HAL
open science

Rôle des membres de la famille du TNF dans la destruction articulaire médiée par les synoviocytes de type fibroblastique

Rachel Audo

To cite this version:

Rachel Audo. Rôle des membres de la famille du TNF dans la destruction articulaire médiée par les synoviocytes de type fibroblastique. Biologie cellulaire. 2005. hal-01592915

HAL Id: hal-01592915

https://ephe.hal.science/hal-01592915

Submitted on 25 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTERE DE LA JEUNESSE, DE L'ÉDUCATION NATIONALE
ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la vie et de la terre

MÉMOIRE
Présenté par

Rachel AUDO

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Rôle des membres de la famille du TNF dans la destruction articulaire médiée par les synoviocytes de type fibroblastique

Soutenu le 18 juillet devant le jury composé de :

PRESIDENT : Dr Thierry DUPRESSOIR
EXAMINATEUR : Dr Jacques MOREL
EXAMINATEUR : Dr Michel HAHNE
EXAMINATEUR : Dr Valérie PINET
EXAMINATEUR : Dr Mireille ROSSEL

LABORATOIRE DE STAGE :

INSERM U454
IMMUNOPATHOLOGIE DE L'INFLAMMATION
CHU Arnaud de Villeneuve
34095 Montpellier cedex5

Directeur de stage :Dr Jacques MOREL
j-morel@ chu-montpellier.fr

LABORATOIRE EPHE :

BIOLOGIE CELLULAIRE QUANTITATIVE
Université Montpellier II - INSERM EMI 343
Case courrier 103 - Place E. Bataillon

34095 Montpellier Cedex 5

Directeur : Dr Norbert KOENIG

RÉSUMÉ:

La polyarthrite rhumatoïde est un rhumatisme inflammatoire chronique responsable d'un gonflement articulaire et d'une destruction ostéo-chondrale. D'étiologie inconnue, cette affection se traduit par une inflammation chronique localisée au niveau des articulations, associée à une hypertrophie de la membrane synoviale qui va progressivement se transformer en une structure pseudo-tumorale appelée pannus. La formation du pannus est principalement liée aux synoviocytes de type fibroblastique qui sont progressivement transformés, envahissent et détruisent l'articulation.

Le TNF-a est une cytokine clé dans la polyarthrite rhumatoïde. Parmi les membres de la famille du TNF a, RANKL, OPG et TRAIL pourraient également jouer un rôle important. Avant d'envisager d'utiliser ces cytokines en thérapeutique, il est important de déterminer leur rôle et leur relevance dans la pathogénie. Le projet de recherche a donc consisté à étudier *ex vivo*, l'implication de ces cytokines dans la destruction ostéoarticulaire médiée par les synoviocytes de type fibroblastique.

RANKL est une cytokine impliquée dans l'ostéoclastogénèse, et agit directement sur la résorption osseuse. *In vitro*, cette cytokine est responsable de la résorption osseuse médiée par les cellules de la synoviale. Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle dans la destruction osseuse. Le premier axe de travail consiste donc à évaluer l'influence des cytokines pro-inflammatoires sur l'expression de RANKL et de son récepteur leurre OPG. L'évaluation de leur expression par les techniques de PCR quantitative, de cytométrie en flux et de dosage ELISA ont permis de mettre en évidence que les cytokines pro-inflammatoires n'influencent pas l'expression de RANKL par les FLS.

Une étude, dans un modèle murin d'arthrite induite au collagène, a montré que le blocage de TRAIL endogène aggrave l'inflammation et l'hyperplasie synoviale. Ces données suggèrent donc que TRAIL est un facteur protecteur de l'arthrite inflammatoire auto-immune. Cependant, le rôle de TRAIL dans la PR n'est pas connu et doit être éclairci avant de l'envisager comme traitement dans cette maladie. Afin de déterminer le rôle de TRAIL dans l'hyperplasie synoviale, nous avons évalué les effets de TRAIL sur les cellules de la synoviale. Nous avons pu mettre en évidence que TRAIL a la capacité d'induire à la fois la prolifération, et l'apoptose des FLS. En effet, sur une même population cellulaire, TRAIL induit précocement l'apoptose d'environ 20% des synoviocytes, tandis que les cellules résistantes vont proliférer. Nous démontrons donc que TRAIL est un facteur de croissance pour les cellules de la synoviale. Nous avons également démontré que les voies de signalisation intracellulaire des MAP Kinases ERK et p38 et de la PI-3K/Akt participent à la prolifération cellulaire induite par TRAIL.

MOTS CLEFS : Polyarthrite rhumatoïde, synoviocytes fibroblastiques, inflammation, destruction articulaire, signalisation, apoptose, prolifération, TNF, TRAIL, OPG, RANKL.

LISTE DES ABRÉVIATIONS 1

INTRODUCTION 2

INTRODUCTION DU SUJET

I- PHYSIOPATHOLOGIE DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE 3

1- La réaction inflammatoire 3

1.1- Description 4

1.2- Les acteurs de l'inflammation 4

1.1.a- Les lymphocytes

1.1.b- Les cellules phagocytaires

1.1.c- Les autres acteurs

1.3- Initiation de l'inflammation chronique dans la PR 5
2 - Place des cytokines dans la PR 5
2.1- Le Tumoral Necrosis Factor-a 6
2.2- L'Interleukine-1 6
2.3- L'Interleukine-18 6
2.4- L'Interleukine-6 et l'Interleukine-15 7
3- Destruction articulaire 7
3.1- Structure de l'articulation 7
3.1.a- L'os
3.1.b- Le cartilage.
3.1.c- La synoviale
3.2- Mécanismes de la destruction articulaire dans la PR 8
3.2.a- L'hyper activation Synoviale
3.2.b- Dégradation du cartilage
3.2.b- Destruction osseuse
-
II- VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE *11*
1- La voie des MAP Kinases 11
1.1 –Description 11
1.1.a- ERK1/2
1.1.b- MAPK p38
1.1.c- SAPK/JNK
1.1.D- PRINCIPALES CIBLES DES MAP KINASES
1.2- MAP KINASE DANS LA PR. 13
2- Akt 14
2.1- Description 14
2.2- Akt dans la PR 14
3- NF-kB 15
3.1- Description 15
3.2- NF-k*B dans la PR* 16

III-APOPTOSE **17**
1- Description de l'apoptose 17
1.1- Initiation de l'apoptose 17
1.1.a- Voie extrinsèque
1.1.b- Voie intrinsèque
1.2- Les caspases 18
1.3- Événements finaux 19

2- Contrôle de l'apoptose
2.1- Facteurs anti-apoptotiques 19
2.2- Défaut d'apoptose dans la PR 20
2.2.a- Défaut d'apoptose dans la PR
2.2.b- Défaut d'apoptose des synoviocytes fibroblastiques

IV- La superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor) 22
1- Super Famille de la TNF/TNFR 22
1.1- Description 22
1.1.a- Ligands
1.1.b- Récepteurs
1.1.c- Dualité de la signalisation:exemple du TNF-R1
2- RANKL, RANK et OPG : membres de la super famille du TNF et remodelage osseux 23
2.1- Description 23
2.2- RANKL/OPG dans la polyarthrite rhumatoïde 24
3- TRAIL et TRAIL-R : membres de la superfamille TNFSF et apoptose 25
3.1- Description 25
3.2- TRAIL dans la polyarthrite rhumatoïde 26

Objectifs de l'étude 27
Procédure expérimentale 28

Matériel et méthodes

I-Matériel biologique
1- Isolement et culture des synoviocytes 29
2- Extraction et amplification des lymphocytes T synoviaux. 30

II- Étude de la régulation de l'expression de RANKL/OPG/TRAIL et TRAIL-Rs 31
1- Stimulation des synoviocytes 31
2- Étude de l'expression des gènes 31
2.1- Reverse transcription (RT) 32
2.1.a -Extraction d'ARN
2.1.b- Reverse Transcription
2.2- Polymerase Chain Reaction (PCR) 33
2.2.a- PCR quantitative
2.2.b- PCR semi-quantitative
3- Étude de l'expression des protéines 34
3.1- Dosage des protéines solubles par ELISA 37
3.2- Marquage des protéines membranaires par cytométrie en flux 39

III- Étude de l'effet de TRAIL sur les synoviocytes 41
1- Mesure de la prolifération
1.1- Stimulation 41
1.2- Test de prolifération 41
1.3- Test de viabilité 42
2- Mesure de l'apoptose : test annexine V 42

3- Étude des voies de signalisation 43
3.1- Stimulation des synoviocytes 43
3.2- Western blot 43
3.2.a- Extraction protéique
3.2.b- Immunoblot
3.3- Immunofluorescence 44

II- STATISTIQUES 45

RÉSULTATS

I- EXPRESSION DE RANK/RANKL ET OPG PAR LES SYNOVIOCYTES FIBROBLASTIQUES 46
1.1- Régulation de l'expression d'OPG 46
1.2- Régulation de l'expression de RANKL 47

II- INFLUENCE DE TRAIL SUR LES SYNOVIOCYTES ET LES LYMPHOCYTES T INFILTRANT LA MEMBRANE SYNOVIALE 49
2.1- Expression de TRAIL et de ses récepteurs par les synoviocytes 49
2.2- Effet de TRAIL sur la mort des synoviocytes 50
2.3- Effet de TRAIL sur la prolifération in vitro des synoviocytes 51
2.4- TRAIL et les voies de prolifération et de survie 53
2.5- TRAIL et la voie pro-apoptotique 55
2.6- TRAIL et les lymphocytes synoviaux 57

DISCUSSION

I- EXPRESSION DE RANK/RANKL ET OPG PAR LES SYNOVIOCYTES FIBROBLASTIQUES 58

II- INFLUENCE DE TRAIL SUR LES SYNOVIOCYTES ET LES LYMPHOCYTES T INFILTRANT LA MEMBRANE SYNOVIALE 61

CONCLUSION 71
BIBLIOGRAPHIE 73
ANNEXES

ABRÉVIATIONS

Ac :Anticorps
ADNc : ADN complémentaire
Ag : Antigène
AIF : Apoptosis-inducing factor
AP-1 : Activator Protein-1
ATF1/2 : Activation Transcription Factor 1/2

Bcl-2 : B-cell folicular lymphoma
BH :Bcl-2 Homology

CMH : Complexe Majeur d'Histocomptabilité
Ct : Cycle seuil
CRD : Cystein Rich Domain
CREB : cAMP Response Element Binding protein

DD : Death Domain
DED : Death effector Domain
DHR : Domaine d'homologie Rel
DISC : Death Inducing Signaling Complex.
DR : Death Receptor

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

FLS : synoviocytes de type fibroblastiques
FADD : Fas Associated Death Domain
FLIP : FLICE inhibitory protein

GSK3 : Glycogen synthase kinase-3

IAP : Inhibitory Apoptosis Protein
ICAM: Intercellular adhesion molecule
Ik**B** : Inibiteur de NF-kB
IKK : IkB kinase
IL : Interleukine
INF : Interféron

JNK : c-Jun N-terminal kinases

MAI maladies auto-immunes
MAP Kinases : Mitogen Activated Protein Kinases
MMP : métallo-protéinases matricielles

NK : Natural Killer
NF-k**B** : Nuclear Factor k B
NLS : séquences de localisation nucléaire

OPG : Ostéoprotégérine

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate Buffer Salt
PDK : Phosphatidylinositol Dependent Kinase
PGE2 : prostaglandine E2

PH : Pleckstrin Homolog
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PIP : phosphatitdylinositols
PKB : Protein Kinase B
PS : Phosphatydil-sérines
PTEN : Phosphatase et TENsin homolog

RAIDD : RIP-Associated Ich1/CED3 Homologous protein with a DD
RANK : Receptor Activator of NFkB
RANKL : Receptor Activator of NFkB liguand
RIP : Receptor Interacting Protein
RT : Reverse Transcription

SAPK2 : Stress Activated Protein Kinase
SCID : SYNDROME COMBINED IMMUNODÉFICIENCE
SHIP : SH2 domain conatinig Inositol Phosphatase
SVF : Sérum de Veau Foetal
Ser :Sérine

TCR : T Cell Receptor
THD : TNF Homology Domain
Thr : Thréonine
TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TRADD : TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF : TNF Receptor Associated Factor
Tm : Température de fusion
TNF : Tumoral Necrosis Factor -a
TNF-L : TNF Ligand
TNF R : TNF Receptor
TRAIL : TNF Related Associated Ligand
Tyr : Tyrosine

INTRODUCTION

Près 0,5 à 1% de la population française souffre de la polyarthrite rhumatoïde. Cette maladie inflammatoire chronique, qui touche la membrane synoviale, est responsable d'une destruction ostéo-chondrale.

Cette pathologie, qui affecte principalement les femmes entre 30 et 60 ans, est caractérisée par des douleurs et des gonflements articulaires. L'atteinte est polyarticulaire, symétrique et touche particulièrement les articulations des mains et des pieds. L'affection se traduit biologiquement par une inflammation localisée au niveau des articulations, associée à l'hypertrophie de la membrane synoviale, et à la destruction progressive et irréversible de l'os et du cartilage. À ce jour, la prise en charge de cette maladie passe par des traitements ponctuels visant à lutter contre la douleur et l'inflammation lors des crises. À ces traitements ponctuels s'ajoutent des traitements de fond ayant pour but de prévenir ou de ralentir le processus de destruction des articulations. C'est sur l'amélioration de ces traitements que devront se concentrer les efforts de recherche et développement.

La destruction articulaire est liée à l'envahissement de la cavité articulaire par la membrane synoviale qui devient alors un tissu pseudo-tumoral appelé pannus. Ce pannus est fortement incriminé dans les phénomènes de destruction osseuse et cartilagineuse qui sont observés dans la PR. Ainsi, le

contrôle de l'expansion des cellules de la synoviale et de leur activité pro-résorptive pourrait permettre de limiter la destruction articulaire.

Les thérapies visant à neutraliser l'activité biologique du TNF-a apparaissent à ce jour comme les traitements les plus efficaces et permettent dans la plupart des cas une rémission importante. Cependant, certains patients montrent une résistance à ces traitements. Ils présentent aussi des effets secondaires liés à la perturbation des défenses immunitaires, avec le développement de maladies « opportunistes » (pour revue : (Roberts et McColl 2004) (Klinkhoff 2004)). Il est donc important de définir d'autres cibles, pour permettre de combiner les traitements et contrôler de manière efficace à la fois l'inflammation et la destruction articulaire. Parmi les protéines de la grande famille du TNF et de ses récepteurs, d'autres cibles ou thérapeutiques sont envisagées, tels que RANKL, OPG et TRAIL. RANKL et OPG interviennent dans la régulation de la résorption osseuse en contrôlant directement l'activité des ostéoclastes. Dans une étude récente, TRAIL a été décrit comme un facteur pouvant avoir un effet bénéfique dans la PR, en prévenant l'inflammation et l'hyperplasie synoviale.

Nous nous sommes intéressés à l'implication de ces membres de la famille du TNF-a dans la destruction articulaire. Le travail initié ici porte sur les synoviocytes de type fibroblastique isolés à partir de la synoviale de patients atteints de PR, et concerne à la fois leurs propriétés destructrices et hyper-prolifératives. Dans un premier temps, nous évaluerons l'influence des facteurs pro-inflammatoires sur l'expression de RANKL et OPG, afin de déterminer leur rôle dans l'activité pro-résorptive des synoviocytes. Puis, l'effet de TRAIL sur les synoviocytes sera évalué et caractérisé afin de vérifier si TRAIL contrôle l'expansion de ces cellules.

I- Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme inflammatoire chronique. D'étiologie inconnue, cette affection se traduit par une inflammation chronique localisée au niveau de la membrane synoviale, tissu recouvrant les articulations. La PR se caractérise par une hypertrophie de la membrane synoviale, qui va progressivement envahir l'articulation et participer à la destruction du tissu cartilagineux et osseux. Les mécanismes d'initiation de la réaction inflammatoire ne sont pas encore totalement clarifiés. Suite à un signal de danger restant à identifier, les acteurs de la réaction inflammatoire (macrophages activés, lymphocytes, cellules dendritiques, cellules endothéliales…) vont se concentrer au sein de l'articulation, où ils vont reconnaître un auto-antigène et produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNFa, IL-18…). Ceci crée un environnement inflammatoire, qui va persister au sein de l'articulation (Sweeney et Firestein 2004).

1- La réaction inflammatoire

1.1- Description

La réaction inflammatoire est un processus organisé en réponse à une agression tissulaire. Les agressions peuvent être d'origine exogène (plaie, UV, brûlure, infection...) ou d'origine endogène (réaction immunitaire à un antigène, nécrose tissulaire, occlusion artérielle, tumeur, ischémie).

L'inflammation est une composante de l'immunité innée, qui a pour objet de diriger les molécules sériques et les cellules du système immunitaire vers le site de lésion tissulaire. Ceci va favoriser la mise en place de la réponse immunitaire spécifique. Les acteurs de la réaction inflammatoire (polynucléaires neutrophiles, monocytes activés, lymphocytes) sont attirés par chimiotactisme et vont migrer dans le tissu inflammatoire. Lors de la phase aiguë de l'inflammation, les neutrophiles sont les cellules majoritairement représentées, puis les macrophages provenant de la différenciation des monocytes circulants deviennent progressivement majoritaires. (Pour données sur l'inflammation, voir cours consultés en lignes : (Duyckaerts C. *et al*. 2002-2003)(Prin L, 2004-2005))

On distingue trois grandes phases dans le processus inflammatoire :

-La phase d'initiation qui permet de mobiliser les différents acteurs
-La phase d'amplification qui est liée à l'activation des cellules au site inflammatoire et correspond à la mise en place de systèmes de défense innée puis adaptée contre l'élément agresseur
-La phase de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire, qui se traduit par l'élimination de l'élément déclencheur et par l'arrêt de l'activation des cellules de défense. La phase de réparation met très souvent en jeu les fibroblastes qui vont fournir les éléments nécessaires à la reconstruction du tissu lésé.

1.2- Les acteurs de l'inflammation

1.2.a- Les Lymphocytes

Les lymphocytes B et T sont les principales cellules de la phase effectrice de la réponse immunitaire spécifique :

- Réponse Humorale: les lymphocytes B activés se différencient en plasmocytes responsables de la production et de la sécrétion des immunoglobulines (Ig). Ces cellules sont généralement capables de reconnaître directement l'antigène (Ag) via les Ig présentes à leur surface. Dans la PR, elles seront responsable de la production du facteur rhumatoïde et d'auto-anticorps.(Mariette 2004)

- Réponse Cellulaire: Il existe deux sous-populations de cellules T: les cellules CD4+ helper ou auxiliaire, et les cellules T CD8+ cytotoxiques. La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T se fait grâce aux cellules présentatrices de l'antigène, qui peuvent apprêter un antigène à leur surface, dans les molécules du CMH. Le complexe CMH/Ag pourra être reconnu par le TCR (T Cell Receptor) dans un contexte CMH spécifique. Cette reconnaissance va alors initier l'activation du lymphocyte. Dans la PR, les cellules T CD4+, qui représentent dans la PR environs 80% de l'infiltrat lymphocytaire, sont majoritairement des cellules de type Th1. Ces lymphocytes vont sécréter préférentiellement de l'IL-2 et de l'INF-g. (Cope 2002)

1.2.b- Les cellules phagocytaires

Les polynucléaires neutrophiles, et les monocytes/macrophages ont pour rôle de phagocyter et d'éliminer les éléments agresseurs et permettent une réponse immunitaire spécifique. Les macrophages présents dans la membrane synoviale de patients atteints de PR proviennent majoritairement de la différenciation tissulaire des monocytes circulants apportés par l'infiltrat de cellules inflammatoires. Dans la PR, ces cellules participent à la mise en place de la réponse immunitaire spécifique, à l'inflammation et à la destruction articulaire. Ce sont les principales cellules productrices de l'IL-1 et du TNF, deux cytokines jouant un rôle central dans la pathologie. Les macrophages de la synoviale vont

entretenir l'inflammation et l'immunité spécifique, mais aussi la destruction tissulaire, en activant les synoviocytes fibroblastiques de la synoviale, cellules responsables de la destruction (Kinne, Brauer et al. 2000; Liu et Pope 2004).

1.2.c- Les autres acteurs

Les mastocytes, les cellules endothéliales et fibroblastiques vont également participer au processus inflammatoire. Les mastocytes permettent l'initiation de l'inflammation via la sécrétion de facteurs vaso-actifs et pro-inflammatoires, et les cellules endothéliales sont aussi impliquées dans les stades précoces, en intervenant dans le recrutement des cellules circulantes. Les fibroblastes vont favoriser le déplacement tissulaire des cellules de l'inflammation en dégradant les matrices extracellulaires. Ils interviennent ensuite dans la réparation du site inflammatoire, en permettant la reconstruction des tissus.

1.3- Initiation de l'inflammation chronique dans la PR

Le système immunitaire joue un rôle central dans le déclenchement et la persistance du rhumatisme inflammatoire, mais les causes du dérèglement immunitaire sont encore mal définies. À la fois la réponse immunitaire spécifique acquise et l'immunité innée semblent participer à l'initiation de cette pathologie.

Quel que soit le facteur déclenchant, un foyer inflammatoire va se créer au sein de l'articulation, plus précisément au niveau de la membrane synoviale, qui est alors colonisée par les cellules mononucléaires de type lymphocytaire et monocytaire. La migration de ces cellules dans la synoviale est favorisée par le développement de néo-vaisseaux et par la production de chimiokines et de molécules d'adhésion au sein de la synoviale. Sous l'influence de l'environnement inflammatoire, les cellules infiltrant la membrane vont alors être activées, produire des cytokines qui vont entretenir et amplifier la réaction inflammatoire. De plus, l'hyperactivation des cellules de la synoviale (fibroblastes, macrophages, cellules dendritiques, cellules T) serait responsable de la réaction immunitaire cellulaire et humorale dirigée contre un ou des auto-antigène(s) non identifiés. Cette réaction spécifique va entraîner la production de cytokines pro-inflammatoire. Les deux phénomènes vont donc s'auto-entretenir, empêchant la résolution de l'inflammation. L'ensemble de ces événements serait donc à l'origine de la chronicité de la réaction inflammatoire et de l'activation des cellules synoviales (Sweeney et Firestein 2004) (Firestein 2003).

2- Médiateurs de l'inflammation

2.1- Cytokines dans la PR

Les cytokines sont des protéines importantes dans l'organisation de la réponse immunitaire. Capables d'agir sous leur forme soluble et/ou membranaire, elles interviennent dans différents processus. Elles permettent de contrôler la différenciation, l'activation, et la survie des acteurs de la réponse immunitaire. Elles contrôlent aussi la balance entre réponse humorale et cellulaire, et l'inflammation. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, il existe un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires en faveur des facteurs pro-inflammatoires.

La polyarthrite rhumatoïde est associée à l'IL-1b et au TNF-a (Feldmann, Brennan et al. 2001), qui sont principalement produits par les synoviocytes de type macrophagique. De même, les cytokines

pro-inflammatoires IL-6, IL-8, IL-18, et IL-15 semblent participer à la pathogénie de la PR. Tous ces facteurs sont impliqués dans l'inflammation synoviale, dans l'hyperactivation des cellules de la membrane synoviale, et dans les mécanismes de destruction articulaire (Feldmann, Maini et al. 2001) (Feldmann, Brennan et al. 1996).

2.2- Le Tumor Necrosis Factor-a

Le TNF est considéré comme le médiateur principal de l'inflammation et joue un rôle clé dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, le TNF-a est retrouvé en concentration élevée dans le liquide synovial et dans le sérum des patients atteints de PR. L'efficacité des traitements anti-TNF démontre son rôle central dans la pathologie (Roberts et McColl 2004). De plus, les souris transgéniques surexprimant le TNF-a développent spontanément une arthrite rassemblant les trois principaux symptômes de la PR, c'est-à-dire l'inflammation de la synoviale, la destruction cartilagineuse, et l'érosion osseuse (Matsuno, Yudoh et al. 2002).

Le TNF-a est une molécule clé dans la PR, qui agit en synergie avec l'IL-1 pour amplifier et prolonger les réactions inflammatoires (Zwerina, Hayer et al. 2004). Cette cytokine est exprimée majoritairement par les cellules de type macrophagique, à la fois sous forme soluble et sous forme membranaire, et possède un spectre d'action assez large. Elle soutient l'expression de cytokines, de molécules d'adhésions et de facteurs pro-destructeurs par les cellules de la synoviale(Feldmann, Brennan et al. 1996).

2.3- Interleukine-1

L'IL-1 est principalement produite par les monocytes, ainsi que par les synoviocytes de type macrophagique. Tout comme le TNF, le taux d'IL-1 est fortement augmenté chez les patients atteints de PR et de nombreux modèles expérimentaux démontrent son importance. Cette cytokine est impliquée à la fois dans l'entretien de l'inflammation et dans la destruction articulaire (Niki, Yamada et al. 2004) (pour revue :(Dinarello 2002)). En effet, l'IL-1 stimule l'expression des métallo-protéinases matricielles (MMP) et des aggrécanases, responsables des destructions cartilagineuses, et de prostaglandine E2 (PGE2). L'IL-1 altère le processus de réparation articulaire en inhibant la synthèse du collagène et des protéoglycanes qui composent le cartilage. De plus, l'IL-1 augmente la résorption osseuse en activant la différenciation et la survie des ostéoclastes.

2.4- Interleukine-18

L'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire, de structure proche de l'IL-1b. Ce facteur a tout d'abord été décrit comme un inducteur puissant de la sécrétion d'INF-g par les cellules T cytotoxiques et les cellules Natural Killer (NK) (Dinarello 1999). On lui attribue également plusieurs activités similaires à l'IL-1b, comme l'induction du TNF-a, et de l'IL-8. C'est un médiateur puissant de l'inflammation, qui participe au syndrome inflammatoire observé dans la polyarthrite rhumatoïde. En effet, l'IL-18 joue un rôle dans la migration des cellules inflammatoires vers les tissus synoviaux en induisant l'expression de chimiokines (Gracie, Forsey et al. 1999) et de molécules d'adhésion (CAM) (VCAM et ICAM) dans les synoviocytes de type fibroblastique (FLS) (Morel, Park et al. 2001) (Morel, Park et al. 2001). Elle participe également à la destruction articulaire en stimulant la production de métalloprotéines par les macrophages (Liew et McInnes 2002).

2.5- Interleukine-6 et -15

L'IL-6 est exprimée par de nombreux types cellulaires, dont les cellules de type fibroblastique, et possède un spectre d'activité assez large (Naka, Nishimoto et al. 2002). Sa participation dans la pathogénie de la PR est liée à son rôle dans la phase aiguë de l'inflammation et surtout, à son rôle dans la maturation et l'activation des ostéoclastes, cellules responsables de la destruction osseuse (Kudo, Sabokbar et al. 2003).

L'IL-15 est présente, dans des proportions équivalentes à celles du TNF-a dans le liquide synovial des patients atteints de PR. Elle stimule l'expression de TNF-a par les FLS et, étant un facteur similaire à l'IL-2, permet aussi de favoriser l'activation des lymphocytes. Dans la PR, l'administration du récepteur soluble IL-15R à des primates permet de supprimer l'arthrite induite (Liew et McInnes 2002).

3- Destruction articulaire

3.1- Structure de l'articulation

L'articulation est à la jonction des extrémités osseuses, et cette structure est nécessaire à la mobilité du squelette.

(Pour données, voir cours consultés en lignes Rombouts J.J. et Delloye Ch. 2000)

3.1.a- L'os

Le squelette constitue la charpente de l'organisme et sert de soutien aux différents tissus. L'os est constitué par du collagène minéralisé par des cristaux d'hydroxyapathie, ce qui en fait un tissu extrêmement solide. C'est un tissu vivant et chez l'adulte, environ 5 à 10 % de la masse osseuse sont renouvelés par an. L'intégrité de ce tissu est contrôlée par les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse, tandis que les ostéoclastes sont responsables de sa destruction (Udagawa, Kotake et al. 2002).

3.1.b- Le cartilage

Le cartilage articulaire est constitué d'une matrice extracellulaire solide synthétisée par les chondrocytes. La matrice, très hydrophile, contient 70 % de fibres de collagène et d'élastine et 30 % de protéoglycanes. Elle assure la résistance aux pressions, et joue un rôle dans la cohésion et dans la communication intra-articulaire. Le liquide synovial, qui est sécrété par les cellules du tissu synovial, apporte par diffusion les nutriments nécessaires au cartilage.

3.1.c- La synoviale

La membrane synoviale est une fine membrane qui tapisse l'articulation et possède un rôle nourricier et protecteur des chocs mécaniques. Elle retient le fluide synovial en place dont la viscosité permet la lubrification de l'articulation, minimisant ainsi les phénomènes de friction Ce tissu est principalement composé de cellules de type macrophagique et de cellules de type fibroblastique (FLS).

Ces dernières représentent environ 2/3 de l'ensemble des synoviocytes. Les synoviocytes de type fibroblastique sont issus de la lignée mésenchymateuse et produisent le collagène et les protéoglycanes qui composent la matrice extra-cellulaire du cartilage (Edwards 2000). À l'état physiologique, les cellules de la synoviale sont organisées en mono ou bicouche. Dans la PR, la membrane synoviale est hyperplasique avec la multiplication et ladésorganisation des couches cellulaires. Les synoviocytes fibroblastiques auraient un rôle majeur dans l'initiation et la chronicité de la maladie (Buckley, Pilling et al. 2001). Leur importance dans la pathogénie de la PR est liée à leur production de médiateurs de l'inflammation et de la destruction ostéo-articulaire (Ritchlin 2000).

3.2- Mécanismes de la destruction articulaire dans la PR

-

La destruction articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde est liée à la transformation de la membrane synoviale en un tissu pseudo-tumoral appelé pannus, qui va progressivement envahir et détruire l'articulation.

-

3.2.a- L'hyper activation synoviale

La formation du pannus est principalement liée à l'hyperprolifération des synoviocytes de type fibroblastique, qui acquièrent des propriétés pseudo-tumorales et envahissent l'articulation (Aidinis, Plows et al. 2003) (Tolboom, Pieterman et al. 2002). Cette transformation pourrait être soit ordonnée par le micro-environnement inflammatoire (Hadjigogos 2003) (Cha, Ahn et al. 2003), soit liée aux propriétés intrinsèques des FLS. Elle se définit par la perte de l'inhibition de contact, par l'activation d'oncogènes et par un défaut d'apoptose (Xue, Takahashi et al. 1997) (Asahara, Hasunuma et al. 1997). Ainsi, les synoviocytes prolifèrent de manière anarchique, entraînant l'épaississement de la membrane synoviale. Ils participent à l'entretien de l'inflammation et à la destruction articulaire (Nonomura, Kohsaka et al. 2003).

L'importance de ce tissu dans la pathogénie de la PR a été démontrée par différents modèles et notamment par le modèle de xénogreffe de synoviale de patient atteint de PR et de cartilage humain dans des souris SCID (Muller-Ladner, Kriegsmann et al. 1996) (Lehmann, Jungel et al. 2000). Ce modèle d'immunodéficience démontre l'autonomie du tissu synovial, car il envahit et détruit l'articulation sans la mise en place d'une réaction immunitaire T dépendante**.**

Les fibroblastes de la synoviale chez les patients atteints de PR possèdent des propriétés morphologiques et fonctionnelles qui les rapprochent des cellules cancéreuses et présentent une capacité de prolifération importante et incontrôlée (Qu, Garcia et al. 1994). Ceci est lié à l'expression de plusieurs oncogènes, à la perte de l'inhibition de contact et à l'autonomisation vis-à-vis de l'accrochage et des facteurs de croissance, qu'ils produisent eux-mêmes en grandes quantités (Muller-Ladner, Kriegsmann et al. 1995). Les proto-oncogènes sont des gènes qui codent pour des protéines régulant la croissance, la différenciation et la mort cellulaire. De nombreux proto-oncogènes, comme la p53 (Yamanishi, Boyle et al. 2002), c-ras, c-myc, c-fos, sont impliqués dans le phénotype particulier des synoviocytes sans que l'on sache s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de l'environnement inflammatoire (pour revue : (Michael et Alisa 2000)) .

L'examen radiographique et anatomopathologique de l'articulation montre que la zone de destruction articulaire correspond à la jonction pannus/articulation, ce qui est un argument pour le rôle pro-destructeur de la membrane synoviale. En général, la synovectomie permet de prévenir la destruction articulaire (Kanbe, Takemura et al. 2004). Par ailleurs, de nombreuses données, *in vivo* et *in vitro*, démontrent que les synoviocytes interviennent dans le phénomène de destruction articulaire (Muller-Ladner, Kriegsmann et al. 1996; Ritchlin 2000).

3.2.b- Dégradation du cartilage

La destruction du cartilage est liée à la production par les chondrocytes et les synoviocytes, de protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire. Les synoviocytes interviennent grâce à l'expression de métalloprotéases matricielles (MMP), comme la collagénase (MMP1), la stromélysine (MMP3), d'aggrécanases qui dégradent les protéoglycanes et de cystéines protéases (cathepsines, granzyme (Hou, Li et al. 2001) (Ronday, van der Laan et al. 2001) (Hashimoto, Kakegawa et al. 2001)). Ces facteurs sont constitutivement sur-exprimés dans la PR et leur expression est augmentée par l'IL-1b et le TNF-a. De même, l'expression des MMP par les chondrocytes est induite par l'IL-1b.

Parallèlement à cela, les inhibiteurs des protéases (TIMP), qui permettent de réguler les phénomènes de destruction tissulaire, ne sont pas augmentés et tendent même à être sous exprimés (Jeong, Kim et al. 2004). L'IL-1b est également responsable d'une diminution de la synthèse du collagène et des protéoglycanes, composants de la matrice extracellulaire du tissu cartilagineux.

3.2.c- Destruction osseuse

La zone de contact entre la matrice osseuse et le pannus est une zone d'érosion importante, témoignant du rôle essentiel des cellules de la synoviale dans la résorption osseuse. Cette action pro-résorptive a été démontrée *in vitro* grâce à des systèmes de coculture de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et de fibroblastes isolés de synovial de patients atteints de PR. Ce système de coculture, associé à des conditions de culture particulières (addition de Vitamine D3, M-CSF), permet la différenciation et la maturation des cellules monocytaires du sang en cellules ostéoclastiques, qui seront responsables de la résorption osseuse (Takayanagi, Oda et al. 1997) (Gravallese, Harada et al. 1998).

Parmi les facteurs généraux contrôlant la résorption osseuse, on peut citer l'IL-6 (Kudo, Sabokbar et al. 2003) (Funk, Cordaro et al. 1998) et les prostaglandines (PGE2), qui vont participer à l'ostéoclastogénèse. L'IL 1 et le TNF vont induire une surexpression de ces divers facteurs. De plus, le système RANKL/RANK, membres de la famille du TNF semble être impliqué dans la destruction osseuse médiée par les FLS et les cellules T (Kotake, Udagawa et al. 2001) (Takayanagi, Iizuka et al. 2000).

II- Voies de signalisation

La polyarthrite est caractérisée par une prolifération anarchique des cellules de la synoviale, entraînant une inflammation chronique et la formation du pannus qui va envahir et détruire progressivement l'articulation. Les voies de signalisation sont activées en réponse aux différents stimulus inflammatoires, et aux signaux de croissance ou de stress parvenant aux cellules de la synoviales. Ces voies permettent de transmettre un signal intracellulaire aux cellules, qui vont être activées et adapter leur activité cellulaire au signal reçu. Dans la PR, cette signalisation intervient à la fois dans le caractère invasif et destructeur du pannus.

1- La voie des MAP Kinases (*Mitogen Activated Protein Kinases*)

1.1- Description

La voie des MAP Kinases (Mitogen Activated Protein Kinases) désigne la voie de transduction initiée par les facteurs mitogéniques (facteurs de croissances). La protéine Ras (ou $p21^{ras}$) est un carrefour important dans l'activation de la cascade des MAP Kinases. Elle peut-être activée par différents récepteurs comme les récepteurs tyrosine kinases, les récepteurs associés à une tyrosine kinase, les récepteurs couplés aux protéines G. Les membres de la superfamille de Ras, Ras/Rap, Roc/Rac, Rab, Ran et Arf, sont des petites protéines de 16 à 25 kDa qui possèdent une activité GTPasique et sont elles-mêmes activées par échange de GDP en GTP. Ras transmet un signal d'activation aux protéines de signalisation du compartiment des MAP Kinases qui regroupe ERK, p38, et JNK. La première des cibles est la MAPKKK, qui recrute la MAPKK, qui à son tour active la MAPK. Cette activation en cascade se fait par phosphorylation en résidus sérine, thréonine ou tyrosine, des différents acteurs. Les substrats des MAP Kinases sont quant à eux nombreux et variés, d'où leur implication dans de nombreux mécanismes cellulaires (Kyriakis et Avruch 2001).

1.1.a- ERK

Les *Extracellular signal-Regulated Kinases* sont des messagers importants de la voie des MAP Kinases qui activent les programmes de prolifération cellulaire, de différenciation, et de survie. Les sérine/thréonine Kinases ERK1/2 vont particulièrement interagir avec les protéines possédant des région riches en prolines. Ces kinases permettent l'activation de cibles situées dans le cytosol (RSK), mais possèdent également la capacité d'être transloquées au noyau pour y activer directement certains facteurs de transcription (Elk-1, c-Fos, c-Myc, STAT3…). L'activation d'ERK1/2 permet à la cellule de mettre en place toute la machinerie nécessaire à la transcription, la traduction et à la synthèse protéique qui va ensuite favoriser la croissance cellulaire via, par exemple, l'expression de la cycline D (Roux et Blenis 2004).

1.1.b- MAP Kinase p38

Aussi connue sous le nom de SAPK2 (Stress Activated Protein Kinase 2), cette kinase a d'abord été décrite comme une MAP Kinase activée par des signaux de stress tels que les endotoxines ou l'hyperosmolarité. Plus généralement, l'activation de la p38 s'effectue en réponse aux signaux de stress cellulaire (UV, hypoxie, stress oxydatif, ischémie), de l'inflammation (TNFa, IL-1b), et de l'apoptose.

Suite à l'activation des MAPKKK et MAPKK spécifiques de la voie de la p38, cette dernière est phosphorylée et interagit à la fois avec des protéines cytoplasmiques et nucléaires. NFkB fait également partie de ses cibles. Ses substrats lui confèrent une importance majeure dans la régulation de la synthèse de cytokines et dans la migration cellulaire, d'où un rôle essentiel dans l'immunité et dans l'inflammation (Herlaar et Brown 1999). En effet, cette kinase intervient dans les réponses fonctionnelles des cellules T, macrophages et neutrophiles activés, en activant des programmes aussi variés que l'apoptose, l'adhérence, le chimiotactisme, la différenciation cellulaire, ou encore la production cytokinique (Roux et Blenis 2004) (Kyriakis et Avruch 2001).

1.1.c- SAPK/JNK

Les c-Jun N-terminal kinases (JNKs) font elles aussi parties des SAPKs *(Stress Activated Protein Kinase)*. En réponse aux signaux externes de stress cellulaire (cytokines pro-inflammatoires, stress génotoxiques), ces kinases ont comme propriété majeure d'interagir et d'activer les facteurs de

transcription c-Jun, et également ATF-2. JNK est impliquée dans l'inflammation, dans la synthèse de protéases, et dans le contrôle de l'apoptose, avec des effets à la fois pro- et anti-apoptotique (induction de la synthèse de FasL, oun de Bcl-2 et de Bcl-Xl (Kyriakis et Avruch 2001)).

1.1.D- DESCRIPTION DES PRINCIPALES CIBLES DES MAP KINASES

-

AP-1 (Activator Protein-1) est la cible principale des MAP Kinases. C'est un hétérodimère composé de membres de la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP. Cette famille regroupe c-jun, junB, junD, c-Fos et ATF1/2 (Activation Transcription Factor 1/2), qui s'associent grâce à leur domaine bZIP (leucine à glissière) pour former un complexe jun-jun, jun-fos, ou jun-ATF. Le complexe AP-1 contrôle la transcription de nombreux gènes, codant entre autres pour l'IL-1 et-2, le TNF-a, CD40, CD30, des protéases MMP, des molécules d'adhésion, et pour c-Jun (Shaulian et Karin 2001).

L'activité du Facteur AP-1 est contrôlée à différents niveaux. Tout d'abord, la fonction d'AP-1 va être dépendante de sa composition (van Dam et Castellazzi 2001). La nature des familles de protéines (jun, fos ou ATF) formant le dimère AP-1 va influencer sa fonction et pour une même famille, les fonction pourront également être différentes. Lorsque *c*-jun et/ou jun-b entrent dans la composition d'AP-1, il sera plutôt impliqué dans les phase S et G2/M du cycle cellulaire, alors que jun-D bloque la prolifération et est impliqué dans le maintien des cellules dans un état de repos (Lallemand, Spyrou et al. 1997) (Pfarr, Mechta et al. 1994). De plus, l'activité d'AP-1 peut-être régulée au niveau post-traductionnel par phosphorylation. Ainsi, c-Jun phosphorylé sur une région située dans la partie C-terminale ne peut plus se fixer à l'ADN, cette zone étant responsable de sa fixation à l'ADN. En revanche, lorsqu'il est phosphorylé en N-terminale par les JNKs, son activité *trans*-activatrice est alors amplifiée d'un facteur environ égal à 30. La GSK3 est une kinase qui va inhiber AP-1, tandis que les JNKs et p38 vont activer directement c-jun, jun D, ou ATF2 par phosphorylation (Kyriakis et Avruch 2001) (Minden, Lin et al. 1994).

Les MAP Kinases régulent donc l'activité d'AP-1 soit en contrôlant l'expression des différents facteurs susceptibles de former AP-1, soit en les phosphorylant.

Parmi les autres cibles des MAP Kinases, on retrouve la p53, c-Myc et d'autres protéines nucléaires ou cytoplasmiques. La p53 est une protéine contrôlant l'état du génome et le déroulement du cycle cellulaire. Le facteur *c*-myc est impliqué dans la prolifération et l'activation cellulaire, et permet notamment la transition de la phase de repos G0 à la phase G1 (revu dans (Michael et Alisa 2000)). Elk-1 est un facteur de transcription qui va induire l'expression de *c-fos*.

Les MAP Kinases possèdent de nombreuses cibles, et leurs différentes voies de signalisation présentent de nombreuses inter-connections. Néanmoins, d'un point de vue fonctionnel, on peut impliquer ERK dans la prolifération, p38 dans la régulation des réponses immunes et inflammatoires, et JNK dans la destruction tissulaire.

1.2- MAP KINASES DANS LA PR

-

L'importance des MAP Kinases dans la PR est largement démontrée dans l'étude de Yamamoto et al. (Yamamoto, Fukuda et al. 2003). Les auteurs se sont interrogés sur la place de Ras dans l'activation de cellules de la synoviale rhumatoïde, et dans la résorption. Pour évaluer son implication dans la polyarthrite rhumatoïde, ils ont transféré le mutant dominant négatif AxRasDN dans des cellules

de type fibroblastique et des ostéoclastes isolés de patients atteints de PR. Ceci a pour effet de considérablement diminuer le taux de prolifération des FLS, et la production cytokinique constitutive et induite par l'IL-1b. De plus, ils démontrent que les MAP Kinases sont impliquées dans le développement de l'arthrite induite à l'adjuvant chez le rat. En effet, l'injection intra-articulaire du mutant AxRasDN au sein d'articulation inflammée des rats permet de diminuer à la fois l'hyperplasie synoviale, l'inflammation et la destruction osseuse.

Le travail de Schett *et al*. montre que, contrairement aux tissus de patient atteints de rhumatismes non-inflammatoires , les MAP kinases ERK, p38 et JNK, sont activées dans les tissus de patients atteints de PR. L'étude par immuno-histochime des kinases phosphorylées a permis de déduire le profil d'activation des MAP kinases dans les tissus synoviaux. L'activation de ERK est surtout localisée autour des micro-vaisseaux de la synoviale, celle de la p38 est surtout observée dans les cellules de la couche sous-intimale, et dans les cellules endothéliales de la synoviale. JNK est actif dans les zones d'infiltration des cellules mononucléaires (Schett, Tohidast-Akrad et al. 2000) (Han, Boyle et al. 1999).

Le facteur de transcription AP-1, cible privilégiée des MAP Kinases/SAPK est particulièrement sur exprimé et sur-activé dans les tissus synoviaux de patients atteints de PR (Dooley, Herlitzka et al. 1996). Ceci est certainement lié à la stimulation constante par les cytokines pro-inflammatoires IL-1b et TNFa. Jun et Fos contrôlent l'expression des protéines qui seront responsables de la destruction articulaire (Neff, Zeisel et al. 2003) (Han, Boyle et al. 2001) et de la prolifération des synoviocytes (Morita, Kashihara et al. 1998) (Asahara, Hasunuma et al. 1997). En revanche, jun-D voit son expression diminuée dans les synoviocytes de PR, ceci pouvant contribuer à la croissance excessive de ces cellules (Wakisaka, Suzuki et al. 1998).

Dans la PR, le contexte inflammatoire va initier les différentes MAP Kinases, qui à leur tour seront impliquées à la fois dans l'entretien de l'inflammation, dans l'hyperactivation et dans la destruction tissulaire associée à la PR (revu dans (Firestein et Manning 1999)).

2- Akt

2.1- Description

L'activation de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) par des facteurs de croissance ou de survie permet la génération de phosphatitdylinositols (PIP) membranaires qui vont interagir avec le domaine spécifique PH (Pleckstrin Homolog) d'Akt. Ceci permet son recrutement à la membrane cytoplasmique. Akt, aussi appelé PKB (Protein Kinase B) est alors activée par la kinase PDK (Phosphatidylinositol Dependent Kinase) par phosphorylations successives de la thréonine en position 308 puis 474. PTEN (Phosphatase et TENsin homolog) et SHIP (SH2 domain conatinig Inositol Phosphatase) sont des phosphatases qui déphosphorylent les PIP responsables de la localisation membranaire de Akt, et régulent ainsi négativement son activité.

Akt est une sérine/thréonine kinase qui est largement impliquée dans la survie et la croissance cellulaire. Elle a notamment pour cibles des facteurs de transcription comme CREB (cAMP Response Element Binding protein) et des facteurs pro-apoptotiques, dont BAD et la caspase 9, qui vont être directement inactivés par phosphorylation. De plus, Akt diminue la transcription de gène pro-apoptotique (ex : Fas) et désactive la GSK3 (Glycogen synthase kinase-3) qui est une kinase inhibitrice des réponses proliferatives et anti-apoptotiques. Enfin, Akt permet de stabiliser la cycline D en la phosphorylant et d'activer le facteur de transcription NF-kB. Cette voie prépare donc la réponse aux facteurs mitogéniques et elle est très souvent impliquée dans la survie et la prolifération de cellules

tumorales (pour revue (Franke, Hornik et al. 2003)).

2.2- Akt dans la PR

Les études *in situ* par immuno-histochimie de tissus synoviaux de patients atteints de PR montrent que Akt est constitutivement activée (Zhang, Wang et al. 2001). On observe également un défaut de l'expression de PTEN (Pap, Franz et al. 2000), qui est un suppresseur de tumeur dont la mutation est souvent associée au développement de cancers. En effet, le défaut de PTEN contribue à leur caractère invasif. Le défaut qualitatif ou quantitatif de PTEN entraîne une phosphorylation constitutive de Akt (Cantley et Neel 1999).

L'importance d'Akt dans le développement de maladies auto-immunes (MAI) est démontrée par le modèle de souris KO pour PTEN (Di Cristofano, Kotsi et al. 1999). Ce modèle présente un défaut de l'apoptose induite par Fas, associé au développement d'une maladie auto-immune. L'activation constitutive d'Akt pourrait donc expliquer en partie l'hyper-prolifération des FLS et leur relative résistance à l'apoptose.

3- NF-kB (*Nuclear Factor* k *B)*

3.1- Description

En général, NF-kB (Nuclear Factor kB) est impliqué dans les mécanismes de défense immunitaire et dans l'inflammation. Ce facteur de transcription est également décrit comme un facteur protégeant de l'apoptose.

Le facteur de transcription NF-kB est un dimère issu de l'association entre deux des membres de la famille NF-kB/Rel. Les éléments composant cette famille sont séparés en deux classes : la classe NF-kB et la classe Rel. Ils ont en commun un domaine appelé DHR (Domaine d'homologie à Rel), qui est présent dans la partie N-terminale. Ce domaine contient une séquence de dimérisation, permettant la formation du complexe NF-kB, ainsi que des séquences de localisation nucléaire (NLS) et d'interaction à l'ADN. Ceci permet de réguler son activité transcriptionnelle, qui est portée par le domaine transactivateur situé en partie C-terminale des membres de la classe Rel. Ainsi, seuls les dimères possédant une sous-unité Rel seront capables d'induire la transcription des gènes cibles. La combinaison la plus largement représentée est l'hétérodimère p50/p65 (RelA), qui est donc généralement le dimère désigné par la dénomination NF-kB.

NF-kB est présent dans le compartiment cytoplasmique, dans lequel il est associé à IkB-a, son inhibiteur. En effet, IkB-a cache le signal de localisation nucléaire (NLS) se trouvant sur la p50 de NF kB et retient donc NF-kB en dehors du noyau. Les signaux de libération de NF-kB sont des cytokines (TNF, IL1), des facteurs de croissance, le stress oxydatif, les radiations, ou des éléments bactériens (LPS). Ces différents signaux vont permettre l'activation d'IkB kinase (IKK). La phosphorylation de IkB par IKK1 ou IKK2 entraîne la dégradation de IkB-a par le protéasome et la libération du signal de localisation nucléaire de NF-kB.

Ceci permet ainsi le transport nucléaire de NF-kB et l'activation de la transcription de ses gènes cibles. Environs 150 gènes possèdent une séquence de liaison pour NF-kB et sont donc potentiellement activés. Ainsi, le spectre d'activité de NF-kB est très large : régulation de l'expression des immuno-récepteurs, des molécules d'adhésion, de diverses cytokines et facteurs de croissance et de survie. (pour revue voir : (Chen, Castranova et al. 2001))

3.2 -NF-kB dans la PR

NF-kB est un élément important à la fois dans l'initiation et dans la persistance de l'inflammation synoviale. Ce facteur de transcription régule de nombreux gènes, comme les facteurs anti-apoptotiques TRAF1, TRAF-2, c-IAP, Bcl-2 homologue A1, Bcl-xL, XIAP et les facteurs impliqués dans l'inflammation, tels que le TNF-a, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, la cyclooxygénase-2, l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthetase). (Makarov 2001).

Les tissus synoviaux de patients atteints de PR présentent une activation importante de NF-kB (Asahara, Asanuma et al. 1995) (Yamasaki, Kawakami et al. 2001). Cette activation est très élevée dans la zone de contact du cartilage et du pannus (Benito, Murphy et al. 2004). En revanche, NF-kB n'est pas activé dans les tissus synoviaux de patients atteints de rhumatismes non-inflammatoire de type arthrose. L'étude par immuno-histochimie montre que les cellules présentant le pourcentage de translocation le plus important sont les cellules de type macrophagique et les cellules endothéliales (Aupperle, Bennett et al. 2001). L'IL-1b et le TNF-a sont tous les deux capables d'activer NF-kB, qui lui-même induit l'expression de ces protéines. Il y aurait donc un auto-entretien entre l'activation de NF-kB et la production de L'IL-1 et le TNF-a. De plus, NF-kB active l'expression de l'IL-6, de L'IL-8, de ICAM et de la collagénase par les cellules fibroblastiques de la synoviale. NF-kB est donc impliqué dans l'inflammation, dans la résorption du cartilage par les MMP, mais aussi dans la destruction osseuse médiée par RANKL et par l'IL-6 (pour revue, (Jue, Jeon et al. 1999) (Makarov 2001)).

III- L'APOPTOSE

La polyarthrite est caractérisée par une augmentation de la cellularité synoviale, entraînant une inflammation chronique, et la formation d'un pannus qui va envahir et détruire progressivement l'articulation. Cette hyperplasie serait due à une prolifération excessive des fibroblastes et cellules inflammatoires (macrophages, cellules T), et/ou à un défaut du processus apoptotique. La résistance des cellules de la synoviale à l'apoptose est la piste privilégiée pour expliquer l'hyperplasie synoviale et la persistance de l'inflammation au sein de l'articulation.

1- Description de l'Apoptose

1.1- Initiation de l'apoptose

L'apoptose désigne la mort cellulaire programmée et va intervenir dans de nombreux mécanismes physiologiques. Ce « suicide » cellulaire est important dans l'embryogenèse, dans l'élimination des cellules endommagées, et dans le système immunitaire. En effet, l'apoptose joue un rôle dans la tolérance et dans la résolution de l'inflammation aiguë et de la réponse spécifique. L'apoptose est également le mécanisme impliqué dans l'élimination des cellules infectées par les cellules T cytotoxique et cellules NK. Aussi, un excès ou défaut d'apoptose aura des conséquences sur le bon fonctionnement de l'organisme. Le dysfonctionnement du processus apoptotique sera par exemple impliqué dans les maladies auto-immunes, cancéreuses, ou neurodégénératives.

La nécrose est généralement la conséquence d'une agression mécanique, entraînant l'éclatement de la membrane plasmique avec libération du contenu cellulaire et déclenchement d'une réaction inflammatoire. L'apoptose est déclenchée par un signal qui va activer une cascade d'événements cellulaires permettant la

fragmentation et l'élimination contrôlée de la cellule cible.

Il existe deux types de signaux capables d'initier l'apoptose : les signaux activant les récepteurs de mort, et les signaux activant la voie mitochondriale. Les deux voies vont ensuite recruter des protéases orchestrant l'élimination de la cellule. (pour revue : (Schultz et Harrington 2003))

1.1.a- Voie extrinsèque

Cette voie est induite suite à l'activation de récepteurs possédant des domaines de mort (DD pour Death Domain). À ce jour, six récepteurs de mort (Death Receptors, DR) ont été décrits : Fas, TNF-R1, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 et DR6. Tous ces récepteurs appartiennent à la superfamille du TNF.

La liaison du ligand à son récepteur de mort entraîne l'activation des récepteurs, qui permet l'assemblage d'un complexe moléculaire appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex). Cette structure est le résultat de l'interaction du DD se trouvant sur la portion C-terminale intracellulaire du récepteur, au DD de la protéine adaptatrice FADD. Cette protéine va à son tour recruter via son DED (Death effector Domain) une pro-caspase initiatrice (la pro-caspase-8 ou –10), permettant son activation, et la mise en marche de la cascade d'activation des caspases.

1.1.b- Voie intrinsèque

La voie intrinsèque est généralement activée en réponse à des stress cellulaires tel que les dommages de l'ADN, l'hypoxie, les UV, la déprivation en facteurs de croissance, et les défauts des points de contrôle du cycle cellulaire.

Ces stress vont mobiliser les membres pro-apoptotiques de la famille du Bcl-2, qui sont des protéines régulant l'intégrité de la mitochondrie. Ceci va perturber le potentiel membranaire mitochondrial et entraîner la libération dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c, AIF (Apoptosis-inducing factor), SMAC/DIABLO. Le cytochrome c va induire la formation de l'apoptosome, complexe formé d'Apaf-1, de la pro-caspase 9, et du cytochrome c. Ce complexe permettra alors l'activation de la caspase 9. La caspase 9 activée va ensuite initier l'activation des caspases dites exécutrices 3, 6 et 7. AIF est un facteur permettant également l'activation des caspases et aurait une action directe sur le clivage de l'ADN. Le facteur SMAC/DIABLO est quant à lui un facteur qui va permettre de garantir la fonctionnalité des caspases, en bloquant les molécules inhibitrices des caspases (IAPs). (Adrain et Martin 2001)

Cependant, ces deux voies ne peuvent être strictement dissociées. En effet, la voie dite extrinsèque, qui fait intervenir les caspases initiatrice 8 et 10, est amplifiée grâce au clivage par la caspase 8 (FLICE) du facteur pro-apoptotique Bid. Ce facteur, qui fait partie de la famille Bcl-2, est alors capable d'interagir avec les protéines contrôlant l'intégrité mitochondriale, et donc d'initier la voie pro-apoptotique mitochondriale. De même, les facteurs libérés par la mitochondrie permettent de sensibiliser la cellule à la voie extrinsèque, notamment par la neutralisation de facteurs inhibant les caspases.

1.2 - Les caspases

-

Les caspases sont des protéases riches en cystéines, qui clivent leur substrat en un site spécifique, situé après un résidu d'acide aspartique. En dehors de toute stimulation, elles sont présentes dans le cytoplasme sous forme de pro-enzymes. Elles possèdent alors le pro-domaine N terminal, qui contient soit un domaine

de recrutement au récepteur DED, soit un domaine CARD (CAspase Recruitement Domain). La partie C terminale porte deux sous unités, une large (p17-20) et une petite (p10), qui vont composer la caspase active. L'activation se fait par clivage protéolytique, qui permettra de séparer la petite unité de la grande unité, et d'éliminer le pro-domaine. La forme activée est composée de deux petites sous unités associées à deux grandes sous unités. (Pour revue : (Degterev, Boyce et al. 2003))

On distingue 3 groupes de caspases :

- Initiatrices de l'apoptose : caspases 8, 9, 2,10, 14
- Initiatrices de l'apoptose et de l'inflammation. : caspases 1, 4 , 5.
- Effectrices : caspases 3, 6, 7.

Les différents processus apoptotiques auront comme finalité l'activation des caspases effectrices 3, 6, 7, qui sont responsables de la dislocation cellulaire. Cependant, on sait que d'autres enzymes peuvent participer à ce mécanisme, comme les cathepsines (protéases à cystéine lysozomiales), les calpaïnes, les granzymes.

1.3- Événements finaux

Les caspases ciblent des protéines qui régulent des fonctions essentielles à l'intégrité et au fonctionnement cellulaire. Les substrats des caspases seront en effet impliqués dans de nombreux mécanismes tels que le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la réparation de l'ADN, du cytosquelette.

Morphologiquement, ceci va se traduire par une perte des jonctions cellulaires, des expansions cytoplasmiques et par une diminution de volume. La condensation et la fragmentation nucléaire sont suivies par un désassemblage cellulaire, avec perturbation des membranes cellulaires et formation de corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques permettent d'emprisonner le contenu cellulaire, prévenant ainsi le déclenchement d'une réaction inflammatoire. Ils seront ensuite éliminés par phagocytose.

2- Contrôle de l'apoptose

2.1- Facteurs anti-apoptotiques

Parmi les mécanismes contrôlant directement la cascade de l'apoptose, on peut citer différents facteurs qui vont interagir à différents niveaux du mécanisme.

- L'initiation du signal peut être bloqué par FLIP (FLICE inhibitory protein). C'est une protéine cytoplasmique qui contient 2 DED et possède donc la capacité de fixer à la fois FADD et la caspase 8. Ainsi, il empêche le recrutement de la caspase 8 par FADD. De plus, FLIP permettrait l'activation des MAP Kinases (Kataoka, Budd et al. 2000).

-Bcl-2 (B-cell folicular lymphoma) est une protéine ancrée dans la membrane externe de la mitochondrie. C'est un facteur inhibiteur de l'apoptose mitochondriale, car il stabilise sa membrane externe et bloque ainsi le relarguage du cytochrome c. Les membres de la famille de Bcl-2, qui partagent tous un domaine d'homologie BH (Bcl-2 Homology), se divisent en deux catégories : les molécules pro-apoptotiques d'un côté et les molécules anti-apoptotiques de l'autre. Elles vont être capable d'interagir entre elles via leurs domaines BH et ces interactions conditionneront le relarguage

du cytochrome c de l'espace inter-membranaire. (Burlacu 2003)

-Les IAP sont des protéines caractérisées par un domaine d'environ 70 aa, appelé BIR pour *bacculovirus IAP repeat*, répété 1 à 3 fois. À ce jour, six molécules ont été regroupées dans la famillle des IAP chez les mammifères : XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, BRUCE et survivin . Les IAP sont capables d'interargir avec les caspases actives et de les inhiber. (Deveraux et Reed 1999)

-

-

2.2- Défaut d'apoptose dans la PR

La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une accumulation des cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes) et des cellules de la synoviale, contribuant d'une part à la chronicité de l'inflammation, d'autre part à l'invasion articulaire par la membrane synoviale. Ce phénomène s'explique par un déséquilibre de la balance prolifération/ apoptose.

2.2.a- Défaut d'apoptose au sein de la synoviale

Le défaut d'apoptose semble l'explication la plus vraisemblable. En effet, ni les lymphocytes, ni les macrophages de la synoviale ne montrent de signe de prolifération *in vivo*, (Sugiyama, Tsukazaki et al. 1996) et seuls les FLS semblent proliférer localement. L'étude de l'apoptose au sein de la synoviale par la méthode de TUNEL, méthode consistant à détecter la fragmentation de l'ADN, associée à l'étude morphologique et à l'absence de corps apoptotiques dans les macrophages de la synoviale, prouvent que l'apoptose est un événement rare dans la synoviale de patients atteints de PR.

Pourtant, les macrophages expriment à la fois Fas, et le récepteur Fas qui est aussi exprimé par les FLS (Perlman, Pagliari et al. 2001) (Matsumoto, Muller-Ladner et al. 1996). Les deux types cellulaires devraient donc être capable de répondre au signal pro-apoptotique médié par Fas. De plus, les FLS possèdent le TNF-R1 et sont donc potentiellement sensibles à l'apoptose induite par le TNF. La synoviale semble donc être un environnement propice à la survie cellulaire, à la fois par une stimulation cytokinique constante, et par des propriétés intrinsèques des cellules de la synoviale.

Ainsi, les mécanismes de résistance expliquant la survie des macrophages aux signaux de mort cellulaire sont liés à la surexpression de FLIP (Schedel, Gay et al. 2002) (Perlman, Pagliari et al. 2001), l'activation constitutive de NF-kB (Handel, McMorrow et al. 1995)) et l'activation constitutive de la voie PI-3K/Akt, qui régulent respectivement l'expression d'A1 (Pagliari, Perlman et al. 2000) et Mcl-1 (Liu, Perlman et al. 2001), membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les cellules T quant à elles résistent à l'apoptose grâce à la surexpression de Bcl-X_L, et à l'activation constitutive de NF-kB (Salmon, Scheel-Toellner et al. 1997) (Gombert, Borthwick et al. 1996). De plus, *in situ*, les FLS produisent de l'INF-b, qui est un facteur de survie pour les cellules T (Pilling, Akbar et al. 1999).

2.2.b- Défaut d'apoptose des synoviocytes fibroblastiques

La compréhension des mécanismes de résistance à l'apoptose développée par les synoviocytes de type fibroblastique est importante dans la mesure où ils apparaissent comme un élément majeur de l'inflammation et de la destruction articulaire. De nombreux mécanismes ont été décrits.

L'expression de FLIP et de la sentrine, facteur anti-apoptotique, protègent les FLS de l'apoptose induite par Fas et le TNF-a (Franz, Pap et al. 2000) (Palao, Santiago et al. 2004). Le TNF-a peut, via le TNF-R1 présent à la surface des FLS, activer les voies de signalisation dépendantes des TRAF (TNF Receptor Associated Factor), et la voie des caspases. Les FLS répondent au TNF-a en proliférant, témoignant donc que le signal de prolifération et de survie est privilégié au détriment de la voie de

l'apoptose. En revanche, l'inhibition de NF-kB permet de les sensibiliser à l'apoptose induite par le TNF (Zhang, Huang et al. 2000). L'inhibition d'Akt aura le même effet (Zhang, Wang et al. 2001).
Bcl 2 est fortement exprimé dans les tissus synoviaux de patients atteints de PR, notamment par les cellules de type fibroblastique (Perlman, Georganas et al. 2000). De plus, *in vitro*, le traitement des FLS par le TNF, l'IL-1 (Wakisaka, Suzuki et al. 1998) et l'IL-15 (Kurowska, Rudnicka et al. 2002) augmente l'expression de Bcl 2.

Le gène suppresseur de tumeur *p53* code pour une protéine nucléaire chargée de la surveillance du bon déroulement du cycle cellulaire. En effet, l'expression de la p53 est induite en cas de dommage de l'ADN qui serait détecté lors du point de contrôle entre la phase de croissance G1 et la phase de synthèse S. Elle va alors bloquer la progression du cycle cellulaire et permettre la réparation de l'ADN, ou dans le cas de dommages trop importants, l'élimination par apoptose de la cellule endommagée/mutée. Dans la PR, l'expression de la p53 est fortement augmenté (Firestein, Nguyen et al. 1996). Ceci est lié aux stress génotoxiques que subissent les cellules de la synoviale. Cependant on observe en parallèle un taux de mutation important du gène (Seemayer, Kuchen et al. 2003), ce qui invalide sa fonction pro-apoptotique. Ces mutations qui seraient liées à des agressions mutagènes (NO, Radicaux ox) présentes au foyer inflammatoire, vont contribuer au défaut d'apoptose des FLS.

IV- La Superfamille du Tumor Necrosis Factor (TNF)

Le TNF-a est une molécule clé dans la polyarthrite rhumatoïde, qui agit en synergie avec l'IL 1b. Ce sont en effet les deux cytokines les plus abondantes dans la synoviale de patients atteints de PR et les facteurs inhibant l'activité biologique de TNF-a sont d'une grande efficacité dans le traitement de la maladie.

1- Super Famille du TNF et de ses récepteurs

1.1- Description

Les membres de la famille du TNF jouent un rôle fondamental dans le développement, dans la régulation de la réponse immunitaire, et dans l'inflammation. Toute dysrégulation de l'expression d'un des membres de la superfamille du TNF-L (TNF Ligand) ou TNF R (TNF Receptor) va souvent impliquer le développement de pathologies auto-immunes, tumorales, osseuse etc... Pour exemple, l'auto-immunité lymphoproliférative de type I est liée à Fas/FasL, le syndrome de fièvre périodique est lié au TNFR1… Isolés et caractérisés en 1984, le TNF-a et la Lymphotoxine b (LTb ou TNFb) se sont progressivement vu attribuer de nombreux homologues structurels et fonctionnels (Fig.12). (pour revue : (Bodmer, Schneider et al. 2002; Aggarwal 2003))

1.1.a- Ligands

On compte à ce jour 19 TNF-L, qui ont pour caractéristique commune le domaine d'homologie au TNF (THD), situé sur leur partie C-terminale extracellulaire. À l'exception d'APRIL et LTa qui sont uniquement des facteurs sécrétés, les TNF-L sont initialement exprimés comme des protéines transmembranaires de type II, exposant ainsi leur domaine THD à l'extérieur de la cellule. Ces protéines transmembranaires peuvent être clivées, pour donner des protéines solubles, capables d'agir à distance,

mais qui pourront aussi alors acquérir de nouvelles propriétés. Ainsi, le TNF solubilisé devient un médiateur puissant de l'inflammation, tandis que le clivage de FasL va altérer sa capacité cytotoxique, FasL soluble devenant ainsi un leurre, ou antagoniste du récepteur Fas. Ce sont des facteurs pléiotropiques qui, suivant le type cellulaire et le récepteur activé, vont pouvoir induire différentes voies, responsables soit de la prolifération, de la survie, de la différenciation ou de la mort cellulaire. (Gaur et Aggarwal 2003)

1.1.b- Récepteurs

Actuellement, 29 récepteurs des molécules de la famille du TNF ont été décrits. Les membres de la superfamille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type I, l'extrémité N-terminale étant située dans le compartiment extracellulaire. Leur partie extracellulaire est caractérisée par la présence de domaine riche en cystéine (CRD). Ensuite, on distingue deux grands groupes, suivant les caractéristiques de leur domaine intracellulaire et leurs caractéristiques fonctionnelles. Sous la dénomination de « Récepteur de Mort » ou DR (Death Receptor), sont regroupés les récepteurs qui possèdent un domaine de mort DD (Death Domain) et vont donc être capables d'activer le programme de mort cellulaire ou apoptose. (TNF-R1, CD95, TRAIL-R, TNF-R1, Death-Receptor 6, Nerve Growth Factor-R).

Le deuxième groupe concerne les récepteurs impliqués dans l'activation des voies de différenciation, de prolifération, de survie cellulaire ou dans l'inflammation, par la mobilisation, via les TRAF, des voies de signalisation des MAP Kinases, Akt, ou NFkB. Cependant, cette classification consistant à distinguer les récepteurs de mort des autres récepteurs ne reflète pas la complexité du TNF et de ses homologues. En effet, les récepteurs de « mort » peuvent, dans certains contextes cellulaire et moléculaire, induire des signaux de prolifération, de survie, ou de différenciation. Cette appellation est donc erronée et tend à disparaître.

Les TNF-R sont des récepteurs ne possèdant pas d'activité enzymatique intrinsèque. Les récepteurs TNF-R contiennent de 1 à 6 domaines de liaison au ligand. Suite à la fixation de leurs ligands respectifs, les récepteurs TNF-R forment des complexes trimériques ou multimériques qui vont être stabilisés par la formation de ponts dissulfures. La formation de ces ponts dissulfure est possible grâce à la présence de cystéines intracellulaires.

Tous ces récepteurs semblent capables d'activer la voie NF-kB, via le recrutement de TRAF. Les TRAF sont des protéines adaptatrices cytoplasmiques qui régulent négativement la voie de signalisation de l'apoptose, en stimulant la survie cellulaire grâce, notamment, à l'activation de NFkB. NFkB est responsable de l'expression de gènes de survie tels que les TRAF1/2; cIAP1/2, inhibiteurs des caspases ; des membres de la famille de Bcl 2, inhibiteurs de la voie mitochondriale de l'apoptose ; cFLIP, décrit comme un inhibiteur de la caspase 8. (Gaur et Aggarwal 2003)

1.1.c- Dualité de la signalisation : exemple du TNF-R1

Le TNF-a possède deux récepteurs, TNF-R1 et TNF-R2, dont l'activation permettra de recruter les protéines adaptatrices TRADD, TRAF2 et RIP. TRAF2 pourra à son tour initier la voie d'activation de NFkB, mais aussi les voies de survie des MAP Kinases, et PI-3K/ Akt. RIP est une sérine/thréonine kinase impliquée dans l'activation de NF-kB et dans l'apoptose. En effet, RIP possède un DD, lui permettant d'interagir avec RAIDD, qui se lie à la caspase 2 (Ahmad, Srinivasula et al. 1997) (Chou, Matsuo et al. 1998). De plus, via TRADD, le TNF-R1 peut également recruter la protéine adaptatrice FADD qui va initier la voie des caspases, et ainsi, l'apoptose. (pour revue : (Baud et Karin 2001))

L'exemple du TNF-R1 illustre la notion que les récepteurs DR sont capables d'induire des signaux pro-apoptotiques, mais aussi des signaux antagonistes de survie et/ou prolifération et/ou

différenciation. (Pour revue : (Baud et Karin 2001; Gaur et Aggarwal 2003))

-

-

2/ RANKL, RANK et OPG : membre de la super famille du TNF et remodelage osseux

-

2.1- Description

Décrite depuis quelques années, la triade RANKL / RANK / OPG fait l'objet d'un intérêt croissant dans l'étude des pathologies osseuses. Ces trois molécules, qui appartiennent à la famille du TNF et de ses récepteurs, sont impliquées dans le remodelage du tissus osseux. L'intégrité de ce tissu est soumise à l'équilibre entre l'activité des ostéoblastes, responsables de la formation osseuse, et celle des ostéoclastes, responsable de la résorption osseuse. RANKL, agoniste du Récepteur RANK, est un facteur stimulant de l'ostéoclastogénèse, tandis que son récepteur soluble, l'Ostéoprotégérine (OPG) va neutraliser son action et donc favoriser la formation osseuse. (pour revue : (Theill, Boyle et al. 2002))

RANKL (TNFSF11/TRANCE/ODF) appartient à la Super-famille du TNF. Isolée en 1997 par 4 groupes indépendants, cette molécule a été identifiée sous le nom de TRANCE (Wong, Rho et al. 1997), RANKL (Anderson, Maraskovsky et al. 1997), ODF (Yasuda, Shima et al. 1998) et OPGL (Lacey, Timms et al. 1998). RANKL et TRANCE ont été décrites comme des molécules impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire, alors qu'OPGL et ODF ont été présentées comme des facteurs de l'ostéoclastogénèse.

Cette protéine homotrimérique est exprimée par les ostéoblastes, les cellules mésenchymateuses et les cellules T, sous forme membranaire de 45 kDa. Elle peut ensuite être clivée par une métalloprotéine, appelée la *TNF*-a *convertase Enzyme* (TACE), donnant une forme soluble de 26 kDa. Utilisée dans les modèles *in vitro*, cette cytokine possède la capacité d'induire la différenciation des pré-ostéoclastes, mais également d'activer les ostéoclastes matures. Dans les modèles animaux *rankl*-/-, l'activité ostéoclastique est défectueuse, entraînant une ostéopétrose, c'est-à-dire une augmentation anormale de la masse osseuse (Kong, Yoshida et al. 1999)

RANK, récepteur cellulaire de RANKL, est une protéine transmembranaire de 97 kDa, exprimée à la surface des précurseurs hématopoïétiques des ostéoclastes (appartenant à la lignée macrophagique-monocytaire), des ostéoclastes matures, des chondrocytes, des cellules épithéliales, mais également des cellules dendritiques et des cellules T matures. La fixation de son ligand active différentes voies (NFkB, JNK, AKT/PKB) qui seront impliquées dans la différenciation des macrophages en ostéoclastes, l'activation de ces ostéoclastes et le maintien de leur activité résorptive par activation des voies de survie (Dougall, Glaccum et al. 1999).

OPG, homodimère de 110 KDa, est un second récepteur pour RANKL, mais ne possède pas la séquence hydrophobe d'ancrage à la membrane. Produit sous forme soluble, il ne peut pas transmettre de signal à la cellule et correspond donc à un récepteur leurre. OPG est également nommé OCIF, pour OsteoClastogenis Inhibitory Factor, reflétant son activité anti-résorptive. Les souris KO pour OPG développent une ostéoporose sévère, qui peut être prévenue par l'administration d'OPG exogène (Bolon, Shalhoub et al. 2002) (Min, Morony et al. 2000)

En général, les facteurs influençant le métabolisme osseux agissent sur le système RANK/RANKL/OPG. Ainsi, la vitamine D3, PGE_2, IL-1, IL-6, IL-17, TNF-a, la ParaTyroïde Hormone (PTH) sont des facteurs de la résorption osseuse qui vont induire la surexpression de RANKL par les lignées ostéoblastiques et cellules stromales. Ces mêmes facteurs diminuent l'expression du récepteur leurre OPG (Horwood, Elliott et al. 1998; Nakashima, Kobayashi et al. 2000). Dans certains types cellulaires, l'activation par les cytokines pro-inflammatoires entraîne l'augmentation simultanée

d'OPG et de RANKL (Collin-Osdoby, Rothe et al. 2001). C'est finalement l'augmentation globale du ratio RANKL/OPG qui sera déterminant.

2.2- RANKL/OPG dans la polyarthrite rhumatoïde

-

L'une des caractéristiques principales de la PR est la destruction osseuse. En effet, de nombreuses zones d'érosion peuvent être observées lors des radiographies, et le système RANKL/OPG est incriminé dans ces symptômes. Un modèle de souris développant une arthrite inflammatoire destructrice et n'exprimant pas RANKL a permis de mettre en évidence le rôle de RANKL dans la destruction osseuse (Pettit, Ji et al. 2001). Chez l'Homme, plusieurs études immunohistochimiques démontrent une sur-expression de RANKL accompagnée d'une diminution d'OPG dans les tissus synoviaux de patients atteints d'une forme active et destructive de PR (Crotti, Smith et al. 2002; Haynes, Barg et al. 2003). La relation entre le ratio RANKL/OPG et le stade de la maladie semble pouvoir être une valeur prédictive de la progression pathologique. Les lymphocytes T activés apparaissent comme la source majeure de RANKL mais il semblerait que les synoviocytes de type fibroblastique (FLS) soient également producteurs de RANKL (Gravallese, Manning et al. 2000). De plus, l'étude de Takayanagi a montré, dans des systèmes de cocultures de synoviocytes de type B et de PBMC, que les fibroblastes exprimaient un facteur ancré à la membrane stimulant la formation des ostéoclastes et que ce facteur était bloqué par l'addition d'OPG exogène (Takayanagi, Iizuka et al. 2000).

Ziolkowska *et al*. montrent que chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde les taux sériques et synoviaux de RANKL soluble et d'OPG sont augmentés. Les cellules responsables de la production d'OPG sont les PBMC, les cellules mononucléées du liquide synovial et les fibroblastes de la synoviale, ces derniers en étant les meilleurs producteurs. *In vitro*, l'expression d'OPG par les FLS est induite par les cytokines pro-inflammatoires IL-1b et le TNF-a (Ziolkowska, Kurowska et al. 2002). Dans le cas des FLS, RANKL serait exprimé constitutionnellement (Gravallese, Manning et al. 2000), et les événements influençant son expression restent à déterminer.

Si OPG et RANKL sont impliqués dans la résorption osseuse dans la PR, les mécanismes responsables du déséquilibre de la balance devront être éclaircis. Le système RANKL/RANK et OPG est un système complexe, dont les mécanismes de régulation restent à éclaircir. OPG est pressenti comme traitement préventif de la destruction osseuse liée à la PR, et dans les modèles d'arthrite expérimentale, le traitement par OPG a montré des effets bénéfiques sur la progression des lésions osseuses (Kong, Feige et al. 1999). Étant également impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire, il paraît nécessaire d'évaluer de manière précise le rôle de RANKL et d'OPG dans la PR. De plus, OPG interfère dans un deuxième système, dont l'importance dans la PR est discutée depuis peu : TRAIL.

3/ TRAIL et TRAIL-R : membre de la super famille du TNF et apoptose

-

3.1- Description

TRAIL (TNFSF10/Apo-2L) a été isolé par deux groupes dans les années 1995-1996 (Wiley, Schooley et al. 1995). C'est une protéine transmembranaire de type II (partie C-terminale extracellulaire) de 40kDa, appartenant à la Super Famille du TNF. La partie extracellulaire de TRAIL partage environ 28% d'homologie avec CD95L et 23% avec TNF-a. TRAIL membranaire peut être clivée, donnant ainsi

une forme soluble. Tout la plupart des membres de la superfamille du TNF, TRAIL forme une structure homotrimérique. L'ARNm codant pour cette cytokine est retrouvé dans de nombreux types cellulaires et dans le système immunitaire la protéine est particulièrement exprimée par les cellules T, NK et macrophages activés. TRAIL est décrit comme un facteur essentiel à la surveillance de la progression tumorale par les cellules du système immunitaire. En effet, c'est un facteur ayant une activité pro-apoptotique spécifique de certaines lignées cancéreuses (Walczak, Miller et al. 1999). On lui connaît 5 récepteurs : TRAIL-R1 et TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 et OPG le récepteur soluble (Emery, McDonnell et al. 1998) tous membres de la superfamille de TNF Récepteurs. (pour revue : (Kelley et Ashkenazi 2004) (Kimberley et Screaton 2004))

TRAIL-R1/DR4 (50 kDa) et TRAIL-R2/DR5 (46-50 kDa) (Schneider, Thome et al. 1997) possèdent dans leur partie C terminale intracellulaire, un domaine DD. L'interaction de TRAIL avec les récepteurs de mort TRAIL-R2 et DR4 entraîne la formation de complexes homotrimériques, ou hétérotrimériques. Ceci va permettre, via leurs domaines de mort **DD**, l'assemblage du DISC et l'initiation de l'apoptose, par activation de la voie des caspases (Kischkel, Lawrence et al. 2000). Ces récepteurs ont également la possibilité de recruter TRAF-2 et RIP, permettant l'activation des voies des MAP Kinases et de NF-kB.

TRAIL-R3/DcR1 (32-35 kDa) et TRAIL-R4/DcR2 sont des récepteurs transmembranaires leurres ; le premier est un récepteur couplé à la GPI (Glycosil-phosphatidyl-Inositol), qui ne possède pas de partie intracellulaire et va donc fixer TRAIL sans induire de signal (Degli-Esposti, Smolak et al. 1997). Le deuxième possède un domaine cytoplasmique tronqué, qui conserve uniquement la capacité d'activer la voie NFkB, permettant ainsi de protéger de l'apoptose médiée par les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Degli-Esposti, Dougall et al. 1997; Sheridan, Marsters et al. 1997).

3.2- TRAIL et PR

L'intérêt pour TRAIL dans la polyarthrite émerge depuis quelques années, avec la démonstration que TRAIL et OPG interagissent et s'antagonisent mutuellement. Ainsi, *in vitro*, l'adition de TRAIL exogène permet d'inhiber l'effet anti-ostéoclastique de la protéine recombinante OPG, tandis que OPG permet de bloquer l'apoptose induite par TRAIL (Emery, McDonnell et al. 1998).

En 2003, Shipman et Croucher montrent *in vitro* que OPG sécrété par les ostéoblastes pourrait être un facteur de survie pour les cellules de myélome. Song *et al*. se sont intéressés au rôle de TRAIL dans l'arthrite murine induite au collagène et ont démontré que le blocage *in vivo* de TRAIL par un de ces récepteurs solubilisé (sTRAIL-R2) exacerbait le phénomène d'inflammation et d'hyperplasie synoviale (Song, Chen et al. 2000). TRAIL pourrait donc être l'un des facteurs impliqués dans la régulation de l'inflammation et de la prolifération des cellules de la synoviale.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

La destruction articulaire est sans doute la conséquence la plus handicapante dans la polyarthrite. Le pannus est une structure pseudo tumorale qui va progressivement envahir l'articulation et participer à la destruction du tissu cartilagineux et osseux. Deux aspects paraissent donc important à contrôler pour prévenir la destruction articulaire dans la PR : la formation du pannus, et l'activité pro-resorptive des synoviocytes

Sous la pression des signaux extrinsèques, mais aussi de certaines caractéristiques intrinsèques, les synovioytes de type fibroblastique de patients atteints de PR sont progressivement transformés et acquièrent des propriétés destructrices et invasives. Ainsi, ces cellules sont directement impliquées dans la destruction de la matrice osseuse. RANKL jouerait un rôle dans la résorption osseuse par les synoviocytes. RANKL est un membre de la Super Famille du TNF qui active directement l'ostéoclastogénèse. Cette cytokine est surexprimée dans les tissus synoviaux de patients atteint de PR.

Les cytokines pro-inflammatoires ont pour effet d'augmenter l'expression de RANKL dans certains types cellulaires tels que les cellules endothéliale et les ostéoblastes. Or, dans la PR, l'IL-1b, le TNFa et l'IL-18, cytokines pro-inflammatoires bien représentées dans l'articulation inflammatoire, ont été décrits comme des facteurs stimulant l'ostéoclastogénèse.

Le premier axe de recherche consistera donc à évaluer l'influence de l'IL-18, l'IL-1b et le TNF-a sur l'expression de RANKL et de OPG par les synoviocytes fibroblastiques isolés de tissus synoviaux de patients atteints de PR.

TRAIL est également un membre de la Super Famille du TNF qui a la capacité d'induire spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans le modèle murin d'arthrite au collagène, l'hinibition de TRAIL endogène, par injection du récepteur solubilisé TRAIL-R2, aggrave l'inflammation et l'hyperplasie synoviale. Cette étude suggère que TRAIL est un facteur protecteur de l'arthrite inflammatoire auto-immune et il pourrait donc représenter un traitement potentiel dans la PR. En effet, les synoviocytes de la membrane synoviale rhumatoïde prolifèrent de manière excessive et le défaut d'apoptose semble être un élément majeur de l'hyperplasie synoviale. Les caractéristiques pseudo-tumorales de ces cellules permettent d'envisager que TRAIL puisse avoir un effet pro-apoptotique sur les synoviocytes. L'administration de TRAIL permettrait donc de contrôler la formation et l'expansion du pannus et ainsi de contrôler la destruction articulaire. Cependant, les effets de TRAIL sur les cellules de la synoviale humaine devront d'abord être évalués.

La deuxième partie du projet consistera à déterminer et à caractériser, *ex vivo*, l'effet de TRAIL sur les synoviocytes de type fibroblastique de patients atteints de PR.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Abraham, M. C. and S. Shaham (2004). "Death without caspases, caspases without death." Trends Cell Biol **14**(4): 184-93.

Adrain, C. and S. J. Martin (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas." Trends Biochem Sci **26**(6): 390-7.

Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-56.

Ahmad, M., S. M. Srinivasula, et al. (1997). "CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP." Cancer Res **57**(4): 615-9.

Aidinis, V., D. Plows, et al. (2003). "Functional analysis of an arthritogenic synovial fibroblast." Arthritis Res Ther **5**(3): R140-57.

Anderson, D. M., E. Maraskovsky, et al. (1997). "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." Nature **390**(6656): 175-9.

Asahara, H., M. Asanuma, et al. (1995). "High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis." Biochem Mol Biol Int **37**(5): 827-32.

Asahara, H., T. Hasunuma, et al. (1997). "In situ expression of protooncogenes and Fas/Fas ligand in rheumatoid arthritis

synovium." J Rheumatol **24**(3): 430-5.
Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-30.
Aupperle, K., B. Bennett, et al. (2001). "NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes." J Immunol **166**(4): 2705-11.

Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol **11**(9): 372-7.
Benito, M. J., E. Murphy, et al. (2004). "Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **50**(6): 1781-7.
Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
Bolon, B., V. Shalhoub, et al. (2002). "Osteoprotegerin, an endogenous antiosteoclast factor for protecting bone in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **46**(12): 3121-35.
Buckley, C. D., D. Pilling, et al. (2001). "Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation." Trends Immunol **22**(4): 199-204.
Burlacu, A. (2003). "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins." J Cell Mol Med **7**(3): 249-57.

Cantley, L. C. and B. G. Neel (1999). "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4240-5.
Cha, H. S., K. S. Ahn, et al. (2003). "Influence of hypoxia on the expression of matrix metalloproteinase-1, -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid synovial fibroblasts." Clin Exp Rheumatol **21**(5): 593-8.
Chen, F., V. Castranova, et al. (2001). "New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation." Am J Pathol **159**(2): 387-97.
Chou, J. J., H. Matsuo, et al. (1998). "Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment." Cell **94**(2): 171-80.
Collin-Osdoby, P., L. Rothe, et al. (2001). "Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis." J Biol Chem **276**(23): 20659-72.
Cope, A. P. (2002). "Studies of T-cell activation in chronic inflammation." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S197-211.
Crotti, T. N., M. D. Smith, et al. (2002). "Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, osteoarthritis, and from normal patients: semiquantitative and quantitative analysis." Ann Rheum Dis **61**(12): 1047-54.

Dai, S. M., K. Nishioka, et al. (2004). "Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha." Ann Rheum Dis **63**(11): 1379-86.
Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, et al. (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." Immunity **7**(6): 813-20.
Degli-Esposti, M. A., P. J. Smolak, et al. (1997). "Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family." J Exp Med **186**(7): 1165-70.
Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**(53): 8543-67.
Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-52.
Di Cristofano, A., P. Kotsi, et al. (1999). "Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice." Science **285**(5436): 2122-5.
Dinarello, C. A. (1999). "IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family." J Allergy Clin Immunol **103**(1 Pt 1): 11-24.
Dinarello, C. A. (2002). "The IL-1 family and inflammatory diseases." Clin Exp Rheumatol **20**(5 Suppl 27): S1-13.
Dooley, S., I. Herlitzka, et al. (1996). "Constitutive expression of c-fos and c-jun, overexpression of ets-2, and reduced expression of metastasis suppressor gene nm23-H1 in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **55**(5): 298-304.
Dougall, W. C., M. Glaccum, et al. (1999). "RANK is essential for osteoclast and lymph node development." Genes Dev **13**(18): 2412-24.

Edwards, J. C. (2000). "Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis." Arthritis Res **2**(5): 344-7.
Ehrhardt, H., S. Fulda, et al. (2003). "TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB." Oncogene **22**(25): 3842-52.
Emery, J. G., P. McDonnell, et al. (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **273**(23):

14363-7.

Feldmann, M., F. M. Brennan, et al. (2001). "The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis." Curr Dir Autoimmun **3**: 188-99.

Feldmann, M., F. M. Brennan, et al. (1996). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis." Annu Rev Immunol **14**: 397-440.

Feldmann, M., R. N. Maini, et al. (2001). "Cytokine blockade in rheumatoid arthritis." Adv Exp Med Biol **490**: 119-27.

Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." Nature **423**(6937): 356-61.

Firestein, G. S. and A. M. Manning (1999). "Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease." Arthritis Rheum **42**(4): 609-21.

Firestein, G. S., K. Nguyen, et al. (1996). "Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium." Am J Pathol **149**(6): 2143-51.

Franke, T. F., C. P. Hornik, et al. (2003). "PI3K/Akt and apoptosis: size matters." Oncogene **22**(56): 8983-98.

Franz, J. K., T. Pap, et al. (2000). "Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(3): 599-607.

Funk, J. L., L. A. Cordaro, et al. (1998). "Synovium as a source of increased amino-terminal parathyroid hormone-related protein expression in rheumatoid arthritis. A possible role for locally produced parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." J Clin Invest **101**(7): 1362-71.

Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-8.

Goldring, S. R. (2003). "Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling." Calcif Tissue Int **73**(2): 97-100.

Gombert, W., N. J. Borthwick, et al. (1996). "Fibroblasts prevent apoptosis of IL-2-deprived T cells without inducing proliferation: a selective effect on Bcl-XL expression." Immunology **89**(3): 397-404.

Gracie, J. A., R. J. Forsey, et al. (1999). "A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis." J Clin Invest **104**(10): 1393-401.

Grataroli, R., D. Vindrieux, et al. (2004). "Characterization of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in the adult human testis." Mol Hum Reprod **10**(2): 123-8.

Gravallese, E. M., Y. Harada, et al. (1998). "Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis." Am J Pathol **152**(4): 943-51.

Gravallese, E. M., C. Manning, et al. (2000). "Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor." Arthritis Rheum **43**(2): 250-8.

Griffith, T. S., W. A. Chin, et al. (1998). "Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells." J Immunol **161**(6): 2833-40.

Hadjigogos, K. (2003). "The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Panminerva Med **45**(1): 7-13.

Han, Z., D. L. Boyle, et al. (1999). "Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis." J Pharmacol Exp Ther **291**(1): 124-30.

Han, Z., D. L. Boyle, et al. (2001). "c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis." J Clin Invest **108**(1): 73-81.

Handel, M. L., L. B. McMorrow, et al. (1995). "Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65." Arthritis Rheum **38**(12): 1762-70.

Hashimoto, Y., H. Kakegawa, et al. (2001). "Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis." Biochem Biophys Res Commun **283**(2): 334-9.

Haynes, D. R., E. Barg, et al. (2003). "Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls." Rheumatology (Oxford) **42**(1): 123-34.

Haynes, D. R., T. N. Crotti, et al. (2001). "Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint." Rheumatology (Oxford) **40**(6): 623-30.

Herlaar, E. and Z. Brown (1999). "p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease." Mol Med Today **5**(10): 439-47.

Hirth, A., A. Skapenko, et al. (2002). "Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Res **4**(2): 117-25.

Horwood, N. J., J. Elliott, et al. (1998). "Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells." Endocrinology **139**(11): 4743-6.

Hou, W. S., Z. Li, et al. (2001). "Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation." Am J Pathol **159**(6): 2167-77.

Ichikawa, K., W. Liu, et al. (2003). "TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis." J

Immunol **171**(2): 1061-9.

Jeong, J. G., J. M. Kim, et al. (2004). "Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **324**(1): 3-7.

Ji, J. D., H. Cheon, et al. (2001). "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 **17**(3): 215-21.

Jo, M., T. H. Kim, et al. (2000). "Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." Nat Med **6**(5): 564-7.

Jue, D. M., K. I. Jeon, et al. (1999). "Nuclear factor kappaB (NF-kappaB) pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis." J Korean Med Sci **14**(3): 231-8.

Kanbe, K., T. Takemura, et al. (2004). "Synovectomy reduces stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1) which is involved in the destruction of cartilage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis." J Bone Joint Surg Br **86**(2): 296-300.

Kang, Y. C., K. M. Kim, et al. (2004). "Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent cFLIP expression and Bad phosphorylation." Cell Death Differ **11**(12): 1287-98.

Kasperkovitz, P. V., T. C. Timmer, et al. (2005). "Fibroblast-like synoviocytes derived from patients with rheumatoid arthritis show the imprint of synovial tissue heterogeneity: evidence of a link between an increased myofibroblast-like phenotype and high-inflammation synovitis." Arthritis Rheum **52**(2): 430-41.

Kataoka, T., R. C. Budd, et al. (2000). "The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways." Curr Biol **10**(11): 640-8.

Kelley, S. K. and A. Ashkenazi (2004). "Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL." Curr Opin Pharmacol **4**(4): 333-9.

Kimberley, F. C. and G. R. Screaton (2004). "Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors." Cell Res **14**(5): 359-72.

Kinne, R. W., R. Brauer, et al. (2000). "Macrophages in rheumatoid arthritis." Arthritis Res **2**(3): 189-202.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, et al. (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." Immunity **12**(6): 611-20.

Klinkhoff, A. (2004). "Biological agents for rheumatoid arthritis: targeting both physical function and structural damage." Drugs **64**(12): 1267-83.

Kong, Y. Y., U. Feige, et al. (1999). "Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand." Nature **402**(6759): 304-9.

Kong, Y. Y., H. Yoshida, et al. (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." Nature **397**(6717): 315-23.

Kotake, S., N. Udagawa, et al. (2001). "Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients." Arthritis Rheum **44**(5): 1003-12.

Kudo, O., A. Sabokbar, et al. (2003). "Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism." Bone **32**(1): 1-7.

Kurowska, M., W. Rudnicka, et al. (2002). "Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2." J Immunol **169**(4): 1760-7.

Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-69.

Lacey, D. L., E. Timms, et al. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell **93**(2): 165-76.

Lallemand, D., G. Spyrou, et al. (1997). "Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts." Oncogene **14**(7): 819-30.

Lamhamedi-Cherradi, S. E., S. Zheng, et al. (2003). "Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes." Diabetes **52**(9): 2274-8.

Lamhamedi-Cherradi, S. E., S. J. Zheng, et al. (2003). "Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice." Nat Immunol **4**(3): 255-60.

Lawrence, D., Z. Shahrokh, et al. (2001). "Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions." Nat Med

7(4): 383-5.

LeBlanc, H., D. Lawrence, et al. (2002). "Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax." Nat Med **8**(3): 274-81.

LeBlanc, H. N. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." Cell Death Differ **10**(1): 66-75.

Lehmann, J., A. Jungel, et al. (2000). "Grafting of fibroblasts isolated from the synovial membrane of rheumatoid arthritis (RA) patients induces chronic arthritis in SCID mice-A novel model for studying the arthritogenic role of RA fibroblasts in vivo." J Autoimmun **15**(3): 301-13.

Liew, F. Y. and I. B. McInnes (2002). "The role of innate mediators in inflammatory response." Mol Immunol **38**(12-13): 887-90.

Liu, H., H. Perlman, et al. (2001). "Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation." J Exp Med **194**(2): 113-26.

Liu, H. and R. M. Pope (2004). "Phagocytes: mechanisms of inflammation and tissue destruction." Rheum Dis Clin North Am **30**(1): 19-39, v.

Liu, Z., X. Xu, et al. (2003). "CII-DC-AdTRAIL cell gene therapy inhibits infiltration of CII-reactive T cells and CII-induced arthritis." J Clin Invest **112**(9): 1332-41.

Lunemann, J. D., S. Waiczies, et al. (2002). "Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells." J Immunol **168**(10): 4881-8.

Makarov, S. S. (2001). "NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction." Arthritis Res **3**(4): 200-6.

Malagarie-Cazenave, S., N. Andrieu-Abadie, et al. (2002). "Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF--induced cell death." Expert Rev Mol Med **2002**: 1-15.

Mariette, X. (2004). "The B cell: a new therapeutic target in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." Joint Bone Spine **71**(5): 357-60.

Matsumoto, S., U. Muller-Ladner, et al. (1996). "Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts." J Rheumatol **23**(8): 1345-52.

Matsuno, H., K. Yudoh, et al. (2002). "The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera." Rheumatology (Oxford) **41**(3): 329-37.

Michael, V. V. and K. E. Alisa (2000). "Cell cycle implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Front Biosci **5**: D594-601.

Min, H., S. Morony, et al. (2000). "Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis." J Exp Med **192**(4): 463-74.

Minden, A., A. Lin, et al. (1994). "c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases." Mol Cell Biol **14**(10): 6683-8.

Mino, T., E. Sugiyama, et al. (1998). "Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha synergistically stimulate prostaglandin E2-dependent production of interleukin-11 in rheumatoid synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **41**(11): 2004-13.

Miranda-Carus, M. E., A. Balsa, et al. (2004). "Rheumatoid arthritis synovial fluid fibroblasts express TRAIL-R2 (DR5) that is functionally active." Arthritis Rheum **50**(9): 2786-93.

Miyashita, T., A. Kawakami, et al. (2004). "Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells." Clin Exp Immunol **137**(2): 430-6.

Miyashita, T., A. Kawakami, et al. (2003). "Akt is an endogenous inhibitor toward tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in rheumatoid synovial cells." Biochem Biophys Res Commun **312**(2): 397-404.

Morel, J. C., C. C. Park, et al. (2001). "Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NFkappaB activation." Lab Invest **81**(10): 1371-83.

Morel, J. C., C. C. Park, et al. (2001). "A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways." J Biol Chem **276**(40): 37069-75.

Morita, Y., N. Kashihara, et al. (1998). "Antisense oligonucleotides targeting c-fos mRNA inhibit rheumatoid synovial fibroblast proliferation." Ann Rheum Dis **57**(2): 122-4.

Muller-Ladner, U., J. Kriegsmann, et al. (1996). "Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice." Am J Pathol **149**(5): 1607-15.

Muller-Ladner, U., J. Kriegsmann, et al. (1995). "Oncogenes in rheumatoid arthritis." Rheum Dis Clin North Am **21**(3): 675-90.

Naka, T., N. Nishimoto, et al. (2002). "The paradigm of IL-6: from basic science to medicine." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S233-42.

Nakano, K., Y. Okada, et al. (2004). "Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **50**(8): 2450-8.

Nakashima, T., Y. Kobayashi, et al. (2000). "Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines." Biochem Biophys Res Commun **275**(3): 768-75.

Neff, L., M. Zeisel, et al. (2003). "ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase." J Biol Chem **278**(30): 27721-8.

Niki, Y., H. Yamada, et al. (2004). "Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice." J Immunol **172**(1): 577-84.

Nonomura, Y., H. Kohsaka, et al. (2003). "Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in the treatment of arthritis." J Immunol **171**(9): 4913-9.

Ogawa, Y., M. Ohtsuki, et al. (2003). "Suppression of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis by induction of apoptosis in activated CD4+ T cells." Arthritis Rheum **48**(12): 3350-8.

Pagliari, L. J., H. Perlman, et al. (2000). "Macrophages require constitutive NF-kappaB activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis." Mol Cell Biol **20**(23): 8855-65.

Palao, G., B. Santiago, et al. (2004). "Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis." Arthritis Rheum **50**(9): 2803-10.

Pap, T., J. K. Franz, et al. (2000). "Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction." Arthritis Res **2**(1): 59-64.

Park, Y. W., J. D. Ji, et al. (2003). "Actinomycin D renders cultured synovial fibroblasts susceptible to tumour necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis." Scand J Rheumatol **32**(6): 356-63.

Perlman, H., C. Georganas, et al. (2000). "Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability." J Immunol **164**(10): 5227-35. s

Perlman, H., N. Nguyen, et al. (2003). "Rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages express decreased tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R2 and increased decoy receptor tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R3." Arthritis Rheum **48**(11): 3096-101.

Perlman, H., L. J. Pagliari, et al. (2001). "Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis." Arthritis Rheum **44**(1): 21-30.

Pettit, A. R., H. Ji, et al. (2001). "TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis." Am J Pathol **159**(5): 1689-99.

Pfarr, C. M., F. Mechta, et al. (1994). "Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras." Cell **76**(4): 747-60.

Pilling, D., A. N. Akbar, et al. (1999). "Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis." Eur J Immunol **29**(3): 1041-50.

Qu, Z., C. H. Garcia, et al. (1994). "Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining." Arthritis Rheum **37**(2): 212-20.

Ravi, R., G. C. Bedi, et al. (2001). "Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB." Nat Cell Biol **3**(4): 409-16.

Ritchlin, C. (2000). "Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis." Arthritis Res **2**(5): 356-60.

Rivollier, A., M. Mazzorana, et al. (2004). "Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment." Blood **104**(13): 4029-37.

Roberts, L. and G. J. McColl (2004). "Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis." Intern Med J **34**(12): 687-93.

Ronday, H. K., W. H. van der Laan, et al. (2001). "Human granzyme B mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **40**(1): 55-61.

Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-44.

Salmon, M., D. Scheel-Toellner, et al. (1997). "Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium." J Clin Invest **99**(3): 439-46.

Schedel, J., R. E. Gay, et al. (2002). "FLICE-inhibitory protein expression in synovial fibroblasts and at sites of cartilage and bone erosion in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **46**(6): 1512-8.

Schett, G., M. Tohidast-Akrad, et al. (2000). "Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(11): 2501-12.

Schneider, P., D. Olson, et al. (2003). "Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." J Biol Chem **278**(7): 5444-54.

Schneider, P., M. Thome, et al. (1997). "TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB." Immunity **7**(6): 831-6.

Schultz, D. R. and W. J. Harrington, Jr. (2003). "Apoptosis: programmed cell death at a molecular level." Semin Arthritis Rheum **32**(6): 345-69.

Secchiero, P., A. Gonelli, et al. (2003). "TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways." Circulation **107**(17): 2250-6.

Secchiero, P., A. Gonelli, et al. (2002). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces monocytic maturation of leukemic and normal myeloid precursors through a caspase-dependent pathway." Blood **100**(7): 2421-9.

Sedger, L. M., D. M. Shows, et al. (1999). "IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression." J Immunol **163**(2): 920-6.

Seemayer, C. A., S. Kuchen, et al. (2003). "p53 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts at sites of invasion." Ann Rheum Dis **62**(12): 1139-44.

Shaulian, E. and M. Karin (2001). "AP-1 in cell proliferation and survival." Oncogene **20**(19): 2390-400.

Sheridan, J. P., S. A. Marsters, et al. (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." Science **277**(5327): 818-21.

Shigeyama, Y., T. Pap, et al. (2000). "Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(11): 2523-30.

Soderstrom, T. S., M. Poukkula, et al. (2002). "Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8." J Immunol **169**(6): 2851-60.

Song, K., Y. Chen, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression." J Exp Med **191**(7): 1095-104.

Sugiyama, M., T. Tsukazaki, et al. (1996). "Localisation of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **55**(7): 442-9.

Sweeney, S. E. and G. S. Firestein (2004). "Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation." Int J Biochem Cell Biol **36**(3): 372-8.

Takayanagi, H., H. Iizuka, et al. (2000). "Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(2): 259-69.

Takayanagi, H., H. Oda, et al. (1997). "A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis." Biochem Biophys Res Commun **240**(2): 279-86.

Takeda, K., M. J. Smyth, et al. (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." J Exp Med **195**(2): 161-9.

Thakkar, H., X. Chen, et al. (2001). "Pro-survival function of Akt/protein kinase B in prostate cancer cells. Relationship with TRAIL resistance." J Biol Chem **276**(42): 38361-9.

Theill, L. E., W. J. Boyle, et al. (2002). "RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution." Annu Rev Immunol **20**: 795-823.

Tolboom, T. C., E. Pieterman, et al. (2002). "Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10." Ann Rheum Dis **61**(11): 975-80.

Truneh, A., S. Sharma, et al. (2000). "Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor." J Biol Chem **275**(30): 23319-25.

Tsai, H. F., J. J. Lai, et al. (2004). "Induction of costimulation of human CD4 T cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: possible role in T cell activation in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **50**(2): 629-39.

Tsokos, G. C. and M. Tsokos (2003). "The TRAIL to arthritis." J Clin Invest **112**(9): 1315-7.

Udagawa, N., S. Kotake, et al. (2002). "The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis." Arthritis Res **4**(5): 281-9.

van Dam, H. and M. Castellazzi (2001). "Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis." Oncogene **20**(19): 2453-64.

Vindrieux, D., M. Devonec, et al. (2002). "Identification of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors in adult rat ventral prostate." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 115-21.

Wakisaka, S., N. Suzuki, et al. (1998). "Possible correction of abnormal rheumatoid arthritis synovial cell function by jun D transfection in vitro." Arthritis Rheum **41**(3): 470-81.

Wakisaka, S., N. Suzuki, et al. (1998). "Modulation by proinflammatory cytokines of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis (RA)." Clin Exp Immunol **114**(1): 119-28.

Walczak, H., R. E. Miller, et al. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." Nat Med **5**(2): 157-63.

Wiley, S. R., K. Schooley, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-82.

Wong, B. R., J. Rho, et al. (1997). "TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells." J Biol Chem **272**(40): 25190-4.

Xue, C., M. Takahashi, et al. (1997). "Characterisation of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes." Ann Rheum Dis **56**(4): 262-7.

Yagita, H., K. Takeda, et al. (2004). "TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy." Cancer Sci **95**(10): 777-83.

Yamamoto, A., A. Fukuda, et al. (2003). "Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant-negative Ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts." Arthritis Rheum **48**(9): 2682-92.

Yamanishi, Y., D. L. Boyle, et al. (2002). "Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis." Am J Pathol **160**(1): 123-30.

Yamasaki, S., A. Kawakami, et al. (2001). "Importance of NF-kappaB in rheumatoid synovial tissues: in situ NF-kappaB expression and in vitro study using cultured synovial cells." Ann Rheum Dis **60**(7): 678-84.

Yao, Q., S. Wang, et al. (2003). "Intra-articular adenoviral-mediated gene transfer of trail induces apoptosis of arthritic rabbit synovium." Gene Ther **10**(12): 1055-60.

Yasuda, H., N. Shima, et al. (1998). "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3597-602.

Zhang, H. G., N. Huang, et al. (2000). "Gene therapy that inhibits nuclear translocation of nuclear factor kappaB results in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of human synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **43**(5): 1094-105.

Zhang, H. G., Y. Wang, et al. (2001). "Regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase Akt." Arthritis Rheum **44**(7): 1555-67.

Zhang, L. and B. Fang (2005). "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer." Cancer Gene Ther **12**(3): 228-37.

Zhang, X. D., T. Nguyen, et al. (2000). "Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types." FEBS Lett **482**(3): 193-9.

Ziolkowska, M., M. Kurowska, et al. (2002). "High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment." Arthritis Rheum **46**(7): 1744-53.

Zwerina, J., S. Hayer, et al. (2004). "Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction." Arthritis Rheum **50**(1): 277-90.

Références documents consultés en ligne :

-

-

Duyckaerts C., Fouret P., Hauw. 2002-2003. PCEM2. Anatomie pathologique-Chap3-Inflammation. http://www.chups.jussieu.fr/polys/anapath/Cours/POLY.Chp.3.6.html

Prin L., Hachulla E., Dubucquoi S., Hennache B, Bonnotte B. Abbal M., Gilbert Faure G., Paul Bouletreau P. 2004-2005. Polycopié : Module-8- Réaction inflammatoire - Aspects biologiques et cliniques. http://w3med.univ-lille2.fr/inflammation/frdocuments.htm

Rombouts J.J. et Professeur Delloye Ch. 2000. Chirurgie de l'appareil locomoteur- Volume 1-Généralité. www.md.ucl.ac.be/didac/orto/syllabu1.pdf