatives sont indiquées par * p<0,05 par rapport au traitement au LPS.

III.3 Interaction des ligands avec la voie de signalisation du LPS : Etude de la fixation de NF-κB et d'AP-1 sur l'ADN

Dans les synoviocytes de type A et B, NF-κB et AP-1 interviennent également de manière importante dans le contrôle de l'expression de différents gènes de l'inflammation.

Comme dans les chondrocytes, nous avons étudié la potentialité de ligands de PPAR γ à moduler l'activation de ces deux voies transcriptionnelles. Pour cela, des cultures de synoviocytes de type B ont été pré-incubées en présence de 15d-PGJ $_2$ ou de troglitazone pendant 1 heure avant le traitement au LPS à 10 μ g/ml pendant 1 heure. Les expériences de gel retard ont été réalisées sur des extraits nucléaires de synoviocytes de type B afin d'évaluer la fixation de NF- κ B et d'AP-1 sur l'ADN. Les résultats de la figure 40 montrent une formation rapide des complexes protéines/oligonucléotides après un traitement au LPS. Un pré-traitement avec la 15d-PGJ $_2$ à 10 μ M inhibe la fixation de NF- κ B sur l'ADN de 48% ($p < 0,05$) et d'AP-1 de 50% ($p < 0,05$). En revanche, un pré-traitement en présence de troglitazone n'a aucun effet sur la fixation de NF- κ B. En revanche, et de manière surprenante, nous avons observé une augmentation importante de la fixation d'AP-1 sur l'ADN (160%, $p < 0,05$). Comme auparavant, une incubation des protéines nucléaires avec une sonde non radiomarquée concentrée 100 fois montre la spécificité de fixation de ces deux facteurs de transcription sur l'ADN.

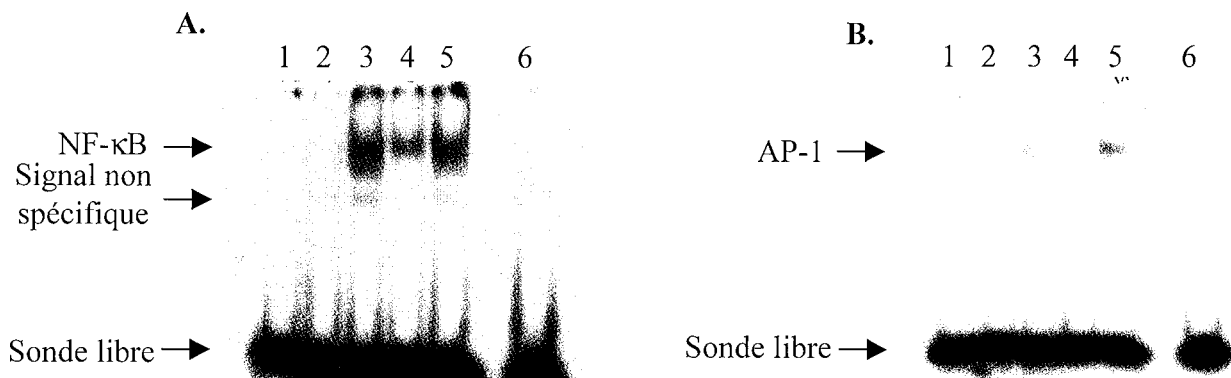


Figure 40 : Effets des ligands de PPAR γ sur la fixation de NF- κ B (A) et d'AP-1 (B) induite par le LPS.

Les synoviocytes B de rat ont été pré-incubés en présence de 15d-PGJ $_2$ ou troglitazone (10 μ M) avant d'être stimulés par du LPS (10 μ g/ml) pendant une heure. Les protéines nucléaires ont été extraites et analysées en retard sur gel utilisant les sondes radiomarquées pour NF- κ B et AP-1. Les complexes sont visualisés par autoradiographie. Piste 1 : sonde seule, piste 2 : témoin, piste 3 : LPS 10 μ g/ml, piste 4 : 15d-PGJ $_2$ 10 μ M + LPS, piste 5 : tro 10 μ M + LPS, piste 6 : LPS + compétition avec une sonde froide concentrée 100 fois. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

De plus, des expériences de super retard sur gel, nous ont permis d'identifier les sous unités formant les complexes protéiques NF- κ B et AP-1. Les résultats montrent que NF- κ B est constitué d'un hétérodimère p50-p65 et AP-1, d'un hétérodimère c-jun/c-fos (Figure 41).

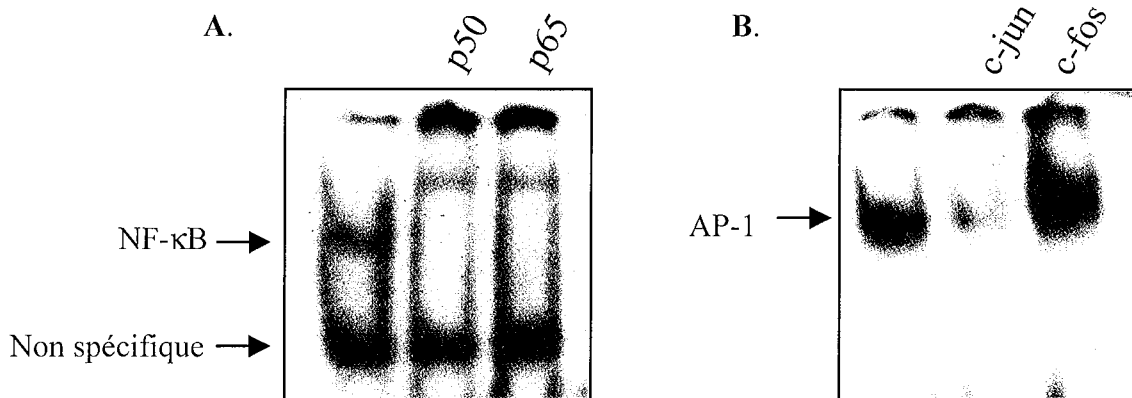


Figure 41 : Identification des sous-unités de NF- κ B(A) et d'AP-1(B) par analyse en super retard sur gel.

Les complexes ADN-protéines nucléaires correspondant aux complexes NF- κ B et AP-1 ont été séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide natif. La réaction de super retard sur gel a été réalisée en incubant à 4°C pendant 30 minutes les complexes avec les anticorps anti-p65, anti-p50, anti-c-fos et anti-c-jun. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Discussion

Chaque type cellulaire présent dans l'articulation peut exercer une action sur les autres et plus particulièrement au cours du développement d'arthropathies dégénératives ou inflammatoires. La destruction du cartilage apparaît comme le phénomène clé dans la pathologie arthrosique et implique donc plus particulièrement les chondrocytes, responsable de l'homéostasie du cartilage. En revanche, la membrane synoviale apparaît comme le principal tissu impliqué dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde, ceci par la production de MMP, de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 et de NO en quantité suffisante pour induire la dégradation du cartilage (Zvaifler N.J. et Firestein G.S., 1994). En effet, dans des modèles de coculture *in vitro*, des synoviocytes de type B induisent la dégradation du cartilage induite par l'IL-1 β et le TNF α (Scott B.B., 1997).

Les récepteurs nucléaires, PPAR α , PPAR γ et ROR α jouent un rôle majeur dans le métabolisme lipidique, l'homéostasie du glucose et la différenciation cellulaire. Plus récemment, il a été montré que sur des modèles de culture cellulaire ou sur des modèles animaux, l'activation de ces récepteurs par un ligand spécifique permettait de réduire l'inflammation, en modulant notamment à la fois la production et les effets de cytokines pro-inflammatoires (Hinz B. 2003, Jiang C., 1998, Petrova T.V., 1999, Poynter M.E. et Daynes R.A., 1998, Ricote M., 1998, Takano H., 2000). Un effet anti-arthritique d'un agoniste de ROR α (CGP-54,608) a également été mis en évidence (Wiesenberg I., 1998). Dans un modèle d'arthrite à l'adjuvant chez la souris, il a été observé un effet anti-inflammatoire de ligands de PPAR γ (pioglitazone et rosiglitazone) par inhibition de la voie NF- κ B (Shiojiri T., 2002). Ces récepteurs semblent être impliqués de manière très spécifique dans le contrôle de l'inflammation, en fonction du type cellulaire et de la nature de l'agent de stimulation mais également en fonction de l'espèce. Une étude antérieure effectuée au laboratoire nous a permis de mettre en évidence pour la première fois l'expression constitutive de ces trois récepteurs nucléaires dans le cartilage de rat (Bordji K, 2000). Ces résultats indiquent donc que PPAR α , PPAR γ et ROR α peuvent être des cibles potentielles dans les arthropathies inflammatoires ou dégénératives.

L'objectif de notre travail a consisté dans un premier temps à caractériser la présence de PPAR α , PPAR γ et ROR α dans des chondrocytes humains obtenus chez des patients arthrosiques et dans des synoviocytes de rat. Nous avons également évalué leur modification éventuelle d'expression induite par l'IL-1 β (50 U/ml ou 10 ng/ml) dans les chondrocytes et par le LPS (10 μ g/ml) qui est un puissant inducteur de l'expression de cytokines, dans les

synoviocytes. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à évaluer la potentialité d'agonistes spécifiques de ces récepteurs à moduler les effets de l'IL-1 ou du LPS.

Ainsi, nous avons montré, par RT-PCR quantitative multistandard, par western-blot et par immunocytochimie, la présence de ces trois récepteurs dans les chondrocytes humains issus de patients arthrosiques et dans les synoviocytes de rat. Nous avons également observé un effet très différent de l'IL-1 β sur l'expression de l'ARNm de chacun des trois facteurs de transcription. En effet, après traitement par l'IL-1 β (50 U/ml), l'expression de PPAR α reste inchangée tandis que l'expression de PPAR γ est diminuée et que celle de ROR α est augmentée. Ces modulations d'expression de PPAR α et PPAR γ ont également été observées dans des synoviocytes traités au LPS. Elles sont d'ailleurs en accord avec les résultats obtenus dans les chondrocytes de rat. Les modifications différentes de l'expression de PPAR α , PPAR γ et ROR α semblent donc indiquer une implication inégale de ces récepteurs dans les effets de l'IL-1 β sur les cellules cibles de l'articulation.

La potentialité de ligands de PPAR et de ROR α à diminuer les effets de l'IL-1 ou du LPS a tout d'abord été testée vis-à-vis de l'induction de l'expression d'iNOS et de COX-2, deux enzymes fortement impliquées dans le développement de l'inflammation. Si les ligands de PPAR α et ROR α testés sur les chondrocytes se révèlent inefficaces à moduler l'expression induite par l'IL-1 β de ces deux enzymes, des résultats différents ont été obtenus avec les deux ligands de PPAR γ . La 15d-PGJ₂ inhibe ainsi totalement l'induction de l'expression d'iNOS et partiellement celle de COX-2 tandis que la troglitazone ne conduit qu'à une inhibition partielle de l'expression d'iNOS. Ces résultats sont confirmés par des études récentes montrant dans des chondrocytes traités à l'IL-1 β que des agonistes de PPAR γ inhibent la production de NO, la baisse de synthèse des PG et l'expression de gènes de l'inflammation tels que les MMP, iNOS et COX-2 (Fahmi H., 2001, Sabatini M., 2002).

Dans des synoviocytes de rat traités au LPS, nous avons également montré que la 15d-PGJ₂ diminuait de façon dose-dépendante l'expression d'iNOS et de COX-2 induite par le LPS et que la troglitazone n'avait qu'un effet partiel sur l'expression d'iNOS. De plus, l'étude de l'induction de cytokines pro-inflammatoires a montré que la 15d-PGJ₂ module l'expression d'IL-1 β et de TNF α induite par le LPS. Il a également été montré dans des cellules gliales, que la 15d-PGJ₂ inhibait la production de NO, d'IL-12 et de TNF α ainsi que l'expression d'iNOS, induite par le LPS (Drew P.D. et Chavis J.A., 2001, Kitamura Y., 1999, Petrova T.V., 1999). De plus, la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de COX-2 induite par le LPS dans une lignée

macrophagique (cellules U937) mais pas dans des cellules endothéliales (Inoue H, 2000). Plus récemment, des études ont montré que des ligands de PPAR γ (15d-PGJ₂ et rosiglitazone) inhibaient l'expression de la MMP-1 induite par de l'IL-1 β dans des synoviocytes humains issus de patients arthrosiques (Fahmi H., 2002). Il est intéressant de noter que la troglitazone diminue l'expression du TNF α mais pas celle de l'IL-1 β , de manière plus importante qu'avec la 15d-PGJ₂.

Les différences entre ces deux ligands sont retrouvées lors des expériences de mesure de synthèse des PG dans les chondrocytes et de la production de NO dans les deux types cellulaires. En effet, seule la 15d-PGJ₂ a un effet chondroprotecteur car elle restaure partiellement la baisse de synthèse des PG de chondrocytes encapsulés dans des billes d'alginate et diminue la production de NO, tandis que la troglitazone n'a qu'un effet partiel sur la production de NO dans les deux types cellulaires. Ces résultats confortent certaines données de la littérature qui ont montré, sur d'autres types cellulaires, les mêmes différences d'efficacité de la 15d-PGJ₂ et de la troglitazone à moduler l'activation cellulaire (Petrova T.V., 1999, Bordji K., 2000). Ainsi, la 15d-PGJ₂ inhibe la production de TNF α et d'IL-6 induite par le LPS dans des macrophages tandis que des ligands ayant une meilleure affinité pour PPAR γ n'ont pas d'effet (Thieringer R., 2000). De même, dans un modèle d'arthrite à l'adjuvant chez le rat, la 15d-PGJ₂ améliore la pathologie en supprimant la formation du panus et l'infiltration cellulaire avec une meilleure efficacité que la troglitazone (Kawahito Y., 2000).

La 15d-PGJ₂ est décrit comme un ligand de PPAR γ . Cependant, l'absence ou le peu d'effet observé avec la troglitazone soulève la question de l'implication réelle du récepteur dans l'action de cette prostaglandine dans les chondrocytes humains et dans les synoviocytes de rat. Les données de la littérature sur cette question sont très contradictoires et les cibles intracellulaires de la 15d-PGJ₂ pouvant expliquer ses effets anti-inflammatoires semblent être dépendantes du type cellulaire, du stimulus et de l'espèce étudiés. En effet, dans des lignées cellulaires de monocytes ou de macrophages activés, la 15d-PGJ₂ modulent l'activation cellulaire par inhibition de la transcription par un mécanisme dépendant de PPAR γ (Jiang C., 1998, Ricote M., 1998). Au contraire, d'autres études ont montré que les effets anti-inflammatoires de ligands de PPAR γ pouvaient être indépendants de PPAR γ du fait du manque d'effet observé avec d'autres ligands (Castrillo A., 2000, Petrova T.V., 1999, Rossi A., 2000, Straus D.S., 2000). Ainsi, d'autres cibles intracellulaires ont été identifiées et plus

particulièrement dans la voie de signalisation de NF- κ B (Castrillo A., 2000, Petrova T.V., 1999, Rossi A., 2000, Straus D.S., 2000). D'autres équipes ont émis l'hypothèse que les récepteurs PPAR activés pourraient inhiber l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et d'AP-1 en séquestrant certains co-activateurs communs tels que p300, Src-1 et CREB-binding protein (Pineda Torra I., 1999).

NF- κ B et AP-1 étant deux facteurs de transcription inductibles par l'IL-1 β , contrôlant l'expression de gènes de l'inflammation, nous avons recherché des interactions inhibitrices éventuelles entre les ligands de PPAR γ , la 15d-PGJ₂ et la troglitazone et les facteurs de transcription, NF- κ B et AP-1. Nos résultats obtenus dans les chondrocytes montrent clairement que la 15d-PGJ₂ inhibe significativement la translocation de p65 dans le noyau mais également la fixation de NF- κ B sur l'ADN. En revanche, la troglitazone n'a aucun effet sur ces deux étapes de la voie de signalisation de NF- κ B. Des résultats similaires ont été observés dans les synoviocytes. Cependant, dans les synoviocytes humains issus de patients arthritiques, la troglitazone est capable d'inhiber l'activation de NF- κ B induite par le TNF α (Ji J.D., 2001) suggérant ici encore que les effets des ligands sont spécifiques du type cellulaire et de la nature de l'agent de stimulation mais également de l'espèce. L'absence d'effet de la troglitazone pourrait être expliquée par une expression trop faible de PPAR γ dans les chondrocytes et les synoviocytes. En effet, la comparaison de l'expression de PPAR γ dans différents tissus, le foie, le tissu adipeux et le cartilage de rat, montre que ce récepteur est plus faiblement exprimé dans le cartilage (Bordji K., 2000). Une autre hypothèse pourrait être que l'action de la 15d-PGJ₂ est indépendante de PPAR γ dans nos types cellulaires.

Concernant AP-1, nos analyses en western-blot montrent que les deux ligands n'inhibent pas la translocation de c-jun. Le contraire est même observé pour la 15d-PGJ₂ qui potentialise les effets de l'IL-1 β . Cependant, la fixation d'AP-1 sur l'ADN est diminuée par un pré-traitement à la 15d-PGJ₂. Ces résultats pour le moins surprenants et contradictoires, sont en accord avec ceux observés dans des cellules HeLa n'exprimant pas PPAR γ . En effet, la 15d-PGJ₂ est capable d'amplifier l'activation d'AP-1 induite par le phorbol 12-tétradécanoïque 13-acétate, dans ces cellules. Cet effet est attribué à l'activation de la jun N-terminal kinase (JNK) par la 15d-PGJ₂ (Straus D.S., 2000). Cela a pour effet d'augmenter la translocation d'AP-1 dans le noyau sans pour autant augmenter sa fixation sur l'ADN. Dans les synoviocytes de rat, la fixation d'AP-1 sur l'ADN induite par le LPS est inhibée par un prétraitement à la 15d-PGJ₂ alors que la troglitazone la potentialise. Ces observations démontrent que la troglitazone module l'expression d'iNOS et du TNF α induite par le LPS sans inhiber les voies

transcriptionnelles AP-1 et NF- κ B. Cet effet inhibiteur de la transcription ne semble donc pas être le résultat d'une interaction protéine-protéine ou protéine-ADN mais il serait plutôt dû à une compétition vis-à-vis des mêmes coactivateurs entre PPAR γ , AP-1 et NF- κ B. Cependant aucune donnée de ce travail ne nous permet de l'affirmer avec certitude.

La faible action de la troglitazone laisse penser que les effets anti-inflammatoires de la 15d-PGJ₂ dans les chondrocytes humains et les synoviocytes de rat sont principalement indépendants de PPAR γ et passent par l'inhibition des voies transcriptionnelles NF- κ B et AP-1. Afin d'améliorer notre compréhension de l'action de la 15d-PGJ₂, des expériences de transfection transitoire ont été réalisées sur des cultures de chondrocytes. Elles ont pour but d'augmenter l'expression d'une forme native ou mutée de PPAR γ . Les prélèvements humains étant peu nombreux et les transfections de chondrocytes humains étant plus difficiles à réaliser, les études ont été effectuées sur des chondrocytes de rat.

Nous avons tout d'abord évalué la potentialité de la troglitazone, la rosiglitazone et la 15d-PGJ₂ à moduler certains paramètres de l'inflammation après transfection. Nous avons observé une fois encore que seule la 15d-PGJ₂ est capable de diminuer l'expression du messager d'iNOS et de COX-2 ainsi que la production de NO et de PGE2 induite par l'IL-1 β . La troglitazone et la rosiglitazone ne modifient pas l'expression de ces gènes et modulent très faiblement la production de NO et de PGE2. L'utilisation d'un vecteur dominant-négatif de PPAR γ a permis de montrer que les effets de la 15d-PGJ₂ sur la production de NO et de PGE2 sont indépendants de PPAR γ dans les chondrocytes. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans d'autres types cellulaires, où les effets de la 15d-PGJ₂ sont notamment dus à une interaction avec d'autres voies de signalisation cellulaire, comme NF- κ B. NF- κ B est activé après phosphorylation et dégradation de la sous-unité inhibitrice I κ B α . Cette sous-unité est phosphorylée par le complexe IKK, qui contient deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et une sous-unité régulatrice, IKK γ ou NEMO. I κ B α phosphorylée va être ensuite ubiquitinylée avant d'être dégradée par le protéasome (Karin M., 1999). Diverses publications récentes ont montré que la 15d-PGJ₂ peut interférer avec différentes étapes de la voie de signalisation de NF- κ B. Cependant, les cibles intracellulaires de cette cyclopentenone ont été identifiées dans des lignées cellulaires établies et rarement dans des cultures primaires de cellules. Ainsi, dans des macrophages murins traités au LPS, la 15d-PGJ₂ affecte l'activité de IKK, car elle inhibe la phosphorylation des résidus sérines d'I κ B (Castrillo A., 2000). De

même, Rossi *et al.* ont montré que la 15d-PGJ₂ inhibe la phosphorylation de IKK β dans des cellules HeLa (Rossi A., 2000). Cette cyclopentenone peut également inhiber la fixation de NF- κ B sur l'ADN par alkylation d'un résidu cystéine présent dans le domaine de liaison à l'ADN de p65 (Straus D.S., 2000).

Dans notre travail, nous avons démontré que la 15d-PGJ₂ inhibe la voie de signalisation de NF κ B induite par l'IL-1 β tandis que les ligands synthétiques testés n'ont pas d'effet. Ces résultats sont corrélés à une diminution de la translocation de p65 dans le noyau et l'inhibition partielle de la transactivation de NF- κ B. Nous avons également observé que la dégradation d'I κ B α est inhibée par la 15d-PGJ₂ mais que sa phosphorylation n'est pas affectée. La phosphorylation d'I κ B α dépend du complexe IKK, qui doit être lui-même phosphorylé pour être actif. Nous avons donc étudié les effets d'un pré-traitement avec la 15d-PGJ₂ sur l'activation de ce complexe. Nos résultats montrent que la phosphorylation d'IKK β induite par l'IL-1 β est inhibée après un pré-traitement par de la 15d-PGJ₂ tandis que celle de IKK α n'est pas modifiée. Des données de la littérature indiquent que la phosphorylation d'I κ B semble être le résultat majeur de l'activation sous-unité IKK β . Ainsi, nous pouvons suggérer que l'inhibition de la dégradation de la sous-unité inhibitrice par le protéasome résulte de l'absence de phosphorylation de IKK β . Cependant, les expériences de western-blot montrent que la phosphorylation de I κ B α est maintenue suggérant que celle-ci résulte de l'activation de IKK α et de son activité enzymatique, qui n'est pas inhibée. A notre connaissance, ce mécanisme d'action de la 15d-PGJ₂ n'a jamais été décrit dans la littérature et d'autant plus dans les chondrocytes. Il est à noter que des travaux récents décrivant les effets de l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), un polyphénol dérivé du thé vert montrent que cette molécule a un mécanisme d'action similaire à celui que nous avons mis en évidence avec la 15d-PGJ₂ dans les chondrocytes humains (Lin Y.L. et Lin J.K., 1997, Yang F., 2001). En effet, l'EGCG inhibe la dégradation de I κ B α induite par l'IL-1 β mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation de cette sous-unité par le complexe IKK (Singh R., 2002). Cependant, les activités spécifiques de IKK α et IKK β n'ont pas été évaluées dans ce travail. Cette étude conforte nos résultats concernant les effets anti-inflammatoires de la 15d-PGJ₂, qui sont causés par une diminution de la dégradation de I κ B α .

Conclusions et Perspectives

Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en évidence la présence de PPAR α , PPAR γ et ROR α et à étudier leur modulation d'expression par l'IL-1 β et le LPS dans des chondrocytes humains issus de patients arthrosiques et des synoviocytes de type B de rat. Nous avons ainsi montré que ces récepteurs étaient présents dans les deux types cellulaires et que l'IL-1 β et le LPS induisent des modifications de leur expression très différentes. En effet, si l'expression de PPAR α est inchangée, celle de PPAR γ est diminuée et celle de ROR α est augmentée. Ces résultats suggèrent une implication très inégale de ces récepteurs dans les effets de l'IL-1 β ou du LPS sur le cartilage.

Nous avons ensuite étudié la potentialité de ligands spécifiques de PPAR et de ROR α à moduler les effets de l'IL-1 β dans des chondrocytes humains et du LPS, qui est un inducteur de cytokines, dans des synoviocytes de rat. Ainsi, nous avons montré que les ligands de PPAR α (Wy-14,643) et de ROR α (CGP 54,608) que nous avons testés n'ont pas d'effet sur les paramètres inflammatoires étudiés. Seuls les ligands de PPAR γ , la 15d-PGJ₂ et la troglitazone, ont des propriétés anti-inflammatoires. Cependant, les effets observés avec la 15d-PGJ₂ sont plus importants que ceux de la troglitazone qui a pourtant une meilleure affinité pour le récepteur PPAR γ . De plus, nos résultats de surexpression d'une forme native ou mutée suggèrent donc que les effets anti-inflammatoires de la 15d-PGJ₂ sont indépendants de PPAR γ dans nos deux types cellulaires, ce qui est en accord avec certaines données de la littérature.

Par ailleurs, nous avons également mis en évidence le mécanisme d'action de la 15d-PGJ₂ ainsi que les cibles intracellulaires dans la voie de signalisation de NF- κ B dans les chondrocytes de rat. Ainsi, la 15d-PGJ₂ inhibe la fixation de NF- κ B et celle d'AP-1 dans les chondrocytes et dans les synoviocytes. Nous avons également montré que l'action inhibitrice de la 15d-PGJ₂ sur le complexe enzymatique I κ B kinase, entraîne une inhibition de la dégradation de la protéine inhibitrice I κ B α qui mène ainsi à une diminution de la translocation de p65 dans le noyau et donc à une inhibition de la voie NF- κ B. Après phosphorylation, la sous-unité I κ B α doit être ubiquitinylée puis prise en charge par le protéasome afin d'être dégradée. Nous pourrions envisager de mesurer le taux d'ubiquitylation de la protéine I κ B α phosphorylée à l'aide d'anticorps anti-ubiquitine. Si l'action de la 15d-PGJ₂ n'empêche pas l'ubiquitylation de cette sous-unité, nous envisagerons de vérifier l'activité du protéasome en présence de 15d-PGJ₂ et l'éventuelle

prise en charge d'I κ B α par des protéines chaperonnes la protégeant de la dégradation par le protéasome.

Des travaux récents ont montré que la 15d-PGJ₂ pouvait également moduler l'activation de ERK1/2 indépendamment de PPAR γ (Eligini S., 2002, Wilmer W.A., 2001), par conséquent il serait intéressant d'identifier d'autres cibles intracellulaires de la 15d-PGJ₂ dans les voies de signalisation des MAPK dans nos modèles cellulaires.

Concernant les effets de la troglitazone sur les synoviocytes de rat traités par du LPS, où nous avons remarqué un effet plus important qu'avec la 15d-PGJ₂, vis-à-vis de l'expression du TNF α , il serait intéressant de comprendre les mécanismes liés à ce résultat. Pour cela, nous voudrions tout d'abord vérifier si les effets anti-inflammatoires des thiazolidinediones dans les synoviocytes peuvent s'expliquer par l'induction d'une ou plusieurs protéines SOCS (Suppressor Of Cytokines Signaling). Ces protéines sont considérées comme des inhibiteurs endogènes de la signalisation des cytokines agissant par les kinases de type Janus (JAK/STAT). Des travaux récents ont montré que SOCS 1 et 3 ont un rôle très important dans le contrôle de la réponse au LPS ainsi que sur les effets anti-LPS de l'IL-10. De plus, il semblerait que certains ligands de PPAR γ seraient des inducteurs de ces protéines.

D'autre part, une étude récente a démontré un pouvoir inducteur des ligands de PPAR γ sur la sécrétion d'IL-1Ra par des monocytes activés au PMA (Meier C.A., 2002). L'IL-1Ra est un antagoniste compétitif de l'IL-1 et est une cible thérapeutique dans les arthropathies. Il serait donc intéressant d'étudier la modulation de l'expression de l'IL-1Ra par des ligands de PPAR dans nos types cellulaires.

Références bibliographiques

- Alaaeddine, N., J.A. DiBattista, J.P. Pelletier, J.M. Cloutier, K. Kiansa, M. Dupuis, and J. Martel-Pelletier, Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol*, 1997. **24**(10): p. 1985-94.
- Allenby, G., M.T. Bocquel, M. Saunders, S. Kazmer, J. Speck, M. Rosenberger, A. Lovey, P. Kastner, J.F. Grippo, P. Chambon, and et al., Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(1): p. 30-4.
- Amin, A.R., M. Attur, R.N. Patel, G.D. Thakker, P.J. Marshall, J. Rediske, S.A. Stuchin, I.R. Patel, and S.B. Abramson, Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest*, 1997. **99**(6): p. 1231-7.
- Amri, E.Z., F. Bonino, G. Ailhaud, N.A. Abumrad, and P.A. Grimaldi, Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem*, 1995. **270**(5): p. 2367-71.
- Andre, E., K. Gawlas, and M. Becker-Andre, A novel isoform of the orphan nuclear receptor RORbeta is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene*, 1998. **216**(2): p. 277-83.
- Angel, P., K. Hattori, T. Smeal, and M. Karin, The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*, 1988. **55**(5): p. 875-85.
- Angel, P. and M. Karin, The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
- Arend, W.P. and J.M. Dayer, Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(3): p. 305-15.
- Arend, W.P., M. Malyak, M.F. Smith, Jr., T.D. Whisenand, J.L. Slack, J.E. Sims, J.G. Giri, and S.K. Dower, Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol*, 1994. **153**(10): p. 4766-74.
- Arend, W.P., M. Malyak, C.J. Guthridge, and C. Gabay, Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 27-55.
- Arend, W.P. and C.J. Guthridge, Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59 Suppl 1**: p. i60-4.
- Arner, E.C., Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol*, 2002. **2**(3): p. 322-9.
- Atkins, G.B., X. Hu, M.G. Guenther, C. Rachez, L.P. Freedman, and M.A. Lazar, Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(9): p. 1550-7.
- Attur, M.G., I.R. Patel, R.N. Patel, S.B. Abramson, and A.R. Amin, Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998. **110**(1): p. 65-72.
- Auwerx, J., G. Martin, M. Guerre-Millo, and B. Staels, Transcription, adipocyte differentiation, and obesity. *J Mol Med*, 1996. **74**(7): p. 347-52.
- Aydelotte, M.B., R.R. Greenhill, and K.E. Kuettner, Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res*, 1988. **18**(3): p. 223-34.
- Aydelotte, M.B. and K.E. Kuettner, Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res*, 1988. **18**(3): p. 205-22.
- Aydelotte, M.B., E.J. Thonar, J. Mollenhauer, and J. Flechtenmacher, Culture of chondrocytes in alginate gel: variations in conditions of gelation influence the structure of the alginate gel, and the arrangement and morphology of proliferating chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998. **34**(2): p. 123-30.

- Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 1996. **87**(1): p. 13-20.
- Baldwin, A.S., Jr., The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 649-83.
- Baler, R., S. Coon, and D.C. Klein, Orphan nuclear receptor RZRbeta: cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **220**(3): p. 975-8.
- Bankers-Fulbright, J.L., K.R. Kalli, and D.J. McKean, Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci*, 1996. **59**(2): p. 61-83.
- Banner, C.D., M. Gottlicher, E. Widmark, J. Sjovall, J.J. Rafter, and J.A. Gustafsson, A systematic analytical chemistry/cell assay approach to isolate activators of orphan nuclear receptors from biological extracts: characterization of peroxisome proliferator-activated receptor activators in plasma. *J Lipid Res*, 1993. **34**(9): p. 1583-91.
- Barak, Y., M.C. Nelson, E.S. Ong, Y.Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K.R. Chien, A. Koder, and R.M. Evans, PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 1999. **4**(4): p. 585-95.
- Barchowsky, A., D. Frleta, and M.P. Vincenti, Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*, 2000. **12**(10): p. 1469-79.
- Barger, P.M., A.C. Browning, A.N. Garner, and D.P. Kelly, p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 44495-501.
- Basu-Modak, S., O. Braissant, P. Escher, B. Desvergne, P. Honegger, and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem*, 1999. **274**(50): p. 35881-8.
- Bayly, A.C., R.A. Roberts, and C. Dive, Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J Cell Biol*, 1994. **125**(1): p. 197-203.
- Beck, F., S. Plummer, P.V. Senior, S. Byrne, S. Green, and W.J. Brammar, The ontogeny of peroxisome-proliferator-activated receptor gene expression in the mouse and rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1992. **247**(1319): p. 83-7.
- Becker-Andre, M., E. Andre, and J.F. DeLamarter, Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **194**(3): p. 1371-9.
- Becker-Andre, M., I. Wiesenberg, N. Schaeren-Wiemers, E. Andre, M. Missbach, J.H. Saurat, and C. Carlberg, Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*, 1994. **269**(46): p. 28531-4.
- Benderdour, M., G. Tardif, J.P. Pelletier, J.A. Di Battista, P. Reboul, P. Ranger, and J. Martel-Pelletier, Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1beta. *J Rheumatol*, 2002. **29**(6): p. 1262-72.
- Benninghoff, A., *Form und bau der gelenkknorpel in ihren beziehungen zur function. I. Die modellierenden und formerhaltenden faktoren des knorpelreliefs.*, in *Z Gesamte Anat*. 1925. p. 43-63.
- Berger, J., P. Bailey, C. Biswas, C.A. Cullinan, T.W. Doebber, N.S. Hayes, R. Saperstein, R.G. Smith, and M.D. Leibowitz, Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology*, 1996. **137**(10): p. 4189-95.

- Berger, J., M.D. Leibowitz, T.W. Doebber, A. Elbrecht, B. Zhang, G. Zhou, C. Biswas, C.A. Cullinan, N.S. Hayes, Y. Li, M. Tanen, J. Ventre, M.S. Wu, G.D. Berger, R. Mosley, R. Marquis, C. Santini, S.P. Sahoo, R.L. Tolman, R.G. Smith, and D.E. Moller, Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem*, 1999. **274**(10): p. 6718-25.
- Bhaumick, B. and R.M. Bala, Differential effects of insulin-like growth factors I and II on growth, differentiation and glucoregulation in differentiating chondrocyte cells in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1991. **125**(2): p. 201-11.
- Bird, J.L., T. Wells, D. Platt, and M.T. Bayliss, IL-1 beta induces the degradation of equine articular cartilage by a mechanism that is not mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **238**(1): p. 81-5.
- Birnboim, H.C. and J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
- Blanco, F.J., Y. Geng, and M. Lotz, Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol*, 1995a. **154**(8): p. 4018-26.
- Blanco, F.J., R.L. Ochs, H. Schwarz, and M. Lotz, Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*, 1995b. **146**(1): p. 75-85.
- Blanco, F.J. and M. Lotz, IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res*, 1995. **218**(1): p. 319-25.
- Bocos, C., M. Gottlicher, K. Gearing, C. Banner, E. Enmark, M. Teboul, A. Crickmore, and J.A. Gustafsson, Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995. **53**(1-6): p. 467-73.
- Boileau, C., J. Martel-Pelletier, F. Moldovan, J.Y. Jouzeau, P. Netter, P.T. Manning, and J.P. Pelletier, The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(10): p. 2637-47.
- Bois-Joyeux, B., C. Chauvet, H. Nacer-Cherif, W. Bergeret, N. Mazure, V. Giguere, V. Laudet, and J.L. Danan, Modulation of the far-upstream enhancer of the rat alpha-fetoprotein gene by members of the ROR alpha, Rev-erb alpha, and Rev-erb beta groups of monomeric orphan nuclear receptors. *DNA Cell Biol*, 2000. **19**(10): p. 589-99.
- Bondeson, J., B. Foxwell, F. Brennan, and M. Feldmann, Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5668-73.
- Bordji, K., J.P. Grillasca, J.N. Gouze, J. Magdalou, H. Schohn, J.M. Keller, A. Bianchi, M. Dauca, P. Netter, and B. Terlain, Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem*, 2000. **275**(16): p. 12243-50.
- Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras, Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, 1995. **375**(6530): p. 377-82.
- Braissant, O., F. Fougelle, C. Scotto, M. Dauca, and W. Wahli, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 1996. **137**(1): p. 354-66.
- Braissant, O. and W. Wahli, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology*, 1998. **139**(6): p. 2748-54.

- Bresnihan, B., J.M. Alvaro-Gracia, M. Cobby, M. Doherty, Z. Domljan, P. Emery, G. Nuki, K. Pavelka, R. Rau, B. Rozman, I. Watt, B. Williams, R. Aitchison, D. McCabe, and P. Musikic, Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(12): p. 2196-204.
- Bristulf, J., S. Gatti, D. Malinowsky, L. Bjork, A.K. Sundgren, and T. Bartfai, Interleukin-1 stimulates the expression of type I and type II interleukin-1 receptors in the rat insulinoma cell line Rinn5F; sequencing a rat type II interleukin-1 receptor cDNA. *Eur Cytokine Netw*, 1994. **5**(3): p. 319-30.
- Brockman, J.A., R.A. Gupta, and R.N. Dubois, Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 1998. **115**(5): p. 1049-55.
- Brooks, J.W. and S.B. Mizel, Interleukin-1 signal transduction. *Eur Cytokine Netw*, 1994. **5**(6): p. 547-61.
- Brown, K.K., B.R. Henke, S.G. Blanchard, J.E. Cobb, R. Mook, I. Kaldor, S.A. Klierer, J.M. Lehmann, J.M. Lenhard, W.W. Harrington, P.J. Novak, W. Faison, J.G. Binz, M.A. Hashim, W.O. Oliver, H.R. Brown, D.J. Parks, K.D. Plunket, W.Q. Tong, J.A. Menius, K. Adkison, S.A. Noble, and T.M. Willson, A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, 1999. **48**(7): p. 1415-24.
- Broxmeyer, H.E., Is interleukin 17, an inducible cytokine that stimulates production of other cytokines, merely a redundant player in a sea of other biomolecules? *J Exp Med*, 1996. **183**(6): p. 2411-5.
- Bruckner, P., L. Vaughan, and K.H. Winterhalter, Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(9): p. 2608-12.
- Brzozowski, A.M., A.C. Pike, Z. Dauter, R.E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G.L. Greene, J.A. Gustafsson, and M. Carlquist, Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 1997. **389**(6652): p. 753-8.
- Buckwalter, J.A., J.C. Pita, F.J. Muller, and J. Nessler, Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates. *J Orthop Res*, 1994. **12**(1): p. 144-8.
- Buckwalter, J.A., Maintaining and restoring mobility in middle and old age: the importance of the soft tissues. *Instr Course Lect*, 1997. **46**: p. 459-69.
- Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 1998. **47**: p. 477-86.
- Burmester, G.R., B. Stuhlmuller, G. Keyszer, and R.W. Kinne, Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(1): p. 5-18.
- Camp, H.S. and S.R. Tafuri, Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10811-6.
- Camp, H.S., S.R. Tafuri, and T. Leff, c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology*, 1999. **140**(1): p. 392-7.
- Camp, H.S., A. Chaudhry, and T. Leff, A novel potent antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks adipocyte differentiation but does not revert the phenotype of terminally differentiated adipocytes. *Endocrinology*, 2001. **142**(7): p. 3207-13.
- Campbell, I.K., D.S. Piccoli, M.J. Roberts, K.D. Muir, and J.A. Hamilton, Effects of tumor necrosis factor alpha and beta on resorption of human articular cartilage and production of plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(4): p. 542-52.
- Campbell, I.K., J. Wojta, U. Novak, and J.A. Hamilton, Cytokine modulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production by human articular cartilage and chondrocytes. Down-regulation by tumor necrosis factor alpha and up-regulation by transforming growth factor-B basic fibroblast growth factor. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1226**(3): p. 277-85.

- Carlberg, C., R. Hooft van Huijsduijnen, J.K. Staple, J.F. DeLamarter, and M. Becker-Andre, RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(6): p. 757-70.
- Caron, J.P., J.C. Fernandes, J. Martel-Pelletier, G. Tardif, F. Mineau, C. Geng, and J.P. Pelletier, Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(9): p. 1535-44.
- Carter, D.B., M.R. Deibel, Jr., C.J. Dunn, C.S. Tomich, A.L. Laborde, J.L. Slightom, A.E. Berger, M.J. Bienkowski, F.F. Sun, R.N. McEwan, and et al., Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature*, 1990. **344**(6267): p. 633-8.
- Castrillo, A., M.J. Diaz-Guerra, S. Hortelano, P. Martin-Sanz, and L. Bosca, Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(5): p. 1692-8.
- Cavaillon, J.M. and N. Haeflner-Cavaillon, [Interleukin 1: a mediator with multiple functions]. *Presse Med*, 1986. **15**(5): p. 185-7.
- Chabaud, M., F. Fossiez, J.L. Taupin, and P. Miossec, Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol*, 1998. **161**(1): p. 409-14.
- Chabaud, M., P. Garnero, J.M. Dayer, P.A. Guerne, F. Fossiez, and P. Miossec, Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2000. **12**(7): p. 1092-9.
- Chattopadhyay, N., D.P. Singh, O. Heese, M.M. Godbole, T. Sinohara, P.M. Black, and E.M. Brown, Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR_s) in human astrocytic cells: PPAR γ agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res*, 2000. **61**(1): p. 67-74.
- Chen, J.D. and R.M. Evans, A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 1995. **377**(6548): p. 454-7.
- Cherkaoui Malki, M., Y.C. Lone, M. Corral-Debrinski, and N. Latruffe, Differential proto-oncogene mRNA induction from rats treated with peroxisome proliferators. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. **173**(3): p. 855-61.
- Chernoff, A.E., E.V. Granowitz, L. Shapiro, E. Vannier, G. Lonnemann, J.B. Angel, J.S. Kennedy, A.R. Rabson, S.M. Wolff, and C.A. Dinarello, A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol*, 1995. **154**(10): p. 5492-9.
- Chevalier, S. and R.A. Roberts, G1-arrested FaO cells re-enter the cell cycle upon stimulation with the rodent non-genotoxic hepatocarcinogen nafenopin. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(7): p. 1209-13.
- Chinetti, G., S. Griglio, M. Antonucci, I.P. Torra, P. Delerive, Z. Majd, J.C. Fruchart, J. Chapman, J. Najib, and B. Staels, Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 25573-80.
- Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR_s): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*, 2000. **49**(10): p. 497-505.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
- Chow, L., E.M. Levine, and T.A. Reh, The nuclear receptor transcription factor, retinoid-related orphan receptor beta, regulates retinal progenitor proliferation. *Mech Dev*, 1998. **77**(2): p. 149-64.
- Christensen, J.G., A.J. Gonzales, R.C. Cattley, and T.L. Goldsworthy, Regulation of apoptosis in mouse hepatocytes and alteration of apoptosis by nongenotoxic carcinogens. *Cell Growth Differ*, 1998. **9**(9): p. 815-25.

- Chu, R., L.D. Madison, Y. Lin, P. Kopp, M.S. Rao, J.L. Jameson, and J.K. Reddy, Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding beta-oxidation enzymes: cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(25): p. 11593-7.
- Chung, S.W., B.Y. Kang, S.H. Kim, Y.K. Pak, D. Cho, G. Trinchieri, and T.S. Kim, Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 32681-7.
- Cipolletta, C., J.Y. Jouzeau, P. Gegout-Pottie, N. Presle, K. Bordji, P. Netter, and B. Terlain, Modulation of IL-1-induced cartilage injury by NO synthase inhibitors: a comparative study with rat chondrocytes and cartilage entities. *Br J Pharmacol*, 1998. **124**(8): p. 1719-27.
- Clark, J.M., The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J Anat*, 1990. **171**: p. 117-30.
- Cope, A.P., D.L. Gibbons, D. Aderka, B.M. Foxwell, D. Wallach, R.N. Maini, M. Feldmann, and F.M. Brennan, Differential regulation of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) by IL-4; upregulation of P55 and P75 TNF-R on synovial joint mononuclear cells. *Cytokine*, 1993. **5**(3): p. 205-12.
- Cremer, M.A., E.F. Rosloniec, and A.H. Kang, The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med*, 1998. **76**(3-4): p. 275-88.
- Crofford, L.J., R.L. Wilder, A.P. Ristimaki, H. Sano, E.F. Remmers, H.R. Epps, and T. Hla, Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest*, 1994. **93**(3): p. 1095-101.
- Cunnane, G., O. FitzGerald, K.M. Hummel, R.E. Gay, S. Gay, and B. Bresnihan, Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 1999. **38**(1): p. 34-42.
- Davies, S.S., A.V. Pontsler, G.K. Marathe, K.A. Harrison, R.C. Murphy, J.C. Hinshaw, G.D. Prestwich, A.S. Hilaire, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre, Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 16015-23.
- Dayer, J.M. and D. Burger, Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors. *Eur Cytokine Netw*, 1994. **5**(6): p. 563-71.
- Dayer, J.M., U. Feige, C.K. Edwards, 3rd, and D. Burger, Anti-interleukin-1 therapy in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 2001. **13**(3): p. 170-6.
- Dayer, J.M., The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2003. **42 Suppl 2**: p. ii3-10.
- Dean, D.D. and J.F. Woessner, Jr., Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases. *Biochem J*, 1984. **218**(1): p. 277-80.
- Delerive, P., K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, J.C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*, 1999. **274**(45): p. 32048-54.
- Delerive, P., D. Monte, G. Dubois, F. Trottein, J. Fruchart-Najib, J. Mariani, J.C. Fruchart, and B. Staels, The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep*, 2001. **2**(1): p. 42-8.
- Delerive, P., W.W. Chin, and C.S. Suen, Identification of Revrb(alpha) as a novel ROR(alpha) target gene. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35013-8.

- Desvergne, B. and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999. **20**(5): p. 649-88.
- Devchand, P.R., H. Keller, J.M. Peters, M. Vazquez, F.J. Gonzalez, and W. Wahli, The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, 1996. **384**(6604): p. 39-43.
- DiBattista, J.A., J. Martel-Pelletier, N. Fujimoto, K. Obata, M. Zafarullah, and J.P. Pelletier, Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest*, 1994. **71**(2): p. 270-8.
- DiBattista, J.A., S. Dore, N. Morin, and T. Abribat, Prostaglandin E2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem*, 1996. **63**(3): p. 320-33.
- DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, and M. Karin, A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
- Diep, Q.N., R.M. Touyz, and E.L. Schiffrin, Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension*, 2000. **36**(5): p. 851-5.
- Dinarello, C.A., Interleukin-1. *Dig Dis Sci*, 1988. **33**(3 Suppl): p. 25S-35S.
- Dinarello, C.A., Reduction of inflammation by decreasing production of interleukin-1 or by specific receptor antagonism. *Int J Tissue React*, 1992. **14**(2): p. 65-75.
- Dinarello, C.A., The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J*, 1994a. **8**(15): p. 1314-25.
- Dinarello, C.A., The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw*, 1994b. **5**(6): p. 517-31.
- Dinarello, C.A., Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*, 1998. **16**(5-6): p. 457-99.
- Dinarello, C.A., Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*, 1999. **179** Suppl 2: p. S294-304.
- Dinarello, C.A., Proinflammatory cytokines. *Chest*, 2000. **118**(2): p. 503-8.
- Dingle, J.T., The secretion of enzymes into the pericellular environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1975. **271**(912): p. 315-24.
- Drevlow, B.E., R. Lovis, M.A. Haag, J.M. Sinacore, C. Jacobs, C. Blosche, A. Landay, L.W. Moreland, and R.M. Pope, Recombinant human interleukin-1 receptor type I in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(2): p. 257-65.
- Drew, P.D. and J.A. Chavis, The cyclopentone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14) prostaglandin J2 represses nitric oxide, TNF-alpha, and IL-12 production by microglial cells. *J Neuroimmunol*, 2001. **115**(1-2): p. 28-35.
- Dreyer, C., G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, and W. Wahli, Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 879-87.
- Dreyer, C., H. Keller, A. Mahfoudi, V. Laudet, G. Krey, and W. Wahli, Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell*, 1993. **77**(1): p. 67-76.
- Dubocovich, M.L. and J.S. Takahashi, Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(11): p. 3916-20.
- Dussault, I. and V. Giguere, Differential regulation of the N-myc proto-oncogene by ROR alpha and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(4): p. 1860-7.

- Eisenberg, S.P., R.J. Evans, W.P. Arend, E. Verderber, M.T. Brewer, C.H. Hannum, and R.C. Thompson, Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 1990. **343**(6256): p. 341-6.
- Eligini, S., C. Banfi, M. Brambilla, M. Camera, S.S. Barbieri, F. Poma, E. Tremoli, and S. Colli, 15-deoxy-delta12,14-Prostaglandin J2 inhibits tissue factor expression in human macrophages and endothelial cells: evidence for ERK1/2 signaling pathway blockade. *Thromb Haemost*, 2002. **88**(3): p. 524-32.
- Elstner, E., C. Muller, K. Koshizuka, E.A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J.W. Said, D. Heber, and H.P. Koeffler, Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(15): p. 8806-11.
- Eyre, D.R., S. Apon, J.J. Wu, L.H. Ericsson, and K.A. Walsh, Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett*, 1987. **220**(2): p. 337-41.
- Eyre, D.R., I.R. Dickson, and K. Van Ness, Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxyproline residues. *Biochem J*, 1988. **252**(2): p. 495-500.
- Eyre, D.R., The collagens of articular cartilage. *Semin Arthritis Rheum*, 1991. **21**(3 Suppl 2): p. 2-11.
- Eyre, D.R., J.J. Wu, and P. Woods, *Cartilage specific collagens. Structural studies*, in *Articular cartilage and osteoarthritis*, K.K.e. coll., Editor. 1992, Raven Press: NY. p. 119-131.
- Fahmi, H., J.A. Di Battista, J.P. Pelletier, F. Mineau, P. Ranger, and J. Martel-Pelletier, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(3): p. 595-607.
- Fahmi, H., J.P. Pelletier, J.A. Di Battista, H.S. Cheung, J.C. Fernandes, and J. Martel-Pelletier, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(2): p. 100-8.
- Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A.M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J.C. Fruchart, S. Deeb, A. Vidal-Puig, J. Flier, M.R. Briggs, B. Staels, H. Vidal, and J. Auwerx, The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18779-89.
- Fan, C.Y., J. Pan, N. Usuda, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, and J.K. Reddy, Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem*, 1998. **273**(25): p. 15639-45.
- Fawns, H.T. and J.W. Landells, Histochemical studies of rheumatic conditions. Observations on fine structures of matrix of normal bone and cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 1953. **12**: p. 105-113.
- Fernandes, J., G. Tardif, J. Martel-Pelletier, V. Lascau-Coman, M. Dupuis, F. Moldovan, M. Sheppard, B.R. Krishnan, and J.P. Pelletier, In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression. *Am J Pathol*, 1999. **154**(4): p. 1159-69.
- Firestein, G.S., Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(11): p. 1781-90.
- Firestein, G.S. and A.M. Manning, Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(4): p. 609-21.
- FitzGerald, O. and B. Bresnihan, Synovial membrane cellularity and vascularity. *Ann Rheum Dis*, 1995. **54**(6): p. 511-5.
- Flannery, C.R., C.B. Little, C.E. Hughes, and B. Caterson, Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **251**(3): p. 824-9.

- Forman, B.M., P. Tontonoz, J. Chen, R.P. Brun, B.M. Spiegelman, and R.M. Evans, 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, 1995. **83**(5): p. 803-12.
- Forman, B.M., J. Chen, and R.M. Evans, Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(9): p. 4312-7.
- Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J.J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque, T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 1996. **183**(6): p. 2593-603.
- Franchimont, P. and C. Bassleer, Effects of hormones and local growth factors on articular chondrocyte metabolism. *J Rheumatol Suppl*, 1991. **27**: p. 68-70.
- Freemont, A.J., V. Hampson, R. Tilman, P. Goupille, Y. Taiwo, and J.A. Hoyland, Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis*, 1997. **56**(9): p. 542-9.
- Frost, J.A., J.L. Swantek, S. Stippec, M.J. Yin, R. Gaynor, and M.H. Cobb, Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 19693-9.
- Fruchart, J.C., P. Duriez, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 1999. **10**(3): p. 245-57.
- Fuchs, A.C., E.V. Granowitz, L. Shapiro, E. Vannier, G. Lonnemann, J.B. Angel, J.S. Kennedy, A.R. Rabson, E. Radwanski, M.B. Affrime, D.L. Cutler, P.C. Grint, and C.A. Dinarello, Clinical, hematologic, and immunologic effects of interleukin-10 in humans. *J Clin Immunol*, 1996. **16**(5): p. 291-303.
- Fukuda, K., K. Ohtani, H. Dan, and S. Tanaka, Interleukin-1 inhibits keratan sulfate production by rabbit chondrocytes: possible role of prostaglandin E2. *Inflamm Res*, 1995. **44**(4): p. 178-81.
- Fukumoto, T., A. Matsukawa, S. Ohkawara, K. Takagi, and M. Yoshinaga, Administration of neutralizing antibody against rabbit IL-1 receptor antagonist exacerbates lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Inflamm Res*, 1996. **45**(9): p. 479-85.
- Fulkerson, J.P. and P. Damiano, Effect of prostaglandin E2 on adult pig articular cartilage slices in culture. *Clin Orthop*, 1983(179): p. 266-9.
- Futani, H., A. Okayama, K. Matsui, S. Kashiwamura, T. Sasaki, T. Hada, K. Nakanishi, H. Tateishi, S. Maruo, and H. Okamura, Relation between interleukin-18 and PGE2 in synovial fluid of osteoarthritis: a potential therapeutic target of cartilage degradation. *J Immunother*, 2002. **25 Suppl 1**: p. S61-4.
- Gadher, S.J. and D.E. Woolley, Comparative studies of adherent rheumatoid synovial cells in primary culture: characterisation of the dendritic (stellate) cell. *Rheumatol Int*, 1987. **7**(1): p. 13-22.
- Gariot, P., E. Barrat, L. Mejean, J.P. Pointel, P. Drouin, and G. Debry, Fenofibrate and human liver. Lack of proliferation of peroxisomes. *Arch Toxicol*, 1983. **53**(2): p. 151-63.
- Gearing, K.L., M. Gottlicher, M. Teboul, E. Widmark, and J.A. Gustafsson, Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(4): p. 1440-4.
- Geng, Y., J. Valbracht, and M. Lotz, Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J Clin Invest*, 1996. **98**(10): p. 2425-30.
- Ghivizzani, S.C., R. Kang, H.I. Georgescu, E.R. Lechman, D. Jaffurs, J.M. Engle, S.C. Watkins, M.H. Tindal, M.K. Suchanek, L.R. McKenzie, C.H. Evans, and P.D. Robbins, Constitutive intra-articular expression of human IL-1 beta following gene transfer to rabbit synovium produces all major pathologies of human rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 1997. **159**(7): p. 3604-12.

- Giguere, V., M. Tini, G. Flock, E. Ong, R.M. Evans, and G. Otulakowski, Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*, 1994. **8**(5): p. 538-53.
- Glass, C.K., Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev*, 1994. **15**(3): p. 391-407.
- Glass, C.K., D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld, Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(2): p. 222-32.
- Gordon, M.K., P. Castagnola, B. Dublet, T.F. Linsenmayer, M. Van der Rest, R. Mayne, and B.R. Olsen, Cloning of a cDNA for a new member of the class of fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *Eur J Biochem*, 1991. **201**(2): p. 333-8.
- Gouze, J.N., K. Bordji, S. Gulberti, B. Terlain, P. Netter, J. Magdalou, S. Fournel-Gigleux, and M. Ouzzine, Interleukin-1beta down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glucosamine on interleukin-1beta-mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(2): p. 351-60.
- Gracie, J.A., R.J. Forsey, W.L. Chan, A. Gilmour, B.P. Leung, M.R. Greer, K. Kennedy, R. Carter, X.Q. Wei, D. Xu, M. Field, A. Foulis, F.Y. Liew, and I.B. McInnes, A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 1999. **104**(10): p. 1393-401.
- Granneman, J., R. Skoff, and X. Yang, Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J Neurosci Res*, 1998. **51**(5): p. 563-73.
- Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982. **126**(1): p. 131-8.
- Greene, M.E., B. Blumberg, O.W. McBride, H.F. Yi, K. Kronquist, K. Kwan, L. Hsieh, G. Greene, and S.D. Nimer, Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*, 1995. **4**(4-5): p. 281-99.
- Greenfeder, S.A., P. Nunes, L. Kwee, M. Labow, R.A. Chizzonite, and G. Ju, Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem*, 1995. **270**(23): p. 13757-65.
- Guilak, F., W.R. Jones, H.P. Ting-Beall, and G.M. Lee, The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. **7**(1): p. 59-70.
- Hai, T. and T. Curran, Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(9): p. 3720-4.
- Han, Z., D.L. Boyle, A.M. Manning, and G.S. Firestein, AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity*, 1998. **28**(4): p. 197-208.
- Hanley, K., Y. Jiang, S.S. He, M. Friedman, P.M. Elias, D.D. Bikle, M.L. Williams, and K.R. Feingold, Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPARalpha. *J Invest Dermatol*, 1998. **110**(4): p. 368-75.
- Harding, H.P., G.B. Atkins, A.B. Jaffe, W.J. Seo, and M.A. Lazar, Transcriptional activation and repression by RORalpha, an orphan nuclear receptor required for cerebellar development. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(11): p. 1737-46.
- Hardingham, T.E. and A.J. Fosang, Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J*, 1992. **6**(3): p. 861-70.
- Hardingham, T.E. and A.J. Fosang, The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl*, 1995. **43**: p. 86-90.

- Harris, E.D., Jr., Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*, 1990. **322**(18): p. 1277-89.
- Harris, S.G. and R.P. Phipps, The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(4): p. 1098-105.
- Harris, J.M., P. Lau, S.L. Chen, and G.E. Muscat, Characterization of the retinoid orphan-related receptor-alpha coactivator binding interface: a structural basis for ligand-independent transcription. *Mol Endocrinol*, 2002. **16**(5): p. 998-1012.
- Hascall, V.C. and D. Heinegard, Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid. *J Biol Chem*, 1974. **249**(13): p. 4232-41.
- Hashimoto, S., R.L. Ochs, F. Rosen, J. Quach, G. McCabe, J. Solan, J.E. Seegmiller, R. Terkeltaub, and M. Lotz, Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998a. **95**(6): p. 3094-9.
- Hashimoto, S., K. Takahashi, D. Amiel, R.D. Coutts, and M. Lotz, Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998b. **41**(7): p. 1266-74.
- Hashimoto, S., K. Takahashi, R.L. Ochs, R.D. Coutts, D. Amiel, and M. Lotz, Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(10): p. 2123-31.
- Häuselmann, H.J., M.B. Aydelotte, B.L. Schumacher, K.E. Kuettner, S.H. Gitelis, and E.J. Thonar, Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix*, 1992. **12**(2): p. 116-29.
- Häuselmann, H.J., L. Oppliger, B.A. Michel, M. Stefanovic-Racic, and C.H. Evans, Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Lett*, 1994. **352**(3): p. 361-4.
- Häuselmann, H.J., J. Flechtenmacher, L. Michal, E.J. Thonar, M. Shinmei, K.E. Kuettner, and M.B. Aydelotte, The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(3): p. 478-88.
- Hayashi, T., T. Sekine, and T. Okamoto, Identification of a new serine kinase that activates NF kappa B by direct phosphorylation. *J Biol Chem*, 1993. **268**(35): p. 26790-5.
- He, Y.W., M.L. Deftos, E.W. Ojala, and M.J. Bevan, RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity*, 1998. **9**(6): p. 797-806.
- He, T.C., T.A. Chan, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, 1999. **99**(3): p. 335-45.
- Heinegard, D. and A. Oldberg, Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb J*, 1989. **3**(9): p. 2042-51.
- Heinegard, D., *Articular cartilage and osteoarthritis.*, K.K.e. coll., Editor. 1992, Raven Press Ltd.: NY.
- Henderson, B. and E.R. Pettipher, Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. *Clin Exp Immunol*, 1989. **75**(2): p. 306-10.
- Henderson, B., R.C. Thompson, T. Hardingham, and J. Lewthwaite, Inhibition of interleukin-1-induced synovitis and articular cartilage proteoglycan loss in the rabbit knee by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Cytokine*, 1991. **3**(3): p. 246-9.
- Herrup, K. and R.J. Mullen, Regional variation and absence of large neurons in the cerebellum of the staggerer mouse. *Brain Res*, 1979. **172**(1): p. 1-12.

- Hertz, R., J. Bishara-Shieban, and J. Bar-Tana, Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem*, 1995. **270**(22): p. 13470-5.
- Hing, W.A., A.F. Sherwin, and C.A. Poole, The influence of the pericellular microenvironment on the chondrocyte response to osmotic challenge. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(4): p. 297-307.
- Hinz, B., K. Brune, and A. Pahl, 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-gamma-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(2): p. 415-20.
- Hirose, T., R.J. Smith, and A.M. Jetten, ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **205**(3): p. 1976-83.
- Hom, J.T., A.M. Bendele, and D.G. Carlson, In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol*, 1988. **141**(3): p. 834-41.
- Homandberg, G.A. and F. Hui, High concentrations of fibronectin fragments cause short-term catabolic effects in cartilage tissue while lower concentrations cause continuous anabolic effects. *Arch Biochem Biophys*, 1994. **311**(2): p. 213-8.
- Honorati, M.C., M. Bovara, L. Cattini, A. Piacentini, and A. Facchini, Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(10): p. 799-807.
- Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, and Y. Iwakura, Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med*, 2000. **191**(2): p. 313-20.
- Horlein, A.J., A.M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C.K. Glass, and et al., Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 1995. **377**(6548): p. 397-404.
- Horwitz, A.L. and A. Dorfman, Subcellular sites for synthesis of chondromucoprotein of cartilage. *J Cell Biol*, 1968. **38**(2): p. 58-68.
- Horwitz, K.B., T.A. Jackson, D.L. Bain, J.K. Richer, G.S. Takimoto, and L. Tung, Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*, 1996. **10**(10): p. 1167-77.
- Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
- Hsu, M.H., C.N. Palmer, W. Song, K.J. Griffin, and E.F. Johnson, A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J Biol Chem*, 1998. **273**(43): p. 27988-97.
- Hu, E., J.B. Kim, P. Sarraf, and B.M. Spiegelman, Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2100-3.
- Huber, M., S. Trattng, and F. Lintner, Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol*, 2000. **35**(10): p. 573-80.
- Huin, C., L. Corriveau, A. Bianchi, J.M. Keller, P. Collet, P. Kremarik-Bouillaud, L. Domenjoud, P. Becuwe, H. Schohn, D. Menard, and M. Dauca, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *J Histochem Cytochem*, 2000. **48**(5): p. 603-11.
- Hulkower, K.I., S.J. Wertheimer, W. Levin, J.W. Coffey, C.M. Anderson, T. Chen, D.L. DeWitt, R.M. Crowl, W.C. Hope, and D.W. Morgan, Interleukin-1 beta induces cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. Evidence for their roles in the production of prostaglandin E2. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(5): p. 653-61.

- Hunter, J.G., M.F. van Delft, R.A. Rachubinski, and J.P. Capone, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands differentially modulate muscle cell differentiation and MyoD gene expression via peroxisome proliferator-activated receptor gamma -dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, 2001. **276**(41): p. 38297-306.
- Hunziker, E.B., *Articular cartilage and osteoarthritis.*, K.K.e. coll., Editor. 1992, Raven Press ltd.: NY.
- Huttunen, J.K., V. Manninen, M. Manttari, P. Koskinen, M. Romo, L. Tenkanen, O.P. Heinonen, and M.H. Frick, The Helsinki Heart Study: central findings and clinical implications. *Ann Med*, 1991. **23**(2): p. 155-9.
- Ijpenberg I.J., E. Jeannin, W. Wahli, and B. Desvergne, Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem*, 1997. **272**(32): p. 20108-17.
- Inoue, H., T. Tanabe, and K. Umesono, Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 28028-32.
- Inoue, K., Y. Kawahito, Y. Tsubouchi, M. Kohno, R. Yoshimura, T. Yoshikawa, and H. Sano, Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in renal cell carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **287**(3): p. 727-32.
- Ismail, S., R.M. Atkins, M.F. Pearse, P.A. Dieppe, and C.J. Elson, Susceptibility of normal and arthritic human articular cartilage to degradative stimuli. *Br J Rheumatol*, 1992. **31**(6): p. 369-73.
- Isomäki, P., R. Luukkainen, P. Toivanen, and J. Punnonen, The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(10): p. 1693-702.
- Janssens, S., K. Burns, J. Tschopp, and R. Beyaert, Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol*, 2002. **12**(6): p. 467-71.
- Ji, J.D., H. Cheon, J.B. Jun, S.J. Choi, Y.R. Kim, Y.H. Lee, T.H. Kim, I.J. Chae, G.G. Song, D.H. Yoo, S.Y. Kim, and J. Sohn, Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun*, 2001. **17**(3): p. 215-21.
- Jiang, C., A.T. Ting, and B. Seed, PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 82-6.
- Jin, P., Y. Sun, and G.A. Grabowski, Role of Sp proteins and RORalpha in transcription regulation of murine prosaposin. *J Biol Chem*, 1998. **273**(21): p. 13208-16.
- Jones, P.S., R. Savory, P. Barratt, A.R. Bell, T.J. Gray, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, and D.R. Bell, Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur J Biochem*, 1995. **233**(1): p. 219-26.
- Joosten, L.A., M.M. Helsen, T. Saxne, F.A. van De Loo, D. Heinegard, and W.B. van Den Berg, IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol*, 1999a. **163**(9): p. 5049-55.
- Joosten, L.A., E. Lubberts, M.M. Helsen, T. Saxne, C.J. Coenen-de Roo, D. Heinegard, and W.B. van den Berg, Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res*, 1999b. **1**(1): p. 81-91.
- Jovanovic, D., J.P. Pelletier, N. Alaaeddine, F. Mineau, C. Geng, P. Ranger, and J. Martel-Pelletier, Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998a. **6**(1): p. 40-9.

- Jovanovic, D.V., J.A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F.C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, and J.P. Pelletier, IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, 1998b. **160**(7): p. 3513-21.
- Juge-Aubry, C., A. Pernin, T. Favez, A.G. Burger, W. Wahli, C.A. Meier, and B. Desvergne, DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, 1997. **272**(40): p. 25252-9.
- Juge-Aubry, C.E., E. Hammar, C. Siegrist-Kaiser, A. Pernin, A. Takeshita, W.W. Chin, A.G. Burger, and C.A. Meier, Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10505-10.
- Kahle, P., J.G. Saal, K. Schaudt, J. Zacher, P. Fritz, and G. Pawelec, Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Ann Rheum Dis*, 1992. **51**(6): p. 731-4.
- Kallen, J.A., J.M. Schlaepfli, F. Bitsch, S. Geisse, M. Geiser, I. Delhon, and B. Fournier, X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure (Camb)*, 2002. **10**(12): p. 1697-707.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(2): p. 240-6.
- Karin, M. and M. Delhase, JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase I action? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9067-9.
- Karin, M., The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27339-42.
- Kassam, A., J.P. Capone, and R.A. Rachubinski, Orphan nuclear hormone receptor RevErbalpha modulates expression from the promoter of the hydratase-dehydrogenase gene by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor alpha-dependent transactivation. *J Biol Chem*, 1999. **274**(32): p. 22895-900.
- Katsikis, P.D., C.Q. Chu, F.M. Brennan, R.N. Maini, and M. Feldmann, Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 1994. **179**(5): p. 1517-27.
- Kawahito, Y., M. Kondo, Y. Tsubouchi, A. Hashiramoto, D. Bishop-Bailey, K. Inoue, M. Kohno, R. Yamada, T. Hla, and H. Sano, 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest*, 2000. **106**(2): p. 189-97.
- Kehrer, J.P., S.S. Biswal, E. La, P. Thuillier, K. Datta, S.M. Fischer, and J.P. Vanden Heuvel, Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)alpha by MK886. *Biochem J*, 2001. **356**(Pt 3): p. 899-906.
- Keller, H., C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato, and W. Wahli, Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(6): p. 2160-4.
- Keller, H., F. Givel, M. Perroud, and W. Wahli, Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol Endocrinol*, 1995. **9**(7): p. 794-804.
- Kern, P.A., S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, and G. Ranganathan, Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **280**(5): p. E745-51.
- Kersten, S., J. Seydoux, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, B. Desvergne, and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, 1999. **103**(11): p. 1489-98.
- Kersten, S., S. Mandard, P. Escher, F.J. Gonzalez, S. Tafuri, B. Desvergne, and W. Wahli, The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *Faseb J*, 2001. **15**(11): p. 1971-8.

- Kimura, M., S. Tanaka, Y. Yamada, Y. Kiuchi, T. Yamakawa, and H. Sekihara, Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. *Endocrinology*, 1998. **139**(7): p. 3249-53.
- Kitamura, S., Y. Miyazaki, Y. Shinomura, S. Kondo, S. Kanayama, and Y. Matsuzawa, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res*, 1999. **90**(1): p. 75-80.
- Kliwer, S.A., K. Umesono, D.J. Noonan, R.A. Heyman, and R.M. Evans, Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 1992. **358**(6389): p. 771-4.
- Kliwer, S.A., J.M. Lenhard, T.M. Willson, I. Patel, D.C. Morris, and J.M. Lehmann, A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, 1995. **83**(5): p. 813-9.
- Kliwer, S.A., S.S. Sundseth, S.A. Jones, P.J. Brown, G.B. Wisely, C.S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T.M. Willson, J.M. Lenhard, and J.M. Lehmann, Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(9): p. 4318-23.
- Kobayashi, Y., K. Yamamoto, T. Saido, H. Kawasaki, J.J. Oppenheim, and K. Matsushima, Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(14): p. 5548-52.
- Koch, A.E., P.J. Polverini, S.L. Kunkel, L.A. Harlow, L.A. DiPietro, V.M. Elner, S.G. Elner, and R.M. Strieter, Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 1992. **258**(5089): p. 1798-801.
- Koch, A.E., M.M. Halloran, C.J. Haskell, M.R. Shah, and P.J. Polverini, Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*, 1995. **376**(6540): p. 517-9.
- Koibuchi, N. and W.W. Chin, ROR alpha gene expression in the perinatal rat cerebellum: ontogeny and thyroid hormone regulation. *Endocrinology*, 1998. **139**(5): p. 2335-41.
- Kopmels, B., J. Mariani, N. Delhaye-Bouchaud, F. Audibert, D. Fradelizi, and E.E. Wollman, Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J Neurochem*, 1992. **58**(1): p. 192-9.
- Krey, G., O. Braissant, F. L'Horsset, E. Kalkhoven, M. Perroud, M.G. Parker, and W. Wahli, Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(6): p. 779-91.
- Kubota, T., K. Koshizuka, E.A. Williamson, H. Asou, J.W. Said, S. Holden, I. Miyoshi, and H.P. Koeffler, Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 1998. **58**(15): p. 3344-52.
- Kubota, N., Y. Terauchi, H. Miki, H. Tamemoto, T. Yamauchi, K. Komeda, S. Satoh, R. Nakano, C. Ishii, T. Sugiyama, K. Eto, Y. Tsubamoto, A. Okuno, K. Murakami, H. Sekihara, G. Hasegawa, M. Naito, Y. Toyoshima, S. Tanaka, K. Shiota, T. Kitamura, T. Fujita, O. Ezaki, S. Aizawa, T. Kadowaki, and et al., PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, 1999. **4**(4): p. 597-609.
- Kucharova, S. and R. Farkas, Hormone nuclear receptors and their ligands: role in programmed cell death (review). *Endocr Regul*, 2002. **36**(1): p. 37-60.
- Kuettner, K.E., M.B. Aydelotte, and E.J. Thonar, Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *J Rheumatol Suppl*, 1991. **27**: p. 46-8.
- Kumar, R. and E.B. Thompson, The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, 1999. **64**(5): p. 310-9.
- Kumar, S., B.J. Votta, D.J. Rieman, A.M. Badger, M. Gowen, and J.C. Lee, IL-1- and TNF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol*, 2001. **187**(3): p. 294-303.

- Laan, M., Z.H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D.C. Gruenert, B.E. Skoogh, and A. Linden, Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol*, 1999. **162**(4): p. 2347-52.
- Lacraz, S., L. Nicod, B. Galve-de Rochemonteix, C. Baumberger, J.M. Dayer, and H.G. Welgus, Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. *J Clin Invest*, 1992. **90**(2): p. 382-8.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(259): p. 680-5.
- Lallena, M.J., M.T. Diaz-Meco, G. Bren, C.V. Paya, and J. Moscat, Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(3): p. 2180-8.
- Lang, D., J. Knop, H. Wesche, U. Raffetseder, R. Kurrle, D. Boraschi, and M.U. Martin, The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol*, 1998. **161**(12): p. 6871-7.
- Lau, P., P. Bailey, D.H. Dowhan, and G.E. Muscat, Exogenous expression of a dominant negative RORalpha1 vector in muscle cells impairs differentiation: RORalpha1 directly interacts with p300 and myoD. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(2): p. 411-20.
- Laudet, V. and G. Adelmant, Nuclear receptors. Lonesome orphans. *Curr Biol*, 1995. **5**(2): p. 124-7.
- Ledwith, B.J., S. Manam, P. Troilo, D.J. Joslyn, S.M. Galloway, and W.W. Nichols, Activation of immediate-early gene expression by peroxisome proliferators in vitro. *Mol Carcinog*, 1993. **8**(1): p. 20-7.
- Lee, S.S., T. Pineau, J. Drago, E.J. Lee, J.W. Owens, D.L. Kroetz, P.M. Fernandez-Salguero, H. Westphal, and F.J. Gonzalez, Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(6): p. 3012-22.
- Lee, F.S., R.T. Peters, L.C. Dang, and T. Maniatis, MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9319-24.
- Lefebvre, A.M., I. Chen, P. Desreumaux, J. Najib, J.C. Fruchart, K. Geboes, M. Briggs, R. Heyman, and J. Auwerx, Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med*, 1998. **4**(9): p. 1053-7.
- Lehmann, J.M., L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, and S.A. Kliewer, An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 1995. **270**(22): p. 12953-6.
- Lehmann, J.M., J.M. Lenhard, B.B. Oliver, G.M. Ringold, and S.A. Kliewer, Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1997. **272**(6): p. 3406-10.
- Leone, T.C., C.J. Weinheimer, and D.P. Kelly, A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7473-8.
- Lin, Y.L. and J.K. Lin, (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol*, 1997. **52**(3): p. 465-72.
- Ling, L., Z. Cao, and D.V. Goeddel, NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3792-7.
- Loeser, R.F., Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology*, 2000. **37**(1-2): p. 109-16.

- Lohmander, L.S., H. Roos, L. Dahlberg, L.A. Hoerrner, and M.W. Lark, Temporal patterns of stromelysin-1, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury to the cruciate ligament or meniscus. *J Orthop Res*, 1994. **12**(1): p. 21-8.
- Lotz, M. and P.A. Guerne, Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem*, 1991. **266**(4): p. 2017-20.
- Lotz, M., F.J. Blanco, J. von Kempis, J. Dudler, R. Maier, P.M. Villiger, and Y. Geng, Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J Rheumatol Suppl*, 1995. **43**: p. 104-8.
- Malfait, A.M., G. Verbruggen, E.M. Veys, J. Lambert, L. De Ridder, and M. Cornelissen, Comparative and combined effects of interleukin 6, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha on proteoglycan metabolism of human articular chondrocytes cultured in agarose. *J Rheumatol*, 1994. **21**(2): p. 314-20.
- Malinowsky, D., J. Lundkvist, S. Laye, and T. Bartfai, Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor. *FEBS Lett*, 1998. **429**(3): p. 299-302.
- Mamontova, A., S. Seguret-Mace, B. Esposito, C. Chaniale, M. Bouly, N. Delhaye-Bouchaud, G. Luc, B. Staels, N. Duverger, J. Mariani, and A. Tedgui, Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation*, 1998. **98**(24): p. 2738-43.
- Mankin, H.J. and B.V. Treadwell, Osteoarthritis: a 1987 update. *Bull Rheum Dis*, 1986. **36**(5): p. 1-10.
- Mankin, H.J., L.C. Jennings, B.V. Treadwell, and S.B. Trippel, Growth factors and articular cartilage. *J Rheumatol Suppl*, 1991. **27**: p. 66-7.
- March, C.J., B. Mosley, A. Larsen, D.P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C.S. Henney, S.R. Kronheim, K. Grabstein, and et al., Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, 1985. **315**(6021): p. 641-7.
- Maroudas, A., *Physicochemical properties of articular cartilage*, in *Adult Articular Cartilage*, F. MAR, Editor. 1979, Pitman Medical: London. p. 215-290.
- Maroudas, A., J. Mizrahi, E.P. Katz, and M. Soudry, *Physicochemical properties and functional behaviour of normal and osteoarthritic human cartilage*, in *Articular Cartilage Biochemistry*, S.R. Kuettner KE, Hascall VC, Editor. 1986, Raven Press: New York. p. 311-27.
- Marsman, D.S., R.C. Cattley, J.G. Conway, and J.A. Popp, Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res*, 1988. **48**(23): p. 6739-44.
- Martel-Pelletier, J., R. McCollum, J. DiBattista, M.P. Faure, J.A. Chin, S. Fournier, M. Sarfati, and J.P. Pelletier, The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(5): p. 530-40.
- Martel-Pelletier, J., R. McCollum, N. Fujimoto, K. Obata, J.M. Cloutier, and J.P. Pelletier, Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest*, 1994. **70**(6): p. 807-15.
- Martel-Pelletier, J., Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998. **6**(6): p. 374-6.
- Martel-Pelletier, J., Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. **7**(4): p. 371-3.
- Marx, N., G. Sukhova, C. Murphy, P. Libby, and J. Plutzky, Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol*, 1998. **153**(1): p. 17-23.

- Matsui, T., S. Sashihara, Y. Oh, and S.G. Waxman, An orphan nuclear receptor, mROR alpha, and its spatial expression in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. **33**(2): p. 217-26.
- Matsuura, H., H. Adachi, R.C. Smart, X. Xu, J. Arata, and A.M. Jetten, Correlation between expression of peroxisome proliferator-activated receptor beta and squamous differentiation in epidermal and tracheobronchial epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1999. **147**(1-2): p. 85-92.
- Matysiak-Scholze, U. and M. Nehls, The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4. *Genomics*, 1997. **43**(1): p. 78-84.
- Mayne, R., Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum*, 1989. **32**(3): p. 241-6.
- Mayne, R. and R. Brewton, *Extracellular matrix of cartilage: collagen*, in *Joint cartilage degradation. Basic and clinical aspects.*, J. Woessner and D. Howell, Editors. 1993, Dekker M.: New York. p. 81-108.
- McBroom, L.D., G. Flock, and V. Giguere, The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(2): p. 796-808.
- Meier, C.A., R. Chicheportiche, C.E. Juge-Aubry, M.G. Dreyer, and J.M. Dayer, Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cytokine*, 2002. **18**(6): p. 320-8.
- Melchiorri, C., R. Meliconi, L. Frizziero, T. Silvestri, L. Pulsatelli, I. Mazzetti, R.M. Borzi, M. Ugucioni, and A. Facchini, Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(12): p. 2165-74.
- Meyer, T., M. Kneissel, J. Mariani, and B. Fournier, In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor RORalpha function in bone metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(16): p. 9197-202.
- Michalik, L., B. Desvergne, N.S. Tan, S. Basu-Modak, P. Escher, J. Rieusset, J.M. Peters, G. Kaya, F.J. Gonzalez, J. Zakany, D. Metzger, P. Chambon, D. Duboule, and W. Wahli, Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol*, 2001. **154**(4): p. 799-814.
- Milgrom, E., [Nuclear receptors]. *Thérapie*, 1999. **54**(3): p. 327-31.
- Millward-Sadler, S.J., M.O. Wright, L.W. Davies, G. Nuki, and D.M. Salter, Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(9): p. 2091-9.
- Missbach, M., B. Jagher, I. Sigg, S. Nayeri, C. Carlberg, and I. Wiesenberg, Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity. *J Biol Chem*, 1996. **271**(23): p. 13515-22.
- Mitrovic, D., L. Lippiello, F. Gruson, F. Aprile, and H.J. Mankin, Effects of various prostanoids on the in vitro metabolism of bovine articular chondrocytes. *Prostaglandins*, 1981. **22**(3): p. 499-511.
- Mizukami, J. and T. Taniguchi, The antidiabetic agent thiazolidinedione stimulates the interaction between PPAR gamma and CBP. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **240**(1): p. 61-4.
- Molis, T.M., L.L. Spriggs, and S.M. Hill, Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(12): p. 1681-90.
- Mollenhauer, J., J.A. Bee, M.A. Lizarbe, and K. von der Mark, Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol*, 1984. **98**(4): p. 1572-9.
- Moos, V., S. Fickert, B. Muller, U. Weber, and J. Sieper, Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol*, 1999. **26**(4): p. 870-9.

- Moraitis, A.N., V. Giguere, and C.C. Thompson, Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(19): p. 6831-41.
- Moras, D. and H. Gronemeyer, The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(3): p. 384-91.
- Moretti, R.M., M.M. Marelli, M. Motta, and P. Limonta, Role of the orphan nuclear receptor ROR alpha in the control of the metastatic behavior of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncol Rep*, 2002. **9**(5): p. 1139-43.
- Mudaliar, S. and R.R. Henry, New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: The glitazones or insulin sensitizers. *Annu Rev Med*, 2001. **52**: p. 239-57.
- Mueller, E., P. Sarraf, P. Tontonoz, R.M. Evans, K.J. Martin, M. Zhang, C. Fletcher, S. Singer, and B.M. Spiegelman, Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*, 1998. **1**(3): p. 465-70.
- Muir, H., Proteoglycans of cartilage. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 1978. **12**: p. 67-81.
- Murphy, G., C.G. McAlpine, C.T. Poll, and J.J. Reynolds, Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **831**(1): p. 49-58.
- Murrell, G.A., D. Jang, and R.J. Williams, Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **206**(1): p. 15-21.
- Musti, A.M., M. Treier, and D. Bohmann, Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science*, 1997. **275**(5298): p. 400-2.
- Nagy, L., P. Tontonoz, J.G. Alvarez, H. Chen, and R.M. Evans, Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 229-40.
- Nakagawa, S., M. Watanabe, and Y. Inoue, Prominent expression of nuclear hormone receptor ROR alpha in Purkinje cells from early development. *Neurosci Res*, 1997. **28**(2): p. 177-84.
- Nakano, H., M. Shindo, S. Sakon, S. Nishinaka, M. Mihara, H. Yagita, and K. Okumura, Differential regulation of I kappa B kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappa B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3537-42.
- Naumann, M. and C. Scheidereit, Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *Embo J*, 1994. **13**(19): p. 4597-607.
- Neidhart, M., R.E. Gay, and S. Gay, Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(8): p. 1719-28.
- Nelson, F., L. Dahlberg, S. Laverty, A. Reiner, I. Pidoux, M. Ionescu, G.L. Fraser, E. Brooks, M. Tanzer, L.C. Rosenberg, P. Dieppe, and A. Robin Poole, Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest*, 1998. **102**(12): p. 2115-25.
- Nemali, M.R., N. Usuda, M.K. Reddy, K. Oyasu, T. Hashimoto, T. Osumi, M.S. Rao, and J.K. Reddy, Comparison of constitutive and inducible levels of expression of peroxisomal beta-oxidation and catalase genes in liver and extrahepatic tissues of rat. *Cancer Res*, 1988. **48**(18): p. 5316-24.
- Nietfeld, J.J., B. Wilbrink, M. Helle, J.L. van Roy, W. den Otter, A.J. Swaak, and O. Huber-Bruning, Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(11): p. 1695-701.

- Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto, The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 1999. **398**(6724): p. 252-6.
- Nouri, A.M., G.S. Panayi, and S.M. Goodman, Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluids. *Clin Exp Immunol*, 1984. **55**(2): p. 295-302.
- O'Keefe, R.J., I.D. Crabb, J.E. Puzas, and R.N. Rosier, Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res*, 1992. **7**(4): p. 397-404.
- O'Neill, L.A. and C. Kaltschmidt, NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*, 1997. **20**(6): p. 252-8.
- Ohta, S., K. Imai, K. Yamashita, T. Matsumoto, I. Azumano, and Y. Okada, Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage. *Lab Invest*, 1998. **78**(1): p. 79-87.
- Okimura, A., Y. Okada, S. Makihira, H. Pan, L. Yu, K. Tanne, K. Imai, H. Yamada, T. Kawamoto, M. Noshiro, W. Yan, and Y. Kato, Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(6): p. 1029-36.
- Okura, T., M. Nakamura, Y. Takata, S. Watanabe, Y. Kitami, and K. Hiwada, Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 2000. **407**(3): p. 227-35.
- Olee, T., S. Hashimoto, J. Quach, and M. Lotz, IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol*, 1999. **162**(2): p. 1096-100.
- Osumi, T., J.K. Wen, and T. Hashimoto, Two cis-acting regulatory sequences in the peroxisome proliferator-responsive enhancer region of rat acyl-CoA oxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **175**(3): p. 866-71.
- Pacquelet, S., N. Presle, C. Boileau, H. Dumond, P. Netter, J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, B. Terlain, and J.Y. Jouzeau, Interleukin 17, a nitric oxide-producing cytokine with a peroxynitrite-independent inhibitory effect on proteoglycan synthesis. *J Rheumatol*, 2002. **29**(12): p. 2602-10.
- Padilla, J., K. Kaur, H.J. Cao, T.J. Smith, and R.P. Phipps, Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 6941-8.
- Paravicini, G., M. Steinmayr, E. Andre, and M. Becker-Andre, The metastasis suppressor candidate nucleotide diphosphate kinase NM23 specifically interacts with members of the ROR/RZR nuclear orphan receptor subfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **227**(1): p. 82-7.
- Pazin, M.J. and J.T. Kadonaga, What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell*, 1997. **89**(3): p. 325-8.
- Pelletier, J.P. and J. Martel-Pelletier, Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID. *J Rheumatol Suppl*, 1989. **18**: p. 19-27.
- Pelletier, J.P., J.A. DiBattista, P. Roughley, R. McCollum, and J. Martel-Pelletier, Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am*, 1993. **19**(3): p. 545-68.
- Pelletier, J.P., R. McCollum, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier, Synthesis of metalloproteinases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *J Rheumatol Suppl*, 1995. **43**: p. 109-14.
- Pelletier, J.P., F. Mineau, P. Ranger, G. Tardif, and J. Martel-Pelletier, 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**(1): p. 77-84.

- Pelletier, J.P., J.P. Caron, C. Evans, P.D. Robbins, H.I. Georgescu, D. Jovanovic, J.C. Fernandes, and J. Martel-Pelletier, In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(6): p. 1012-9.
- Peters, J.M., R.C. Cattley, and F.J. Gonzalez, Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(11): p. 2029-33.
- Peters, J.M., S.S. Lee, W. Li, J.M. Ward, O. Gavrilova, C. Everett, M.L. Reitman, L.D. Hudson, and F.J. Gonzalez, Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(14): p. 5119-28.
- Petrova, T.V., K.T. Akama, and L.J. Van Eldik, Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4668-73.
- Pettipher, E.R., G.A. Higgs, and B. Henderson, Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(22): p. 8749-53.
- Peyron, J. and V. Stanescu, *Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie. Physiologie. Métabolisme. Vieillessement.*, in *Appareil locomoteur*, E. Techniques, Editor. 1994: Paris-France.
- Phelps, C.B., L.L. Sengchanthalangsy, T. Huxford, and G. Ghosh, Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J Biol Chem*, 2000. **275**(38): p. 29840-6.
- Phelps, C.B., L.L. Sengchanthalangsy, S. Malek, and G. Ghosh, Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers. *J Biol Chem*, 2000. **275**(32): p. 24392-9.
- Pineda Torra, I., P. Gervois, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol*, 1999. **10**(2): p. 151-9.
- Plaas, A., F. Barry, and S. Wong-Palms, *Keratan sulfate substitution on cartilage matrix molecules.*, in *Articular cartilage and osteoarthritis*, K.Kuettner, Editor. 1992, Raven Press: NY. p. 69-79.
- Plows, D., L. Probert, S. Georgopoulos, L. Alexopoulou, and G. Kollias, The role of tumor necrosis factor (TNF) in arthritis: studies in transgenic mice. *Rheumatol Eur Suppl*, 1995. **2**: p. 51-4.
- Poole, C.A., M.H. Flint, and B.W. Beaumont, Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat*, 1984. **138** (Pt 1): p. 113-38.
- Poole, C.A., M.H. Flint, and B.W. Beaumont, Morphology of the pericellular capsule in articular cartilage revealed by hyaluronidase digestion. *J Ultrastruct Res*, 1985. **91**(1): p. 13-23.
- Poole, C.A., M.H. Flint, and B.W. Beaumont, Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res*, 1987. **5**(4): p. 509-22.
- Poole, C.A., S. Ayad, and J.R. Schofield, Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J Cell Sci*, 1988. **90** (Pt 4): p. 635-43.
- Poole, C.A., A. Matsuoka, and J.R. Schofield, Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 1991. **34**(1): p. 22-35.
- Poole, C.A., S. Ayad, and R.T. Gilbert, Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci*, 1992. **103** (Pt 4): p. 1101-10.
- Potter, G.B., G.M. Beaudoin, 3rd, C.L. DeRenzo, J.M. Zarach, S.H. Chen, and C.C. Thompson, The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev*, 2001. **15**(20): p. 2687-701.

- Poynter, M.E. and R.A. Daynes, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32833-41.
- Puigserver, P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright, and B.M. Spiegelman, A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 1998. **92**(6): p. 829-39.
- Pujol, J.P., P. Galera, F. Redini, A. Mauviel, and G. Loyau, Role of cytokines in osteoarthritis: comparative effects of interleukin 1 and transforming growth factor-beta on cultured rabbit articular chondrocytes. *J Rheumatol Suppl*, 1991. **27**: p. 76-9.
- Pulkkinen, L., K. Kainulainen, T. Krusius, P. Makinen, J. Schollin, K.H. Gustavsson, and L. Peltonen, Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of Marfan syndrome. *J Biol Chem*, 1990. **265**(29): p. 17780-5.
- Raspe, E., H. Duez, P. Gervois, C. Fievet, J.C. Fruchart, S. Besnard, J. Mariani, A. Tedgui, and B. Staels, Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor RORalpha. *J Biol Chem*, 2001. **276**(4): p. 2865-71.
- Raspe, E., G. Mautino, C. Duval, C. Fontaine, H. Duez, O. Barbier, D. Monte, J. Fruchart, J.C. Fruchart, and B. Staels, Transcriptional regulation of human Rev-erbalpha gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor alpha. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49275-81.
- Reddy, J.K., D.G. Scarpelli, V. Subbarao, and N.D. Lalwani, Chemical carcinogens without mutagenic activity: peroxisome proliferators as a prototype. *Toxicol Pathol*, 1983. **11**(2): p. 172-80.
- Redler, I., V.C. Mow, M.L. Zimny, and J. Mansell, The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin Orthop*, 1975(112): p. 357-62.
- Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao, and M. Rothe, Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell*, 1997. **90**(2): p. 373-83.
- Renaud, J.P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras, Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 1995. **378**(6558): p. 681-9.
- Reppert, S.M., D.R. Weaver, S.A. Rivkees, and E.G. Stopa, Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*, 1988. **242**(4875): p. 78-81.
- Reuther, J.Y. and A.S. Baldwin, Jr., Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of IkappaBalpha that functions as a stable inhibitor of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 1999. **274**(29): p. 20664-70.
- Revell, J.P. and E.D. Hay, *An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage.*, in *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1963. p. 110-144.
- Ricote, M., A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, and C.K. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
- Rieusset, J., F. Touri, L. Michalik, P. Escher, B. Desvergne, E. Niesor, and W. Wahli, A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol*, 2002. **16**(11): p. 2628-44.
- Roberts, R.A., A.R. Soames, J.H. Gill, N.H. James, and E.B. Wheeldon, Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(8): p. 1693-8.
- Roberts, R.A., N.H. James, N.J. Woodyatt, N. Macdonald, and J.D. Tugwood, Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha). *Carcinogenesis*, 1998. **19**(1): p. 43-8.

- Rosen, E.D., C.J. Walkey, P. Puigserver, and B.M. Spiegelman, Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 2000. **14**(11): p. 1293-307.
- Rosenfield, R.L., A. Kentsis, D. Deplewski, and N. Ciletti, Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(2): p. 226-32.
- Rossi, A., P. Kapahi, G. Natoli, T. Takahashi, Y. Chen, M. Karin, and M.G. Santoro, Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*, 2000. **403**(6765): p. 103-8.
- Roux-Lombard, P., C. Modoux, and J.M. Dayer, Production of interleukin-1 (IL-1) and a specific IL-1 inhibitor during human monocyte-macrophage differentiation: influence of GM-CSF. *Cytokine*, 1989. **1**(1): p. 45-51.
- Roux-Lombard, P., C. Modoux, T. Vischer, J. Grassi, and J.M. Dayer, Inhibitors of interleukin 1 activity in synovial fluids and in cultured synovial fluid mononuclear cells. *J Rheumatol*, 1992. **19**(4): p. 517-23.
- Sabatini, M., A. Bardiot, C. Lesur, N. Moulharat, M. Thomas, I. Richard, and A. Fradin, Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(9): p. 673-9.
- Saez, E., P. Tontonoz, M.C. Nelson, J.G. Alvarez, U.T. Ming, S.M. Baird, V.A. Thomazy, and R.M. Evans, Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med*, 1998. **4**(9): p. 1058-61.
- Sah, R.L., A.C. Chen, A.J. Grodzinsky, and S.B. Trippel, Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*, 1994. **308**(1): p. 137-47.
- Saha, N., F. Moldovan, G. Tardif, J.P. Pelletier, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier, Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(8): p. 1577-87.
- Sandy, J.D., P.J. Neame, R.E. Boynton, and C.R. Flannery, Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem*, 1991. **266**(14): p. 8683-5.
- Sarraf, P., E. Mueller, D. Jones, F.J. King, D.J. DeAngelo, J.B. Partridge, S.A. Holden, L.B. Chen, S. Singer, C. Fletcher, and B.M. Spiegelman, Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med*, 1998. **4**(9): p. 1046-52.
- Sarraf, P., E. Mueller, W.M. Smith, H.M. Wright, J.B. Kum, L.A. Aaltonen, A. de la Chapelle, B.M. Spiegelman, and C. Eng, Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell*, 1999. **3**(6): p. 799-804.
- Sashihara, S., P.A. Felts, S.G. Waxman, and T. Matsui, Orphan nuclear receptor ROR alpha gene: isoform-specific spatiotemporal expression during postnatal development of brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996. **42**(1): p. 109-17.
- Schaeren-Wiemers, N., E. Andre, J.P. Kapfhammer, and M. Becker-Andre, The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *Eur J Neurosci*, 1997. **9**(12): p. 2687-701.
- Schaiff, W.T., M.G. Carlson, S.D. Smith, R. Levy, D.M. Nelson, and Y. Sadovsky, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(10): p. 3874-81.
- Scharstuhl, A., H.L. Glansbeek, H.M. van Beuningen, E.L. Vitters, P.M. van der Kraan, and W.B. van den Berg, Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 507-14.
- Schiff, M.H., Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59 Suppl 1**: p. i103-8.

- Schinner, S., C. Dellas, M. Schroder, C.A. Heinlein, C. Chang, J. Fischer, and W. Knepel, Repression of glucagon gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through inhibition of Pax6 transcriptional activity. *J Biol Chem*, 2002. **277**(3): p. 1941-8.
- Schlaak, J.F., I. Pfers, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, and E. Marker-Hermann, Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol*, 1996. **14**(2): p. 155-62.
- Schmitz, M.L. and P.A. Baeuerle, The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *Embo J*, 1991. **10**(12): p. 3805-17.
- Schoonjans, K., B. Staels, and J. Auwerx, The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1302**(2): p. 93-109.
- Schröder, M., C. Danielsson, I. Wiesenberg, and C. Carlberg, Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *J Biol Chem*, 1996. **271**(33): p. 19732-6.
- Schultz, R., W. Yan, J. Toppari, A. Volkl, J.A. Gustafsson, and M. Peltö-Huikko, Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha messenger ribonucleic acid and protein in human and rat testis. *Endocrinology*, 1999. **140**(7): p. 2968-75.
- Schwarzenberger, P., V. La Russa, A. Miller, P. Ye, W. Huang, A. Zieske, S. Nelson, G.J. Bagby, D. Stoltz, R.L. Mynatt, M. Spriggs, and J.K. Kolls, IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6383-9.
- Scott, B.B., L.M. Weisbrot, J.D. Greenwood, E.R. Bogoch, C.J. Paige, and E.C. Keystone, Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(3): p. 490-8.
- Seibert, K., Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, W. Perkins, L. Lee, and P. Isakson, Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(25): p. 12013-7.
- Sen, C.K. and L. Packer, Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J*, 1996. **10**(7): p. 709-20.
- Sha, W.C., Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor. *J Exp Med*, 1998. **187**(2): p. 143-6.
- Shalev, A., C.A. Siegrist-Kaiser, P.M. Yen, W. Wahli, A.G. Burger, W.W. Chin, and C.A. Meier, The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology*, 1996. **137**(10): p. 4499-502.
- Shalom-Barak, T., J. Quach, and M. Lotz, Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27467-73.
- Shanley, T.P., J.L. Peters, M.L. Jones, S.W. Chensue, S.L. Kunkel, and P.A. Ward, Regulatory effects of endogenous interleukin-1 receptor antagonist protein in immunoglobulin G immune complex-induced lung injury. *J Clin Invest*, 1996. **97**(4): p. 963-70.
- Shao, D., S.M. Rangwala, S.T. Bailey, S.L. Krakow, M.J. Reginato, and M.A. Lazar, Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*, 1998. **396**(6709): p. 377-80.
- Sher, T., H.F. Yi, O.W. McBride, and F.J. Gonzalez, cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, 1993. **32**(21): p. 5598-604.

- Shikhman, A.R., D.C. Brinson, and M. Lotz, Profile of glycosaminoglycan-degrading glycosidases and glycoside sulfatases secreted by human articular chondrocytes in homeostasis and inflammation. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(6): p. 1307-14.
- Shingu, M., T. Isayama, C. Yasutake, T. Naono, M. Nobunaga, K. Tomari, K. Horie, and Y. Goto, Role of oxygen radicals and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. *Inflammation*, 1994. **18**(6): p. 613-23.
- Shiojiri, T., K. Wada, A. Nakajima, K. Katayama, A. Shibuya, C. Kudo, T. Kadowaki, T. Mayumi, Y. Yura, and Y. Kamisaki, PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol*, 2002. **448**(2-3): p. 231-8.
- Shlopov, B.V., W.R. Lie, C.L. Mainardi, A.A. Cole, S. Chubinskaya, and K.A. Hasty, Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(11): p. 2065-74.
- Sidman, R.L., P.W. Lane, and M.M. Dickie, Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science*, 1962. **137**: p. 610-12.
- Siegle, I., T. Klein, J.T. Backman, J.G. Saal, R.M. Nusing, and P. Fritz, Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(1): p. 122-9.
- Sims, J.E., M.A. Gayle, J.L. Slack, M.R. Alderson, T.A. Bird, J.G. Giri, F. Colotta, F. Re, A. Mantovani, K. Shanebeck, and et al., Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(13): p. 6155-9.
- Sims, J.E., J.G. Giri, and S.K. Dower, The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. **72**(1): p. 9-14.
- Singh, R., S. Ahmed, N. Islam, V.M. Goldberg, and T.M. Haqqi, Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(8): p. 2079-86.
- Singh Ahuja, H., S. Liu, D.L. Crombie, M. Boehm, M.D. Leibowitz, R.A. Heyman, C. Depre, L. Nagy, P. Tontonoz, and P.J. Davies, Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(4): p. 765-73.
- Staels, B., W. Koenig, A. Habib, R. Merval, M. Lebre, I.P. Torra, P. Delerive, A. Fadel, G. Chinetti, J.C. Fruchart, J. Najib, J. Maclouf, and A. Tedgui, Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*, 1998. **393**(6687): p. 790-3.
- Stanton, H., L. Ung, and A.J. Fosang, The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *Biochem J*, 2002. **364**(Pt 1): p. 181-90.
- Steinberg, J.J. and C.B. Sledge, Chondrocyte mediated cartilage degradation: regulation by prostaglandin E2, cyclic AMP and interferon alpha. *J Rheumatol Suppl*, 1991. **27**: p. 63-5.
- Steinhilber, D., M. Brungs, O. Werz, I. Wiesenberger, C. Danielsson, J.P. Kahlen, S. Nayeri, M. Schrader, and C. Carlberg, The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem*, 1995. **270**(13): p. 7037-40.
- Steinmayr, M., E. Andre, F. Conquet, L. Rondi-Reig, N. Delhaye-Bouchaud, N. Auclair, H. Daniel, F. Crepel, J. Mariani, C. Sotelo, and M. Becker-Andre, staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3960-5.
- Stephens, R.W., P. Ghosh, T.K. Taylor, C.A. Gale, J.C. Swann, R.G. Robinson, and J. Webb, The origins and relative distribution of polysaccharidases in rheumatoid and osteoarthritic fluids. *J Rheumatol*, 1975. **2**(4): p. 393-400.

- Steppan, C.M., S.T. Bailey, S. Bhat, E.J. Brown, R.R. Banerjee, C.M. Wright, H.R. Patel, R.S. Ahima, and M.A. Lazar, The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 307-12.
- Stier, H., H.D. Fahimi, P.P. Van Veldhoven, G.P. Mannaerts, A. Volkl, and E. Baumgart, Maturation of peroxisomes in differentiating human hepatoblastoma cells (HepG2): possible involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha). *Differentiation*, 1998. **64**(1): p. 55-66.
- Stockwell, R.A., The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat*, 1967. **101**(4): p. 753-63.
- Stockwell, R.A. and G. Meachim, *The chondrocytes.*, in *Adult Articular Cartilage*, M.A.R. Freeman, Editor. 1973, Pitman Medical: London. p. 51-99.
- Stockwell, R.A., Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 1978. **12**: p. 7-13.
- Straus, D.S., G. Pascual, M. Li, J.S. Welch, M. Ricote, C.H. Hsiang, L.L. Sengchanthalangsy, G. Ghosh, and C.K. Glass, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4844-9.
- Su, C.G., X. Wen, S.T. Bailey, W. Jiang, S.M. Rangwala, S.A. Keilbaugh, A. Flanigan, S. Murthy, M.A. Lazar, and G.D. Wu, A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*, 1999. **104**(4): p. 383-9.
- Sugawara, A., A. Uruno, M. Kudo, Y. Ikeda, K. Sato, Y. Taniyama, S. Ito, and K. Takeuchi, Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 9676-83.
- Svensson, L., A. Oldberg, and D. Heinegard, Collagen binding proteins. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. **9 Suppl A**: p. S23-8.
- Symons, J.A., J.A. Eastgate, and G.W. Duff, A soluble binding protein specific for interleukin 1 beta is produced by activated mononuclear cells. *Cytokine*, 1990. **2**(3): p. 190-8.
- Takano, H., T. Nagai, M. Asakawa, T. Toyozaki, T. Oka, I. Komuro, T. Saito, and Y. Masuda, Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 2000. **87**(7): p. 596-602.
- Tanaka, M., M. Harigai, Y. Kawaguchi, S. Ohta, T. Sugiura, K. Takagi, S. Ohsako-Higami, C. Fukasawa, M. Hara, and N. Kamatani, Mature form of interleukin 18 is expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue and contributes to interferon-gamma production by synovial T cells. *J Rheumatol*, 2001. **28**(8): p. 1779-87.
- Taskiran, D., M. Stefanovic-Racic, H. Georgescu, and C. Evans, Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **200**(1): p. 142-8.
- Thieringer, R., J.E. Fenyk-Melody, C.B. Le Grand, B.A. Shelton, P.A. Detmers, E.P. Somers, L. Carbin, D.E. Moller, S.D. Wright, and J. Berger, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 1046-54.
- Tiku, M.L., S. Gupta, and D.R. Deshmukh, Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res*, 1999. **30**(5): p. 395-405.
- Tini, M., R.A. Fraser, and V. Giguere, Functional interactions between retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR alpha) and the retinoic acid receptors in the regulation of the gamma F-crystallin promoter. *J Biol Chem*, 1995. **270**(34): p. 20156-61.
- Tojima, Y., A. Fujimoto, M. Delhase, Y. Chen, S. Hatakeyama, K. Nakayama, Y. Kaneko, Y. Nimura, N. Motoyama, K. Ikeda, M. Karin, and M. Nakanishi, NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature*, 2000. **404**(6779): p. 778-82.
- Tontonoz, P., E. Hu, R.A. Graves, A.I. Budavari, and B.M. Spiegelman, mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, 1994. **8**(10): p. 1224-34.

- Tontonoz, P., S. Singer, B.M. Forman, P. Sarraf, J.A. Fletcher, C.D. Fletcher, R.P. Brun, E. Mueller, S. Altioik, H. Oppenheim, R.M. Evans, and B.M. Spiegelman, Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(1): p. 237-41.
- Tontonoz, P., L. Nagy, J.G. Alvarez, V.A. Thomazy, and R.M. Evans, PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 241-52.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
- Trenkner, E. and M.K. Hoffmann, Defective development of the thymus and immunological abnormalities in the neurological mouse mutation "staggerer". *J Neurosci*, 1986. **6**(6): p. 1733-7.
- Treuter, E., T. Albrechtsen, L. Johansson, J. Leers, and J.A. Gustafsson, A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(6): p. 864-81.
- Trippel, S.B., Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl*, 1995. **43**: p. 129-32.
- Tyler, J.A., Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J*, 1989. **260**(2): p. 543-8.
- Ulfgren, A.K., S. Lindblad, L. Klareskog, J. Andersson, and U. Andersson, Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1995. **54**(8): p. 654-61.
- van Beuningen, H.M., H.L. Glansbeek, P.M. van der Kraan, and W.B. van den Berg, Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. **8**(1): p. 25-33.
- van de Loo, A.A. and W.B. van den Berg, Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann Rheum Dis*, 1990. **49**(4): p. 238-45.
- van de Loo, F.A., L.A. Joosten, P.L. van Lent, O.J. Arntz, and W.B. van den Berg, Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 1995. **38**(2): p. 164-72.
- van de Loo, F.A., O.J. Arntz, F.H. van Enkevort, P.L. van Lent, and W.B. van den Berg, Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthritis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(4): p. 634-46.
- van den Berg, W.B. and B. Bresnihan, Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*, 1999. **13**(4): p. 577-97.
- van den Berg, W.B., Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59 Suppl 1**: p. i81-4.
- van der Kraan, P.M., H.L. Glansbeek, E.L. Vitters, and W.B. van den Berg, Early elevation of transforming growth factor-beta, decorin, and biglycan mRNA levels during cartilage matrix restoration after mild proteoglycan depletion. *J Rheumatol*, 1997. **24**(3): p. 543-9.
- Van Lent, P.L., F.A. Van De Loo, A.E. Holthuysen, L.A. Van Den Bersselaar, H. Vermeer, and W.B. Van Den Berg, Major role for interleukin 1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. *J Rheumatol*, 1995. **22**(12): p. 2250-8.
- van Meurs, J.B., P.L. van Lent, Singer, II, E.K. Bayne, F.A. van de Loo, and W.B. van den Berg, Interleukin-1 receptor antagonist prevents expression of the metalloproteinase-generated neoepitope VDIPEN in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(4): p. 647-56.

- Vane, J.R., J.A. Mitchell, I. Appleton, A. Tomlinson, D. Bishop-Bailey, J. Croxtall, and D.A. Willoughby, Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(6): p. 2046-50.
- Vannier, E., L.C. Miller, and C.A. Dinarello, Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(9): p. 4076-80.
- Vannier, E., R. de Waal Malefyt, A. Salazar-Montes, J.E. de Vries, and C.A. Dinarello, Interleukin-13 (IL-13) induces IL-1 receptor antagonist gene expression and protein synthesis in peripheral blood mononuclear cells: inhibition by an IL-4 mutant protein. *Blood*, 1996. **87**(8): p. 3307-15.
- Verschure, P.J. and C.J. Van Noorden, The effects of interleukin-1 on articular cartilage destruction as observed in arthritic diseases, and its therapeutic control. *Clin Exp Rheumatol*, 1990. **8**(3): p. 303-13.
- Verschure, P.J., C.J. Van Noorden, J. Van Marle, and W.B. Van den Berg, Articular cartilage destruction in experimental inflammatory arthritis: insulin-like growth factor-1 regulation of proteoglycan metabolism in chondrocytes. *Histochem J*, 1996. **28**(12): p. 835-57.
- Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1beta. *Arthritis Res*, 2001. **3**(6): p. 381-8.
- Vogel, K.G., M. Paulsson, and D. Heinegard, Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*, 1984. **223**(3): p. 587-97.
- Vogt, P.K. and T.J. Bos, jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res*, 1990. **55**: p. 1-35.
- Vu-Dac, N., P. Gervois, T. Grotzinger, P. De Vos, K. Schoonjans, J.C. Fruchart, J. Auwerx, J. Mariani, A. Tedgui, and B. Staels, Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor RORalpha. *J Biol Chem*, 1997. **272**(36): p. 22401-4.
- Wagner, R.L., J.W. Apriletti, M.E. McGrath, B.L. West, J.D. Baxter, and R.J. Fletterick, A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 1995. **378**(6558): p. 690-7.
- Wagner, S., P. Fritz, H. Einsele, S. Sell, and J.G. Saal, Evaluation of synovial cytokine patterns in rheumatoid arthritis and osteoarthritis by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Rheumatol Int*, 1997. **16**(5): p. 191-6.
- Wahli, W., Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly*, 2002. **132**(7-8): p. 83-91.
- Walker, N.P., R.V. Talanian, K.D. Brady, L.C. Dang, N.J. Bump, C.R. Ferez, S. Franklin, T. Ghayur, M.C. Hackett, L.D. Hammill, and et al., Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 1994. **78**(2): p. 343-52.
- Way, J.M., W.W. Harrington, K.K. Brown, W.K. Gottschalk, S.S. Sundseth, T.A. Mansfield, R.K. Ramachandran, T.M. Willson, and S.A. Kliewer, Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology*, 2001. **142**(3): p. 1269-77.
- Wesche, H., W.J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, and Z. Cao, MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 837-47.
- Wesche, H., K. Resch, and M.U. Martin, Effects of IL-1 receptor accessory protein on IL-1 binding. *FEBS Lett*, 1998. **429**(3): p. 303-6.
- Westacott, C.I., J.T. Whicher, I.C. Barnes, D. Thompson, A.J. Swan, and P.A. Dieppe, Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 1990. **49**(9): p. 676-81.

- Westacott, C.I., R.M. Atkins, P.A. Dieppe, and C.J. Elson, Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J Rheumatol*, 1994. **21**(9): p. 1710-5.
- Westacott, C.I. and M. Sharif, Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum*, 1996. **25**(4): p. 254-72.
- Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, 1996. **74**(10): p. 589-607.
- Wiesenberg, I., M. Missbach, J.P. Kahlen, M. Schrader, and C. Carlberg, Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(3): p. 327-33.
- Wiesenberg, I., M. Chiesi, M. Missbach, C. Spanka, W. Pignat, and C. Carlberg, Specific activation of the nuclear receptors PPARgamma and RORA by the antidiabetic thiazolidinedione BRL 49653 and the antiarthritic thiazolidinedione derivative CGP 52608. *Mol Pharmacol*, 1998. **53**(6): p. 1131-8.
- Wilmer, W.A., C. Dixon, L. Lu, T. Hilbelink, and B.H. Rovin, A cyclopentenone prostaglandin activates mesangial MAP kinase independently of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **281**(1): p. 57-62.
- Wilson, K.P., J.A. Black, J.A. Thomson, E.E. Kim, J.P. Griffith, M.A. Navia, M.A. Murcko, S.P. Chambers, R.A. Aldape, S.A. Raybuck, and et al., Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 1994. **370**(6487): p. 270-5.
- Winrow, C.J., J.P. Capone, and R.A. Rachubinski, Cross-talk between orphan nuclear hormone receptor RZRalpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in regulation of the peroxisomal hydratase-dehydrogenase gene. *J Biol Chem*, 1998. **273**(47): p. 31442-8.
- Woronicz, J.D., X. Gao, Z. Cao, M. Rothe, and D.V. Goeddel, IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science*, 1997. **278**(5339): p. 866-9.
- Wright, J.K., T.E. Cawston, and B.L. Hazleman, Transforming growth factor beta stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by human synovial and skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1094**(2): p. 207-10.
- Wright, H.M., C.B. Clish, T. Mikami, S. Hauser, K. Yanagi, R. Hiramatsu, C.N. Serhan, and B.M. Spiegelman, A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2000. **275**(3): p. 1873-7.
- Wu, Z., Y. Xie, R.F. Morrison, N.L. Bucher, and S.R. Farmer, PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest*, 1998. **101**(1): p. 22-32.
- Yaeger, P.C., T.L. Masi, J.L. de Ortiz, F. Binette, R. Tubo, and J.M. McPherson, Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res*, 1997. **237**(2): p. 318-25.
- Yamada, H., T. Kikuchi, O. Nemoto, K. Obata, H. Sato, M. Seiki, and M. Shinmei, Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human articular chondrocytes. *J Rheumatol*, 1996. **23**(10): p. 1739-43.
- Yamaguchi, Y., D.M. Mann, and E. Ruoslahti, Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*, 1990. **346**(6281): p. 281-4.
- Yang, F., H.S. Oz, S. Barve, W.J. de Villiers, C.J. McClain, and G.W. Varilek, The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol*, 2001. **60**(3): p. 528-33.

- Yang, W.S., C.Y. Jeng, T.J. Wu, S. Tanaka, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, J.P. Wang, C.L. Chen, T.Y. Tai, and L.M. Chuang, Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2002. **25**(2): p. 376-80.
- Yeldandi, A.V., M.S. Rao, and J.K. Reddy, Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*, 2000. **448**(2): p. 159-77.
- Yokomizo, T., T. Izumi, K. Chang, Y. Takuwa, and T. Shimizu, A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 620-4.
- Yoshikawa, T., Z. Brkanac, B.R. Dupont, G.Q. Xing, R.J. Leach, and S.D. Detera-Wadleigh, Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, 1996. **35**(3): p. 637-8.
- Yu, K., W. Bayona, C.B. Kallen, H.P. Harding, C.P. Ravera, G. McMahon, M. Brown, and M.A. Lazar, Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem*, 1995. **270**(41): p. 23975-83.
- Zandi, E., D.M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, and M. Karin, The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 1997. **91**(2): p. 243-52.
- Zanjani, H.S., K. Herrup, J.M. Guastavino, N. Delhaye-Bouchaud, and J. Mariani, Developmental studies of the inferior olivary nucleus in staggerer mutant mice. *Brain Res Dev Brain Res*, 1994. **82**(1-2): p. 18-28.
- Zhang, B., J. Berger, G. Zhou, A. Elbrecht, S. Biswas, S. White-Carrington, D. Szalkowski, and D.E. Moller, Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 1996. **271**(50): p. 31771-4.
- Zhao, Q. and F.S. Lee, Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem*, 1999. **274**(13): p. 8355-8.
- Zhou, Y.C. and D.J. Waxman, Cross-talk between janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) signaling pathways. Growth hormone inhibition of pparalpha transcriptional activity mediated by stat5b. *J Biol Chem*, 1999. **274**(5): p. 2672-81.
- Zhu, Y., C. Qi, J.R. Korenberg, X.N. Chen, D. Noya, M.S. Rao, and J.K. Reddy, Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(17): p. 7921-5.
- Zhu, Y., C. Qi, S. Jain, M.S. Rao, and J.K. Reddy, Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*, 1997. **272**(41): p. 25500-6.
- Zuo, X., G. Li, T. Luo, J. Li, Y. Liu, and M. Luo, Differentiation of NIH3T3 fibroblasts into adipocytes induced by peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 expression. *Chin Med J (Engl)*, 2001. **114**(9): p. 916-20.
- Zvaifler, N.J. and G.S. Firestein, Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(6): p. 783-9.

Annexes

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, but not troglitazone, modulates IL-1 β effects in human chondrocytes by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation pathways

Sandrine Boyault^a, Marie-Agnès Simonin^a, Arnaud Bianchi^b, Emmanuel Compe^c,
Bertrand Liagre^a, Didier Mainard^a, Philippe Bécuwe^b, Michel Dauça^b, Patrick Netter^a,
Bernard Terlain^a, Karim Bordji^{a,*}

^aLaboratoire de Pharmacologie, UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I, Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^bLaboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, Université Henri Poincaré, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^cUnité INSERM 476, Faculté de Médecine, Marseille, France

Received 30 March 2001; revised 22 May 2001; accepted 12 June 2001

First published online 22 June 2001

Edited by Masayuki Miyasaka

Abstract The activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) has been shown to inhibit the production and the effects of proinflammatory cytokines. Since interleukin-1 β (IL-1 β) directly mediates cartilage degradation in osteoarthritis, we investigated the capability of PPAR γ ligands to modulate IL-1 β effects on human chondrocytes. RT-PCR and Western blot analysis revealed that PPAR γ expression was decreased by IL-1 β . 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), in contrast to troglitazone, was highly potent to counteract IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression, NO production and the decrease in proteoglycan synthesis. Western blot and gel-shift analyses demonstrated that 15d-PGJ₂ inhibited NF- κ B activation, while troglitazone was ineffective. Although 15d-PGJ₂ attenuated activator protein-1 binding on the DNA, it potentiated c-jun migration in the nucleus. The absence or the low effect of troglitazone suggests that 15d-PGJ₂ action in human chondrocytes is mainly PPAR γ -independent. © 2001 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Peroxisome proliferator-activated receptor; Human chondrocyte; Interleukin-1 β ; 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂; Nuclear factor- κ B; Activator protein-1

1. Introduction

Progressive destruction of articular cartilage is a common feature of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. It is largely accepted that interleukin-1 (IL-1) initiates a number of events which lead to the inhibition of the synthesis of the extracellular matrix components and promotes their degradation [1–3]. Thus, cellular responses to IL-1 within the joint may constitute potential targets for disease intervention.

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) be-

longs to the superfamily of nuclear receptors which are ligand-activated transcription factors. They regulate gene expression by binding with their heterodimeric partner, retinoid X receptor to specific response elements located in the promoter of target genes. These genes are mainly involved in lipid metabolism, glucose homeostasis regulation and in cell differentiation [4–6]. Besides these functions, this nuclear receptor has been shown to play an important role in the control of inflammatory processes. The possibility to modulate cell activation by the use of PPAR γ ligands has been demonstrated in many cell types, including aortic smooth muscle cells [7], monocytes and macrophages [8–10], astrocytes and glial cells [11,12], T lymphocytes [13], vascular endothelial cells [14] or in animal models [15]. However, to date, this receptor has been poorly studied in cartilage.

The modulation of the effects of IL-1 β is of great interest for the protection of cartilage in arthritic diseases. We recently described the presence of PPAR α and PPAR γ in rat cartilage, and we found that 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), a PPAR γ ligand, modulated the IL-1 β -induced decrease in proteoglycan (PG) synthesis [16].

The aim of the present work was to investigate the possibility to counteract IL-1 β effects in human chondrocyte cultures by the use of PPAR γ ligands, and to study the inhibitory effects on the activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) transcriptional pathways. Controversy exists about the identification of intracellular targets involved in the mechanism of action of cyclopentenone, and especially of 15d-PGJ₂ [17]. Some of its effects have been shown to be through the transcriptional inhibition exerted by activated PPAR γ [8–10]. However, other works, which take into account the lack of effect of synthetic PPAR γ ligands, suggest a main contribution of PPAR γ -independent mechanisms on the anti-inflammatory effect of 15d-PGJ₂ [11,17–19]. No data is available concerning the mechanism of action of cyclopentenone prostaglandins in cartilage cells.

In the present study, we demonstrate that 15d-PGJ₂ was much more potent than troglitazone to counteract the decrease in PG synthesis and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) induced by IL-1 β . We also found that this prostaglandin exerts its effects at least partly by antagonizing the activation of AP-1, and especially NF- κ B pathways. These results, and especially the much lower effect of troglitazone, strongly suggest

*Corresponding author. Fax: (33)-3-83 59 26 21.
E-mail: bordji@facmed.u-nancy.fr

Abbreviations: IL-1, interleukin-1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; 15d-PGJ₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2; AP-1, activator protein-1; NF- κ B, nuclear factor- κ B; FCS, fetal calf serum; EMSA, electrophoretic mobility shift assay

that the main effects of 15d-PGJ₂ in human chondrocytes are PPAR γ -independent.

2. Materials and methods

2.1. Chondrocyte isolation and culture

Articular cartilage was obtained after routine joint surgery from informed donors who had undergone hip replacement due to fracture. Cartilage specimens were examined thoroughly, both macroscopically and microscopically. Only those with neither lesions nor alterations were further processed. Slices of cartilage were aseptically dissected and chondrocytes were obtained by sequential digestions with Pronase and collagenase B (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) as previously described [20]. Cells were cultured to confluence at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, in complete medium [Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 μ g ml⁻¹) and 10% fetal calf serum (FCS)]. All experiments were performed with primary or first passage chondrocytes to avoid any problems of de-differentiation. For the PG synthesis studies, chondrocytes were also encapsulated in alginate beads (1.2%, w/v) (from *Macrocystis pyrifera*, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and cultured in three-dimensional matrix according to the method of Häuselmann [21] and modified by us [22].

2.2. Recombinant human IL-1 β (rhIL-1 β) treatments in the presence of specific ligands

Chondrocyte cultures were treated with rhIL-1 β in the range of 0–250 U ml⁻¹ for 14 h (PPAR γ mRNA analysis) or with 50 U ml⁻¹ IL-1 β for 6 h (iNOS and COX-2 mRNA analysis). The ligands or the vehicle (0.1% Me₂SO in final concentration) were added to cells 4 h before rhIL-1 β . The ligands tested were troglitazone (10 μ M) and 15d-PGJ₂ (10 μ M) (France-Biochem, Meudon, France). At 1 μ M, both ligands were ineffective, and at 100 μ M, they were highly toxic for the cells.

2.3. RNA extraction and quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from cell cultures by a single-step guanidinium thiocyanate–phenol chloroform method using Trizol reagent (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France). PPAR γ , iNOS and COX-2 mRNA from human chondrocyte cultures were assayed using a quantitative multistandard RT-PCR method that takes advantage of both interest gene and β -actin sequence conservation between human and rat [23]. This method allowed us to normalize the amount of the gene mRNA to be measured with respect to that of β -actin mRNA. For each sample, human RNA was mixed with a constant amount of total RNA prepared from rat chondrocyte cultures, which brought both competitive rat β -actin and interest gene sequences, and thus acted as a multistandard source. PCRs for each gene amplification were undertaken with oligonucleotide primers that are able to hybridize with human and rat sequences with the same efficiency. For PPAR γ amplification, the direct primer extended from nucleotides 841 to 866 and the reverse primer from nucleotides 1364 to 1339, in accordance with the human sequence (GenBank accession number U79012). For iNOS amplification, the direct primer extended from nucleotides 1489 to 1512 and the reverse primer from nucleotides 1921 to 1897, in accordance with the human sequence (GenBank accession number L09210). For COX-2 amplification, the direct primer extended from nucleotides 410 to 432 and the reverse primer from nucleotides 850 to 830, in accordance with the human sequence (GenBank accession number M90100).

Each amplification product was then distinguished by restriction site polymorphism between the two species. The bands were quantitated after electrophoresis and analysis of ethidium bromide-stained gels. Results are expressed as the ratio (gene_{human}/gene_{rat}) \times (β -actin_{rat}/ β -actin_{human}) in arbitrary units.

2.4. Protein analysis

Immunoblotting analysis of PPAR γ was performed on human chondrocytes treated or not with rhIL-1 β at 250 U ml⁻¹ for 14 h. Proteins were isolated from cells in lysis buffer (10 mM HEPES, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Igepal) containing a protease-inhibitor mixture (Roche). Cell lysates were centrifuged, and the supernatants were collected and subjected to Western blot analysis using an

anti-PPAR γ antibody [24]. Immunoblotting analysis of p65 and c-jun were performed on nuclear extracts of cells stimulated with IL-1 β (50 U ml⁻¹) for 1 h after a pre-incubation of 4 h with the ligand or Me₂SO (0.1%). Nuclear extracts were obtained as described for electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments (see below). For immunocytochemical analysis, chondrocyte layers were fixed in 3% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and permeabilized in methanol for 20 min at 4°C. They were then exposed to the primary anti-PPAR γ antibody (diluted 1:2000) for 30 min at 37°C. Cells were washed twice and incubated with the secondary fluorescein-conjugated antibody (diluted 1:100 in PBS) for 30 min at 37°C. Cells were then mounted in Vectashield medium and photographed with a Polyvar microscope (Reichert-Jung, Vienna, Austria).

2.5. PG synthesis and quantification of nitrites

After 8 days of culture, chondrocytes cultured in alginate beads were treated as described before. The culture medium was then collected to measure the concentration of nitrites according to the method of Griess [25] using NaNO₂ as standard. The beads were incubated in medium containing only 1% FCS with 10 μ Ci ml⁻¹ radiolabeled sodium sulfate (Na₂³⁵SO₄) for 4 h at 37°C. After six washes with 0.15 M NaCl, the alginate beads were solubilized in Soluene 350 overnight, and the ³⁵SO₄-labeled PG content was measured by liquid scintillation with a LKB 1214 counter (Wallac, France).

2.6. Preparation of nuclear extracts and EMSA

For EMSA experiments, nuclear proteins were isolated as described before [26], after few modifications. Briefly, cells were scraped in a lysis buffer [10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT)] containing a protease-inhibitor cocktail and 0.5% Igepal, and were incubated for 15 min on ice. Nuclei were collected by centrifugation at 2000 \times g for 5 min at 4°C and resuspended in 50 μ l of the same buffer without Igepal and KCl, but with 420 mM NaCl. After a 30-min incubation on ice, nuclear debris were removed by centrifugation at 13 000 \times g for 10 min at 4°C, and the supernatants were collected and stored at –80°C before use.

The DNA sequences of the double-stranded oligonucleotide specific of NF- κ B were 5'-GAT CCA GTT GAG GGG ACT TTC CCA GGC G-3' and 5'-GAT CCG CCT GGG AAA GTC CCC TCA ACT G-3'. Those specific to AP-1 were 5'-GAT CCG CTT GAT GAC TCA GCC GGA AG-3' and 5'-GAT CCT TCC GGC TGA GTC ATC AAG CG-3'. Complementary strands were annealed and double-stranded oligonucleotides were labeled with [³²P]dCTP using the Klenow fragment of DNA polymerase (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France). Five micrograms of nuclear proteins were incubated for 10 min at 4°C in a binding buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA and 20% glycerol) in the presence of 2 μ g of poly(dI-dC). The extracts were then incubated for 30 min at 4°C with 10 000 cpm of ³²P-labeled NF- κ B or AP-1 probes. The samples were loaded on a 5% native polyacrylamide gel, and run in 0.5 \times TBE buffer. NF- κ B- and AP-1- specific bands were confirmed by competition with a 100-fold excess of the respective unlabeled probe, which resulted in no shifted band. For supershift experiments, after the addition of the labeled probe, the extracts were incubated for 30 min at 4°C in the presence of the specific antibody (anti-p65 or anti-p50 for NF- κ B; anti-c-fos or anti-c-jun for AP-1).

3. Results

3.1. PPAR γ mRNA and protein expression in human chondrocytes is decreased by IL-1 β

RT-PCR followed by digestion with a specific restriction enzyme led to products of the expected size (524 bp for human uncut product, 291+208+24 bp for rat digested products; Fig. 1A). These results, as well as those of the Western blot analysis (Fig. 1B), indicate that PPAR γ is constitutively expressed in human chondrocytes at both the mRNA and the protein levels. An immunocytochemical analysis was further performed on normal chondrocyte primary cultures in order to investigate the intracellular localization of the transcription factor. Fluorescence signals specific of PPAR γ were mainly observed in nuclei (Fig. 1C), which is in accordance with their

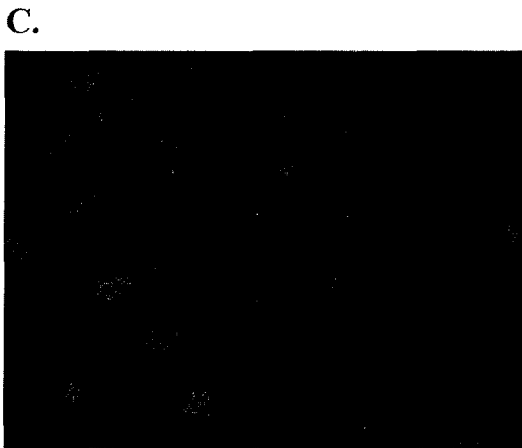
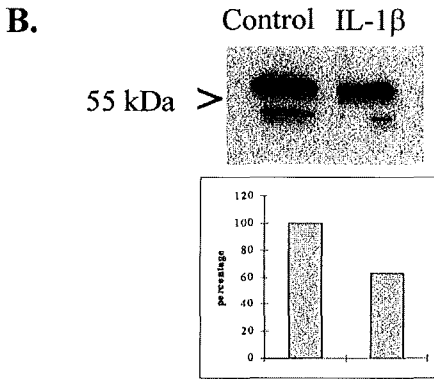
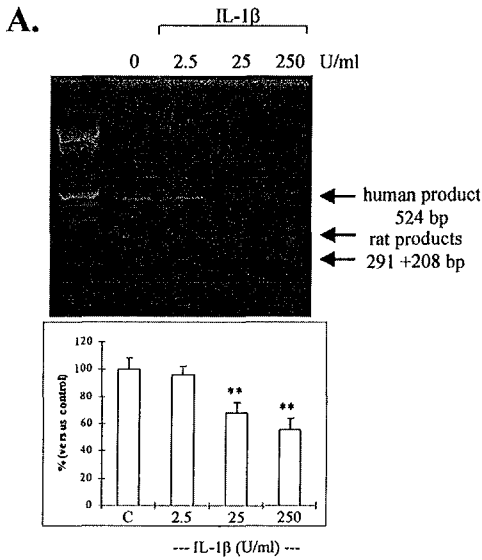


Fig. 1. PPAR γ is constitutively expressed in human chondrocyte cultures and is down-regulated by IL-1 β treatment. A: Electrophoretic profile of RT-PCR products for PPAR γ after specific amplification of mRNA from a mixture of human and rat cells, which brought both competitive rat β -actin and PPAR γ sequences. Top: RT-PCR products for PPAR γ . mRNA was extracted from chondrocyte cultures treated or not with increased concentrations of rhIL-1 β . The amplification products were distinguished by restriction site polymorphism between the two species. Bottom: PPAR γ transcripts were quantified as described in Section 2 using the β -actin from the same cDNA pools as an internal control. B: Top: Western blot analysis of PPAR γ protein expression in cultured chondrocytes treated or not with IL-1 β (250 U ml $^{-1}$) for 14 h. Bottom: The intensity of the bands was determined by densitometric analysis and fixed at 100% for the control. This result is the mean of three independent experiments. C: Intracellular localization of PPAR γ in cultured chondrocytes. Immunocytochemical analysis of PPAR γ expression in human osteoarthritis chondrocyte cultures was performed using polyclonal anti-PPAR γ antibody. PPAR γ protein is mainly observed in nuclei, but not in nucleoles, with a low cytoplasmic localization (** $P < 0.05$).

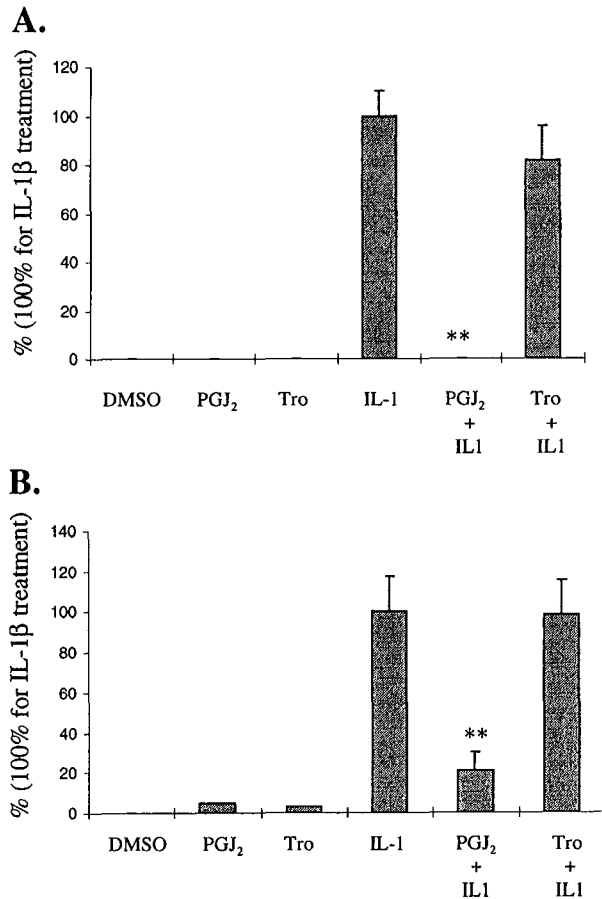


Fig. 2. Effect of troglitazone and 15d-PGJ $_2$ on IL-1 β -induced iNOS (A) and COX-2 (B) mRNA expression. Human chondrocytes were cultured in 1% FCS-containing medium for 4 h, then in the presence of the ligands (troglitazone or 15d-PGJ $_2$) before being stimulated with 50 U ml $^{-1}$ IL-1 β for 6 h. Total RNA was immediately extracted for RT-PCR experiments. Results are expressed as relative arbitrary units with a value of 100 for the IL-1 β treatment. Results represent mean values \pm S.D. ($n = 5$; ** $P < 0.05$).

site of action. No signal was detected in nucleoles. A low cytoplasmic localization was also observed.

Because IL-1 β has a key role in the events leading to cartilage damage, we have investigated its effects on the expression of PPAR γ mRNA and protein. Chondrocyte cultures were treated with IL-1 β in the range of 0–250 U ml $^{-1}$ for 14 h. Fig. 1A shows that PPAR γ mRNA expression was significantly decreased in a dose-dependent manner. A Western blot analysis furthermore showed that the mRNA level encoding PPAR γ upon treatment with IL-1 β (250 U ml $^{-1}$) could be related to the variation of the corresponding protein (Fig. 1B).

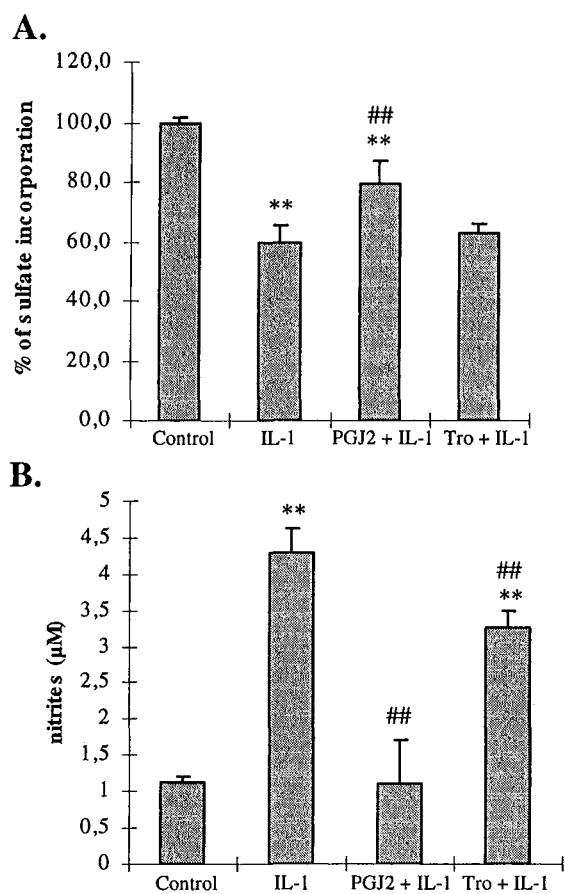


Fig. 3. Effect of PPAR γ ligands on IL-1 β -induced decrease in PG synthesis (A) and NO release (B) in human chondrocytes. Chondrocytes were cultured in alginate beads at a concentration of 5×10^6 cells ml $^{-1}$. Beads were cultured in 1% FCS-containing medium for 12 h before the treatments. Cultures were incubated in the presence of the ligands 4 h before the addition of IL-1 β (50 U ml $^{-1}$) in the medium, and the chondrocytes were stimulated for 24 h. PG synthesis was assessed by incorporation of radiolabeled sodium sulfate for 4 h at 37°C. NO production was determined spectrophotometrically according to the Griess method. Results represent mean values \pm S.D. ($n = 5$; ** $P < 0.05$ versus control; # $P < 0.05$ versus IL-1). ←

3.2. Effects of PPAR γ ligands on IL-1 β -induced iNOS and COX-2 mRNA expression

We further investigated the capability of PPAR γ ligands to modulate the effects of IL-1 β on human chondrocyte cultures. IL-1 β is well known to induce the expression of inflammatory enzymes, such as iNOS and COX-2, and the associated production of metabolites, such as NO and prostaglandin-E2. To this end, chondrocyte cultures were treated with IL-1 β (50 U ml $^{-1}$) for 6 h in the presence or absence of ligands and mRNA expression for iNOS and COX-2 was assessed. IL-1 β induced a strong expression of both iNOS and COX-2 mRNA, and we found that 15d-PGJ $_2$ at 10 μ M was highly efficient to inhibit the mRNA expression of both enzymes. After 4 h of pre-incubation, it completely abolished iNOS mRNA expression (Fig. 2A) and led to a 65% decrease in COX-2 mRNA (Fig. 2B). In contrast to 15d-PGJ $_2$, troglitazone, at 10 μ M, was much less effective because it only led to a 18% reduction in IL-1 β -induced iNOS mRNA expression and did not modulate COX-2 mRNA. No effect was observed with 1 μ M troglitazone, whereas 100 μ M troglitazone was highly toxic for the cells, as shown by a strong increase in

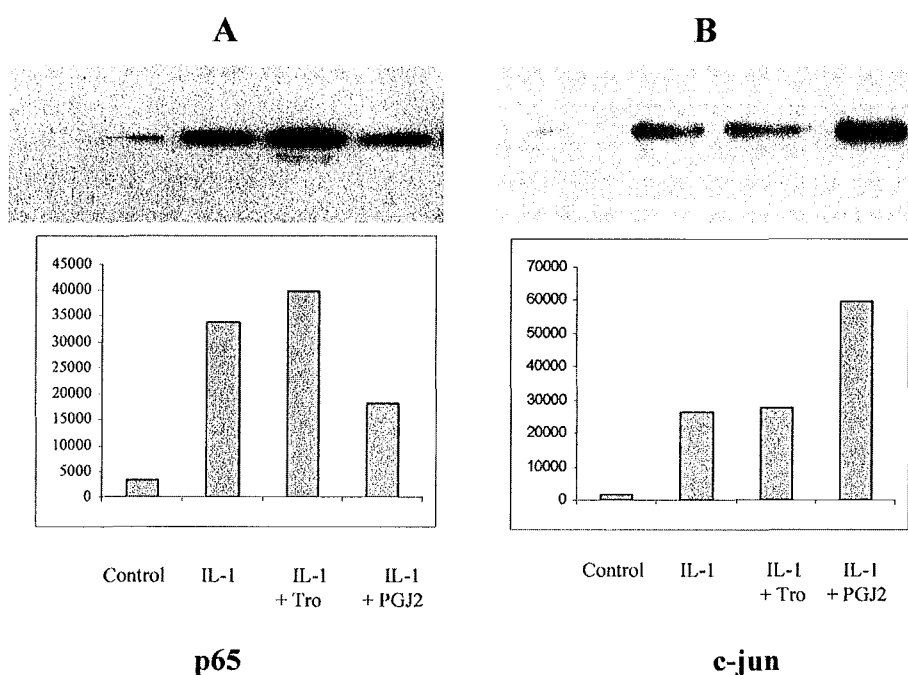


Fig. 4. Effect of troglitazone and 15d-PGJ $_2$ on IL-1 β -induced translocation of p65 and c-jun in the nucleus. Top: Western blot analysis of p65 (A) and c-jun (B) in chondrocyte nuclei after treatment of chondrocyte cultures with IL-1 β (50 U ml $^{-1}$) in the presence or absence of PPAR γ ligands. Nuclear proteins were extracted and immunoblot analysis was performed with specific antibodies. Bottom: the intensity of the bands was determined by densitometric analysis. Quantifications are the result of three independent experiments.

the extracellular lactate dehydrogenase activity (data not shown).

3.3. Effects of PPAR γ ligands on IL-1 β -induced PGs synthesis decrease and NO production

The chondroprotective potentiality of PPAR γ ligands was thereafter tested on chondrocytes cultured in alginate beads by measuring the PGs synthesis and the NO production. Treatment of chondrocytes with IL-1 β (50 U ml $^{-1}$) for 24 h induced a 40% inhibition of radiolabeled sulfate incorporation (Fig. 3A) and a significant increase in nitrite production (Fig. 3B). When chondrocyte cultures were pretreated with 10 μ M 15d-PGJ $_2$, a 50% restoration of the PGs synthesis was observed, whereas no effect was obtained with troglitazone at 10 μ M (Fig. 3A). Moreover, 15d-PGJ $_2$ completely abolished the IL-1 β -induced NO production, which is coherent with its effects on iNOS mRNA, whereas troglitazone led to a weaker inhibition of NO release (-34%; $P < 0.05$ versus IL-1, Fig. 3B).

3.4. 15d-PGJ $_2$ inhibits both NF- κ B and AP-1 activation pathways in IL-1 β -treated chondrocytes

NF- κ B and AP-1 are two important IL-1 β -inducible transcription factors that drive the expression of many genes involved in inflammation or in cartilage degradation, such as iNOS, COX-2, IL-1 β , tumor necrosis factor- α and metalloproteinases. To test if PPAR γ ligands could antagonize NF- κ B or AP-1 activation pathways, chondrocytes were pre-incubated for 4 h in the presence of 10 μ M 15d-PGJ $_2$ or 10 μ M troglitazone before being stimulated with IL-1 β (50 U ml $^{-1}$) for 1 h. Western blot and gel-shift analyses were performed on nuclear extracts to visualize the translocation of p65 and c-jun proteins in the nucleus and the binding of NF- κ B and AP-1 on the DNA, respectively. Fig. 4A shows that 15d-PGJ $_2$ led to a strong decrease in IL-1 β -induced p65 translocation in the nucleus (-48%). In contrast, 15d-PGJ $_2$ was shown to potentiate the effects of IL-1 β on the translocation of c-jun in the nucleus (+114%) (Fig. 4B). For both proteins, no effect was observed after a pre-incubation with troglitazone at 10 μ M.

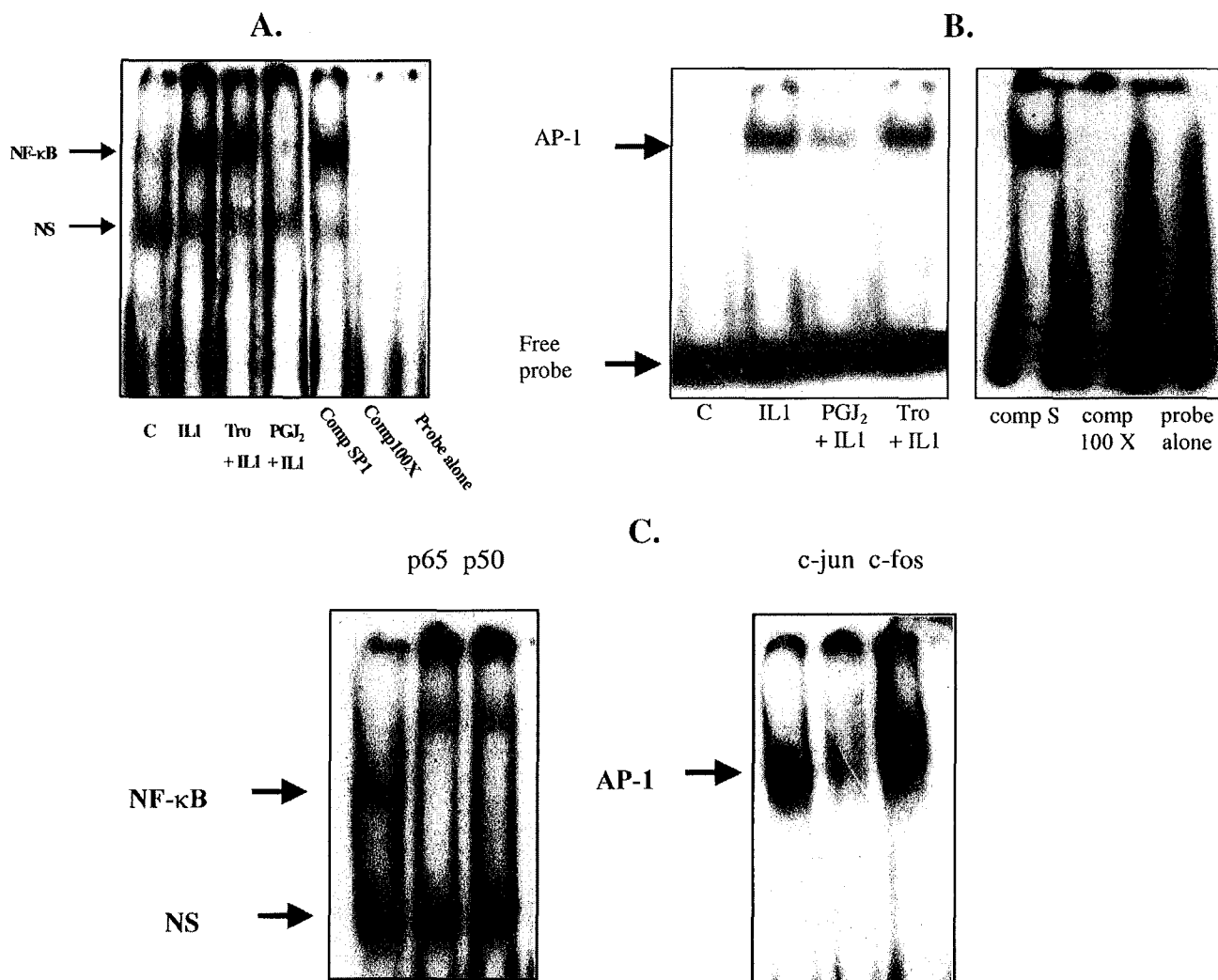


Fig. 5. 15d-PGJ $_2$, but not troglitazone, reduces IL-1 β -induced NF- κ B and AP-1 DNA binding activities in cultured human chondrocytes. Chondrocytes were cultured in 1% FCS-containing medium with 15d-PGJ $_2$ (10 μ M), troglitazone (10 μ M) or vehicle (DMSO 0.1%) for 12 h and subsequently treated with IL-1 β (50 U ml $^{-1}$) for 1 h. Nuclear proteins were extracted and 5 μ g of each sample were subjected to EMSA using NF- κ B (A) or AP-1 (B) consensus site radiolabeled probes. Complexes were visualized by autoradiography. NS = non-specific complex. 100-fold concentrated unlabeled probe. C: EMSA 'supershift' assays identifying the subunit components for NF- κ B and AP-1 dimers. The experiments were performed three times; representative results are shown.

EMSA allowed us to visualize the IL-1 β -induced binding of NF- κ B and AP-1 on oligonucleotide probes containing their specific response element (Fig. 5). After 4 h of pre-incubation, 15d-PGJ₂ prevented NF- κ B and AP-1 activation by IL-1 β , whereas troglitazone was ineffective in both cases. Incubation of nuclear proteins with a 100-fold concentrated unlabeled probe was performed to indicate the specificity of binding of NF- κ B or AP-1 to the DNA. Moreover, a pre-incubation in the presence of specific antibodies made it possible to identify the components of the protein complex as being p65/p50 heterodimer for NF- κ B and c-jun/c-fos for AP-1.

4. Discussion

Besides its key roles in energy metabolism and cell differentiation, PPAR γ has been shown to be involved in the anti-inflammatory action of specific agonists. These effects have been observed in different inflammatory models, such as in a mouse model of colonic inflammation [15], in a vascular inflammation model using smooth muscle cell cultures [7] and in A β -stimulated microglial activation experiments [12]. These studies suggested that PPAR γ ligands would be efficient for the treatment of Alzheimer's disease, inflammatory bowel disease or atherosclerosis. Moreover, both PPAR α and PPAR γ ligands have been reported to inhibit the production and the effects of proinflammatory cytokines by monocytes/macrophages *in vitro* [8,9]. These data indicate that PPAR α and/or PPAR γ could constitute potential targets in the field of inflammatory or degenerative arthropathies. However, the PPARs have been poorly described in the context of arthritic diseases [27], and especially in cartilage.

We have recently reported the constitutive expression of PPAR α and PPAR γ in normal rat cartilage at both mRNA and protein levels [16]. The aim of the present work was to characterize PPAR γ in human normal chondrocytes and to evaluate the effects of ligands on IL-1 β -stimulated cells. The action of the ligands was first tested on iNOS and COX-2 mRNA expression, two major enzymes expressed in chondrocytes after IL-1 β treatment. Our results show that 15d-PGJ₂ is much more efficient than troglitazone. It is worth noting that 15d-PGJ₂ completely abolished IL-1 β -induced iNOS mRNA expression. In the same way, troglitazone only led to a slight inhibition of NO production without any chondroprotective effect.

15d-PGJ₂ is described as a ligand for PPAR γ . However, the absence or the low effect of troglitazone in the present work raises the question of the real involvement of the receptor in the action of this prostaglandin in human chondrocytes. In activated monocyte or macrophage cell lines, cyclopentenone prostaglandins have been shown to modulate cellular activation through the transcriptional inhibition exerted via PPAR γ [8,9]. On the other side, the contribution of other PPAR γ -independent mechanisms on the anti-inflammatory action of 15d-PGJ₂ have been demonstrated, in part, because of the lack of effect of synthetic PPAR γ ligands [11,17–19]. Thus, other intracellular targets have been identified, especially in the NF- κ B signalling pathway. The most reported one is I- κ B kinase (IKK), which is inhibited by direct phosphorylation of its catalytic subunit, IKK β [18]. Other lines of evidence suggested that the cyclopentenone ring system of 15d-PGJ₂ could also directly inhibit the DNA binding activity of NF- κ B through direct alkylation of a cysteine residue located in

the DNA binding domain of the p65 subunit [19]. These two mechanisms have been shown to act in combination to inhibit transactivation of the NF- κ B target gene COX-2 in HeLa cells and RAW264.7 cells. It is well established that NF- κ B and AP-1 are two important IL-1 β -inducible transcription factors involved in the expression of many genes central to arthritic diseases and cartilage degradation [28,29]. Our results clearly show that 15d-PGJ₂ significantly inhibited p65 translocation in the nucleus, but was also very potent to inhibit DNA binding activity of NF- κ B. In comparison, troglitazone was completely ineffective on both steps. Some papers suggested that the involvement of PPAR γ , in the action of 15d-PGJ₂, varied among different cell types. The lack of effect of troglitazone in the present work would suggest a PPAR γ -independent mechanism of action of 15d-PGJ₂, perhaps because the expression level of the receptor in chondrocytes was too low [16]. However, the inefficiency of troglitazone may also be attributed to the decrease in PPAR γ expression upon IL-1 β stimulation. To verify this hypothesis, we have measured the expression of PPAR γ in cells treated with IL-1 β in the presence of one of the ligands. We found that both 15d-PGJ₂ and troglitazone restored the expression of the receptor at the level of control cultures (data not shown). One must also take into account the relative low potency of troglitazone as a PPAR γ ligand. Numerous other agonists have been recently identified as being much more potent and selective towards PPAR γ [30].

Concerning AP-1 activation, our results clearly show that both ligands were ineffective to counteract c-jun translocation in the nucleus, and 15d-PGJ₂ was even shown to potentiate IL-1 β effects. However, the DNA binding of AP-1 was reduced by 15d-PGJ₂. These two opposite effects on the AP-1 pathway in chondrocytes are somewhat surprising. In PPAR γ -negative HeLa cells, 15d-PGJ₂ was shown to strengthen the activating effect of phorbol 12-tetradecanoate 13-acetate on AP-1 [19]. This effect was believed to be attributable to the activity of 15d-PGJ₂ to stimulate jun N-terminal kinase (JNK). This would explain the results of the present work, since p65 is phosphorylated by JNK in response to IL-1 β . In HeLa cells, 15d-PGJ₂ was also shown to induce the phosphorylation of cysteine residues located in the DNA binding domain of NF- κ B subunits. The action of 15d-PGJ₂ on the AP-1 signalling pathway has been much less studied and, to our knowledge, such a mechanism has not been described. However, it could therefore explain the present observations.

In conclusion, the present work characterizes, for the first time, the potentiality of PPAR γ -ligands to modulate the IL-1 β effects on human chondrocytes. By taking into account the low effects obtained with troglitazone, the action of the 15d-PGJ₂ in human chondrocytes seems to be mainly PPAR γ -independent, via the inhibition of both NF- κ B and AP-1 pathways.

Acknowledgements: The authors would like to thank Jean-Marie Keller for performing immunocytochemical experiments. This work was supported in part by the 'Commission de Recherche Clinique', CHU de Nancy-Brabois and by the 'Association de la Recherche contre la Polyarthrite, ARP'.

References

- [1] Arend, W.P. and Dayer, J.-M. (1995) *Arthritis Rheum.* 38, 151–160.
- [2] van de Loo, F.A.J., Joosten, L.A.B., van Lent, P.L.E.M., Arntz,

- O.J. and van den Berg, W.B. (1995) *Arthritis Rheum.* 38, 164–172.
- [3] Pelletier, J.P., Caron, J.P., Evans, C., Robbins, P.D., Georgescu, H.I. and Jovanovic, D. (1997) *Arthritis Rheum.* 40, 1012–1019.
- [4] Schoonjans, K., Martin, G., Staels, B. and Auwerx, J. (1997) *Curr. Opin. Lipidol.* 8, 159–166.
- [5] Desvergne, B. and Wahli, W. (1999) *Endocr. Rev.* 20, 649–688.
- [6] Fajas, L., Fruchart, J.C. and Auwerx, J. (1998) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 165–173.
- [7] Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Leuret, M., Pineda Torra, I., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.-C., Najib, J., Maclouf, J. and Tedgui, A. (1998) *Nature* 393, 790–793.
- [8] Jiang, C., Ting, A.T. and Seed, B. (1998) *Nature* 391, 82–86.
- [9] Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. and Glass, C.K. (1998) *Nature* 391, 79–82.
- [10] Colville-Nash, P.R., Qureshi, S.S., Willis, D. and Willoughby, D.A. (1998) *J. Immunol.* 161, 978–984.
- [11] Petrova, T.V., Akama, K.T. and Van Eldik, L.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4668–4673.
- [12] Combs, C.C., Johnson, D.E., Karlo, J.C., Cannady, S.B. and Landreth, G.E. (2000) *J. Neurosci.* 20, 558–567.
- [13] Yang, X.Y., Wang, L.H., Chen, T., Hodge, D.R., Resau, J.H., Da Silva, L. and Farrar, W.L. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4541–4544.
- [14] Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G. and Staels, B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 32048–32054.
- [15] Su, C.G., Wen, X., Bailey, S.T., Jiang, W., Rangwala, S.M., Keilbaugh, S.A., Flanigan, A., Murthy, S., Lazar, M.A. and Wu, G.D. (1999) *J. Clin. Invest.* 104, 383–389.
- [16] Bordji, K., Grillasca, J.P., Gouze, J.N., Magdalou, J., Schohn, H., Keller, J.M., Bianchi, A., Dauça, M., Netter, P. and Terlain, B. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12243–12250.
- [17] Castrillo, A., Diaz-Guerra, M.J.M., Hortelano, S., Martin-Sanz, P. and Bosca, L. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20, 1692–1698.
- [18] Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. and Santoro, G. (2000) *Nature* 403, 103–108.
- [19] Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G. and Glass, C.K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4844–4849.
- [20] Kuettner, K.E., Pauli, B.U., Gall, G., Memoli, V.A. and Schenk, R.K. (1982) *J. Cell. Biol.* 93, 743–750.
- [21] Häuselmann, H.J., Aydelotte, M.B., Schumacher, B.L., Kuettner, K.E., Gitelis, S.H. and Thonar, E.J.M.A. (1992) *Matrix* 12, 116–129.
- [22] Cipolletta, C., Jouzeau, J.Y., Gegout-Pottie, P., Presle, N., Bordji, K., Netter, P. and Terlain, B. (1998) *Br. J. Pharmacol.* 124, 1719–1727.
- [23] Khiri, H., Reynier, P., Peyrol, N., Lérique, B., Torresani, J. and Planells, R. (1996) *Mol. Cell. Probes* 10, 201–211.
- [24] Huin, C., Corriveau, L., Bianchi, A., Keller, J.-M., Collet, P., Krémarik-Bouillaud, P., Domenjoud, L., Bécuwe, P., Schohn, H., Ménard, D. and Dauça, M. (2000) *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1–9.
- [25] Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982) *Anal. Biochem.* 126, 131–138.
- [26] Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 1475–1489.
- [27] Kawahito, Y., Kondo, M., Tsubouchi, Y., Hashiramoto, A., Bishop-Bailey, D., Inoue, K., Kohno, M., Yamada, R., Hla, T. and Sano, H. (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 189–197.
- [28] Hui, A., Min, W.X., Tang, J. and Cruz, T.F. (1998) *Arthritis Rheum.* 41, 869–876.
- [29] Firestein, G.S. and Manning, A.M. (1999) *Arthritis Rheum.* 42, 609–621.
- [30] Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D. and Henke, B.R. (2000) *J. Med. Chem.* 43, 527–550.

PPAR- γ ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts

MARIE-AGNÈS SIMONIN,¹ KARIM BORDJI,¹ SANDRINE BOYAULT,¹
ARNAUD BIANCHI,² ELVIRE GOUZE,¹ PHILIPPE BÉCUWE,² MICHEL DAUÇA,²
PATRICK NETTER,¹ AND BERNARD TERLAIN¹

¹Laboratoire de Pharmacologie, Unite Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7561, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy; and ²Laboratoire de Biologie du Développement, Unite propre de l'enseignement supérieur 2402, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received 9 March 2001; accepted in final form 5 September 2001

Simonin, Marie-Agnès, Karim Bordji, Sandrine Boyault, Arnaud Bianchi, Elvire Gouze, Philippe Bécuwe, Michel Dauça, Patrick Netter, and Bernard Terlain.

PPAR- γ ligands modulate the effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C125–C133, 2002.—This work demonstrated the constitutive expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ and PPAR- α in rat synovial fibroblasts at both mRNA and protein levels. A decrease in PPAR- γ expression induced by 10 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) was observed, whereas PPAR- α mRNA expression was not modified. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) dose-dependently decreased LPS-induced cyclooxygenase (COX)-2 (–80%) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression (–80%), whereas troglitazone (10 μ M) only inhibited iNOS mRNA expression (–50%). 15d-PGJ₂ decreased LPS-induced interleukin (IL)-1 β (–25%) and tumor necrosis factor (TNF)- α (–40%) expression. Interestingly, troglitazone strongly decreased TNF- α expression (–50%) but had no significant effect on IL-1 β expression. 15d-PGJ₂ was able to inhibit DNA-binding activity of both nuclear factor (NF)- κ B and AP-1. Troglitazone had no effect on NF- κ B activation and was shown to increase LPS-induced AP-1 activation. 15d-PGJ₂ and troglitazone modulated the expression of LPS-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokines differently. Indeed, troglitazone seems to specifically target TNF- α and iNOS pathways. These results offer new insights in regard to the anti-inflammatory potential of the PPAR- γ ligands and underline different mechanisms of action of 15d-PGJ₂ and troglitazone in synovial fibroblasts.

peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands; rat synovial fibroblasts; proinflammatory cytokines

RHEUMATOID ARTHRITIS (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by proliferative and invasive synovitis. Proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α have been shown to play a pivotal role in the pathogenesis of the synovitis in RA (1, 2, 7, 30). Therefore, counteracting the production of inflammatory mediators by synovial cells may be an important key in prevention of the

development of this articular pathology leading to cartilage degradation.

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor supergene family that function in ligand-activated transcription (20, 21). PPARs bind to specific response elements as heterodimers with the retinoid X receptor (14) and activate transcription of target genes in response to a variety of endogenous and exogenous ligands. PPARs consist in three isoforms, which differ in their tissue distribution and ligand specificity. PPAR- γ has been shown to play a major regulatory role in adipocyte and macrophage differentiation and glucose homeostasis (21). PPAR- α is mainly found in tissues that exhibit high levels of lipid catabolism, such as the liver, whereas PPAR- δ expression is ubiquitous and its physiological role is unclear.

It has been demonstrated that these nuclear receptors are involved in inflammation control and, especially, in modulating proinflammatory cytokine production. Indeed, PPAR- γ ligands inhibited production of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in monocytes (11) and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and gelatinase B in activated macrophages (5, 18) and reduced TNF- α expression in obese rat adipose tissue (15). Their involvement in the inflammation process has been demonstrated in other cell types including astrocytes, glial cells (16), and mast cells (26) and in a mouse model of inflammatory bowel disease (25). However, contradictory results exist, because a recent work showed that thiazolidinediones were unable to suppress the production of TNF- α and IL-6 in lipopolysaccharide (LPS)- or phorbol myristate acetate-stimulated monocytes or macrophages (29). The same observations were made with thiazolidinedione-treated mice (29).

Concerning PPAR- α , it was shown that inflammation due to either arachidonic acid or leukotriene B₄ was prolonged in PPAR- α knockout mice compared with controls (6). Studies performed in smooth muscle cells suggested that PPAR- α activators could also mod-

Address for reprint requests and other correspondence: P. Netter, Laboratoire de Pharmacologie, UMR CNRS 7561, Faculté de Médecine de Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy. (E-mail: pharmaco@facmed.u-nancy.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

ulate inflammation in the vascular wall by inhibiting the IL-1-induced production of IL-6 and prostaglandins as well as cyclooxygenase (COX)-2 expression (23).

The involvement of these nuclear receptors in inflammatory or degenerative arthropathies is relatively unexplored, and we previously demonstrated (3) the presence of PPAR- α and PPAR- γ in rat articular cartilage. We also showed (3) that two PPAR- γ ligands, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) and, at a lesser level, troglitazone, could counteract the decrease in proteoglycan synthesis and the nitric oxide (NO) production induced by IL-1 β . Recently, a synovial tissue expression of PPAR- γ was detected in patients with RA, and this study showed that intraperitoneal administration of PPAR- γ ligands ameliorated adjuvant-induced arthritis with suppression of pannus formation in rats (12).

In the present work, we demonstrated the presence of PPAR- γ and PPAR- α in rat type B synovial cells at both mRNA and protein levels and demonstrated a decrease in PPAR- γ expression after treatment with LPS. We further showed that 15d-PGJ₂ and troglitazone modulate the expression of proinflammatory genes differently and that 15d-PGJ₂ exerts its action at least partly by antagonizing the activities of transcription factors AP-1 and nuclear factor (NF)- κ B. These results offer new insights in regard to the implication of PPAR- γ in the actions of 15d-PGJ₂ and troglitazone in LPS-stimulated B synoviocytes.

MATERIALS AND METHODS

B synoviocyte isolation and culture. Synovial tissues were obtained from Wistar male rats (130–150 g; Charles River) killed under dissociative anesthesia [ketamine (Rhône-Mérieux) and acepromazine (Sanofi Santé Animale)]. Synoviocytes were obtained by sequential digestion with Pronase and collagenase B (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). The cells were washed two times in phosphate-buffered saline (PBS) and cultured to confluence in 25-cm² flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The medium used was DMEM-Ham's F-12 supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 μ g/ml), amphotericin B (0.5 μ g/ml), and heat-inactivated fetal calf serum (10%; Life Technologies). The synovial cells were used between passages 3 and 6, at which point they exhibited a fibroblastic morphology.

LPS treatment in presence of PPAR- γ ligands. Twelve hours before the treatments, complete medium was replaced by serum-free medium. The ligands or the vehicle (0.1% Me₂SO in final concentration) were then added to synovial cells 12 h before the addition of LPS. The ligands used were troglitazone (1 and 10 μ M) and 15d-PGJ₂ (1 and 10 μ M; France-Biochem, Meudon, France). Synoviocytes were then treated with LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, 10 μ g/ml; Sigma) for 12 h.

Quantitative RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from cell cultures by a single-step guanidinium thiocyanate-phenol chloroform method using Trizol reagent (GIBCO BRL, Cergy-Pontoise, France). RNA was recovered in ultra-purified water and quantified by spectrophotometry at 260 and 280 nm. PPAR- γ , PPAR- α , iNOS, and COX-2 mRNA from rat synovial cells were assayed using a quantitative multistandard RT-PCR method that takes advantage of both

gene of interest and L27 ribosomal protein sequence conservation between rat and human (13). This protocol allowed us to normalize the amounts of the gene mRNA to be measured with respect to those of L27 mRNA. For each sample, RNA purified from rat synoviocytes was mixed with a constant amount of total RNA prepared from human chondrocyte cultures, which carried both competitive human L27 and gene of interest sequences and thus acted as a multistandard source. The mixture was reverse-transcribed using hexamer random primers. PCRs for each gene amplification were undertaken with oligonucleotide primers that are able to hybridize with rat and human sequences with the same efficiency. For each gene, preliminary kinetic experiments were performed to determine the number of cycles allowed to be in the exponential phase of amplification. For PPAR- α amplification [29 cycles, annealing temperature (AT) = 61°C], the direct primer extended from nucleotides 738 to 761 and the reverse primer from nucleotides 1084 to 1065, in accordance with the human sequence (GenBank accession no. NM005036). For PPAR- γ amplification (30 cycles, AT = 64°C), the direct primer extended from nucleotides 841 to 866 and the reverse primer from nucleotides 1364 to 1339, in accordance with the human sequence (GenBank accession no. U79012). For iNOS amplification (27 cycles, AT = 62°C), the direct primer extended from nucleotides 1489 to 1512 and the reverse primer from nucleotides 1921 to 1897, in accordance with the human sequence (GenBank accession no. L09210). For COX-2 amplification (28 cycles, AT = 59°C), the direct primer extended from nucleotides 410 to 432 and the reverse primer from nucleotides 850 to 830, in accordance with the human sequence (GenBank accession no. M90100). For L27 amplification (27 cycles, AT = 62°C), the direct primer extended from nucleotides 63 to 81 and the reverse primer from nucleotides 287 to 268, in accordance with the human sequence (GenBank accession no. L05094). Each amplification product was then distinguished by restriction site polymorphism between the two species. Amplification products were quantitated after electrophoresis and analysis of ethidium bromide-stained gels, using the L27 from the same cDNA pools as an internal control. Results are expressed as the ratio ($\text{gene}_{\text{rat}}/\text{gene}_{\text{human}} \times (\text{L27}_{\text{human}}/\text{L27}_{\text{rat}})$) in arbitrary units.

IL-1 β and TNF- α mRNA from rat synovial cell cultures were assayed using a semi-quantitative RT-PCR method. For IL-1 β amplification, the direct primer extended from nucleotides 501 to 522 and the reverse primer from nucleotides 843 to 867 (GenBank accession no. M98820). For TNF- α amplification, the direct primer extended from nucleotides 2 to 23 and the reverse primer from nucleotides 513 to 532 (GenBank accession no. X66539). Amplification products were quantitated after electrophoresis and analysis of ethidium bromide-stained gels, using the L27 from the same cDNA pools as an internal control.

Western blot analysis. Immunoblotting analysis of PPAR- γ and PPAR- α was performed on synoviocytes treated or not with LPS for 12 h. Briefly, harvested cells were washed two times with ice-cold PBS and centrifuged at 170g for 10 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in 200 μ l of ice-cold buffer (in mM: 25 HEPES, 400 KCl, 1 EDTA, and 1.5 MgCl₂) supplemented with a protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals), mixed vigorously, and incubated for 30 min on ice. The cell extract was centrifuged at 10,000 g for 10 min, and protein concentration was determined in the supernatant. Fifty micrograms of protein from each sample were mixed with gel loading buffer (50 mM Tris, 10% glycerol, 10% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, and 2 mg bromophenol blue) in a volume ratio of 1:1, boiled for 3 min, and electrophoresed on

a discontinuous SDS-polyacrylamide gel (4% stacking gel and 10% separative gel). The proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore), which was saturated by incubation for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline-Tween buffer containing 3% bovine serum albumin. The membranes were then incubated with anti-rabbit PPAR- α (1:1,000) or anti-rabbit PPAR- γ (1:2,500) antibodies (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. They were further washed three times with Tris-buffered saline-Tween and then incubated with anti-rabbit or anti-goat immunoglobulins (IgGs) coupled to peroxidase (1:20,000; Interchim). The immunocomplexes were visualized by the enhanced chemiluminescence method (Interchim).

Immunocytochemical analysis. Cell layers were fixed in 3% formaldehyde in PBS for 10 min and permeabilized in methanol for 20 min at 4°C. They were then exposed to the primary antibody (diluted 1:500 for anti-PPAR- α and 1:2,000 for anti-PPAR- γ antibodies in PBS) for 30 min at 37°C. After two washes in PBS, cells were incubated with fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG (diluted 1:100 in PBS) for 30 min at 37°C. Negative controls were performed by replacing the primary antibody with preimmune serum. Cells were then mounted in Vectashield medium and photographed with a Polyvar microscope (Reichert-Jung, Vienna, Austria).

Nitrite and IL-1 β assays. NO production was determined spectrophotometrically by measuring the accumulation of nitrite (NO $_2^-$) in culture supernatants by the Griess reaction (8). Briefly, 100 μ l of culture supernatant were mixed with 100 μ l of Griess reagent for 5 min at room temperature. The optical density was measured at 550 nm with a microplate reader, and nitrite concentrations were calculated with a standard curve of sodium nitrite ranging from 0 to 50 μ M. IL-1 β was measured in the supernatants by an enzyme-linked immunosorbent assay method according to the manufacturer's instructions (Biosource International). Results were expressed in picograms per milliliter.

Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay. For electrophoretic mobility shift experiments, rat synovial cells were stimulated or not with LPS for 1 h after a preincubation of 12 h with the ligand or Me $_2$ SO (0.1%). Cell monolayers were scrapped in a lysis buffer [in mM: 10 HEPES, pH 7.9, 10 KCl, and 1 mM dithiothreitol (DTT)] containing a protease inhibitor cocktail and 0.5% Igepal. After a 15-min incubation on ice, nuclei were collected by centrifugation at 1,500 g for 5 min at 4°C. The nuclear pellets were resuspended in 50 μ l of the same buffer without Igepal and KCl but with 420 mM NaCl. After a 30-min incubation on ice, nuclear debris were removed by centrifugation at 13,000 g for 10 min at 4°C and the supernatants were collected and stored at -80°C before use.

The DNA sequences of the double-stranded oligonucleotide specific to NF- κ B were 5'-GAT CCA GTT GAG GGG ACT TTC CCA GGC-3' and 5'-GAT CCG CCT GGG AAA GTC CCC TCA ACT G-3'. Those specific to AP-1 were 5'-GAT CCG CTT GAT GAC TCA GCC GGA AG-3' and 5'-GAT CCT TCC GGC TGA GTC ATC AAG CG-3'. Complementary strands were annealed, and double-stranded oligonucleotides were labeled with [32 P]dCTP using the Klenow fragment of DNA polymerase (GIBCO BRL). Five micrograms of nuclear proteins were incubated for 10 min at 4°C in a binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM MgCl $_2$, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, and 20% glycerol) in the presence of 2 μ g of poly(dI-dC). The extracts were then incubated for 30 min at 4°C with 10,000 cpm of 32 P-labeled NF- κ B or AP-1 probes. The samples were loaded on a 5% native polyacrylamide gel and run in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer. NF- κ B- and AP-1-specific

bands were confirmed by competition with a 100-fold excess of the respective unlabeled probe, which resulted in no shifted bands. For supershift experiments, after the addition of the labeled probe, the extracts were incubated for 30 min at 4°C in the presence of the specific antibody (anti-p65 or anti-p50 for NF- κ B; anti-c-fos or anti-c-jun for AP-1).

Statistical analysis. After comparison of data by analysis of variance, different groups were compared with Fisher's *t*-test. Assays were made in triplicate (except where otherwise indicated), and *P* values (vs. control or LPS treatment) <0.05 were considered significant.

RESULTS

Constitutive expression of PPAR- α and PPAR- γ in rat B synovial cells: modulation of expression by LPS at mRNA and protein levels. By the use of RT-PCR analysis, we first demonstrated the constitutive expression of PPAR- α and PPAR- γ mRNA in normal synovial B cell cultures (Fig. 1). An immunocytochemical analysis further allowed us to visualize the expression of these receptors at the protein level as well as their intracellular distribution (Fig. 2). Fluorescence signals specific for PPAR- α and PPAR- γ were mainly localized to the nucleus with a lower presence in the cytoplasm (Fig. 2, A and C). We thereafter studied the modulation of the nuclear receptors' expression by LPS (10 μ g/ml for 12 h) at both the mRNA and protein levels. The use of a multistandard quantitative RT-PCR analysis showed that PPAR- γ mRNA expression was strongly decreased by LPS treatment, whereas PPAR- α mRNA expression remained unmodified (Fig. 1). The results of the Western blot analysis further showed that changes in mRNA levels encoding PPAR- α and PPAR- γ on treatment with LPS could be related to the variations of the corresponding proteins (Fig. 3).

Ability of PPAR- γ ligands 15d-PGJ $_2$ and troglitazone to modulate LPS-induced iNOS and COX-2 mRNA expression. To test the capability of specific agonists to modulate LPS-induced iNOS and COX-2 mRNA expression, synoviocytes were preincubated for 12 h in the presence of PPAR- γ ligands or vehicle (0.1% Me $_2$ SO) alone before being stimulated with LPS (10 μ g/ml) for 12 h. The ligands used were 15d-PGJ $_2$ (1 and 10 μ M) and troglitazone (1 and 10 μ M). It should be noted that both agonists were tested at 100 μ M, and at this concentration they were found to be highly toxic to the cells, as shown by a strong increase in extracellular lactate dehydrogenase activity (data not shown). LPS treatment for 12 h induced strong COX-2 (Fig. 4A) and iNOS (Fig. 4B) mRNA expression in synovial cells. We observed that 15d-PGJ $_2$ dose-dependently decreased both COX-2 and iNOS mRNA expression (-80% at 10 μ M). Conversely, at the two doses used, troglitazone was less effective than 15d-PGJ $_2$ in modulating iNOS mRNA expression (-50% at 10 μ M), whereas it was ineffective in modulating the induction of COX-2 expression. Nitrite assay in culture supernatants showed that 15d-PGJ $_2$ and troglitazone, at both concentrations tested, significantly decreased NO production (Table 1).

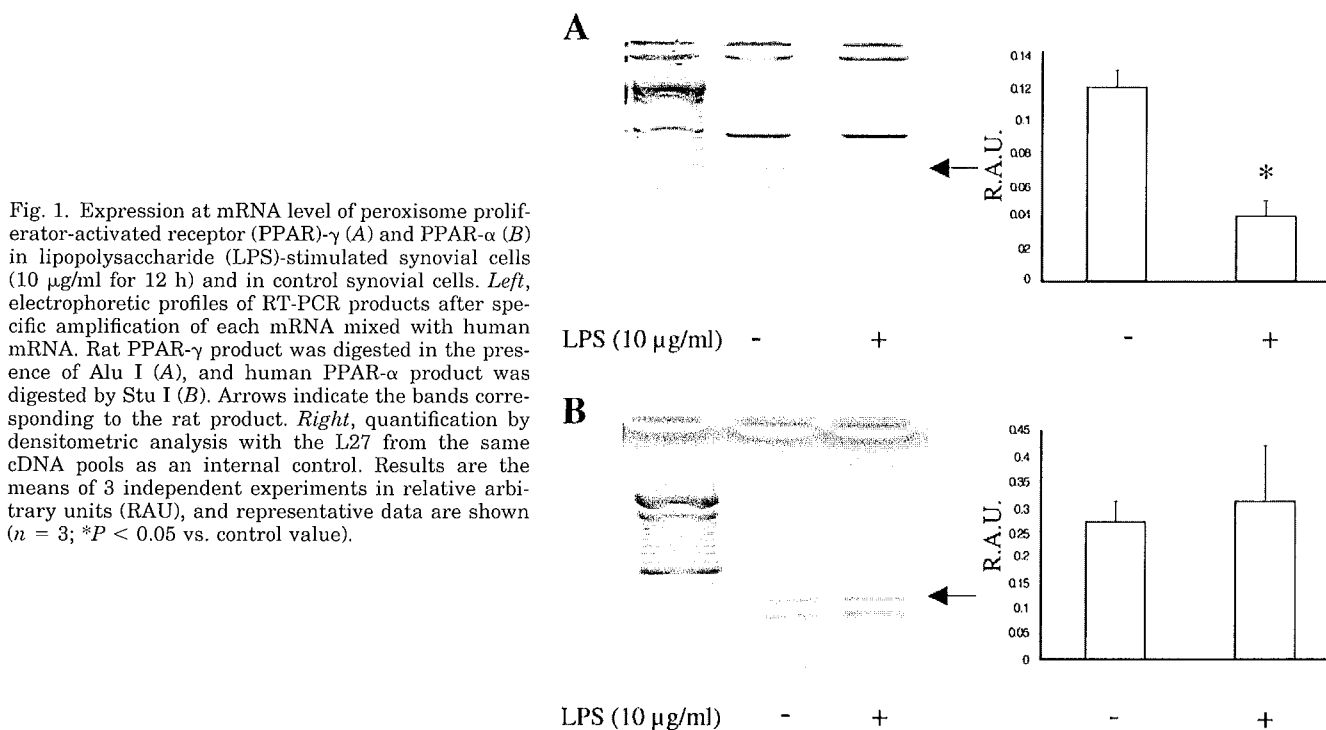


Fig. 1. Expression at mRNA level of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ (A) and PPAR- α (B) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated synovial cells (10 μ g/ml for 12 h) and in control synovial cells. *Left*, electrophoretic profiles of RT-PCR products after specific amplification of each mRNA mixed with human mRNA. Rat PPAR- γ product was digested in the presence of Alu I (A), and human PPAR- α product was digested by Stu I (B). Arrows indicate the bands corresponding to the rat product. *Right*, quantification by densitometric analysis with the L27 from the same cDNA pools as an internal control. Results are the means of 3 independent experiments in relative arbitrary units (RAU), and representative data are shown ($n = 3$; * $P < 0.05$ vs. control value).

Ability of PPAR- γ ligands 15d-PGJ₂ and troglitazone to modulate LPS-induced IL-1 β and TNF- α expression. As described above, synovial B cells were preincubated in the presence of PPAR- γ ligands for 12 h before being stimulated with LPS (10 μ g/ml for 12 h). As expected, LPS induced strong IL-1 β (Fig. 5A) and TNF- α (Fig. 5B) mRNA expression in synovial cells compared with controls. Preincubation in the presence of the highest dose of 15d-PGJ₂ led to the modulation of both IL-1 β (-25%) and TNF- α (-40%) mRNA expression. Interestingly, troglitazone at 10 μ M had an important action in modulating the expression of TNF- α mRNA

(-50%) but had no significant effect on the IL-1 β mRNA expression induced by LPS. The IL-1 β protein assay showed that only 15d-PGJ₂ at 10 μ M was able to reduce IL-1 β production (-50%; Table 1). Troglitazone had no effect, and this confirmed the results at the mRNA level.

Effect of PPAR- γ ligands 15d-PGJ₂ and troglitazone on NF- κ B and AP-1 activation pathways in LPS-stimulated synovial B cells. The transcription factors NF- κ B and AP-1 are well known to control, at least in part, the induction of several genes involved in the inflammatory process, such as IL-1 β , TNF- α , COX-2, and iNOS. In several cell lines, it was recently demonstrated (23, 25) that the activation of PPAR- α or PPAR- γ could lead to the inhibition of NF- κ B and AP-1 activities. To observe the potential antagonizing effect of PPAR- γ ligands on NF- κ B and AP-1 activation pathways in synovial fibroblast cultures, we preincubated cells for 12 h in the presence of 10 μ M 15d-PGJ₂ or 10 μ M troglitazone before stimulation with LPS (10 μ g/ml) for 1 h. A gel-shift analysis was then performed on nuclear extracts to evaluate the binding of NF- κ B and AP-1 to specific radiolabeled probes. We observed that 15d-PGJ₂ induced a strong inhibition of the DNA-binding activity of NF- κ B (-48%; Fig. 6B) and AP-1 (-55%; Fig. 6A). In contrast, troglitazone had no significant effect on NF- κ B DNA-binding activity and, surprisingly, was shown to strongly increase the DNA-binding activity of AP-1 (+160%). Incubation of nuclear proteins with 100-fold concentrated respective unlabeled probe was performed to indicate the specificity of binding of NF- κ B or AP-1 to the DNA. Moreover, preincubation in the presence of specific antibody

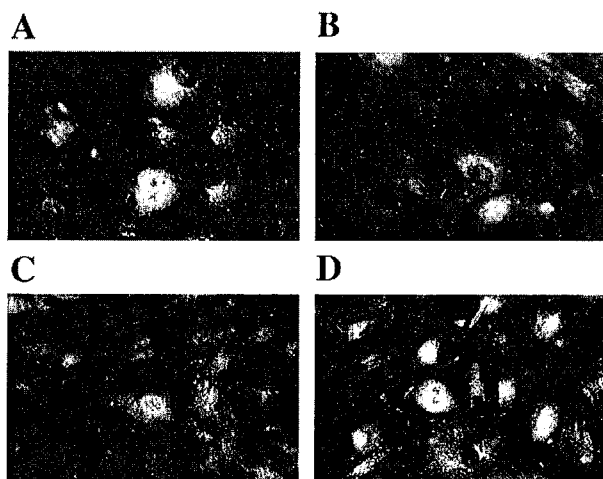


Fig. 2. Immunocytochemical analysis of PPAR- γ (A and B) and PPAR- α (C and D) expression in LPS-stimulated rat synovial cells (10 μ g/ml for 12 h; B and D) and in control cells (A and C).

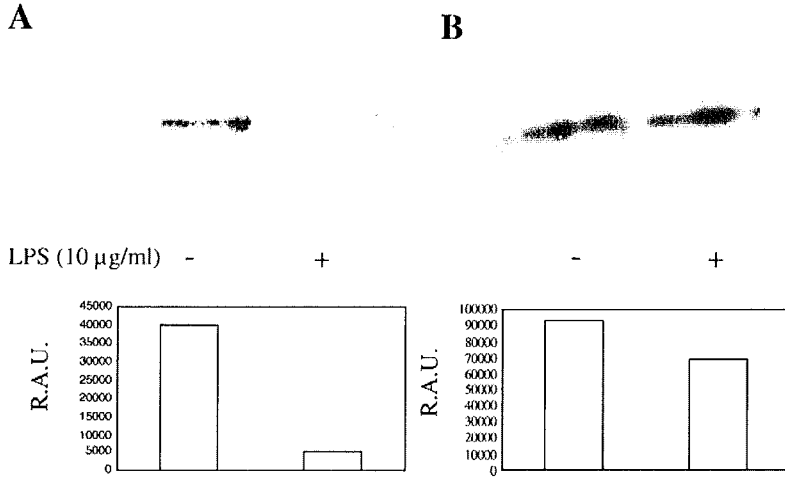


Fig. 3. Expression at the protein level of PPAR- γ (A) and PPAR- α (B) in LPS-stimulated synovial cells (10 $\mu\text{g/ml}$ for 12 h) and in control synovial cells. *Top*, Western blot analysis of nuclear receptor protein expression. Immunodetection was performed with polyclonal anti-PPAR- γ or anti-PPAR- α antibodies and visualized with chemiluminescence. *Bottom*, densitometric analysis of each band. Results are representative of 3 independent experiments.

ies allowed identification of the components of the protein complex as being p65-p50 heterodimer for NF- κ B and c-jun-c-fos for AP-1.

DISCUSSION

Several cell types are present in joints, and each of them can exert an action on the other, especially during the time course of RA. Thus the synovium appears to be the principal tissue involved in the pathogenesis of the disease by producing metalloproteinases, proinflammatory cytokines, and NO in quantities sufficient

to cause cartilage damage (32). Indeed, in in vitro models, human synovial fibroblasts, when cocultured with human macrophages, induced cartilage degradation that was mediated in part by IL-1 β and TNF- α (22). In a previous work (3), we studied the potential role of PPAR- γ ligands in IL-1 β -stimulated rat chondrocytes and showed that mainly 15d-PGJ₂, but also troglitazone, could counteract the deleterious effects of this cytokine. In the present work, we focused on the pharmacological effects of PPAR- γ ligands on cells importantly involved in the development of RA, synovial fibroblasts.

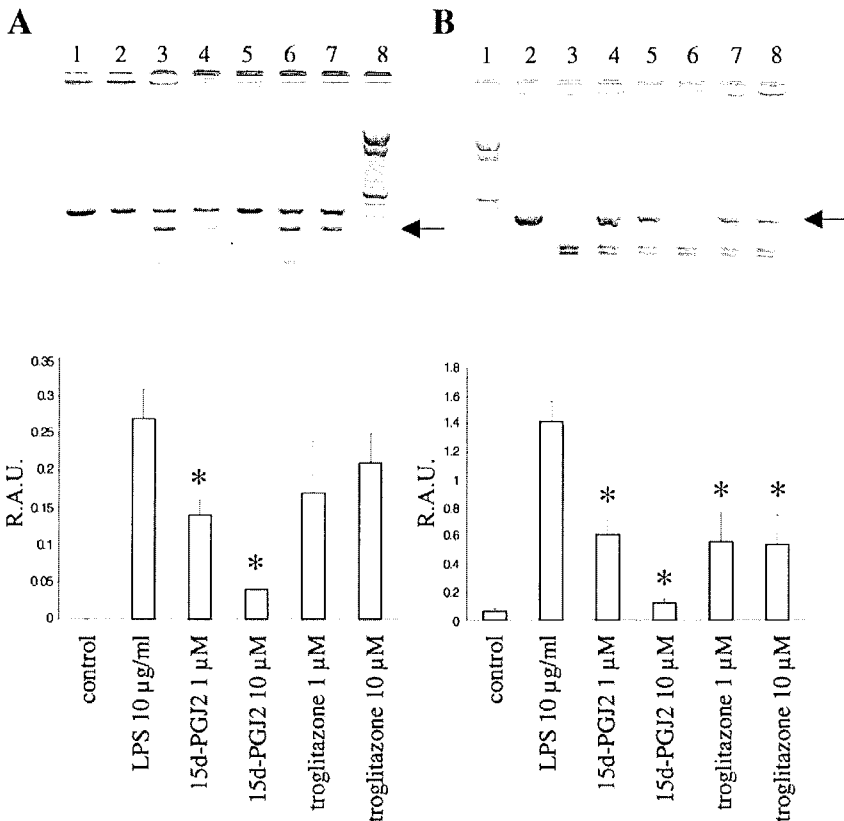


Fig. 4. Effect of PPAR- γ ligands [15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), 1 and 10 μM ; troglitazone, 1 and 10 μM] on LPS-induced cyclooxygenase (COX)-2 (A) and inducible nitric oxide synthase (iNOS; B) mRNA expression. *Top*, electrophoretic profiles of RT-PCR products for COX-2 (A) and iNOS (B) after specific amplification of mRNA with a quantitative multistandard RT-PCR method. A: rat but not human COX-2 product was digested by Ava I. Undigested product was loaded on lane 1; lane 2, control; lane 3, LPS induction; lane 4, LPS + 15d-PGJ₂ 1 μM ; lane 5, LPS + 15d-PGJ₂ 10 μM ; lane 6, LPS + troglitazone 1 μM ; lane 7, LPS + troglitazone 10 μM ; lane 8, molecular weight markers. B: human but not rat iNOS product was digested by Stu I. Lane 1, molecular weight markers. Undigested product was loaded on lane 2; lane 3, control; lane 4, LPS induction; lane 5, LPS + 15d-PGJ₂ 1 μM ; lane 6, LPS + 15d-PGJ₂ 10 μM ; lane 7, LPS + troglitazone 1 μM ; lane 8, LPS + troglitazone 10 μM . Arrows indicate the bands corresponding to the rat product. *Bottom*, quantification by densitometric analysis with L27 from the same cDNA pools as an internal control. Results are means of 3 independent experiments, and representative data are shown ($n = 3$; * $P < 0.05$ vs. LPS treatment).

Table 1. Effect of PPAR- γ ligands on LPS-induced IL-1 β and nitrite production

	Nitrites, nmol/10 ⁶ cells	IL-1 β , pg/ml
Control	192 \pm 25	251 \pm 35
LPS (10 μ g/ml)	955 \pm 182	5,626 \pm 895
15d-PGJ ₂ (1 μ M)	607 \pm 73*	5,325 \pm 529
15d-PGJ ₂ (10 μ M)	312 \pm 84*	2,521 \pm 386*
Troglitazone (1 μ M)	552 \pm 71*	4,807 \pm 715
Troglitazone (10 μ M)	591 \pm 65*	4,992 \pm 819

Values are means \pm SE. PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; 15d-PGJ₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. * P < 0.05 vs. LPS treatment.

By RT-PCR, Western blot, and immunocytochemical analysis, we demonstrated that PPAR- γ and PPAR- α are expressed in rat synovial B cell cultures at both mRNA and protein levels. We then showed that the expression of these nuclear receptors was modulated differently by LPS stimulation. Indeed, only PPAR- γ expression, at both mRNA and protein levels, was decreased by the treatment. Thus PPAR- α seems not to be involved in the cellular responses to LPS in synovial cells. Several papers have reported that PPAR- γ expression is affected by a number of immune mediators. Among these, IL-4 (9), granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor (17), glucocorticoids, and 9-*cis*-retinoic acid have

been reported to upregulate PPAR- γ expression. On the other hand, TNF- α , IL-1, IL-6, leukemia inhibitory factor (28), and leptin have been reported to downregulate PPAR- γ expression. It seems difficult to attribute clinical relevance to these up- and downregulations of PPAR- γ expression. However, the fact that only PPAR- γ , and not PPAR- α , is regulated by LPS may suggest that PPAR- γ is involved in the LPS pathway. The same modulation of PPAR- γ expression was demonstrated previously in rat chondrocytes stimulated with IL-1 β (3).

Thus we further evaluated the ability of PPAR- γ ligands (15d-PGJ₂ and troglitazone) to modulate the effects of LPS stimulation and, especially, their ability to counteract the production of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) after LPS treatment. Our results showed different abilities of 15d-PGJ₂ and troglitazone to counteract the effects of LPS. Indeed, 15d-PGJ₂ dose-dependently decreased LPS-induced COX-2 (-80%) and iNOS (-80%) mRNA expression, whereas troglitazone (10 μ M) only inhibited iNOS mRNA expression (-50%) and had no effect on COX-2 mRNA expression. These effects were also observed at the level of NO production. Concerning the induction of proinflammatory cytokines, we observed that 15d-PGJ₂ modulated LPS-induced IL-1 β (-25%) and TNF- α (-40%) mRNA expression. However, it is interesting that troglitazone only decreased LPS-induced

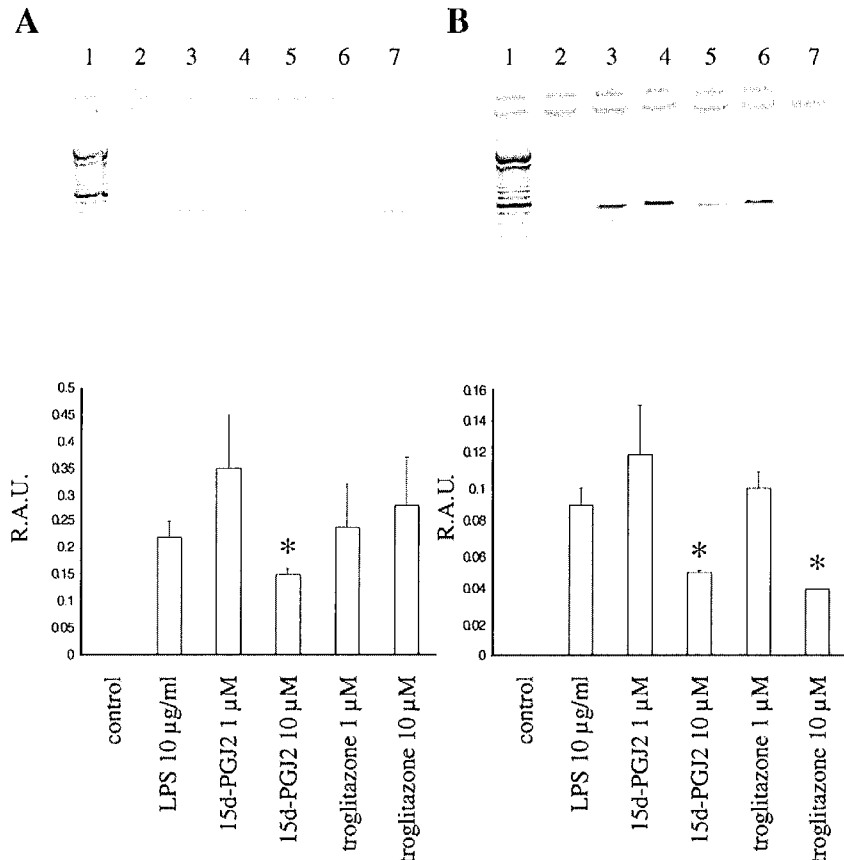


Fig. 5. Effect of PPAR- γ ligands (15d-PGJ₂, 1 and 10 μ M; troglitazone, 1 and 10 μ M) on LPS-induced interleukin (IL)-1 β (A) and tumor necrosis factor (TNF)- α (B) mRNA expression. Top, electrophoretic profiles of RT-PCR products for IL-1 β (A) and TNF- α (B) after specific amplification of mRNA using a semiquantitative RT-PCR method: lane 2, control; lane 3, LPS induction; lane 4, LPS + 15d-PGJ₂ 1 μ M; lane 5, LPS + 15d-PGJ₂ 10 μ M; lane 6, LPS + troglitazone 1 μ M; lane 7, LPS + troglitazone 10 μ M; lane 1, molecular weight markers. Bottom, quantification by densitometric analysis using the L27 from the same cDNA pools as an internal control. Results are means of 3 independent experiments, and representative data are shown (n = 3; * P < 0.05 vs. LPS treatment).

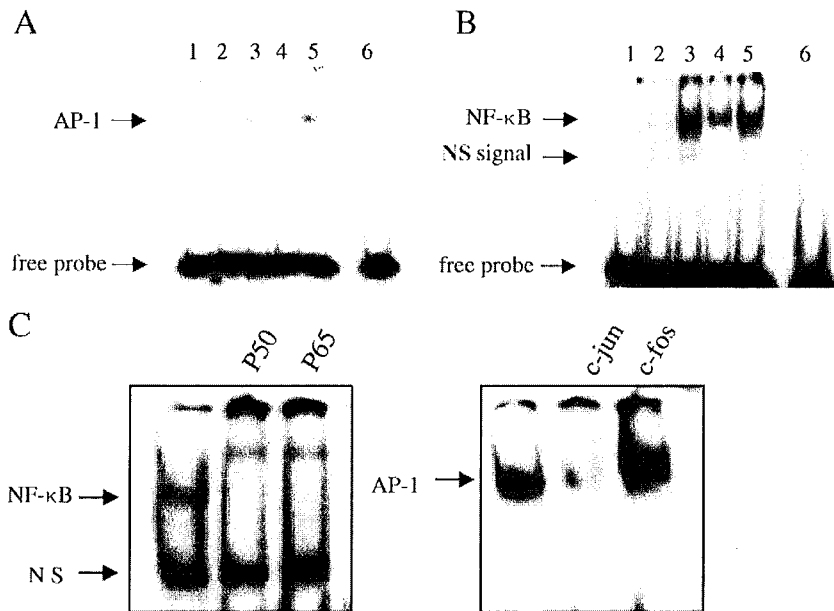


Fig. 6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Synovial cells were cultured in 1% FCS-containing medium with 15d-PGJ₂ (10 μ M), troglitazone (10 μ M), or vehicle (DMSO 0.1%) for 12 h and subsequently treated with LPS (10 μ g/ml) for 1 h. Nuclear proteins were extracted, and 5 μ g of each sample were subjected to EMSA using AP-1 (A) or nuclear factor (NF)- κ B (B) consensus site radiolabeled probes. Complexes were visualized by autoradiography. Lane 1, probe alone; lane 2, control; lane 3, LPS 10 μ g/ml; lane 4, LPS + 15d-PGJ₂ 10 μ M; lane 5, LPS + troglitazone 10 μ M; lane 6, LPS + 100-fold concentrated unlabeled probe. NS, nonspecific. Results are means of 3 independent experiments, and representative results are shown. C: EMSA "supershift" assays identifying the subunits components for NF- κ B and AP-1 dimers.

TNF- α mRNA expression (\sim 50%) but had no significant effect on the induction of IL-1 β mRNA.

In the recent literature, it has been demonstrated that PPAR- γ (or PPAR- α) is very specifically involved in the control of cell activation, depending on both the cell type and the nature of the stimulating agent. Indeed, 15d-PGJ₂ suppressed the LPS-induced expression of COX-2 in the macrophage-like differentiated U937 cells but not in vascular endothelial cells (10). In another work performed with smooth muscle cells, PPAR- α ligands, but not PPAR- γ ligands, were efficient inhibitors of IL-1 β -induced production of IL-6 and prostaglandins and expression of COX-2 (23). Interestingly, in neonatal rat cardiac myocytes stimulated with LPS, both PPAR- γ and PPAR- α ligands inhibited the LPS-induced expression of TNF- α mRNA (27).

Concerning the nature of the stimulating agent, it was shown in monocytes that cytokine synthesis induced by LPS was largely refractory to the effects of 15d-PGJ₂ and troglitazone, whereas phorbol ester and okadaic acid-induced cytokine synthesis is susceptible to their action (11). Thus the cell type and the nature of the stimulating agent are important factors necessary to take into account in evaluating the effects of PPAR- γ ligands in the control of cell activation. Moreover, controversy also exists concerning the identification of intracellular targets involved in the mechanism of action of 15d-PGJ₂. In several recent papers, some data suggested a main contribution of PPAR- γ -independent mechanisms on the action of this prostaglandin, mostly because of the lack of effect of synthetic PPAR- γ ligands such as thiazolidinediones. For instance, in macrophage cultures and in a mouse model of endotoxemia, 15d-PGJ₂ inhibited the LPS-induced production of TNF- α and IL-6, whereas other high-affinity PPAR- γ ligands failed to affect cytokine production (29). The same observations have been made in LPS-stimulated

microglia (16). In these different studies, and in others, new intracellular targets have been identified, especially in the NF- κ B signaling pathway (4, 19, 24, 31). Several lines of evidence suggest that the involvement of PPAR- γ in the effects of 15d-PGJ₂ would depend on the expression level of the nuclear receptor in the cell type under consideration. To our knowledge, there are no data in the literature describing the level of constitutive expression of PPAR- γ protein and the effects of activators in rat synovial fibroblasts. The results of the present work demonstrate that 15d-PGJ₂ is more efficient than troglitazone in modulating the effects of LPS on B synovial cells. In particular, it appeared that the prostaglandin exerted a broader action compared with the drug. Indeed, troglitazone, at 10 μ M, was found to have an important and specific action on both iNOS and TNF- α . Thiazolidinediones are synthetic compounds that are very specific agonists for PPAR- γ [dissociation constant (K_d) = 30–700 nM], whereas 15d-PGJ₂ has a much lower affinity for the receptor (K_d = 2 μ M). Several works showed that the anti-inflammatory effects of 15d-PGJ₂ occur in a concentration range (1–10 μ M) that is consistent with its K_d for PPAR- γ , whereas troglitazone or BRL-49653 often required much higher concentrations (50 μ M) to accomplish the same effects. In the present study, we tested troglitazone at 50 and 100 μ M, but these concentrations were shown to be highly cytotoxic to B cells, in contrast to other studies often performed on much more resistant cell lines. Thus this would strongly suggest that the mechanism of action of 15d-PGJ₂ in synovial B cells is, at least in large part, PPAR- γ independent. Moreover, the effects observed with 10 μ M troglitazone would also indicate that iNOS and TNF- α gene expression is much more sensitive to regulation by PPAR- γ than IL-1 β and COX-2. This could be explained by a particular organization of the promoter of these two genes.

Some of the anti-inflammatory effects obtained through the activation of PPAR- γ have been shown to occur by antagonizing the activities of the transcription factors AP-1 and NF- κ B. These inhibitory effects may be obtained through direct protein-protein or protein-DNA interactions, but they also may be achieved by sequestration of essential transcription coactivators such as cAMP binding protein-p300 or steroid receptor coactivator-1. Thus, in the present work, by a gel-shift analysis, we investigated possible inhibiting interactions between PPAR- γ and NF- κ B or AP-1 transcriptional pathways. We observed that 15d-PGJ₂, but not troglitazone, was very potent to reduce DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1. Surprisingly, troglitazone was even shown to increase AP-1 binding activity. These observations demonstrate that troglitazone modulates LPS-induced iNOS and TNF- α mRNA expression without inhibiting the DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1. Thus its inhibiting action seems not to be the result of a physical interaction between proteins or between protein and DNA but rather the consequence of the titration of AP-1 and NF- κ B coactivators by the PPAR system. However, at this point, it is not possible to confirm this hypothesis. To further evaluate the capability of troglitazone or 15d-PGJ₂ to inhibit specifically the LPS-induced gene expression, it would be necessary to perform transient transfection experiments using adequate reporter vectors. This would allow the demonstration of the inhibiting action of a PPAR- γ ligand on the promoter activity of a specific gene.

In summary, our study demonstrated that PPAR- γ is constitutively expressed in rat synovial fibroblasts at both mRNA and protein levels. We found that, by the use of PPAR- γ activators, it is possible to modulate the effects of LPS on cultured B cells. However, our results also showed that 15d-PGJ₂ and troglitazone modulated the expression of proinflammatory genes differently, probably through PPAR- γ -independent and -dependent pathways, respectively. Thus the use of PPAR- γ agonists may offer new insights in regard to their anti-inflammatory potential by the inhibition of TNF- α , and the specific use of 15d-PGJ₂ would be an interesting tool to counteract the deleterious effects of IL-1 β that are responsible for the degradation of cartilage.

This work was supported in part by European Contract No. QLK6-CT-1999-02072 and the Association de la Recherche contre la Polyarthrite.

REFERENCES

- Arend WP and Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 151-160, 1995.
- Arend WP and Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 33: 305-315, 1999.
- Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauça M, Netter P, and Terlain B. Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and γ and retinoid Z receptor in cartilage. *J Biol Chem* 275: 12243-12250, 2000.
- Castrillo A, Diaz-Guerra MJM, Hortelano S, Martin-Sanz P, and Bosca L. Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 20: 1692-1698, 2000.
- Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D, and Willoughby DA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol* 161: 978-984, 1998.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vasquez M, Gonzales FJ, and Wahli W. The PPAR alpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384: 39-43, 1996.
- Fontana A, Hengartner H, Weber E, Fehr K, Grob PJ, and Cohen G. Interleukin 1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2: 49-53, 1982.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138, 1982.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, and Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400: 378-382, 1999.
- Inoue H, Tanabe T, and Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR γ . *J Biol Chem* 275: 28028-28032, 2000.
- Jiang C, Ting AT, and Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 79-82, 1998.
- Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, and Sano H. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 106: 189-197, 2000.
- Khiri H, Reynier P, Peyrol N, Lericque B, Torresani J, and Planells R. Quantitative multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism. *Mol Cell Probes* 10: 201-211, 1996.
- Kliwer SA, Ulesono K, Noonan DJ, Heyman RA, and Evans RM. Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358: 771-774, 1992.
- Peraldi P, Xu M, and Spiegelman BM. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* 100: 1863-1869, 1997.
- Petrova TV, Akama KT, and Van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down regulation of inducible nitric oxide synthase by 15d-PGJ₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4668-4673, 1999.
- Ricote M, Huang J, Fajias L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, and Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7614-7619, 1998.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, and Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82, 1998.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, and Santoro G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 403: 103-108, 2000.
- Schoonjans K, Martin G, Dtaels B, and Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 8: 159-166, 1997.
- Schoonjans K, Staels B, and Auwerx J. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302: 93-109, 1996.
- Scott BB, Waisbrot LM, Greenwood JD, Bogoch ER, Paige CH, and Keystone EC. Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 40: 490-498, 1997.
- Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebreton M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, and Tedgui A. Activation of human aortic smooth-

- muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 393: 790–793, 1998.
24. **Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Gosh G, and Glass CK.** 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4844–4849, 2000.
 25. **Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, and Wu GD.** A novel therapy for colitis utilizing PPAR γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 104: 383–389, 1999.
 26. **Sugiyama H, Nonaka T, Kishimoto T, Komoriya K, Tsuji K, and Nakahata T.** Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in mouse bone marrow-derived mast cells. *FEBS Lett* 467: 259–262, 2000.
 27. **Takano H, Nagai T, Asakawa M, Toyozaki T, Oka T, Komuro I, Saito T, and Masuda Y.** Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res* 87: 596–602, 2000.
 28. **Tanaka T, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, and Nakao K.** Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* 42: 702–710, 1999.
 29. **Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, and Berger J.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ does not inhibit IL-6 or TNF- α responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol* 164: 1046–1054, 2000.
 30. **Ulfgren AK, Andersson U, Engström M, Klareskog L, Maini RN, and Taylor PC.** Systemic anti-tumor necrosis factor α therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor α synthesis. *Arthritis Rheum* 43: 2391–2396, 2000.
 31. **Wang C, Fu M, d'Amico M, Albanese C, Zhou JN, Brownlee M, Lisanti MP, Chatterjee VKK, Lazar MA, and Pestell RG.** Inhibition of cellular proliferation through I κ B kinase-independent and peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent repression of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 21: 3057–3070, 2001.
 32. **Zvaifler NJ and Firestein GS.** Pannus and pannocytes: alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 6: 783–789, 1994.



Anti inflammatory effect of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 is Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma independent in interleukin-1 β -treated rat chondrocytes. Identification of intracellular targets.

Sandrine BOYAULT*, Arnaud BIANCHI*, David MOULIN*, Sylvie MORIN*, Mathias FRANCOIS[#], Patrick NETTER*, Bernard TERLAIN* and Karim BORDJI*.

* Laboratoire de Pharmacologie, UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy, France.

[#] INSERM U530 Université de Paris 5, Centre Universitaire-UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75270 PARIS Cedex 06.

Corresponding author. E-mail: netter@medecine.uhp-nancy.fr

Key words : Nuclear Factor- κ B, cartilage, cyclopentenone, glitazone.

Short title: New 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 action on nuclear factor- κ B in chondrocytes

Synopsis

Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR γ) ligands are involved in adipocyte differentiation and glucose homeostasis but have also a role in inflammation control by inhibiting the production and effects of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β). This cytokine plays a key role in articular joint degradation in osteoarthritis or in rheumatoid arthritis. We previously demonstrated that PPAR γ ligands have a benefic effect on IL-1 β induced inflammatory mediators and that 15d-PGJ₂ was more potent to counteract IL-1 β effect than troglitazone, which is much more selective towards PPAR γ . Other works suggested a main contribution of PPAR γ independent mechanisms on the anti-inflammatory effect of 15d-PGJ₂.

The aim of the present work was to compare the action of three PPAR γ ligands in IL-1 β treated rat chondrocyte cultures. Firstly, we focused our study on the real involvement of PPAR γ in the anti-inflammatory ligand action. This was performed by inducing an overexpression of functional or mutated PPAR γ protein in chondrocytes. Secondly, we aimed to determine intracellular targets of 15d-PGJ₂ in NF- κ B signalling pathway.

In chondrocytes overexpressing functional PPAR γ protein, we observed that 15d-PGJ₂ pre-treatment inhibited iNOS and COX-2 mRNA expression, nitrite and PGE₂ production, as well as p65 translocation and NF- κ B activation. Troglitazone pre-treatment only decreased nitrite and PGE₂ production whereas rosiglitazone had no effect. 15d-PGJ₂ exhibited the same effect in chondrocytes transfected with a dominant-negative PPAR γ vector. Western-blot analysis showed that 15d-PGJ₂ pre-treatment partially inhibited I κ B α degradation but not its phosphorylation. This was the result of a specific inhibition of IKK β enzymatic activity by 15d-PGJ₂ whereas IKK α activity remained unaffected. Such effect was not observed with synthetic PPAR γ ligands. These results suggest that 15d-PGJ₂ exerts its anti-inflammatory effect in rat chondrocytes by a PPAR γ -independent mechanism. This mechanism can be conferred to a partial inhibition of I κ B α degradation responsible for a decrease in p65 translocation in the nucleus and for the inhibition of NF- κ B pathway.

Abbreviations used: ACO, acylCoA oxydase; AP-1, activating protein-1; A.U., arbitray units; COX-2, cyclooxygenase-2; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethylsulfoxide; EDTA, ethylene diaminetetraacetic; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; EGTA, ethylene glycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetraacetic acid; EMSA, electrophoretic mobility-shift assay, FCS, fetal calf serum; HRP, horseradish peroxidase; IL-1 β , Interleukin-1 beta; I κ B α , inhibitor κ B α ; IKK, I κ B kinase; iNOS, inducible NO synthase; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NO, nitric oxide; PBS, phosphate-buffered saline; PEI, polyethylenimine; PPAR γ , peroxisome-proliferator activated receptor gamma; PGE₂, prostaglandin E₂; PMSF, phenylmethyl sulphonyl fluoride ; PVDF, polyvinylidene fluoride; Rosi, rosiglitazone; TBST, TMB, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine; Tro, troglitazone; 15d-PGJ₂, 15-deoxy- Δ ^{12,14}-prostaglandin J₂.

Introduction

Articular joint degradation, which results from an imbalance between anabolic and catabolic processes, is a common feature of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), have been shown to inhibit the synthesis of cartilage matrix proteins and to promote their degradation by activating metalloproteases [1, 2]. In addition, IL-1 β induces the production of inflammatory mediators, such as nitric oxide, prostaglandins and other reactive oxygen species [3]. Therefore, the modulation of IL-1 β effects and/or its production is known to be an important key to counteract the cartilage degradation.

Peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ is a ligand-activated nuclear transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily. PPAR γ heterodimerizes with retinoid X receptor (RXR) and binds to peroxisome proliferator response element (PPRE) located in the promoter of PPAR γ target genes. Agonists of PPAR γ include synthetic compounds, such as thiazolidinediones, and natural compounds such as fatty acids and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂). PPAR γ ligands are best characterized as regulators of adipocyte differentiation, fatty acids storage and glucose homeostasis [4-6]. Moreover, it has been suggested that PPAR γ ligands have a role in the inflammation control. PPAR γ ligands, such as 15d-PGJ₂ or thiazolidinediones, have been shown to inhibit the transcriptional induction of genes such as TNF- α , inducible NO synthase and gelatinase B by inflammation agents in murine macrophages [7, 8]. Interestingly, other studies showed that these ligands could inhibit the production of TNF α , IL-1 and IL-6 by activated human monocytes [9].

In addition, in IL-1 β stimulated chondrocyte cultures, we and others recently showed that 15d-PGJ₂ modulated nitric oxide production, the decrease in proteoglycan synthesis as well as expression of proinflammatory genes [10-12]. These PPAR γ ligands inhibit gene expression in part by antagonizing the activities of transcription factors such as NF- κ B and AP-1 [9, 13]. Other works suggested a main contribution of PPAR γ independent mechanisms on the anti-inflammatory effect of 15d-PGJ₂ by interacting with NF- κ B signalling pathway [14-16]. Upon exposure to stimuli, including cytokines, endotoxins and oxidative stress, the inhibitory protein I κ B α , which normally sequester NF- κ B dimer in the cytoplasm, is phosphorylated by I κ B kinase (IKK) before to be degraded by the 26S proteasome pathway.

The liberated NF- κ B then translocates to the nucleus, binds to specific sequences in promoters and induces gene expression, especially in the field of inflammation.

Two main mechanisms were described in several cell lines to explain the 15d-PGJ₂ inhibitory effects. Firstly, by interacting with a cysteine residue in the DNA-binding domain of the NF- κ B subunit p65. [17]. Secondly, 15d-PGJ₂ was shown to block IKK activity, possibly through covalent modifications of critical cysteine residues in IKK β [14,15]. However, in other cell types, controversy still exists about the identification of intracellular targets involved in the mechanism of action of 15d-PGJ₂.

The aim of the present work was to compare the action of three PPAR γ ligands (15d-PGJ₂, troglitazone and rosiglitazone) in IL-1 β treated rat chondrocytes overexpressing functional PPAR γ protein. The real involvement of the nuclear receptor in 15d-PGJ₂ action was thereafter evaluated in chondrocytes transfected with a dominant-negative PPAR γ vector. We therefore aimed to identify intracellular targets in the NF- κ B transcriptional pathway of rat chondrocytes.

Our results showed that 15d-PGJ₂ significantly inhibited IL-1 β effects in chondrocytes transfected either with a PPAR γ -expression vector or with a dominant-negative PPAR γ vector. This strongly suggests that 15d-PGJ₂ exerts its anti-inflammatory action in chondrocytes by a PPAR γ -independent mechanism. Finally, we found that this cyclopentenone decreased IKK β activity, which leads to the inhibition of I κ B α degradation.

Experimental

Isolation and culture of rat chondrocytes.

Chondrocytes were isolated from femoral head caps of Wistar male rats. Cells were obtained by sequential digestion with pronase and collagenase B (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) as described previously [18]. The cells were washed two times in phosphate-buffered saline (PBS) and cultured to confluence in 75-cm² flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The medium used was DMEM/Ham's F-12 supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and heat-inactivated fetal calf serum (10% FCS, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The chondrocyte cells were used indifferently from the first to the third passage.

Plasmids and transient transfection experiments

The pcDNA3.1 PPAR γ expression vector was generously provided by Johanne Martel-Pelletier (University of Montreal, Hopital Notre Dame, Montreal, Canada). The pSG5 dominant negative PPAR γ vector was a gift from Pr Marie Thérèse Corvol (Unité INSERM 530, Université de Paris 5, Paris, France).

Twenty four hours before transfection, chondrocytes were seeded in 6-well plates at 5 x 10⁵ cells /well and grown to 60-80% of confluency. Cells were transfected with 500 ng of a PPAR γ expression vector or with 500 ng of dominant negative PPAR γ vector. The transfection was performed using 10 µl of PEI (polyethylenimine) reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) in 1 ml of complete medium. Two hours later, the reagent-containing medium was replaced by complete medium. After a 36h incubation, cells were treated with IL-1 β in presence or absence of PPAR γ ligands.

Recombinant rat IL-1 β treatments in the presence of PPAR γ ligands

Twelve hours before the treatments, complete medium was replaced by DMEM/Ham's F12 containing 1% FCS. Chondrocyte cultures were incubated with a PPAR γ ligand or the vehicle (0.1% DMSO in final concentration) one hour before the addition of IL-1 β (10 ng/ml, Sigma, St Quentin Fallavier, France). Cells were treated with IL-1 β for 6h (PPAR γ , iNOS, COX-2, L27, RP29 mRNA analysis), for 30 min (NF- κ B activation study), for 5 min (I κ B and IKK phosphorylation studies) or for 24h (NO and PGE₂ production measurement) in the presence of the ligand. The PPAR γ ligands tested were troglitazone, rosiglitazone at 10 µM,

(Laboratoires Servier, Suresnes, France) and 15d-PGJ₂ (10 μM, Calbiochem, Meudon, France). This concentration was chosen for the three ligands according to preliminary experiments. At 0.1 or 1 μM, they had no significant effect. At 100 μM, they were shown to be toxic for chondrocytes.

RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from cell cultures by a single-step guanidinium thiocyanate-phenol chloroform method using Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Two micrograms of total RNA were reversed transcribed using hexa-nucleotides random primers. Semi quantitative PCR was performed with Taq DNA polymerase (Eurobio, Les Ulis, France) with primers for PPAR γ , acyl CoA oxidase (ACO) and L27 ribosomal protein as internal control. The sequences for the primers and product length are shown in Table I. Each amplification product was analysed on a 1 % agarose gel, stained by ethidium bromide (0.5 μg/ml) and photographed under UV light. Quantification of each band was performed by densitometry analysis software (gel Doc 2000; Biorad Laboratories, Ivry sur Seine, France) and the results were expressed as the ratio (interest gene / L27 gene).

Real-time PCR analysis

To quantify iNOS and COX-2 mRNA expression, real-time quantitative RT-PCR was performed using Lightcycler Technology (Roche Molecular Biochemicals). PCR was performed with SYBRgreen master mix system (Qiagen). Melting curve was performed to determine the melting temperature of the specific PCR products. After amplification, the size of products were checked on a 1% agarose gel and stained by ethidium bromide (0.5 μg/ml). Each run included positive and negative controls. To standardize iNOS and COX-2 mRNA concentrations, transcripts levels of the housekeeping gene RP29 were determined in parallel for each sample. Results were then expressed as the ratio of the iNOS or COX-2 mRNA concentration and RP29 mRNA concentration.

Quantification of nitrites and PGE₂ production

Thirty six hours after transfection, chondrocyte cultures were treated as described before. NO production was measured as the amount of nitrites (NO₂⁻) released into the culture medium according to the method of Griess [19].

The concentrations of PGE₂ in culture medium were determined by EIA kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, USA) according to the manufacturer's instructions.

Nuclear proteins extraction and NF- κ B transactivation analysis

Nuclear protein extracts were prepared with the TransAM nuclear extract kit according to the manufacturer's protocol (Active Motif Europe, Rixensart, Belgium). After incubation under specific treatment, cells were washed with 5 ml of PBS containing a cocktail of phosphatase inhibitors (provided by the manufacturer). Cells were scraped into PBS with phosphatase and protease inhibitors and centrifuged briefly. Cell pellets were consequently resuspended in 1X hypotonic buffer, kept on ice for 15 min. After addition of detergent and brief vortexing, the lysates were centrifuged at 14,000 g for 30 seconds. The supernatants (cytoplasmic extracts) were collected and stored at -80°C . The pellets were resuspended in complete lysis buffer (20 mM Hepes, pH 7.5, 350 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Igepal CA630, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, phosphatase and protease inhibitors) and vortexed. After 30 min incubation on ice, the lysates were centrifuged at 14,000g for 10 min at 4°C . The supernatant were collected and stored at -80°C . The protein concentration of extracts was determined by a Bradford-based assay (Bio-rad Laboratories).

NF- κ B activation was determined by the TransAM ELISA kit (Active Motif Europe). This method is an alternative to EMSA and, in our experimental conditions, we found it three times more sensitive. This assay is based on a colorimetric reaction. Oligonucleotide containing an NF- κ B consensus binding site has been immobilized in each well of a 96-well plate. 5 μg of nuclear extract were added per well and incubated for 1 hour with middle agitation. The wells were then washed three times with washing buffer (100 mM phosphate buffer, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% Tween 20) and incubated with p65 antibody (1:1000 in washing buffer) for one hour at room temperature. The wells were finally incubated for 1 hour with diluted HRP-conjugated antibody (1:1000 in washing buffer) before the addition of 100 μl of developing solution (TMB substrate solution diluted in 1% of DMSO) and a 5 minutes incubation. The reaction was stopped by addition of stop solution (0.5 M H_2SO_4). Absorbance was read on a spectrophotometer at 450 nm.

Western blot analysis

After incubation with IL-1 β in the presence of ligand or vehicle, cells were washed two times with ice-cold PBS and scrapped off the flask in cold lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1mM β -glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4 , 1mg/ml leupeptin and 1mM PMSF). Cells were disrupted by sonication and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The

supernatants were collected and the protein concentration was determined by a Bradford-based assay. Protein samples were analysed by SDS/PAGE and electroblotted onto PVDF membrane. After 1h in blocking buffer (5% non fat dry milk in TBSTween 0.1%), membranes were blotted overnight at 4°C with antibodies against PPAR γ (Sigma, St Quentin Fallavier, France), I κ B α (Sigma), phosphorylated I κ B α (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France), phosphorylated IKK α/β (Ozyme) and β -actin (Sigma) for total protein extracts (dilution 1:500 for all antibodies) and p65 (dilution 1:500 ; Santa Cruz, USA) for nuclear extracts. After 3 washings with TBSTween, the blot was incubated with anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Cell signaling, St Quentin en Yvelines, France) at 1:2000 dilution in blocking buffer for 1h at room temperature. After four washings, protein bands were detected with the Phototope chemiluminescence detection system (Cell signaling).

Statistical analysis

After comparison of data by analysis of variance, the different groups were compared using Fisher's *t*-test. Assays were made in triplicate (n=3), and *P* values (*vs* control or IL-1 β treatment) less than 0.05 were considered significant.

Results

PPAR γ and ACO mRNA expression in transfected chondrocyte cultures stimulated with IL-1 β in presence or absence of PPAR γ ligands

We determined the expression of PPAR γ in chondrocyte cultures transiently transfected or not with a PPAR γ expression vector. By semiquantitative RT-PCR, we analysed the level of PPAR γ mRNA in chondrocytes 48 hours after transfection. Figure 1A shows that PPAR γ mRNA level in untreated transfected cells was about 5-fold higher than in untreated non-transfected cells. We also observed a 92% decrease ($P<0.01$) in PPAR γ expression in non-transfected cells treated with IL-1 β . However PPAR γ overexpression observed in transfected control cells remained unmodified after IL-1 β treatment in the presence or not of the ligands. We next evaluated the overexpression of PPAR γ at the protein level. The results of western blot analysis showed that 72 hours after transfection with 500 ng vector, PPAR γ protein was strongly overexpressed (+ 144%, $P<0.05$) when compared to non-transfected cells (Figure 1C).

We thereafter measured the effects of PPAR γ overexpression on ACO mRNA expression, a gene positively regulated by PPAR γ . The results in Figure 1B show that ACO mRNA expression was significantly increased (+ 62%, $P<0.01$) in PPAR γ -transfected untreated chondrocytes. This increase was not significantly modified when cells were pre-incubated in the presence of the ligands or treated with IL-1 β .

Modulation of IL-1 β -induced iNOS and COX-2 mRNA expression by PPAR γ ligands

Chondrocytes were transfected with a PPAR γ expression vector as described before. Thirty six hours later, the cultures were pre-incubated for one hour in the presence of PPAR γ ligands before to be stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) for 6h. IL-1 β treatment induced a strong iNOS (Figure 2A) and COX-2 (Figure 2B) mRNA expression. 15d-PGJ₂ pre-incubation led to a 90% ($P<0.05$) decrease in IL-1 β induced iNOS mRNA expression and to a 52% ($P<0.05$) decrease in IL-1 β induced COX-2 mRNA expression. In contrast, troglitazone and rosiglitazone pre-incubation did not modulate induction of iNOS and COX-2 mRNA by IL-1 β

treatment. These results suggest that 15d-PGJ₂ effects on iNOS and COX-2 induction are PPAR γ independent in rat chondrocytes.

Ability of PPAR γ ligands to modulate the production of nitrites and PGE₂ induced by IL-1 β

As described previously, cells were transfected and treated with IL-1 β in the presence or absence of PPAR γ ligands. Twenty four hours later, nitrites and PGE₂ were assayed in culture supernatants. IL-1 β treatment induced a strong production of nitrites (57 μ M) and PGE₂ (2.52 ng/ml) by chondrocytes. 15d-PGJ₂ pre-incubation led to a 97% decrease ($P<0.01$, 1.7 μ M) in nitrite production and a 63% decrease ($P<0.01$, 0.94 ng/ml) in PGE₂ production (Figure 3A and 3B). These results were coherent with its effect on iNOS and COX-2 mRNA expression. In contrast to results obtained to iNOS and COX-2 mRNA expression, troglitazone slightly but significantly reduced nitrite (-18%, $P<0.05$, 47.2 μ M) and PGE₂ (-24%, $P<0.05$, 1.9 ng/ml) production induced by IL-1 β . We also observed an effect of rosiglitazone on nitrite production (-34%, $P<0.05$, 37.4 μ M). However, these results show that 15d-PGJ₂ was more efficient to counteract IL-1 β induced nitrite and PGE₂ release than troglitazone or rosiglitazone.

Effect of 15d-PGJ₂ in IL-1 β treated chondrocytes overexpressing a dominant negative form of PPAR γ

Chondrocytes were transfected with a dominant negative PPAR γ vector. Thirty six hours later, cells were preincubated for one hour with 15d-PGJ₂ and treated with IL-1 β for six hours (COX-2 and iNOS mRNA analysis) or for twenty four hours (nitrites and PGE₂ production measurement). 15d-PGJ₂ completely suppressed iNOS mRNA expression (Figure 4A) and significantly inhibited (-77%, $P<0.01$) COX-2 mRNA expression (Figure 4B). We also found that 15d-PGJ₂ by itself induced an increase in COX-2 mRNA expression (+227%, $P<0.05$). In the same way, figures 4C and 4D show that 15d-PGJ₂ decreased NO production at level less than the control but was less effective to reduce PGE₂ release (-40%, $P<0.05$). Here again, the cyclopentenone prostaglandin alone induced an increase in PGE₂ production.

Effect of PPAR γ ligands on NF- κ B signalling pathway: p65 translocation and DNA binding activity

We firstly examined the effects of 15d-PGJ₂, troglitazone and rosiglitazone on p65 subunit translocation in nuclei of rat chondrocytes treated with IL-1 β . Cells were incubated for one hour with PPAR γ ligands in the culture medium before to be stimulated with IL-1 β for 30 min. Nuclear protein extracts were obtained and analysed by western blot (Figure 5A). IL-1 β treatment for 30 minutes induced an important translocation of p65 in the nucleus. We found that 15d-PGJ₂ preincubation partially inhibited p65 translocation in the nucleus (-32%, $P < 0.05$). In contrast, troglitazone or rosiglitazone pre-incubation did not modulate IL-1 β -induced p65 translocation in the nucleus.

We thereafter studied the effect of the ligands on NF- κ B activation by measuring its DNA binding activity. 5 μ g of nuclear extract were analysed by ELISA kit. NF- κ B was strongly activated by IL-1 β (Figure 5B). A pre-incubation with troglitazone or rosiglitazone led to no change on NF- κ B activation. However 15d-PGJ₂ induced a 55% decrease ($P < 0.05$) in NF- κ B DNA binding activity. No significant change in NF- κ B activation and p65 translocation was observed in cells incubated with PPAR γ ligands alone.

Determination of intracellular targets of 15d-PGJ₂ in NF- κ B transcriptional pathway

NF- κ B is one of the transcriptional pathways that importantly mediates IL-1 β -induced cellular responses. Phosphorylation of I κ B α , the inhibitory subunit of NF- κ B heterodimer on two serines (Ser-32 and Ser-36), is an important step in the NF- κ B activation process and is known to be mediated by the IKK α/β complex. Phosphorylated I κ B α is then ubiquitinated and degraded by the proteasome, releasing the NF- κ B dimer that translocate in the nucleus. In order to identify potential targets of 15d-PGJ₂ in the NF- κ B pathway, western blots for phosphorylated I κ B α , I κ B α and phosphorylated IKK α/β (Figure 6 A, B, C respectively) were performed. Cell cultures were treated with IL-1 β for 5 minutes in presence or absence of PPAR γ ligands and total proteins were extracted. IL-1 β treatment strongly induced the phosphorylation (Figure 6A) and the degradation (Figure 6B) of I κ B α (-80%, $P < 0.05$). Protein extracts from cells pretreated with 15d-PGJ₂ showed partial inhibition (- 55%, $P < 0.05$) of I κ B α degradation but did not affect IL-1 β -induced I κ B α phosphorylation. A

pretreatment with troglitazone or rosiglitazone have no effect on phosphorylation and degradation of I κ B α induced by IL-1 β . Phosphorylation of IKK α / β complex was induced by IL-1 β treatment as shown in Figure 6C. If 15d-PGJ₂ was shown to completely inhibit IL-1 β -induced IKK β phosphorylation, we also observed an increase in IKK α phosphorylation (+144%, $P < 0.05$). Troglitazone or rosiglitazone pre-treatment did not modulate IKK α / β phosphorylation induced by IL-1 β .

Discussion

PPAR γ is a nuclear receptor known to play a major role in adipocyte differentiation, lipid storage and glucose homeostasis [20] but it was also shown to be involved in the modulation of different inflammatory processes, and in the inhibition of the proliferation of various cell types [5, 21]. Interestingly, recent studies showed that PPAR γ ligands inhibited the production and the effects of proinflammatory cytokines in monocytes/macrophages [8, 9, 22], neonatal cardiac myocytes [23] and microglia [16]. We and others have demonstrated in IL-1 β stimulated chondrocytes that PPAR γ agonists inhibit NO production, the decrease in proteoglycan synthesis and the expression of inflammatory genes such as matrix metalloproteases, iNOS, COX-2 [10-12, 24]. However, the real involvement of PPAR γ in these effects was not clearly established in chondrocytes and the aim of the present work was to elucidate this point.

A common feature of the different published results in human or rat chondrocyte cultures is that 15d-PGJ₂ was the most effective among PPAR γ ligands to modulate IL-1 β action. Anti-inflammatory effects with synthetic ligands (troglitazone or rosiglitazone) were obtained at higher concentrations (up to 100 μ M), generally on established cell lines such as Hela cells [25], cancer colorectal cell lines [26], microglia cells [16] or macrophages [8]. However, these high drug concentrations were shown to be toxic on chondrocyte primary cultures.

An argument given to explain the weak effects of synthetic ligands was that the level of PPAR γ expression in chondrocytes would be too low. Since 15d-PGJ₂ affinity for its nuclear receptor is lower than troglitazone, this would strongly suggest a PPAR γ -independent action of the cyclopentenone.

To increase PPAR γ level in chondrocytes, overexpression of PPAR γ in rat chondrocyte cultures was induced through transient transfection experiments with a PPAR γ expression vector. Even in transfected cultures, we observed that only 15d-PGJ₂ was able to decrease iNOS and COX-2 mRNA expression and NO and PGE₂ production induced by IL-1 β (Figure 2A/2B). Troglitazone and rosiglitazone remained ineffective on iNOS and COX-2 mRNA expression. Only a partial inhibition of NO and PGE₂ production was observed with these agonists. Taken together, these observations strongly suggest a main PPAR γ -independent action of 15d-PGJ₂ in rat chondrocytes.

To further demonstrate that 15d-PGJ₂ acts through a PPAR γ -independent mechanism, we transfected chondrocytes with a vector expressing a dominant negative form of PPAR γ . Cells were thereafter treated with IL-1 β in the presence or not of the ligand. The results clearly demonstrate that 15d-PGJ₂ was still effective to counteract IL-1 β , by repressing iNOS and COX-2 mRNA. In the same way, the production of inflammatory mediators was decreased. These results strengthen the hypothesis that 15d-PGJ₂ acts through a PPAR γ -independent mechanism in rat chondrocytes.

NF- κ B, as well as AP-1, are transcriptional factors that govern the expression of many genes involved in the development of inflammatory processes [27-30] and in tissue degradation [31]. Thus, these two transcriptional pathways have been described as playing a central role in mediating the effects of IL-1 β or TNF α in arthritic diseases and in cartilage degradation [32, 33]. NF- κ B is activated after phosphorylation and degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B α . I κ B α is phosphorylated by IKK complex, which contains two catalytic subunits (IKK α and IKK β) (and the IKK γ or NEMO regulatory unit,) at sites that trigger its ubiquitin-dependent degradation [34].

In several recent publications, it has been demonstrated that 15d-PGJ₂ could interfere with multiple steps in NF- κ B signalling pathway. However, intracellular targets of the cyclopentenone prostaglandin have been almost only identified in established cell lines and rarely in primary cell cultures. Thus, in activated murine macrophages, 15d-PGJ₂ affects IKK activity due to the inhibition of the phosphorylation of serine residues [14]. In the same way, Rossi *et al.* showed an inhibition of IKK β phosphorylation by 15d-PGJ₂ in HeLa cells [15]. However, to our knowledge, no data is available concerning the mechanism by which 15d-PGJ₂ acts in chondrocytes, as well as putative intracellular target(s).

In the present work, we demonstrated that 15d-PGJ₂, but not synthetic ligands, inhibited the IL-1 β -induced activation of NF- κ B transcriptional pathway. These results are corroborated by the decrease in p65 translocation in the nucleus and the partial inhibition of NF- κ B transactivation (Figure 5). Interestingly, we also observed that I κ B α degradation was importantly inhibited by 15d-PGJ₂. However, in the same time, this inhibition was not accompanied by a decrease in phosphorylated I κ B α level. This surprising result suggests that 15d-PGJ₂ could inhibit I κ B α protein degradation without affecting its phosphorylation that normally should trigger its ubiquitin-dependent degradation. I κ B α phosphorylation is the result of IKK complex activity. We have then studied the effects of a pre-treatment with

15d-PGJ₂ on both IKK α / β subunits enzymatic action. Our results showed that only IL-1 β -induced IKK β phosphorylation was decreased but not IKK α phosphorylation. This would mean that the phosphorylation of I κ B α is the result of IKK α activity, which is not inhibited by 15d-PGJ₂, as shown in figure 6C. According to the literature, IKK β phosphorylation triggers the degradation of the inhibitory protein. Thus, we can also suggest that the degradation of the inhibitory protein through the proteasome pathway is inhibited as a result of the absence of IKK β phosphorylation activity. To our knowledge, this mechanism has not been described for cyclopentenone prostaglandins in the literature, especially in chondrocytes. Interestingly, a recent paper describing the effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol [35, 36], reported a similar mechanism of action [37] in human chondrocytes. EGCG was shown to suppress IL-1 β -induced I κ B α degradation but had no inhibitory effect on the I κ B α phosphorylating activity of IKK. However, the specific activities of IKK α and IKK β subunits were not analysed in this work.

Taken together, the results of the present work suggest a new PPAR γ -independent inhibitory mechanism of NF- κ B activation by 15d-PGJ₂ in rat chondrocytes. The I κ B α phosphorylating activity of IKK α is not decreased, indicating that the inhibition of activation and translocation of NF- κ B/p65 to the nucleus may result from inhibition of the proteasome pathway. This would then cause the stabilization and the accumulation of I κ B α in the cytoplasm of rat chondrocytes. In conclusion, the anti-inflammatory effects of 15d-PGJ₂ seem to be mainly PPAR γ -independent in IL-1 β treated rat chondrocytes, as demonstrated with the poor effect of synthetic ligands (in spite of their higher affinity for the PPAR γ receptor) as well as PPAR γ overexpression experiments. These new findings might help to understand new aspects of the anti-inflammatory effects of cyclopentenone prostaglandins, especially in chondrocytes. This would contribute to develop novel approaches to modulate inflammation in arthritic diseases.

References

- 1 Arend, W. P. and Dayer, J. M. (1995) Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**, 151-160
- 2 van de Loo, F. A., Joosten, L. A., van Lent, P. L., Arntz, O. J. and van den Berg, W. B. (1995) Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**, 164-172
- 3 Lotz, M., Blanco, F. J., von Kempis, J., Dudler, J., Maier, R., Villiger, P. M. and Geng, Y. (1995) Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J. Rheumatol. Suppl.* **43**, 104-108
- 4 Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P. and Evans, R. M. (2001) PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat. Med.* **7**, 48-52
- 5 Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-1156
- 6 Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. and Lazar, M. A. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798-800
- 7 Colville-Nash, P. R., Qureshi, S. S., Willis, D. and Willoughby, D. A. (1998) Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J. Immunol.* **161**, 978-984
- 8 Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. and Glass, C. K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79-82
- 9 Jiang, C., Ting, A. T. and Seed, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**, 82-86
- 10 Boyault, S., Simonin, M. A., Bianchi, A., Compe, E., Liagre, B., Mainard, D., Becuwe, P., Dauca, M., Netter, P., Terlain, B. and Bordji, K. (2001) 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human

- chondrocytes by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett.* **501**, 24-30
- 11 Sabatini, M., Bardiot, A., Lesur, C., Moulharat, N., Thomas, M., Richard, I. and Fradin, A. (2002) Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 673-679
- 12 Bordji, K., Grillasca, J. P., Gouze, J. N., Magdalou, J., Schohn, H., Keller, J. M., Bianchi, A., Dauca, M., Netter, P. and Terlain, B. (2000) Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 12243-12250
- 13 Spiegelman, B. M. (1998) PPARgamma in monocytes: less pain, any gain? *Cell* **93**, 153-155
- 14 Castrillo, A., Diaz-Guerra, M. J., Hortelano, S., Martin-Sanz, P. and Bosca, L. (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1692-1698
- 15 Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. and Santoro, M. G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**, 103-108
- 16 Petrova, T. V., Akama, K. T. and Van Eldik, L. J. (1999) Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4668-4673
- 17 Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G. and Glass, C. K. (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4844-4849
- 18 Kuettner, K. E., Pauli, B. U., Gall, G., Memoli, V. A. and Schenk, R. K. (1982) Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J. Cell. Biol.* **93**, 743-750
- 19 Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138

- 20 Schoonjans, K., Staels, B. and Auwerx, J. (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1302**, 93-109
- 21 Fu, M., Zhang, J., Zhu, X., Myles, D. E., Willson, T. M., Liu, X. and Chen, Y. E. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J. Biol. Chem.* **276**, 45888-45894
- 22 Hinz, B., Brune, K. and Pahl, A. (2003) 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-gamma-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 415-420
- 23 Takano, H., Nagai, T., Asakawa, M., Toyozaki, T., Oka, T., Komuro, I., Saito, T. and Masuda, Y. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* **87**, 596-602
- 24 Fahmi, H., Di Battista, J. A., Pelletier, J. P., Mineau, F., Ranger, P. and Martel-Pelletier, J. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **44**, 595-607
- 25 Fahmi, H., Pelletier, J. P., Di Battista, J. A., Cheung, H. S., Fernandes, J. C. and Martel-Pelletier, J. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 100-108
- 26 Su, C. G., Wen, X., Bailey, S. T., Jiang, W., Rangwala, S. M., Keilbaugh, S. A., Flanigan, A., Murthy, S., Lazar, M. A. and Wu, G. D. (1999) A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J. Clin. Invest.* **104**, 383-389
- 27 Muller-Ladner, U., Gay, R. E. and Gay, S. (2002) Role of nuclear factor kappaB in synovial inflammation. *Curr. Rheumatol. Rep.* **4**, 201-207
- 28 Tak, P. P. and Firestein, G. S. (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* **107**, 7-11
- 29 Adcock, I. M. (1997) Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* **52**, 178-186

- 30 Bottex-Gauthier, C., Pollet, S., Favier, A. and Vidal, D. R. (2002) [The Rel/NF-kappa-B transcription factors: complex role in cell regulation]. *Pathol. Biol. (Paris)* **50**, 204-211
- 31 Birkedal-Hansen, H. (1993) Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J. Periodontal Res.* **28**, 500-510
- 32 Bondeson, J., Foxwell, B., Brennan, F. and Feldmann, M. (1999) Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5668-5673
- 33 Dinarello, C. (1992) Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in systemic responses to infection and inflammation. in *Basic principles and clinical correlates.* (Gallin, J. I., Goldstein, I. M. and Snyderman, R., eds.), pp. 211-232, Raven Press, New York
- 34 Karin, M. (1999) How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* **18**, 6867-6874
- 35 Lin, Y. L. and Lin, J. K. (1997) (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol. Pharmacol.* **52**, 465-472
- 36 Yang, F., Oz, H. S., Barve, S., de Villiers, W. J., McClain, C. J. and Varilek, G. W. (2001) The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol. Pharmacol.* **60**, 528-533
- 37 Singh, R., Ahmed, S., Islam, N., Goldberg, V. M. and Haqqi, T. M. (2002) Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum.* **46**, 2079-2086

Table and Figure legends

Table 1 : Primers used for semiquantitative and real time quantitative (Q) RT-PCR and product length.

PS: product size in base pair; T_m: melting temperature; Q: real time quantitative RT-PCR.

Figure 1: Effect of PPAR γ ligands on PPAR γ (A) and ACO (B) mRNA level in IL-1 β treated chondrocytes.

Twenty four hours after a transient transfection with a PPAR γ expression vector, cells were pre-incubated with 10 μ M PPAR γ ligands or with 0.1% DMSO before to be treated with IL-1 β (10 ng/ml) for 6 hours. Total cellular RNA was extracted and semiquantitative RT-PCR was performed using PPAR γ (A) and ACO (B)-specific primers. The histograms represent the ratio: target gene mRNA level/L27 mRNA level and the results are expressed as relative arbitrary units with a value of 100 for control. They represent mean values \pm SD (n=3, * P <0.05; ** P <0.01 versus control without surexpression). Total cellular extracts were performed and analysed by western blot for PPAR γ (C) 72 hours after the transfection

Figure 2: Inhibition by PPAR γ ligands of IL-1 β induced iNOS (A) and COX-2 (B) mRNA expression in rat chondrocytes.

Rat chondrocyte cultures were transiently transfected with a PPAR γ expression vector before to be treated with IL-1 β for six hours in the presence or not of PPAR γ ligands (10 μ M). Total RNA was extracted and was analysed for iNOS (A) and COX-2 (B) mRNA expression by real time quantitative RT-PCR. Results are expressed as relative arbitrary units (n=3; # P <0.05, # # P <0.01 versus control; * P <0.05; ** P <0.01 versus IL-1 β treatment).

Figure 3: Effect of PPAR γ ligands on IL-1 β induced NO (A) and PGE₂ (B) production in rat chondrocytes.

After 36h transfection, cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) for 24h in the presence or not of 10 μ M PPAR γ ligands. NO production (A) was measured in the culture medium according to method of Griess and PGE₂ production (B) was determined by ELISA kit. The results are expressed as concentrations (n=3; # P <0.05, # # P <0.01 versus control, * P <0.05; ** P <0.01 versus IL-1 β treatment).

Figure 4: Effect of an overexpression of a dominant negative form of PPAR γ on the modulation by 15d-PGJ₂ of IL-1 β induced iNOS (A), COX-2 (B) mRNA expression and NO (C), PGE₂ (D) production.

Rat chondrocyte cultures were transiently transfected with a dominant negative PPAR γ vector before to be treated with IL-1 β for six or twenty four hours in the presence or not of 15d-PGJ₂ (10 μ M). Total RNA was extracted and was analysed for iNOS (A) and COX-2 (B) mRNA expression by real time quantitative RT-PCR. NO production (C) was measured in the culture medium according to method of Griess and PGE₂ production (D) was determined by ELISA kit (n=3; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus IL-1 β treatment).

Figure 5: Effect of PPAR γ ligands on the translocation of the p65 subunit in the nucleus (A) and on NF- κ B activation (B) in IL-1 β treated chondrocytes.

Thirty six hours after transfection with a PPAR γ expression vector, cells were pre-incubated with 10 μ M PPAR γ ligands for four hours before to be treated with IL-1 β (10ng/ml) for 30 min. Nuclear protein extracts were prepared and 5 μ g of nuclear extract were resolved on SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and probed with an antibody against p65 (A). NF- κ B activation was determined by ELISA kit (TransAm) (B). Results are expressed as relative arbitrary units with a value of 100 for IL-1 β treatment and are representative of three different experiments.

Figure 6: 15d-PGJ₂ did not affect IL-1 β -induced I κ B α phosphorylation in rat chondrocytes but partially inhibited its degradation.

Cells were incubated four hours in the presence of PPAR γ ligands, then with 10 ng/ml IL-1 β for 5 min. Total proteins were extracted and immunoblot analysis was performed with specific antibodies. Total lysates were analysed with antibodies against phosphorylated I κ B α (A), non-phosphorylated I κ B α (B) and phosphorylated IKK α / β (C). The results shown are representative of three independent experiments.

Table I :

Gene	Primer sequence	Tm (°C)	PS (pb)	Cycle number
PPAR γ	sense 5'-ATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAAGC-3'	64	524	30
	antisense 5'-CGGTCTCACTGAGAATAATGACAGC-3'			
ACO	sense 5'-CCAATCACGCAATAGTTCTGG-3'	57	362	28
	antisense 5'-CGCTGTATCGTATGGCGAT-3'			
L27	sense 5'-TCCTGGCTGGACGCTACTC-3'	62	225	27
	antisense 5'-CCACAGAGTACCTTGTGGGC-3'			
INOS (Q)	sense 5'-AATGCGAAGGTCATGGC-3'	60	65	--
	antisense 5'-CGACTTTCCTGTCTCAGTAGCAA-3'			
COX-2 (Q)	sense 5'-TACAAGCAGTGGCAAAGGCC-3'	60	301	--
	antisense 5'-CAGTATTGAGGAGAACAGATGGG-3'			
RP29 (Q)	sense 5'-AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG-3'	59	67	--
	antisense 5'-AGACGCGCAAGAGCGAGAA-3'			

Figure 1:

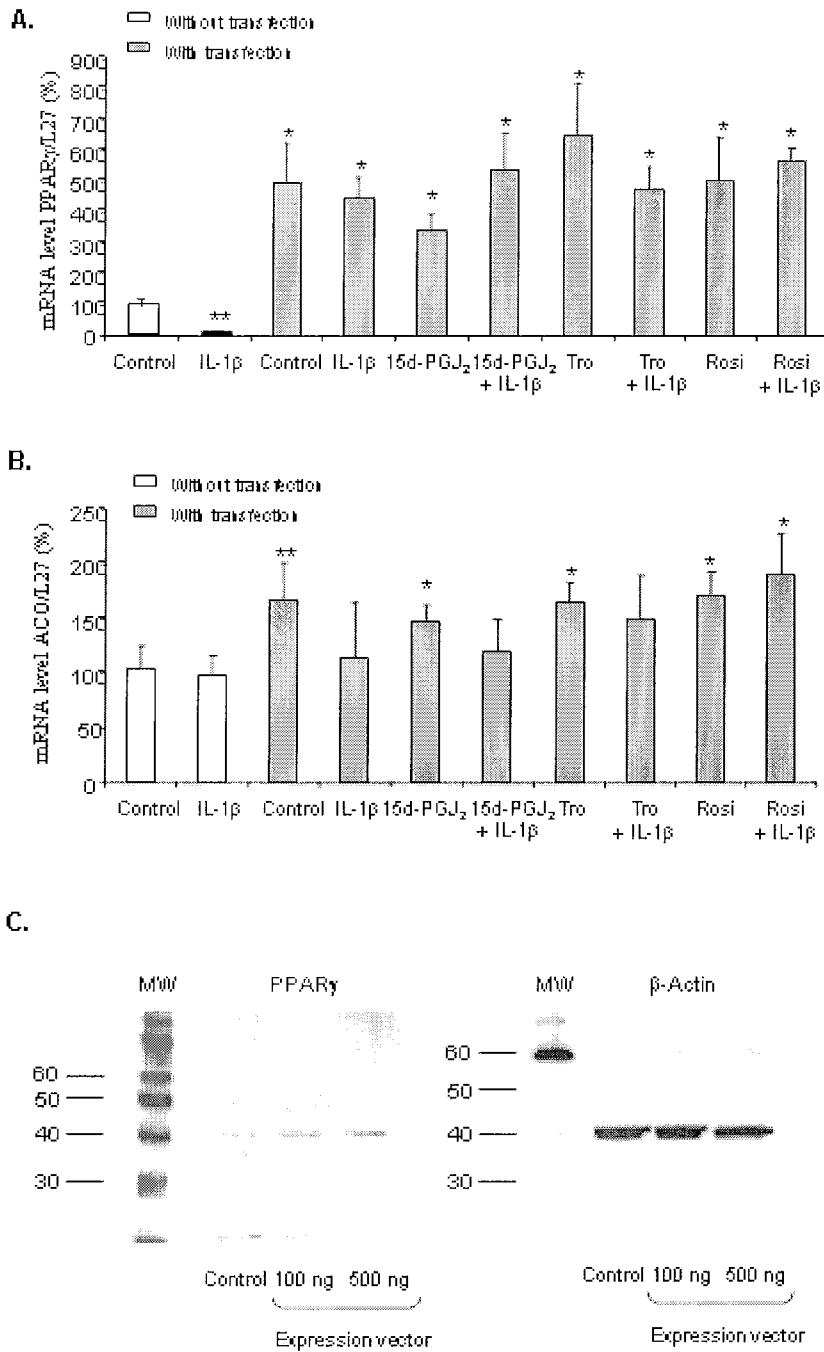


Figure 2:

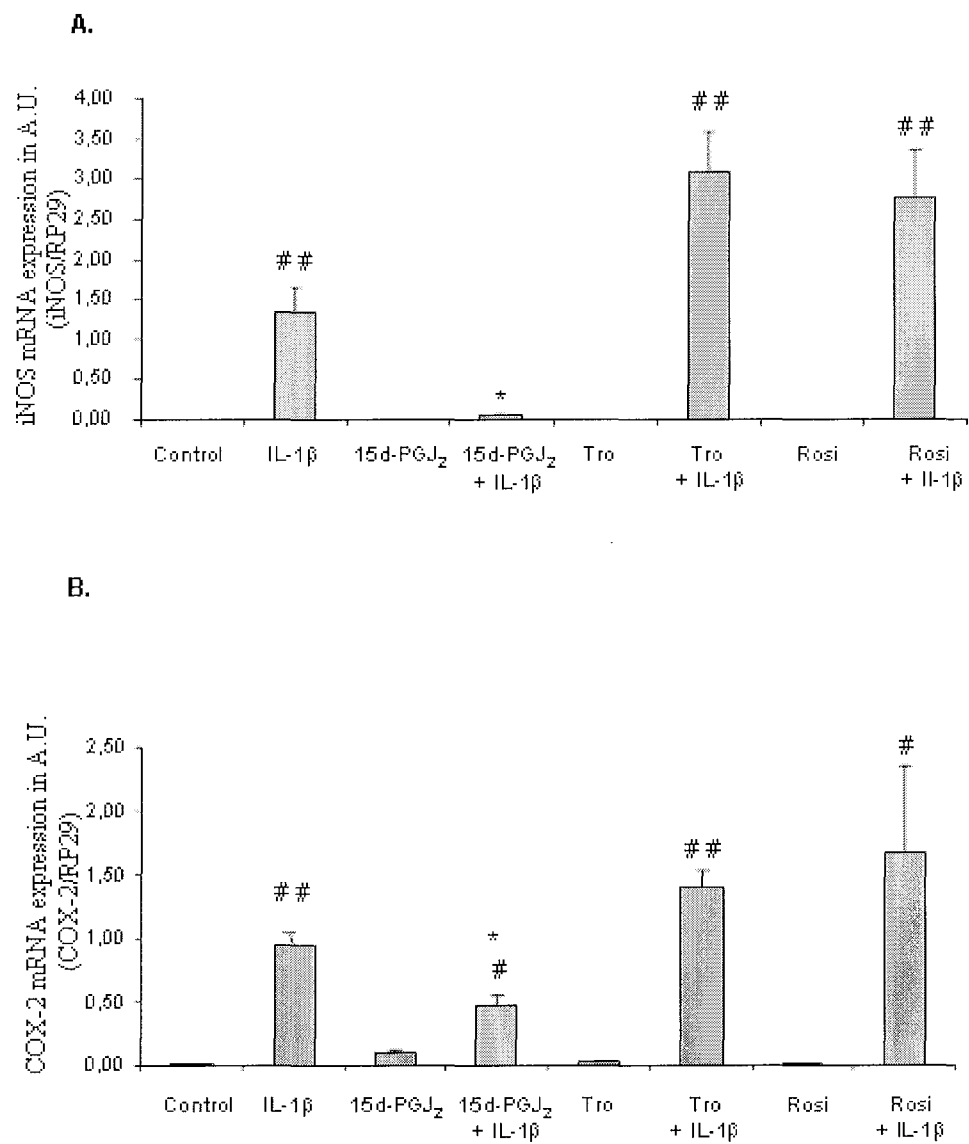


Figure 3:

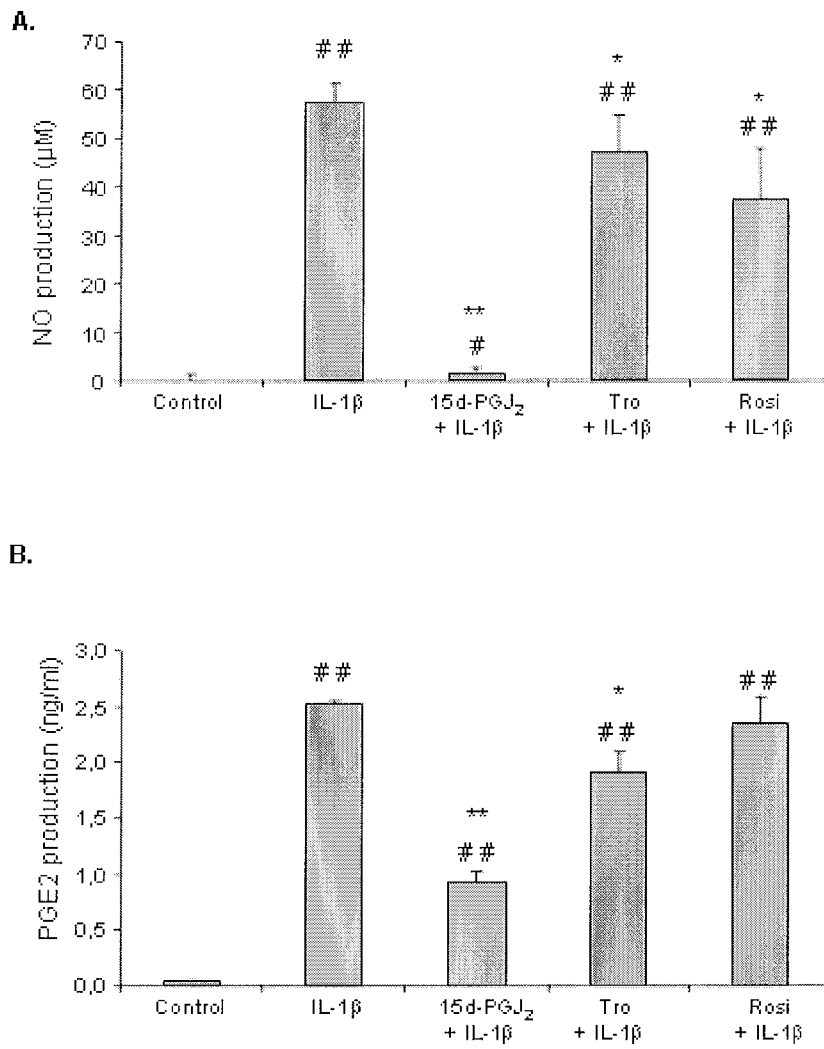


Figure 4 :

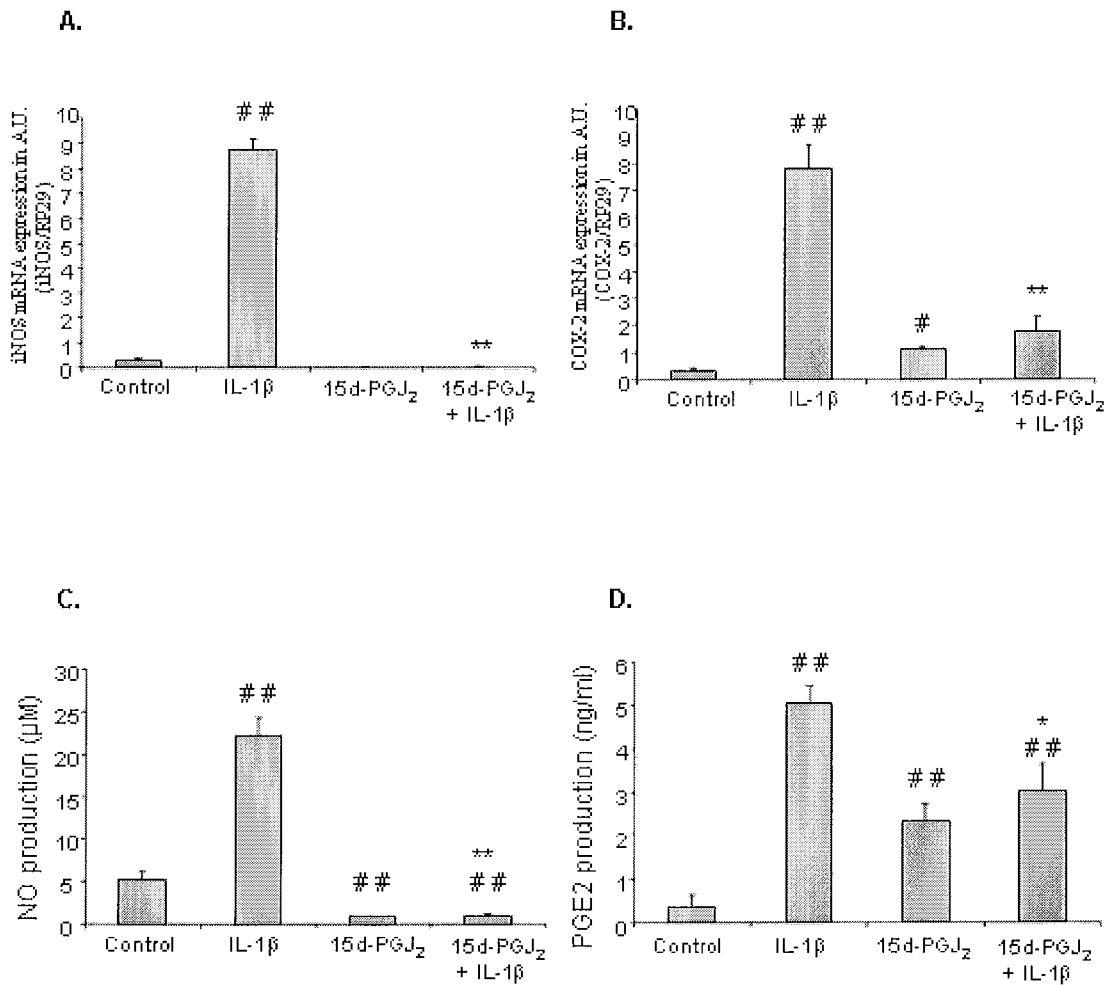
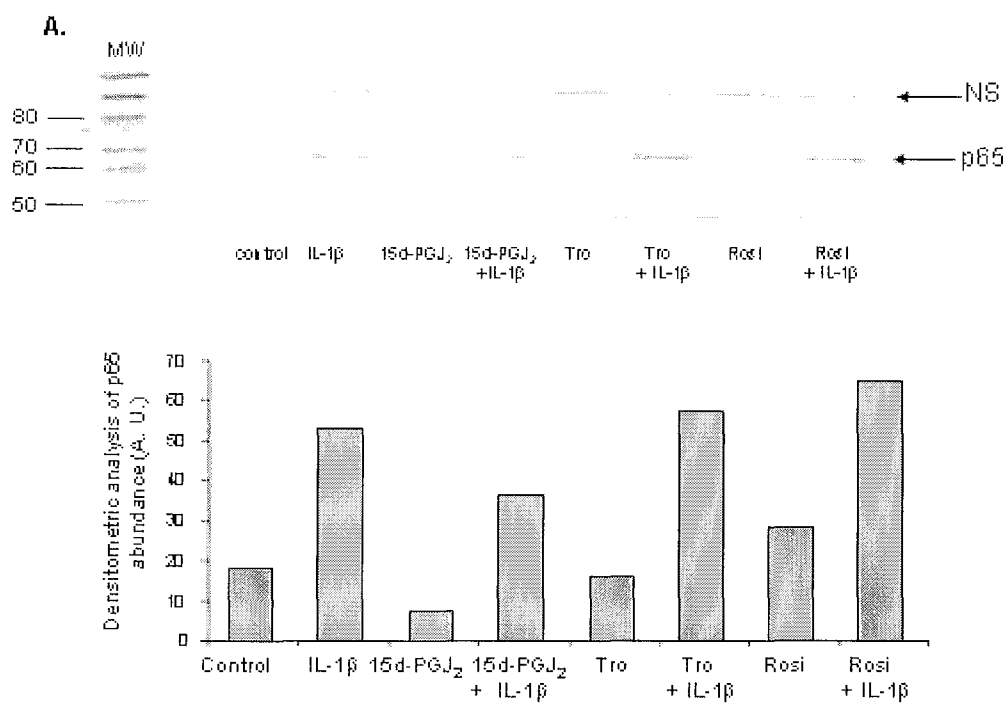


Figure 5 :



B.

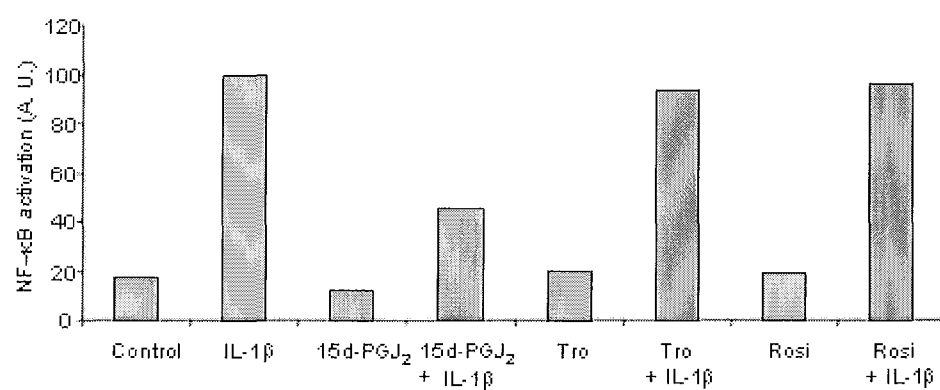
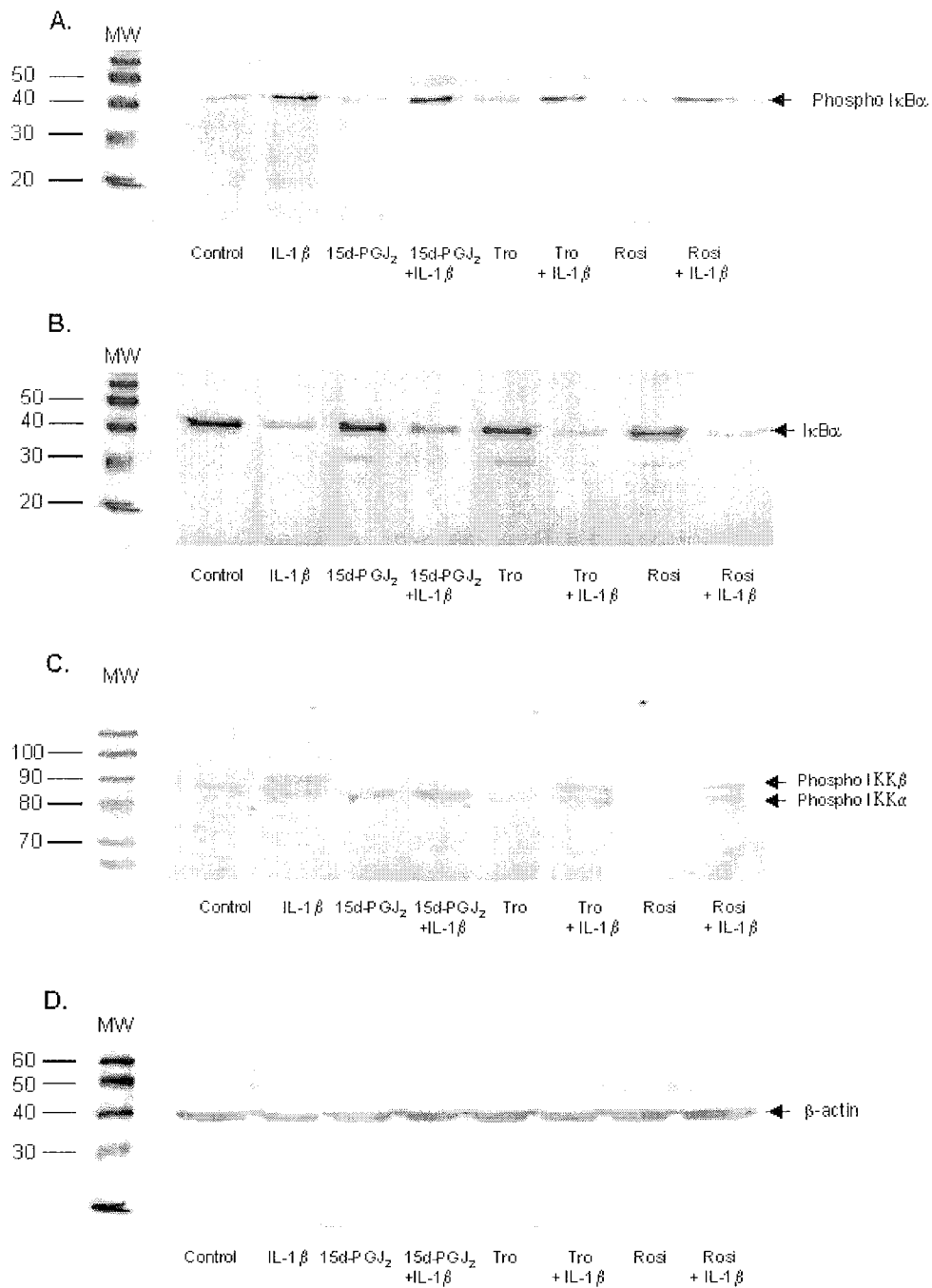
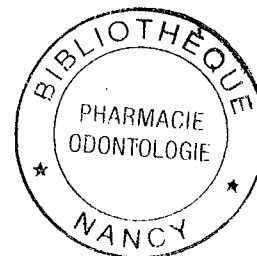


Figure 6 :



Prénom, Nom : **Sandrine BOYAULT**



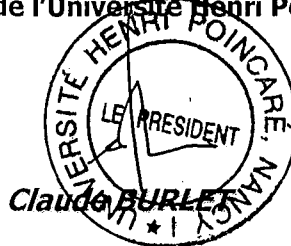
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N° 852

Nancy, le 1^{er} décembre 2003

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



RESUME

La destruction progressive du cartilage, caractéristique commune des arthropathies inflammatoires et dégénératives, résulte d'un déséquilibre entre les processus de synthèse et de dégradation matricielle. L'interleukine-1 (IL-1) joue un rôle central dans la perte d'homéostasie du cartilage lors de ces pathologies articulaires. Cette cytokine induit la production de médiateurs de l'inflammation, tels que le monoxyde d'azote (NO) et les prostaglandines ainsi que l'expression d'enzymes protéolytiques. La modulation des effets et/ou de la production d'IL-1 par les chondrocytes et les synoviocytes, est une stratégie essentielle pour prévenir la dégradation du cartilage.

Les récepteurs nucléaires PPAR (« peroxisome proliferator-activated receptor ») et ROR α (« retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha ») sont des facteurs de transcription impliqués notamment dans la différenciation adipocytaire, le métabolisme lipidique et l'homéostasie du glucose. Des études récentes ont montré que ces récepteurs pouvaient être impliqués dans le contrôle de l'inflammation et plus particulièrement dans la modulation de l'action de cytokines pro-inflammatoires. Notre travail de thèse a consisté tout d'abord à mettre en évidence la présence de ces récepteurs dans les cellules articulaires traitées ou non par de l'IL-1 β . Nous avons ensuite étudié la potentialité de ligands spécifiques à moduler les effets et/ou la production d'IL-1 β ou les effets du lipopolysaccharide (LPS). Enfin, les mécanismes d'action de la 15d-PGJ $_2$, ligand physiologique de PPAR γ , et les cibles intracellulaires éventuelles dans les voies transcriptionnelles, NF- κ B et AP-1, ont été explorés.

Nos travaux menés *in vitro* sur des cultures de chondrocytes humains et de synoviocytes de type B de rat ont montré la présence de PPAR α , PPAR γ et de ROR α , au niveau de l'ARNm et de la protéine. Nous avons également observé que l'expression de ces 3 récepteurs était modulée différemment par l'IL-1 β dans les chondrocytes et par le LPS dans les synoviocytes. Ainsi, si l'expression de PPAR α est inchangée après traitement, l'expression de PPAR γ est diminuée et celle de ROR α est augmentée. L'effet de ligands de PPAR et de ROR α sur certains paramètres de l'inflammation induits par le LPS ou l'IL-1 β a ensuite été étudié. Si dans nos deux modèles cellulaires, les ligands spécifiques de PPAR α et ROR α n'ont eu aucun effet, les ligands de PPAR γ ont permis de s'opposer aux effets de l'IL-1 β ou du LPS. La 15d-PGJ $_2$, ligand naturel de PPAR γ , s'est néanmoins révélée bien plus efficace que les ligands synthétiques pour diminuer l'expression de la NO synthase inductible, de la cyclooxygénase-2, de l'IL-1 β et du tumor necrosis factor alpha (TNF α). De plus, la 15d-PGJ $_2$ inhibe la production de NO induite par le LPS et l'IL-1 β ainsi que la baisse de synthèse des protéoglycanes induite par l'IL-1 β .

Des analyses en Western-blot et en retard sur gel ont montré que la 15d-PGJ $_2$ inhibe la translocation de p65 dans le noyau et la fixation de NF- κ B et d'AP-1 sur l'ADN induite par le LPS ou l'IL-1 β . Le peu d'effet observé avec la troglitazone suggère que l'action de la 15d-PGJ $_2$ dans les chondrocytes et les synoviocytes est principalement indépendante de PPAR γ . Cette hypothèse a été confirmée grâce à des expériences de transfection transitoire dans des chondrocytes de rat qui ont permis de surexprimer un récepteur fonctionnel ou muté (dominant-négatif). Enfin, nous avons pu mettre en évidence une action inhibitrice de la 15d-PGJ $_2$ sur le complexe enzymatique I κ B kinase ainsi qu'une inhibition de la dégradation de la protéine inhibitrice I κ B α , et donc de la voie NF- κ B.

Ce mécanisme d'action anti-inflammatoire des cyclopentenones est tout à fait original et permet d'entrevoir de nouvelles voies thérapeutiques dans le domaine des arthropathies.