

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG I**

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR**

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie  
Domaine : Immunopharmacologie

par

**Mirjam ZEISEL**

***Immunité innée et polyarthrite rhumatoïde :  
étude des interactions PAMPs-PRRs dans l'activation des  
synoviocytes « fibroblast-like »***

**Soutenue publiquement le:** 1<sup>er</sup> décembre 2004

**Membres du jury:**

Madame Valérie Quesniaux	Rapporteur externe
Madame Dominique Wachsmann	Directeur de thèse
Monsieur Jean-Marie Freyssinet	Rapporteur interne
Monsieur Jacques Morel	Membre invité
Monsieur Ulf Müller-Ladner	Rapporteur externe
Monsieur Jean Sibia	Directeur de thèse

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>8</b>
<b><u>1 LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE</u></b>	<b>8</b>
<b><u>1.1 Manifestations cliniques</u></b>	<b>8</b>
<b><u>1.2 Pathogénie de la PR</u></b>	<b>11</b>
<b><u>1.2.1 La réaction inflammatoire synoviale</u></b>	<b>12</b>
<b><u>1.2.1.1 Le rôle de l'immunité adaptative</u></b>	<b>12</b>
<b><u>1.2.1.2 Le rôle de l'immunité innée</u></b>	<b>16</b>
<b><u>1.2.1.2.1 Micro-organismes et composants microbiens</u></b>	<b>19</b>
<b><u>1.2.1.2.2 « Pattern recognition receptors » (PRRs)</u></b>	<b>22</b>
<b><u>1.2.2 Les conséquences de l'inflammation synoviale</u></b>	<b>26</b>
<b><u>1.2.3 Prédispositions génétiques</u></b>	<b>27</b>
<b><u>2 RÔLE PARTICULIER DES FLSs DANS LA PATHOGÉNIE DE LA PR</u></b>	<b>28</b>
<b><u>2.1 Phénotype des FLSs</u></b>	<b>28</b>
<b><u>2.2 Prolifération anormale ou altération de l'apoptose des FLSs ?</u></b>	<b>29</b>
<b><u>2.3 Activation des FLSs</u></b>	<b>32</b>
<b><u>2.3.1 Activation des FLSs par l'environnement rhumatoïde</u></b>	<b>32</b>
<b><u>2.3.2 Activation des FLSs par l'environnement microbien</u></b>	<b>33</b>
<b><u>2.3.3 Voies de signalisation activées dans les FLSs</u></b>	<b>34</b>
<b><u>2.4 Rôle des FLSs dans l'inflammation articulaire</u></b>	<b>40</b>
<b><u>2.4.1 Rôle pro-inflammatoire des FLSs</u></b>	<b>40</b>
<b><u>2.4.2 Rôle dans la survie des lymphocytes</u></b>	<b>43</b>
<b><u>2.5 Rôle des FLSs dans la destruction articulaire</u></b>	<b>44</b>
<b><u>2.5.1 Adhésion des FLSs au cartilage</u></b>	<b>44</b>
<b><u>2.5.2 Rôle dans la libération de médiateurs de la destruction articulaire</u></b>	<b>44</b>
<b><u>2.5.3 Rôle dans l'activation des ostéoclastes</u></b>	<b>47</b>
<b><u>3 LES STREPTOCOQUES ORAUX</u></b>	<b>49</b>
<b><u>3.1 Classification</u></b>	<b>49</b>
<b><u>3.2 Les protéines I/II</u></b>	<b>51</b>
<b><u>3.2.1 Structure des protéines I/II</u></b>	<b>51</b>
<b><u>3.2.1.1 Peptide signal (résidus 1-38)</u></b>	<b>52</b>
<b><u>3.2.1.2 Région N-terminale (résidus 39-120) et région A (résidus 121-465)</u></b>	<b>52</b>
<b><u>3.2.1.3 La région variable étendue (résidus 466-844)</u></b>	<b>53</b>
<b><u>3.2.1.4 Région riche en proline (résidus 845-962)</u></b>	<b>53</b>
<b><u>3.2.1.5 Région C-terminale (résidus 950-1520)</u></b>	<b>53</b>
<b><u>3.2.1.6 Région d'ancrage</u></b>	<b>54</b>
<b><u>3.2.2 Fonctions des protéines I/II</u></b>	<b>54</b>
<b><u>4 OBJECTIFS DU TRAVAIL</u></b>	<b>56</b>

<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>58</b>
<b><u>1 ACTIVITÉ PRO-INFLAMMATOIRE ET DESTRUCTRICE DE LA PROTÉINE I/II</u></b>	<b>58</b>
<b><u>1.1 Etude de la synthèse et de la libération d'IL-6 et d'IL-8</u></b>	<b>58</b>
<u>1.1.1 Résultats</u>	58
<u>1.1.1.1 Expression des ARNm de l'IL-6 et l'IL-8 par les FLSs</u>	58
<u>1.1.1.2 Cinétique de libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs</u>	59
<u>1.1.2 Discussion</u>	60
<b><u>1.2 Etude de la synthèse et de la libération d'IL-18</u></b>	<b>62</b>
<u>1.2.1 Publication : Cellular Microbiology (2004)</u>	63
<u>1.2.2 Discussion</u>	70
<b><u>1.3 Etude de la synthèse et de la libération de MMPs</u></b>	<b>72</b>
<u>1.3.1 Publication : Arthritis Research and Therapy (2004)</u>	72
<u>1.3.2 Résultats complémentaires</u>	82
<u>1.3.3 Discussion</u>	82
<b><u>2 VOIES DE SIGNALISATION ACTIVÉES PAR LA PROTÉINE I/II</u></b>	<b>85</b>
<b><u>2.1 Voies de signalisation des MAPKs/AP-1 et de NF-<math>\kappa</math>B</u></b>	<b>85</b>
<u>2.1.1 Publication : Cellular Microbiology (2001)</u>	85
<u>2.1.2 Résultats complémentaires</u>	96
<u>2.1.2.1 Phosphorylation des MAPKs dans les FLSs arthrosiques</u>	96
<u>2.1.2.2 Implication des MAPKs dans la libération de cytokines par les FLSs arthrosiques</u>	97
<u>2.1.3 Discussion</u>	98
<b><u>2.2 Voies de signalisation reliant les événements précoces membranaires à l'activation des MAPKs</u></b>	<b>100</b>
<u>2.2.1 Publication : Journal of Biological Chemistry (2003)</u>	103
<u>2.2.2 Résultats complémentaires</u>	112
<u>2.2.2.1 Expression de la sous-unité <math>\beta</math>1 des intégrines par les FLSs</u>	112
<u>2.2.2.2 Implication des PTKs de la famille de Src</u>	112
<u>2.2.2.3 Expression de la cavéoline-1 par les FLSs</u>	114
<u>2.2.3 Discussion</u>	114
<b><u>2.3 Voies de signalisation des TLRs</u></b>	<b>117</b>
<u>2.3.1 Matériel et méthodes complémentaires</u>	120
<u>2.3.1.1 Culture des macrophages exprimant ou non TLR-2, TLR-4, TLR-6 et MyD88</u>	120
<u>2.3.1.2 Dosage du TNF-<math>\alpha</math></u>	121
<u>2.3.1.3 Dosage du NO</u>	121
<u>2.3.2 Résultats</u>	121
<u>2.3.2.1 Rôle des TLRs dans la libération de médiateurs de l'inflammation</u>	121
<u>2.3.2.2 Rôle de l'intégrité de la membrane plasmique dans la libération de cytokines</u>	125
<u>2.3.2.3 Rôle de MyD88 dans la libération de médiateurs de l'inflammation</u>	126
<u>2.3.2.4 Phosphorylation de la FAK induite par le LPS</u>	127
<u>2.3.2.5 Implication de la FAK dans la libération de cytokines induite par le LPS</u>	129
<u>2.3.2.6 Rôle de MyD88 dans la phosphorylation de la FAK</u>	130
<u>2.3.3 Discussion</u>	131
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>136</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>140</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

aa	acide aminé
ADAM	« a disintegrin and metalloproteinase domain »
AP-1	« activator protein-1 »
BLP	« bacterial lipoprotein »
BP	« binding protein »
CD	cellule dendritique
CDF	cellule dendritique folliculaire
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigènes
CpG	cytosine phosphate guanine
EGF	« epidermal growth factor »
ELISA	« enzyme-linked immunosorbent assay »
ERK	« extracellular signal-regulated kinase »
FAK	« focal adhesion kinase »
FLIP	« Fas-associated death domain-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein »
FLS	« fibroblast-like synoviocyte »
FRNK	« FAK related non kinase »
HLA	« human leukocyte antigen »
HSP	« heat shock protein »
ICAM	« intercellular adhesion molecule »
Ig	immunoglobuline
IFN	interféron
IL	interleukine
IKK	I $\kappa$ B kinase
IRAK	« IL-1RI-associated protein kinase »
IRF	« interferon regulatory factor »
JAK	Janus kinase
JNK	« jun-N-terminal kinase »
LB	lymphocyte B
LIF	« leukemia inhibitory factor »
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphocyte T
MAL	« MyD88-adaptor-like »

MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
MCP	« monocyte-chemoattractant protein »
MIP	« macrophage inflammatory protein »
MMP	« matrix-metalloproteinase »
MTT	3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
MyD	« myeloid differentiation factor »
NF- κB	« nuclear factor κB »
NO	oxyde nitrique
NOD	non-obese diabetes
OPG	ostéoprotégérine
PAMP	« pathogen-associated molecular pattern »
PCR	« polymerase chain reaction »
PDGF	« platelet-derived growth factor »
PG	peptidoglycan
PI	phosphatidylinositol
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PNN	polynucléaire neutrophile
PR	polyarthrite rhumatoïde
PRR	« pattern recognition receptor »
PTK	protéine tyrosine kinase
Pyk	« proline-rich tyrosine kinase »
R	récepteur
RANK	« receptor activator of nuclear factor κB »
RANTES	« regulated on activation normal T cells expressed and activated »
RT	« reverse transcription »
SCID	« severe combined immunodeficient »
SDF	« stroma-derived factor »
STAT	« signal transducer and activator of transcription »
TAB	« TAK-1 binding protein »
TAK	« TGF-β-activated kinase »
TGF	« transforming growth factor »
TICAM	« TIR-containing adaptor molecule-1 »
TIMP	« tissue inhibitor of metalloproteinase »
TIR	« Toll-IL-1 receptor »

TIRAP	« TIR domain-containing adapter protein »
TLR	« Toll-like receptor »
TNF	« tumor necrosis factor »
TRAF	« TNF-receptor-associated factor »
TRIF	« TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ »
VCAM	« vascular cell adhesion molecule »
VEGF	« vascular endothelial growth factor »

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### Figures

Figure 1	Déformations caractéristiques des mains au cours de la PR	9
Figure 2	Destructions articulaires caractéristiques de la PR	11
Figure 3	Phases de la pathogénie de la PR	19
Figure 4	Représentation du nombre total d'espèces bactériennes identifiées chez des patients atteints de PR	20
Figure 5	Ligands des TLRs	23
Figure 6	Représentation schématique de la structure des intégrines	25
Figure 7	Coupes histologiques des co-implants FLSs/cartilage humain dans le modèle de la souris SCID	29
Figure 8	Voies de signalisation contribuant à la survie/résistance à l'apoptose des FLSs rhumatoïdes	32
Figure 9	Voies de signalisation des MAPKs	35
Figure 10	Activation de NF- $\kappa$ B	37
Figure 11	Voies de signalisation des facteurs STATs	38
Figure 12	Représentation schématique de la structure des MMPs	45
Figure 13	Différenciation des ostéoclastes induite par RANKL	48
Figure 14	Représentation schématique de la structure de la protéine I/II de <i>S. mutans</i> OMZ 175 sérotype f et fonction des différents domaines	51
Figure 15	Zone d'homologie entre la protéine I/II et la chaîne $\alpha$ 2 des IgG humaines	54
Figure 16	Expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 dans les FLSs rhumatoïdes et les FLSs arthrosiques activés ou non par la protéine I/II pendant 1 h et 3 h	58
Figure 17	Cinétique de libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes activés ou non par la protéine I/II	59
Figure 18	Libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes et les FLSs de patients atteints d'arthrose activés par la protéine I/II pendant 6 h et 20 h	60
Figure 19	Profil électrophorétique de l'ARN total extrait de FLSs rhumatoïdes stimulés ou non par la protéine I/II pendant 4 h	82
Figure 20	Cinétique de phosphorylation de ERK1/2, JNKs et p38 dans les FLSs de patients atteints d'arthrose stimulés par la protéine I/II pendant 1 à 60 min	96
Figure 21	Inhibition par le PD98059 et le SB203580 de la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs de patients atteints d'arthrose	97
Figure 22	Organisation des domaines de la FAK	100
Figure 23	Voies de signalisation reliant la FAK aux MAPKs	102
Figure 24	Activation des MAPKs par Shc indépendamment de la FAK	103

Figure 25	Expression de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines à la surface des FLSs	112
Figure 26	Inhibition par l'herbimycine A de la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes stimulés par la protéine I/II	113
Figure 27	Phosphorylation de la FAK sur le résidu Tyr-925, de Src activé et de ERK1/2 activées	113
Figure 28	Expression de la cavéoline-1 par les FLSs	114
Figure 29	Voie de signalisation commune aux récepteurs de l'IL-1/IL-18 et aux TLRs	117
Figure 30	Voies de signalisation des TLRs MyD88-dépendantes et MyD88-indépendantes	118
Figure 31	Libération de TNF- $\alpha$ et de NO par les macrophages TLR-2 <sup>+/+</sup> /TLR4 <sup>+/+</sup> ainsi que les macrophages TLR-2 <sup>-/-</sup> et TLR-4 <sup>-/-</sup> activés par la protéine I/II	122
Figure 32	Libération de TNF- $\alpha$ par les macrophages TLR-6 <sup>+/+</sup> et les macrophages TLR-6 <sup>-/-</sup> activés par la protéine I/II	123
Figure 33	Libération d'IL-6 par les FLSs rhumatoïdes activés par la protéine I/II en l'absence ou en présence d'anticorps anti-TLR-2 et anti-TLR-4	124
Figure 34	Inhibition par la filipine et la nystatine de la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes activés par la protéine I/II	125
Figure 35	Libération de TNF- $\alpha$ et de NO par les macrophages MyD88 <sup>+/+</sup> et les macrophages MyD88 <sup>-/-</sup> stimulés par la protéine I/II	126
Figure 36	Phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les macrophages MyD88 <sup>+/+</sup> stimulés par le LPS	128
Figure 37	Phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les FLSs rhumatoïdes stimulés par le LPS	128
Figure 38	Libération d'IL-6 par les fibroblastes FAK <sup>+/+</sup> transfectés ou non avec FRNK et les fibroblastes FAK <sup>-/-</sup> stimulés par le LPS	129
Figure 39	Libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes transfectés ou non avec FRNK stimulés par le LPS	130
Figure 40	Phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les macrophages MyD88 <sup>-/-</sup> stimulés par la protéine I/II et le LPS	131
Figure 41	Schéma général	139

## Tableaux

Tableau 1	Critères de l'ACR pour le diagnostic de la PR	8
Tableau 2	Epitope de susceptibilité de la PR	14
Tableau 3	Classification des streptocoques	50

# 1 La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est actuellement considérée comme le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires (prévalence = 0,4% de la population européenne et environ 150 000 à 250 000 malades en France). Elle se caractérise par une atteinte inflammatoire des synoviales articulaires et tendineuses, prédominante aux mains, aux pieds et aux genoux. Elle se définit comme un rhumatisme inflammatoire polyarticulaire, évoluant de façon chronique par poussées, pouvant entraîner des déformations et destructions articulaires. La PR peut également être une maladie systémique entraînant des manifestations extra-articulaires pouvant compromettre le pronostic vital. Elle touche plus fréquemment les femmes (3 femmes pour 1 homme) et débute le plus souvent vers 30 à 50 ans, mais peut aussi se déclarer aux extrêmes de la vie.

## 1.1 Manifestations cliniques

Le diagnostic de PR est posé par l'utilisation des critères de l'ACR (American College of Rheumatology, 1987) (Arnett et coll., 1988) dont la sensibilité et la spécificité ne sont pas absolues surtout dans les formes débutantes (tableau 1). Au moins 4 des 7 critères doivent être satisfaits. Les critères 1 et 4 doivent être présents depuis au moins 6 semaines.

Critère	Définition
1. Raideur matinale	Raideur matinale articulaire et péri-articulaire durant au moins une heure avant l'amélioration maximale
2. Arthrite d'au moins trois groupes articulaires	Gonflement des tissus mous ou épanchement (et non pas saillie osseuse isolée) d'au moins trois groupes articulaires, constaté par un médecin. Les 14 groupes possibles sont à gauche ou à droite les interphalangiennes proximales (IPP), les métacarpophalangiennes (MCP), les poignets, les coudes, les genoux, les chevilles et les métatarsophalangiennes (MTP)
3. Arthrite des articulations des mains	Gonflement d'au moins un groupe articulaire (voir définition 2) parmi lesquels les poignets, les MCP ou les IPP
4. Arthrite symétrique	Atteinte simultanée des même groupes articulaires (voire définition 2) des deux côtés du corps (atteinte bilatérale des IPP, MCP ou MTP sans symétrie absolue)
5. Nodules rhumatoïdes	Nodules sous-cutanés sur les proéminences osseuses, les surfaces d'extension ou dans les régions para-articulaires, observés par un médecin
6. Facteurs rhumatoïdes sériques	Mise en évidence d'une quantité anormale de facteurs rhumatoïdes sériques par une méthode dont les résultats sont positifs dans moins de 5% des sujets témoins normaux
7. Modifications radiologiques	Modifications typiques des PR sur les radiographies de face des mains et des poignets avec obligatoirement des érosions ou une décalcification osseuse évidente, localisée, des articulations atteintes ou de façon plus nette dans les régions adjacentes à ces articulations (des modification d'allure seulement arthrosique ne conviennent pas)

Tableau 1 : Critères de l'ACR pour le diagnostic de la PR (Arnett et coll., 1988)

La PR peut débuter de façon insidieuse, progressive ou aiguë. Les manifestations initiales sont le plus souvent des polyarthrites (au moins 4 arthrites) symétriques, concernant les articulations des mains [poignets, métacarpophalangiennes (MCP), interphalangiennes proximales (IPP)] et des avant-pieds [métatarsophalangiennes (MTP)]. Cependant des mono- ou oligoarthrites (jusqu'à 3 arthrites) peuvent être observées. L'inflammation articulaire se caractérise par le gonflement et l'augmentation de la température des articulations touchées. Elle s'accompagne d'une douleur d'horaires inflammatoire, prédominante en fin de nuit et en début de journée, ainsi que d'une raideur articulaire matinale prolongée (dérouillage matinal).

Au cours de l'évolution de la pathologie, qui se fait de façon progressive sur plusieurs années, le nombre d'articulations touchées augmente, le cartilage, l'os et les structures périarticulaires (capsule, tendons) sont détruits, ce qui conduit aux déformations caractéristiques de la PR (figure 1). La maladie évolue par poussées inflammatoires, plus ou moins rapprochées selon les patients.



**Figure 1 : Déformations caractéristiques des mains au cours de la PR**

Les atteintes extra-articulaires, parfois sévères, peuvent compliquer la maladie articulaire et conduire au décès. Il s'agit de manifestations inconstantes en gravité et en nombre selon les patients.

- Nodules rhumatoïdes : ce sont des nodules sous-cutanés se situant le long des crêtes osseuses et autour des articulations. Ils sont asymptomatiques mais peuvent se surinfecter.
- Syndrome de Gougerot-Sjögren : il s'agit d'une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines, essentiellement lacrymales et salivaires, conduisant à une diminution de leur activité sécrétrice qui se traduit cliniquement par une sécheresse buccale et ophtalmologique. Il peut entraîner une kératoconjonctivite.

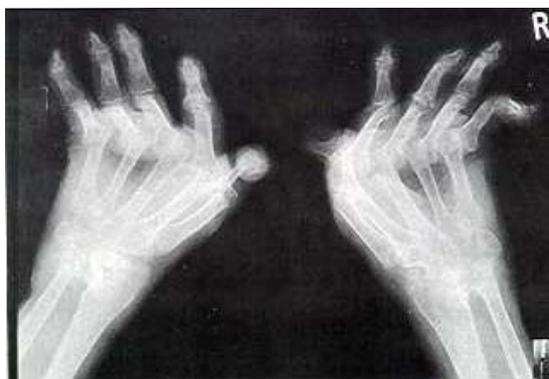
- Vascularite rhumatoïde : l'atteinte inflammatoire des vaisseaux est la complication la plus grave, pouvant mettre en jeu le pronostic vital. Elle se traduit par une artérite nécrosante des vaisseaux, une ulcération cutanée, une péricardite, une multinévrite ou une perforation digestive.
- Manifestations pulmonaires : elles peuvent être diverses (pleurésie, nodules rhumatoïdes intra-pulmonaires, fibrose interstitielle).
- Manifestations rénales : elles s'observent essentiellement dans les PR longtemps évolutives (protéinurie, insuffisance rénale).
- Manifestations cardiaques : il s'agit de péricardites, fréquentes mais asymptomatiques et très rarement d'une inflammation des valves.

Il n'existe pas de signes biologiques totalement spécifiques de la PR même si certains examens sanguins et synoviaux permettent de contribuer au diagnostic de PR et d'en suivre l'évolution. Il existe un syndrome inflammatoire qui varie en fonction de l'activité de la maladie et permet de suivre les poussées. La vitesse de sédimentation (VS) est élevée et les taux sériques des protéines de l'inflammation augmentent (ex : CRP, fibrinogène). Le liquide synovial est stérile, ne contient pas de cristaux mais se caractérise par une augmentation du nombre des cellules de l'inflammation [5000 à 25000/mm<sup>3</sup> surtout de type polynucléaire neutrophile (PNN)].

La mise en évidence d'auto-anticorps peut aider au diagnostic de la PR. On trouve les facteurs rhumatoïdes (FR) qui sont des auto-anticorps de type IgM anti-IgG. Ils sont observés dans environ 70 à 75% des PR mais également dans d'autres affections et chez certaines personnes saines ( $\geq 15\%$  chez les personnes de plus de 70 ans). Ils constituent un élément de pronostic de la PR. Des taux sériques initialement élevés sont souvent associés aux formes sévères de la maladie. On observe également des anticorps anti-filaggrine/profilaggrine, plus spécifiques de la PR (spécificité de 95%) que les RF mais plus rares (sensibilité d'environ 40%). Des tests de nouvelle génération permettent actuellement de détecter des auto-anticorps dirigés contre des résidus citrulline (anticorps anti-CCP) de différentes protéines, telle la filaggrine et la vimentine (Vossenaar et coll., 2004). Ces anticorps anti-CCP sont très intéressants pour le diagnostic de la PR, car ils sont très spécifiques de la PR (95%), les protéines de la membrane synoviale étant anormalement citrullinées dans la PR (Baeten et coll., 2001). Ils présentent une sensibilité de l'ordre de 70%. Les anticorps anti-CCP peuvent être détectés avant l'apparition d'un ou de plusieurs symptômes de la PR et constituent donc un facteur prédictif (Rantapaa-Dahlqvist et coll., 2003; van Gaalen et coll., 2004). Il a été également montré que les peptides

citrullinés présentent une forte affinité pour les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et conduisent à l'activation des lymphocytes T (LT) CD4 chez des souris transgéniques exprimant des allèles de susceptibilité de la PR (HLA-DRB1\*0401) (Hill et coll., 2003). Les anticorps anti-CCP ont été également associés aux allèles de susceptibilité de la PR chez l'homme (van Gaalen et coll., 2004)

Des signes radiologiques apparaissent au cours de la plupart des PR. Ils permettent de suivre l'évolution de la pathologie et de juger de l'efficacité des traitements de fond. Une PR évolutive se caractérise par une déminéralisation des articulations, puis par des érosions osseuses et parfois par une véritable destruction (figure 2). Néanmoins près de 20% des PR sont non érosives.



**Figure 2 : Destructions articulaires caractéristiques de la PR (radiographie de mains)**

## **1.2 Pathogénie de la PR**

Il est actuellement acquis que de nombreux facteurs interviennent dans l'étiopathogénie de la PR : facteurs génétiques, environnementaux, hormonaux et psychologiques qui contribuent à l'activation d'une réponse immunitaire innée et acquise, incontrôlée. La cavité synoviale est le siège d'une réaction inflammatoire excessive qui touche plus particulièrement la membrane synoviale.

La membrane synoviale, constituée de macrophages (synoviocytes de type A) et de fibroblastes (synoviocytes « fibroblast-like » (FLSs) ou synoviocytes de type B) est habituellement pauci cellulaire avec une couche bordante (intimale) composée de 1 à 2 cellules. Au cours de la PR, elle devient hyperplasique : la couche bordante s'épaissit pour comprendre 4

à 10 cellules, parfois même plus de 20 cellules. La membrane synoviale rhumatoïde est le siège d'une inflammation chronique caractérisée par une infiltration cellulaire où prédominent les macrophages, les lymphocytes B (LB) et les LT. On trouve également des cellules dendritiques (CD), des mastocytes et des plasmocytes (pannus rhumatoïde). Takemura et coll. ont montré que dans 56% des cas, les LT, les LB, les macrophages et les CD sont présents en infiltrats diffus sans structure spécifique. Dans les autres cas, les LT et LB infiltrés peuvent s'organiser en microstructures de deux types qui s'excluent mutuellement : i) en follicules secondaires avec un centre germinatif caractérisé par une prolifération cellulaire et la présence d'un réseau de CD folliculaires (CDF) ou ii) en agrégats de LT et LB sans centre germinatif et sans CDF, ce qui distingue cet agrégat d'un follicule primaire. Dans les deux cas, on observe la présence de plasmocytes qui s'accumulent sous la couche bordante (Takemura et coll., 2001).

## **1.2.1 La réaction inflammatoire synoviale**

### **1.2.1.1 Le rôle de l'immunité adaptative**

Historiquement, les **LB**, dont certains synthétisent des FR, sont les premiers acteurs immunologiques à avoir été mis en cause dans la pathogénie de la PR. La découverte des FR a conduit à l'hypothèse selon laquelle la PR pourrait être une maladie auto-immune causée par des auto-anticorps.

Depuis la découverte des FR, d'autres auto-anticorps ont été détectés chez les patients atteints de PR : des auto-anticorps anti-CCP et des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du cartilage (par exemple le collagène de type II, l'aggrécane et la glycoprotéine gp39). Un antigène plus inattendu car ubiquiste a été également mis en cause : la glucose-6-phosphate isomérase (GPI). Le rôle de la GPI a été mis en évidence dans un modèle d'arthrite spontanée chez des souris K/BxN, issues du croisement de souris exprimant le transgène KRN et de souris NOD (molécule A<sup>g7</sup> du CMH) (Mangialaio et coll., 1999). Les LT de ces souris K/BxN expriment le récepteur (TCR) KRN, qui reconnaît la GPI lorsque cet antigène est présenté par les molécules A<sup>g7</sup> et leurs LB synthétisent des anticorps anti-GPI. L'injection d'anticorps anti-GPI purifiés de souris K/BxN à des souris saines permet de leur transférer l'inflammation articulaire, suggérant que ces anticorps sont directement impliqués dans la pathogénie de l'arthrite (Matsumoto et coll., 1999). Il a été également montré que le transfert des anticorps anti-GPI à des souris immunodéficientes, n'exprimant ni LT ni LB, provoque une arthrite chez ces animaux, indiquant que les anticorps anti-GPI sont directement arthritogènes en l'absence de lymphocytes

(Korganow et coll., 1999). L'atteinte spécifiquement articulaire s'expliquerait par le fait que ces anticorps anti-GPI ainsi que des fragments C3b en se fixant à la GPI exprimée au niveau du cartilage, activeraient le complément par la voie alterne (Matsumoto et coll., 2002; Wipke et coll., 2002). Le cartilage est dépourvu d'inhibiteurs membranaires du complément et sa seule protection réside dans le pouvoir "humectant" de l'acide sialique, qui pourrait être masqué par le dépôt d'immun-complexes. Bien que les anticorps anti-GPI puissent jouer un rôle majeur dans les modèles animaux d'arthrite, ils ne semblent pas avoir la même importance chez l'Homme (Matsumoto et coll., 2002). Néanmoins, la présence d'anticorps anti-GPI pourrait être associée aux signes extra-articulaires de la PR : en effet, les patients atteints de PR et présentant des complications extra-articulaires ont des concentrations sériques en anticorps anti-GPI plus élevées que des patients atteints de PR ne présentant pas de signes extra-articulaires et des sujets sains (van Gaalen et coll., 2004).

D'autres arguments sont en faveur d'un rôle important des LB dans la pathogénie de la PR. Ainsi, de nouveaux activateurs des LB, telle la cytokine « B cell activating factor belonging to the TNF superfamily » (BAFF ou Blys) ont été identifiés dans la PR ainsi que dans d'autres maladies auto-immunes. BAFF est synthétisée par les monocytes/macrophages et les CD. En se fixant sur son récepteur BAFF-R à la surface des LB, BAFF donne un signal de survie, de maturation et d'activation aux LB (Mackay et Browning, 2002; Mackay et Mackay, 2002). Sa surexpression chez des souris induit la production d'auto-anticorps, dont des FR (Mackay et coll., 1999). Des concentrations sériques et synoviales importantes de BAFF ont été mises en évidence chez des patients atteints de PR, ce qui suggérerait que BAFF puisse jouer un rôle dans la synthèse d'auto-anticorps au cours de la PR (Cheema et coll., 2001).

Les LB sont également capables d'activer les LT auto-réactifs. Ainsi, Chan et coll. ont montré dans le modèle de la souris MRL/Lpr, qui présente des arthrites, des néphropathies et un syndrome sec, que l'infiltration tissulaire des LT et les manifestations auto-immunes sont dépendantes des LB : absence de LT chez des souris immunodéficientes en LB mais présence chez des souris transgéniques dont les LB expriment des IgM membranaires mais pas d'anticorps solubles (Chan et coll., 1999). En outre, il a été démontré que les LB présents dans le thymus jouent un rôle dans l'acquisition du répertoire LT en régulant la sélection positive de ces lymphocytes (Joao et coll., 2004).

Takemura et coll. ont également montré que les LB étaient indispensables à l'activation des LT dans la membrane synoviale rhumatoïde et que leur déplétion par des anticorps anti-CD20 conduit i) à la disparition des agrégats de LT et LB synoviaux, ii) à une diminution des LT infiltrant la membrane synoviale et iii) à la diminution de production d'interleukine (IL)-1 et de

facteur nécrosant des tumeurs (TNF)- $\alpha$  (Takemura et coll., 2001). L'administration d'anticorps anti-CD20 (rituximab) à des patients atteints de PR permet l'amélioration des signes cliniques de la PR, alors que les concentrations sériques d'immunoglobulines ne sont pas modifiées (Edwards et coll., 2004), suggérant que les LB puissent jouer un rôle dans la pathogénie de la PR, indépendamment de la synthèse d'anticorps (Tsokos, 2004).

Les deuxièmes acteurs immunologiques à avoir été impliqués dans la pathogénie de la PR sont les **LT**. En effet, la forte infiltration de la membrane synoviale par des LT et la découverte de l'association de la PR aux antigènes HLA-DR4 (DRB1\*04) et DR1 (DRB1\*01) ont suggéré que ces cellules joueraient un rôle important dans cette pathologie. Sur 20 sous-types de DR4 seuls quelques-uns semblent impliqués dans la maladie : DRB1\*0401, DRB1\*0404, DRB1\*0405 ; de même pour DR1 : DRB1\*0101, DRB1\*0102. Ils ont en commun une série d'acides aminés (QR/KRA) entre les positions 70 et 74 de la troisième région hypervariable de la chaîne DR $\beta$ 3. Cette séquence est appelée « épitope de susceptibilité » ou « épitope partagé » (shared epitope) (Gregersen et coll., 1987). Elle pourrait jouer un rôle de reconnaissance d'antigènes déclenchant les phénomènes auto-immuns, être responsable d'une altération de la réponse immunitaire contre un agent arthritogène ou moduler les phénomènes de tolérance en interférant précocement avec les sélections positive et négative. Cette séquence est également présente dans des protéines virales ou bactériennes (tableau 2).

Protéine	Séquence en acides aminés
HLA-DR1 $\beta$ *0404	QKRAAVDTYCRHNYG
DnaJ hsp ( <i>Escherichia coli</i> )	QKRAAYDQYGHAAFE
DnaJ hsp ( <i>Lactobacillus lactis</i> )	QKRAAYDQYGEAGAN
DnaJ hsp ( <i>Brucella ovis</i> )	QKRAAYDRFGHAAFE
Protéine gp110 (virus d'Epstein-Barr)	QKRAAQRAAGPSVAS

**Tableau 2 : Epitope de susceptibilité de la PR**

Elle pourrait donc permettre aux micro-organismes d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte ou au contraire être à l'origine d'une réponse auto-immune chez l'hôte. Bien que de nombreuses hypothèses aient été émises, le rôle exact de cette séquence n'est pas encore connu. Récemment, Schönland et coll. ont montré que les LT CD4 de patients atteints de PR, porteurs des allèles HLA-DRB1\*04, présentent des érosions télomériques anormales, qui contribueraient à la sénescence et à l'autoréactivité des LT (Schönland et coll., 2003). Cependant, ceci a été

également observé chez des sujets sains porteurs des allèles HLA-DRB1\*04 (Schönland et coll., 2003).

Outre l'association aux antigènes HLA, d'autres mécanismes conduisent probablement à des anomalies des LT chez les patients atteints de PR, qui se traduisent par i) un répertoire TCR différent de celui des personnes saines, répertoire qui pourrait contribuer à la sélection de LT autoréactifs (Yang et coll., 1999), ii) une expansion clonale de LT CD4, se distinguant par l'absence d'expression de CD28 et de CD7, par leur défaut à entrer en apoptose et par leur autoréactivité (Schmidt et coll., 1996) et iii) des anomalies intrinsèques de différenciation des LT CD4 : *in vitro*, ils se différencient en LTh1 mais peu ou pas en LTh2, contrairement aux LT de personnes saines, ce qui pourrait être à l'origine du déséquilibre en faveur des LTh1 au cours de la PR (Skapenko et coll., 1999). Il a été également suggéré que les patients atteints de PR pourraient avoir un déficit en LT régulateurs naturels ( $T_{reg1}$ : CD4, CD25, CTLA-4), ce qui se traduit par un défaut d'inhibition des LTh1 autoréactifs (Yudoh et coll., 2000; Goronzy et Weyand, 2004).

Le rôle majeur des LT dans l'inflammation synoviale et le développement des arthrites a été suggéré par deux modèles animaux. Klimiuk et coll. ont montré que les LT CD4 jouent un rôle central dans l'inflammation synoviale en régulant la survie des macrophages (Klimiuk et coll., 1999) : l'implantation de membranes synoviales rhumatoïdes déplétées en LT à des souris immunodéficientes (NOD-SCID) conduit à une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires synoviales (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-15) et de métalloprotéases (MMPs), associée à une disparition des macrophages synoviaux. L'administration de LT et d'INF- $\gamma$  permet de restaurer la population de macrophages synoviaux et l'expression des médiateurs inflammatoires et destructeurs (Klimiuk et coll., 1999).

Sakaguchi et coll. ont décrit des arthrites spontanées chez les souris SKG dont les LT possèdent des propriétés arthritogéniques intrinsèques liées à une mutation ponctuelle dans le gène codant ZAP-70, protéine clé des voies de signalisation intracellulaire des LT (Sakaguchi et coll., 2003). Le transfert de LT CD4 de ces souris SKG à des souris athymiques induit des arthrites. En effet, ZAP-70 mutée conduit à une résistance à la stimulation et à l'apoptose via le TCR. Cette mutation provoque également une altération dans la sélection des LT, conduisant à la sélection positive de LT autoréactifs (Sakaguchi et coll., 2003).

Il a été également montré qu'un nombre élevé de LT totaux et de LT cytotoxiques dans la membrane synoviale de patients atteints de PR, est associé à des formes sévères de destruction

articulaires au cours de la PR, suggérant que ces cellules jouent un rôle dans la destruction du cartilage et de l'os (Kraan et coll., 2004).

Enfin, des stratégies thérapeutiques visant les LT ont montré une certaine efficacité dans le traitement de la PR : anticorps anti-CD4 qui interfèrent avec la fonction des LT sans les dépler (Schulze-Koops et coll., 1998), protéine de fusion CTLA-4Ig (abatacept) qui présente une forte affinité pour le CD80/CD86 des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et empêche donc l'activation des LT (Kremer et coll., 2003). Tamamura et coll. ont montré récemment que l'administration sous-cutanée d'un antagoniste de CXCR4, récepteur de SDF-1, est capable d'améliorer une arthrite induite par injection de collagène chez la souris (Tamamura et coll., 2004).

### 1.2.1.2 Le rôle de l'immunité innée

Le développement de techniques permettant la détection de cytokines dans le liquide synovial et la membrane synoviale a conduit à reconsidérer le rôle de l'immunité innée dans la pathogénie de la PR. Les cytokines libérées par les macrophages et les FLSs (IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$ ) sont présentes en plus grandes quantités par rapport aux cytokines secrétées par les LT (IL-2, INF- $\gamma$ ). En outre, l'efficacité des stratégies thérapeutiques visant à bloquer ces cytokines (anticorps anti-TNF- $\alpha$ , récepteurs solubles du TNF- $\alpha$ , IL-1Ra, ...) montre l'importance de ces médiateurs dans l'inflammation chronique et la destruction articulaire observées au cours de la PR. Ces cytokines jouent également un rôle dans l'immunité adaptative : l'interaction LT/macrophages synoviaux conduit à la sécrétion par les macrophages de TNF- $\alpha$  (McInnes et coll., 1997) et d'IL-15 qui par un effet paracrine contribue à la prolifération des LT (McInnes et coll., 1996).

Les **macrophages** ont un phénotype activé au cours de la PR : ils sont considérés comme la source majeure de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 et de NO. Ils libèrent des facteurs de croissance (GM-CSF), des chémokines (IL-8, MIP-1, MCP-1), des enzymes impliquées dans la dégradation du cartilage, telles la MMP-3 et la MMP-9 (Ahrens et coll., 1996) et sur-expriment des molécules de classe II du CMH (Kinne et coll., 2000). Les monocytes circulants présentent également un phénotype activé (libération de cytokines pro-inflammatoires et de prostanoïdes, expression de molécules d'adhésion) (Liotte et coll., 1996). Le nombre de précurseurs monocytaires CD14<sup>+</sup> est supérieur chez les patients atteints de PR que chez les sujets sains, suggérant une altération de l'homéostasie monocyttaire en amont de leur activation synoviale (Hirohata et coll., 1996).

L'importance des macrophages a été également démontrée dans des modèles animaux d'arthrite clairement dépendants des lymphocytes, telle l'arthrite induite par le collagène chez la souris : l'injection de collagène de type II, capable d'activer les monocytes/macrophages *in vitro* (Goto et coll., 1988), à des souris DBA/1 déficientes en LT et LB, induit une arthrite cliniquement comparable à celle induite chez les souris DBA/1 immunocompétentes et des anticorps anti-CD11b ciblant spécifiquement les macrophages permettent de bloquer le transfert de l'arthrite induite par le collagène à des souris immunodéficientes (SCID) (Plows et coll., 1999).

Les monocytes/macrophages et plus particulièrement les récepteurs impliqués dans leur recrutement aux sites inflammatoires (CCR2, CCR5) constituent actuellement une cible thérapeutique intéressante en pathologie humaine. Cependant, les résultats obtenus au cours d'expériences animales sont contradictoires : si l'administration d'antagonistes de CCR2 et de CCR5 à des souris permet d'améliorer l'arthrite expérimentale murine (Gong et coll., 1997; Plater-Zyberk et coll., 1997), Quinones et coll. ont montré récemment que la délétion du gène codant CCR5 ne modifie pas le développement de l'arthrite murine (Quinones et coll., 2004). Ces auteurs ont également démontré que la délétion du gène codant CCR2 peut aggraver l'arthrite induite par injection de collagène chez la souris : en effet, ces souris développent une inflammation synoviale plus sévère que les souris contrôle (FR, infiltration de monocytes et de LT, ...) (Quinones et coll., 2004). Ces résultats surprenants suggèrent que CCR2 pourrait avoir un effet protecteur dans le modèle murin d'arthrite. Le rôle d'un antagoniste de CCR2 est actuellement évalué dans des études cliniques.

D'autres cellules interviennent également dans la pathogénie de la PR. Wipke et coll. ont montré que si on déplète des souris B6.AKR en PNNs à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre un marqueur de surface spécifique des PNNs, on inhibe l'induction de l'arthrite provoquée par l'injection du sérum de souris K/BxN (Wipke et Allen, 2001). Cet effet est transitoire et disparaît avec l'apparition de nouveaux PNNs. Les **mastocytes** pourraient jouer un rôle plus précoce : la dégranulation des mastocytes apparaît dès la 1<sup>ère</sup> heure après injection de sérum de souris K/BxN à des souris C57BL/6J et se prolonge pendant 12 jours (Lee et coll., 2002). L'injection de ce sérum arthritogène à des souris déficientes en mastocytes n'induit pas d'inflammation articulaire, mais ce phénomène est réversible après greffe de mastocytes, indiquant un rôle potentiel des mastocytes dans le développement de l'arthrite (Lee et coll., 2002).

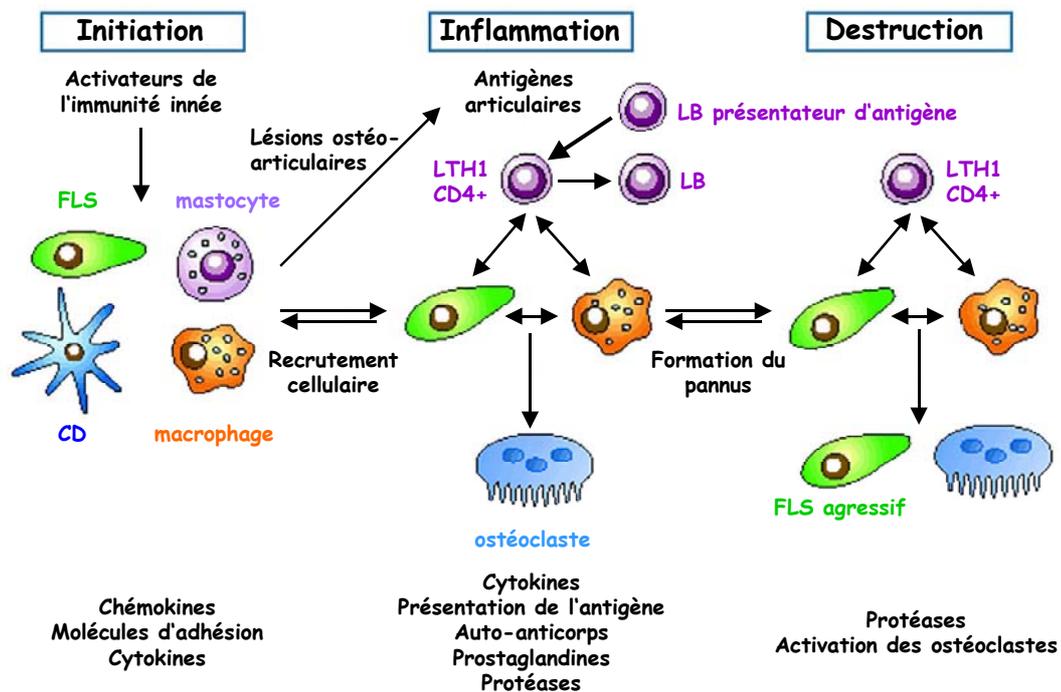
Les **immuncomplexes** présents dans l'articulation participent également au recrutement de cellules inflammatoires et à la libération de cytokines pro-inflammatoires en interagissant avec les RFc et en activant le complément. Ji et coll. ont montré que les RFc $\gamma$ III sont impliqués dans le développement des arthrites après transfert de sérum de souris K/BxN (Ji et coll., 2002). Ces auteurs ont également démontré, en utilisant des souris k.o. pour différents fragments du complément, que la voie alterne du complément et surtout l'interaction C5a/RC5a sont indispensables au développement de l'inflammation synoviale chez la souris K/BxN (Ji et coll., 2002). Le rôle essentiel du RC5a dans l'inflammation articulaire et plus particulièrement dans le recrutement des PNNs, a été confirmé dans le modèle de l'arthrite induite par injection de collagène : les souris k.o pour RC5a ne développent pas d'arthrite alors que les anticorps anti-collagène se déposent bien à la surface du cartilage (Grant et coll., 2002). L'administration orale d'un antagoniste du RC5a permet également de réduire l'arthrite induite par l'injection d'albumine bovine à des rats (Woodruff et coll., 2002). Des études histochimiques ayant montré que l'expression du RC5a est augmentée dans la membrane synoviale rhumatoïde, il est fort probable que ce récepteur puisse également jouer un rôle important en pathologie humaine (Neumann et coll., 2002).

Les **FLSs**, cellules résidentes de la membrane synoviale qui ne sont pas des acteurs classiques de la réponse inflammatoire, sont activés par l'environnement rhumatoïde et contribuent également à la réaction inflammatoire. Leur rôle essentiel dans la pathogénie de la PR sera décrit au chapitre 2 de l'introduction.

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle que pourraient jouer ces différentes cellules présentes dans l'articulation rhumatoïde. Actuellement, on considère que la pathogénie de la PR peut schématiquement être subdivisée en 3 phases, qui ne sont pas mutuellement exclusives : la phase d'initiation, la phase inflammatoire et la phase de destruction (Firestein, 2003) (figure 3).

Dans le modèle présenté par Firestein, la phase d'initiation fait probablement intervenir la stimulation des FLSs, des CD, des mastocytes et des macrophages responsables d'une réponse immunitaire innée conduisant à la migration de monocytes et de lymphocytes dans la cavité articulaire (Firestein et Zvaifler, 2002; Firestein, 2003). Au cours de la phase inflammatoire, l'activation des LT reconnaissant un ou plusieurs antigène(s) du soi ou du non-soi dans l'articulation conduit à la stimulation des LB et à l'amplification de l'activation des macrophages et des FLSs et du recrutement cellulaire. La dernière phase consiste en la destruction articulaire

qui est essentiellement médiée par les ostéoclastes et des effecteurs libérés par les FLSs qui acquièrent un phénotype agressif. Cependant, les connaissances de la chronologie de la pathogénie et de l'importance des différents acteurs de l'immunité restent encore sommaires.



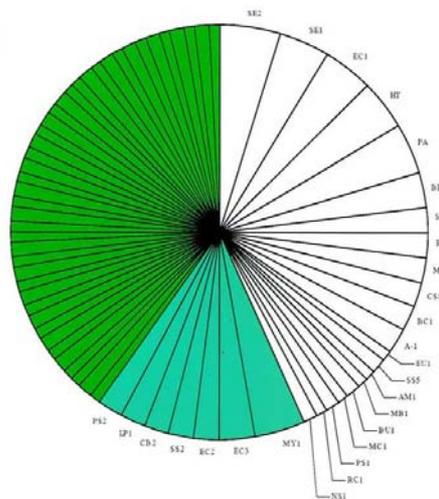
**Figure 3 : Phases de la pathogénie de la PR** d'après (Firestein et Zvaifler, 2002; Firestein, 2003)  
Les différents processus ne s'excluent pas mutuellement. L'activation de l'immunité innée et adaptative peut avoir lieu en parallèle (flèches bidirectionnelles)

### 1.2.1.2.1 Micro-organismes et composants microbiens

Le ou les stimuli responsables de la phase d'initiation de la pathogénie de la PR restent inconnus. Il est actuellement admis qu'il n'existe probablement pas d'événement initiateur spécifique mais que tout stimulus capable d'activer le système immunitaire inné au sein de l'articulation peut être à l'origine de la réponse immunitaire incontrôlée de la PR (Firestein, 2003). Le rôle que pourraient jouer les microorganismes dans le déclenchement ou l'entretien de l'inflammation articulaire observée au cours de la PR a été longtemps soupçonné mais difficile à démontrer, en partie due à la quasi-impossibilité de cultiver des agents infectieux peu virulents et multiples à partir de prélèvements synoviaux de patients atteints de PR.

L'utilisation de techniques de plus en plus sensibles a permis de démontrer qu'en réalité la cavité articulaire n'est pas un milieu stérile. Ainsi Kempself et coll. ont mis en évidence par RT-PCR la présence d'ARNr dans la cavité articulaire de patients atteints de pathologies articulaires variées, telles l'arthrose, la PR ou l'arthrite indifférenciée (Kempself et coll., 2000). Du fait de sa

très grande labilité, l'ARNr est un bon témoin de la présence récente de bactéries dans le milieu étudié. Bien que certaines espèces n'aient été retrouvées que dans les prélèvements de patients atteints de PR, leur nombre et leur variété suggèrent qu'il n'y a probablement pas d'espèce ou de bactérie bien définies qui puissent être impliquées dans la pathogénie de la PR (figure 4). En effet, 49 espèces bactériennes ont été détectées dans les prélèvements synoviaux de patients atteints de PR, chez un ou plusieurs patients: par exemple *Corynebacterium* sp, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguis*, *Pseudomonas putida*, *Leptospira* sp et *Methylobacterium* sp. D'autres espèces, essentiellement des bactéries commensales du tractus gastro-intestinal et de la peau, tels *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* et *E. coli*, ont également été identifiées dans les prélèvements de patients atteints d'arthrose ou d'arthrite indifférenciée (Kempell et coll., 2000). Il est intéressant de noter que des espèces suspectées de jouer un rôle dans l'étiopathogénie de la PR, tels les mycoplasmes, *Proteus mirabilis* et *Mycobacterium tuberculosis* et des espèces responsables d'arthrites réactionnelles n'ont pas été identifiées au cours de cette étude.



**Figure 4 : Représentation du nombre total d'espèces bactériennes identifiées chez les patients atteints de PR (Kempell et coll., 2000)**

En vert d'eau : espèces mises en évidence chez plusieurs patients atteints de PR. En vert : espèces mises en évidence chez un patient atteint de PR. En blanc : espèces mises en évidence chez des patients atteints de PR, des patients atteints d'arthrose et des patients atteints d'arthrite indifférenciée.

Etant donné que l'ARN de nombreuses bactéries commensales est détectable dans la membrane synoviale de patients atteints d'arthropathies diverses, on peut considérer que le passage intra-articulaire de bactéries constitue un phénomène assez banal. Cependant, chez certaines personnes génétiquement prédisposées ces bactéries pourraient déclencher une réaction immunitaire incontrôlée.

Des études ont également montré que les patients atteints de PR présentent une flore digestive différente de celle des sujets sains (Eerola et coll., 1994), que sa composition est influencée par le système HLA (Toivanen et coll., 2001) et que cette flore influence la sévérité de l'arthrite (Peltonen et coll., 1997).

La plupart des travaux tendent actuellement à attribuer un rôle plus important à des composants microbiens ou « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) présents dans l'articulation. Il a été ainsi montré que l'injection intra-articulaire de lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi des bactéries à Gram négatif, induit une arthrite chez la souris (Deng et coll., 1999). L'administration orale de LPS de différentes bactéries commensales du tractus gastro-intestinal à des souris permet de réactiver une arthrite induite par le collagène, ce qui indique que des PAMPs peuvent gagner les articulations à partir des muqueuses (Yoshino et coll., 1999). Des résultats équivalents ont été obtenus après injection intra-articulaire d'autres PAMPs :

- Les motifs cytosine phosphate guanine (CpG) non méthylés présents dans l'ADN bactérien (Deng et coll., 1999). Le LPS et les CpG sont en outre capables d'agir en synergie : des doses suboptimales de LPS et de CpG administrés conjointement induisent une arthrite sévère chez la souris (Deng et coll., 1999).
- Le peptidoglycane (PG), composant présent dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et négatif ainsi que des mycobactéries (Liu et coll., 2001).

Ces résultats suggèrent que des PAMPs variés, seuls ou en synergie, peuvent déclencher une réaction inflammatoire articulaire.

Zhang et coll. ont montré en outre, qu'il existe une corrélation entre la structure du PG et la capacité de certaines bactéries à induire des arthrites : en effet, la structure du PG influence i) sa résistance à la dégradation enzymatique *in vivo* et surtout ii) son activité pro-inflammatoire qui semble être le facteur déterminant de son pouvoir arthritogène (Zhang et coll., 2001; Zhang et coll., 2001). Ceci pourrait expliquer pourquoi au sein d'une même espèce certaines souches sont arthritogènes et d'autres non.

De nombreux PAMPs ont été mis en évidence dans des prélèvements synoviaux de patients atteints de PR. Ainsi, l'ADN correspondant à de nombreuses espèces bactériennes a pu être détecté dans des prélèvements de membrane synoviale par PCR (Wilkinson et coll., 1999; van der Heijden et coll., 2000; Gerard et coll., 2001). La présence de PG et d'acide muramique a été également démontrée par immunohistochimie et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Schrijver et coll., 2000; Chen et coll., 2003). L'ADN, l'ARN ainsi

que des protéines de différents virus, tels le virus d'Epstein-Barr (EBV), le cytomégalo virus (CMV) et le parvovirus B19, ont également été mis en évidence dans la membrane synoviale de patients atteints de PR (Mousavi-Jazi et coll., 1998; Takahashi et coll., 1998; Edinger et coll., 1999), mais le rôle potentiel de ces virus dans la pathogénie de la PR ne sera pas décrit dans ce manuscrit.

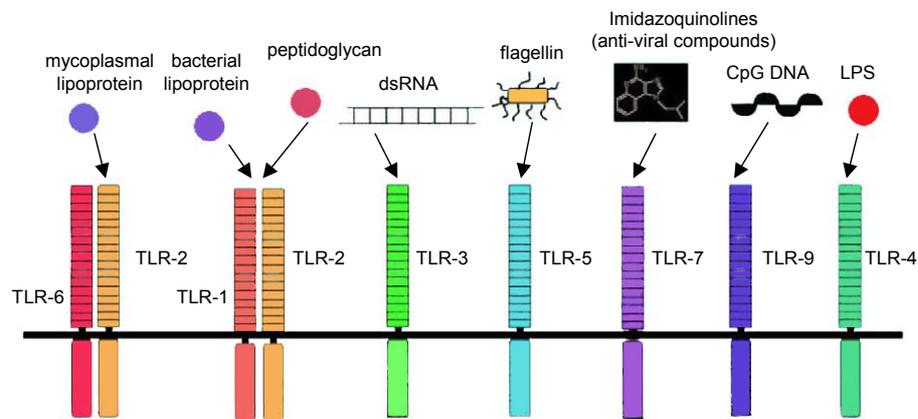
#### **1.2.1.2.2 « Pattern recognition receptors » (PRRs)**

Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs appelés « pattern recognition receptors » (PRRs), qui peuvent être classés en trois catégories : i) les récepteurs solubles, ii) les récepteurs induisant l'endocytose et iii) les récepteurs activant des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la réponse immunitaire (Medzhitov et Janeway, 2000). Parmi les PRRs solubles, figurent le fragment C1q du complément, la « mannan-binding protein » (MBP) et la CRP. Ces récepteurs agissent comme des opsonines solubles et facilitent la phagocytose ultérieure des agents infectieux. Les PRRs induisant l'endocytose sont exprimés à la surface des cellules et facilitent la phagocytose, tels le récepteur du mannose et les récepteurs scavenger. La dernière catégorie de PRRs comprend certaines intégrines (les intégrines à chaîne  $\beta 2$ , les intégrines  $\alpha \nu \beta 3$  et  $\alpha 5 \beta 1$ ) et les « Toll-like receptors » (TLRs). La reconnaissance des PAMPs peut activer différentes voies de signalisation intracellulaire conduisant à l'expression de diverses molécules effectrices :

- dérivés toxiques de l'oxygène (radicaux hydroxyles  $\text{OH}^\cdot$ , oxygène singulet et peroxyde d'hydrogène), de l'azote (NO) et peptides à activité antimicrobienne (défensines) qui constituent une protection immédiate contre l'agent infectieux.
- cytokines, molécules d'adhésion et protéines de la phase aiguë de l'inflammation, impliquées dans la défense précoce ainsi que dans le développement de réponses immunitaires adaptatives.
- molécules de costimulation, tels les CD80 et CD86, ligands du CD28 sur les LT.

Les PRRs les plus étudiés actuellement appartiennent à la famille des **TLRs**. Il s'agit de protéines membranaires de type I, présentant un domaine extracellulaire riche en leucine qui participe à la reconnaissance du ligand et une partie intracellulaire contenant un domaine d'homologie avec le récepteur de l'IL-1 (TIR). A l'heure actuelle, 11 TLRs humains ont été

identifiés (Akira, 2003; Zhang et coll., 2004), reconnaissant des PAMPs variés ainsi que certaines molécules endogènes et synthétiques (figure 5).



**Figure 5 : Ligands des TLRs** (Yamamoto et coll., 2004)

Les TLRs impliqués dans la reconnaissance de PAMPs bactériens sont :

- TLR-2 qui reconnaît des composants bactériens variés, parmi lesquelles figurent les lipoprotéines, les acides lipotéichoïques (LTA) et le PG. TLR-2 constitue des hétérodimères avec TLR-1, TLR-6 et probablement TLR-10.
- TLR-4 est le récepteur du LPS. Cette reconnaissance implique également d'autres molécules, tels la « LPS-binding protein » (LBP), le CD14 et MD-2. Il a été également montré que TLR4 reconnaît des molécules endogènes : la « heat-shock protein » (HSP) 60, la HSP 70 et certains composants de la matrice extracellulaire (la fibronectine, l'acide hyaluronique et l'héparane sulfate).
- TLR-5 est activé par la flagelline, présente dans certaines bactéries arthritogènes : *Borellia* sp.
- TLR-9 est le récepteur des oligonucléotides CpG et, contrairement aux autres TLRs décrits ci-dessus exprimés dans la membrane plasmique, TLR-9 est localisé au niveau des endosomes.
- TLR-11 a récemment été impliqué dans la reconnaissance de bactéries uropathogènes.

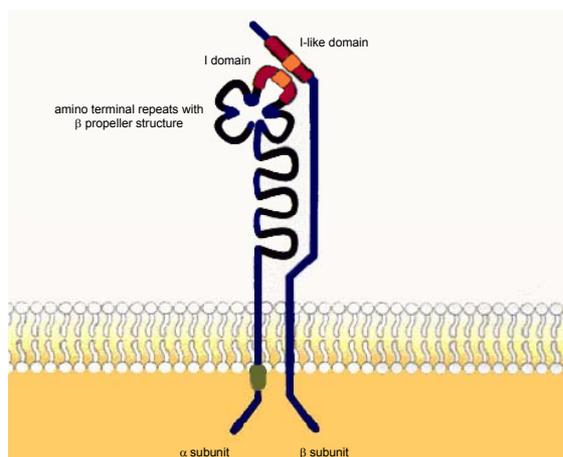
Différentes études ont impliqué les TLRs dans la pathogénie des arthrites expérimentales. L'inflammation articulaire dans le modèle de la souris K/BxN est clairement dépendant de l'interaction IL-1/IL-1R. On peut cependant transférer une arthrite à des souris k. o. IL-1R en leur injectant du sérum de souris K/BxN et du LPS (Choe et coll., 2003). Ces souris ne

développent pas d'arthrite lorsque le sérum est injecté seul (Choe et coll., 2003). Il a été également démontré que des souris déficientes en TLR-2 développent une inflammation articulaire nettement moins sévère après injection de protéines de paroi de *Streptococcus pyogenes* en comparaison avec des souris exprimant TLR-2 (Joosten et coll., 2003).

Les monocytes et les macrophages synoviaux rhumatoïdes expriment fortement TLR-2 (Iwahashi et coll., 2004). Leur stimulation par les acides lipotéichoïques (LTA) conduit à une augmentation de la libération de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-12, qui est dépendante de TLR-2, indiquant que ces PAMPs pourraient jouer un rôle important dans l'activation des monocytes /macrophages rhumatoïdes (Iwahashi et coll., 2004).

L'expression des TLRs par les lymphocytes suggère que ces récepteurs constituent un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Leadbetter et coll. ont montré que la prolifération des LB autoréactifs produisant des FR est induite par des immun-complexes chromatine-IgG2a et nécessite la costimulation du récepteur des LB (BCR) et de TLR-9 (Leadbetter et coll., 2002). L'injection d'oligonucléotides CpG à des rats induit une arthrite probablement dépendante des LT dans la mesure où l'administration d'un anticorps monoclonal anti-TCR permet de diminuer l'arthrite ainsi induite (Svelander et coll., 2004). Il a été également montré que la survie de LT CD4 peut être augmentée après activation de TLR-9 par des oligonucléotides CpG (Gelman et coll., 2004).

Les **intégrines** constituent une autre classe de PRRs impliquées dans la reconnaissance et l'internalisation de nombreux agents pathogènes et la transmission de signaux conduisant à une réponse inflammatoire. Outre leur rôle de PRRs, elles interviennent dans des processus cellulaires variées, telles la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la migration. Il s'agit d'une famille de glycoprotéines transmembranaires de type I. Ce sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Chaque sous-unité possède un large domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et dans la plupart des cas un court domaine intracytoplasmique (figure 6).



**Figure 6 : Représentation schématique de la structure des intégrines**

La région N-terminale de toutes les sous-unités  $\alpha$  est composée de 7 domaines répétitifs de 60 aa formant une structure de type hélice  $\beta$ . Sa face supérieure est impliquée dans la liaison du ligand. Certaines intégrines présentent en plus un module de 200 aa appelé domaine I (ou  $\alpha A$ ) qui participe à la liaison du ligand. La région N-terminale des sous-unités  $\beta$  contient un domaine conservé présentant un site similaire au domaine I de la sous-unité  $\alpha$ , appelé domaine I-like (ou  $\beta A$ ), qui participe également à la liaison du ligand.

Chez les mammifères, 19 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  se combinent pour former 25 récepteurs différents, chaque combinaison  $\alpha\beta$  présente sa propre spécificité de liaison et de signalisation. Les principales intégrines impliquées dans la libération de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) sont les intégrines à chaîne  $\beta 1$  ( $\alpha 5\beta 1$ ),  $\beta 2$  et  $\beta 3$  ( $\alpha v\beta 3$ ). La famille des intégrines à chaîne  $\beta 2$  comprend LFA-1 (CD11a/CD18), CR3/Mac-1 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18). L'adhésion de *Salmonella enterica serovar typhimurium* aux cellules THP-1 conduit à la libération de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-8 par un mécanisme dépendant de CD11a/CD18 (Galdiero et coll., 2001). La liaison de *Coxiella burnetti* aux cellules THP-1 par l'intermédiaire des intégrines CD11b/CD18 et  $\alpha v\beta 3$  (CD51/CD61) induit la libération de TNF- $\alpha$  (Dellacasagrande et coll., 2000). Enfin, les travaux de Al-Okla et coll. ont montré que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est impliquée dans la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) par la protéine I/II des streptocoques oraux (Al-Okla et coll., 1999).

Contrairement aux TLRs, il existe peu de données concernant les voies de signalisation activées par la liaison de pathogènes aux intégrines et conduisant à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Leur rôle en tant que PRRs dans la pathogénie de la PR n'a pas encore été étudié.

## 1.2.2 Les conséquences de l'inflammation synoviale

L'activation des cellules résidentes de la membrane synoviale et le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires au niveau articulaire résulte en une libération massive de médiateurs qui contribuent à la néoangiogenèse synoviale et à la destruction ostéo-cartilagineuse. Si les FLSs et les macrophages constituent la source principale de cytokines et d'enzymes, les PNNs, les mastocytes, les CD, les LB et les LT contribuent également à la libération de cytokines.

L'angiogenèse joue un rôle essentiel dans le développement et l'entretien de la synovite rhumatoïde. Ce phénomène est présent dès les premiers signes de la PR et contribue ensuite à l'entretien des signes inflammatoires. Des études cliniques ont montré que la présence d'érosions osseuses est liée à l'augmentation du flux sanguin, confirmant que l'augmentation de la vascularisation est corrélée aux phases actives de la pathologie (Steuer et coll., 2000). Le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) est le principal médiateur pro-angiogénique et les concentrations sériques de VEGF ont été associées à la sévérité de la PR (Sone et coll., 2001). D'autres facteurs de croissances [angiopoïétine, facteur de croissance des fibroblastes (FGF)] et des cytokines pro-inflammatoires (essentiellement l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ ) participent également à cette néoangiogenèse articulaire. L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  contribuent à la synthèse de VEGF et d'angiopoïétine par les FLSs (Jackson et coll., 1997; Gravallesse et coll., 2003). Des modèles animaux d'arthrite ont permis de démontrer l'efficacité de stratégies thérapeutiques ciblant ce phénomène: ainsi, l'administration d'anticorps anti-VEGF ou de récepteurs solubles du VEGF à des souris dont l'arthrite a été induite par l'injection de collagène, permet de réduire l'inflammation articulaire (Lu et coll., 2000; Miotla et coll., 2000). En outre, l'injection sous-cutanée de TNP-470, dérivé d'une molécule angio-inhibitrice, la fumagilline, à des souris immunodéficientes (SCID) auxquelles ont été greffées des membranes synoviales rhumatoïdes, conduit à l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales et également des FLSs (Nagashima et coll., 2002).

Les phénomènes de destruction articulaire sont principalement sous la dépendance d'enzymes secrétés par les FLSs et les macrophages (MMPs, cathepsines, ...) et de cytokines pro-inflammatoires: IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-17 et «receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand» (RANKL) qui peuvent être libérées par les FLSs, les macrophages et/ou les LT. Ainsi, l'IL-17 est une cytokine libérée par certains LT CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> qui agit en synergie avec l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . L'IL-17 augmente la libération d'IL-6, de chémokines (IL-8, MIP-3 $\alpha$ ), de NO et de

prostaglandine (PG) E<sub>2</sub> par les FLSs (Fossiez et coll., 1996; Chabaud et coll., 1998; Chabaud et coll., 2001) ainsi que la libération d'IL-6, d'IL-1, de TNF- $\alpha$ , de NO, de PGE<sub>2</sub> et de MMP-1, -3, -9 et -13 par les monocytes/macrophages et les chondrocytes (Jovanovic et coll., 1998; Jovanovic et coll., 2000; Koshy et coll., 2002). L'IL-17, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont également capables, seules et en synergie, de stimuler la résorption osseuse. Si le TNF- $\alpha$  est capable d'induire directement la différenciation des ostéoclastes en se liant à ses récepteurs et l'IL-1 $\alpha$  de stimuler l'activation des ostéoclastes via l'IL-1R, la contribution de l'IL-17 à l'ostéoclastogenèse est indirecte : elle induit la libération de PGE<sub>2</sub> et du facteur de différenciation des ostéoclastes (ODF) par les ostéoblastes (Kotake et coll., 1999) et augmente l'expression de RANKL tout en diminuant l'expression d'ostéoprotégérine (OPG) (Nakashima et coll., 2000). L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont capables de potentialiser l'ostéoclastogenèse médiée par RANKL (D et coll., 2004). Le système RANK/RANKL/OPG et son importance dans la résorption osseuse sera décrit au chapitre 2.5.3. de l'introduction.

### 1.2.3 Prédispositions génétiques

Les antigènes HLA ont été les premiers facteurs de susceptibilité décrits dans la PR. Il n'existe cependant pas de concordance supérieure à 30-50% comme l'ont montré des études réalisées sur des jumeaux homozygotes.

Un certain nombre de polymorphismes génétiques ont été également mis en évidence dans des gènes codant des cytokines, des enzymes et des récepteurs qui jouent un rôle dans la réaction inflammatoire synoviale, tels l'IL-1, l'IL-10, la MMP-3 et le Rf $\gamma$ III (Nieto et coll., 2000; Constantin et coll., 2002; Cvetkovic et coll., 2002; Matthey et coll., 2004). Si certains de ces polymorphismes constituent des facteurs de sévérité de la PR, tous ne sont pas associés à la PR : il n'existe aucune corrélation entre le polymorphisme du gène codant l'IFN- $\gamma$  et la sévérité de la PR (Constantin et coll., 2001). En ce qui concerne le TNF- $\alpha$ , des études ont montré une association entre certains allèles et la sévérité de la PR (Cvetkovic et coll., 2002). Par ailleurs, Constantin et coll. ont récemment identifié un polymorphisme dans le gène codant le récepteur du TNF- $\alpha$  (TNFR2) comme facteur de risque de la PR (Constantin et coll., 2004).

Radstake et coll. ont également révélé une association intéressante entre un polymorphisme dans le gène codant TLR-4 (Asp299Gly) et la susceptibilité à développer une PR (Radstake et

coll., 2004). En effet, le variant Asp299Gly, qui présente une signalisation déficiente en réponse au LPS (Arbour et coll., 2000), a été identifié plus fréquemment chez des sujets sains que chez des patients atteints de PR, suggérant que les récepteurs TLR-4 de haute affinité pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de la PR et plus particulièrement dans sa phase d'initiation (Radstake et coll., 2004).

Il est également intéressant de noter qu'un allèle des gènes *PADI 4* codant les peptidylarginine déiminases, enzymes responsables de la transformation des résidus arginine en résidu citrulline, a été associé à la PR (Suzuki et coll., 2003). Suzuki et coll. ont montré que l'ARNm de l'allèle concerné est plus stable que l'ARNm de l'allèle non associé à la PR, ce qui conduirait à une citrullination plus importante des protéines chez les patients atteints de PR (Suzuki et coll., 2003).

## **2 Rôle particulier des FLSs dans la pathogénie de la PR**

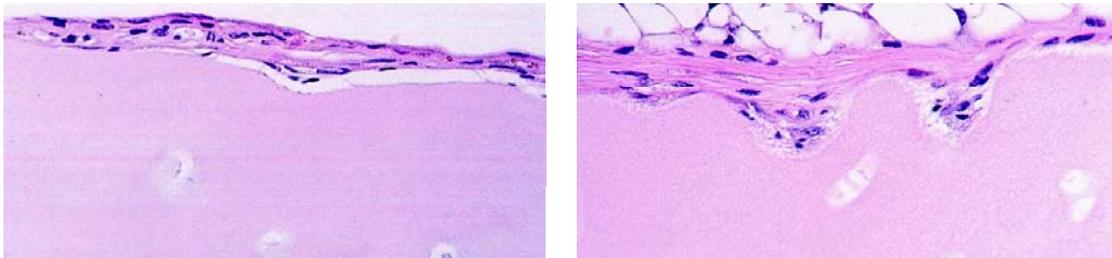
### **2.1 Phénotype des FLSs**

Les FLSs se définissent comme des cellules dérivant de précurseurs mésenchymateux qui sont ensuite renouvelés par division au sein de la membrane synoviale. Ces cellules synthétisent des protéines de la matrice extracellulaire et se distinguent des cellules vasculaires et épithéliales (Edwards, 2000).

La membrane synoviale humaine normale comporte des FLSs de deux phénotypes, les FLSs de la couche bordante (intimaux) et les FLSs de la couche plus profonde (subintimaux). Les FLSs intimaux expriment des protéines spécialisées, tel l'uridine diphosphoglucose déhydrogénase (UDPGD), la molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 (VCAM-1) et le « complement decay-accelerating factor » (DAF), qui contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire et aux interactions avec les leucocytes. Les FLSs intimaux interagissent avec les monocytes circulant pour induire leur différenciation en macrophages résidant, contribuant au renouvellement des macrophages de la membrane synoviale. Les FLSs subintimaux apparaissent au contraire comme des cellules non spécialisées (Edwards, 2000). Au cours de la PR, le phénotype des FLSs intimaux est peu modifié, hormis une diminution de l'expression de l'UDPGD et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de MMPs,

tandis que les FLSs subintimaux subissent de profonds changements et acquièrent un phénotype intimal, principalement induit par le TNF- $\alpha$  (Edwards et coll., 1997).

Les FLSs de la membrane synoviale rhumatoïde possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, les distinguant des FLSs de patients atteints d'arthrose et des FLSs de personnes saines. Ces caractéristiques leur confèrent un phénotype agressif qui se traduit par des anomalies de prolifération et/ou d'apoptose. Les FLSs libèrent en outre des médiateurs inflammatoires et destructeurs conduisant à l'invasion et à la destruction du cartilage. A l'heure actuelle, il est difficile de dire si ces modifications sont à l'origine de la PR ou si elles sont une conséquence de l'inflammation articulaire chronique. Ce phénotype agressif persiste en dehors de toute stimulation par l'environnement rhumatoïde, ce qui suggère que les FLSs sont les principaux médiateurs de la destruction articulaire. En effet, lorsque ces cellules sont co-implantées avec du cartilage humain sain chez des souris immunodéficientes (SCID), elles sont capables d'adhérer et d'envahir le cartilage, alors que ceci n'est pas observé avec des FLSs de personnes saines ou de patients atteints d'arthrose (Müller-Ladner et coll., 1996) (figure 7).



**Figure 7 : Coupes histologiques des co-implants FLSs/cartilage humain dans le modèle de la souris SCID (Pap et coll., 2001)**  
A gauche : FLSs sains, à droite : FLSs rhumatoïdes

## **2.2 Prolifération anormale ou altération de l'apoptose des FLSs ?**

Une des caractéristiques de la membrane synoviale rhumatoïde est l'hyperplasie de la couche bordante. Cet épaissement peut être dû à une prolifération anormale des FLSs rhumatoïdes et/ou à un défaut d'apoptose des FLSs rhumatoïdes.

Les FLSs rhumatoïdes intimaux présentent certaines caractéristiques de cellules transformées : capacité à se multiplier indépendamment de l'ancrage et perte de l'inhibition de contact. Ces cellules surexpriment les oncogènes *ras*, *c-jun*, *c-fos* et *c-myc* (Qu et coll., 1994;

Dooley et coll., 1996), et présentent des altérations de gènes suppresseurs de tumeur, tels *p53* et *PTEN* (Firestein et coll., 1997; Pap et coll., 2000). Ces modifications pourraient contribuer à la prolifération cellulaire ainsi qu'à une augmentation de la durée de vie des FLSs. Ainsi, l'inhibition de *c-myc* par des oligonucléotides anti-sens permet de réduire la prolifération des FLSs et les rend sensibles à l'apoptose (Hashiramoto et coll., 1999).

Les FLSs rhumatoïdes surexpriment également le récepteur  $\alpha$  du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- $\alpha$ ) qui intervient dans la prolifération des FLSs induite par le PDGF *in vitro* (Watanabe et coll., 2002). Le PDGF, qui est un facteur chimiotactique des fibroblastes produit par les macrophages, est présent en grande quantité au niveau des membranes synoviales rhumatoïdes. D'autres facteurs de croissance sont également capables d'induire la prolifération des FLSs : le « transforming growth factor  $\beta$  » (TGF- $\beta$ ) et la pléiotrophine, dont la synthèse par les FLSs augmente sous l'effet du TNF- $\alpha$  et du facteur de croissance épidermique (EGF) (Kim et coll., 2002; Pufe et coll., 2003).

En réalité, *in vitro* les FLSs rhumatoïdes prolifèrent très peu et de façon comparable aux FLSs de patients atteints d'arthrose (Mohr et coll., 1986). En outre, contrairement aux cellules tumorales, la prolifération des FLSs rhumatoïdes ne semble pas être corrélée à leur pouvoir d'invasion. En effet, Seemayer et coll. ont montré que la transformation des FLSs rhumatoïdes par l'antigène T du virus SV-40, qui augmente la prolifération cellulaire (diminution du temps nécessaire au doublement du nombre de cellules, augmentation de l'expression de marqueurs de prolifération cellulaire, tel Ki67), ne les rend pas capables d'envahir le cartilage dans le modèle de la souris SCID. Selon ces auteurs, la modulation de l'expression de molécules d'adhésion (diminution de l'expression de VCAM-1 et augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire, ICAM-1) et la diminution de l'expression d'enzymes dégradant le cartilage, telles la cathépsine K et la MMP-14, seraient à l'origine de ce phénotype non invasif (Seemayer et coll., 2003). Ces mêmes auteurs ont également étudié le rôle que pourrait jouer *p53* dans ces phénomènes d'invasion : ils ont montré que si des FLSs rhumatoïdes expriment très peu *p53 in vitro*, l'expression de cette protéine augmente aux sites d'invasion du cartilage lorsque ces cellules sont co-implantées chez des souris SCID avec du cartilage humain, suggérant une induction de l'expression de *p53* lors des phénomènes d'invasion (Seemayer et coll., 2003).

Selon la deuxième hypothèse, une dérégulation des mécanismes de l'apoptose des FLSs rhumatoïdes expliquerait l'hyperplasie synoviale au cours de la PR. En effet, la majorité des FLSs rhumatoïdes de la couche bordante semble ne pas entrer en apoptose *in vivo* (Matsumoto et

coll., 1996), ce qui peut être expliqué par une résistance à des signaux d'apoptose et/ou par une modulation de voies de signalisation conduisant à l'apoptose.

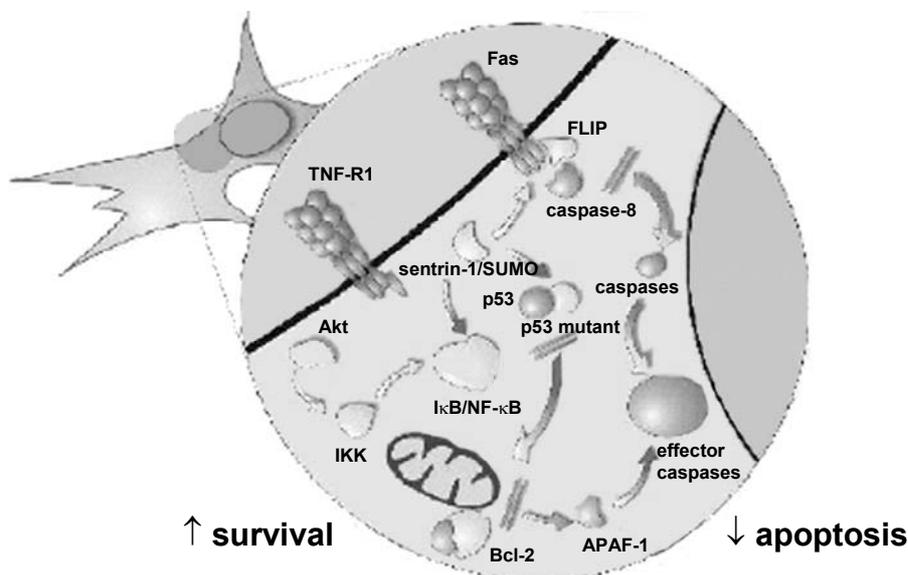
Il a été montré que les FLSs rhumatoïdes surexpriment la sentrine-1/ « small ubiquitin-like modifier » (SUMO-1), molécule anti-apoptotique qui interfère précocement avec les signaux d'apoptose (Franz et coll., 2000). En interagissant par son « death domain » avec Fas/Apo-1 et le TNF-R1, la sentrine-1 protège les FLSs de l'apoptose médiée par le ligand de Fas et le TNF- $\alpha$  (Okura et coll., 1996).

Les FLSs qui restent sensibles aux stimuli apoptotiques peuvent également surexprimer des molécules anti-apoptotiques, telles Bcl-2 et « Fas-associated death domain-like IL-1 $\beta$ -converting-enzyme-inhibitory (FLICE) protein » (FLIP), qui bloquent les voies de signalisation menant à l'apoptose (Matsumoto et coll., 1996; Schedel et coll., 2002). Bcl-2, associée à la membrane mitochondriale, empêche la perméabilisation mitochondriale et la libération du cytochrome c et du facteur induisant l'apoptose (AIF), inhibant ainsi plusieurs voies de signalisation menant à l'apoptose (Saelens et coll., 2004). FLIP peut interagir avec les récepteurs Fas/Apo-1, TNF-R1 et TRAIL-R1 impliqués dans l'apoptose. Bien que possédant un domaine caspase-like qui présente une forte homologie avec la caspase-8, FLIP ne contient pas de domaine catalytique, ce qui l'empêche d'activer les caspases-8 et 10 (Irmeler et coll., 1997). Catrina et coll. ont montré que l'expression de FLIP dépend du stade de la PR et que la résistance des FLSs rhumatoïdes à l'apoptose s'observe essentiellement au début de cette pathologie (Catrina et coll., 2002). Ainsi, dans les membranes synoviales isolées de patients atteints de PR débutantes on observe une faible proportion de FLSs en apoptose, associée à une forte expression de FLIP alors que des membranes synoviales isolées de patients atteints de PR depuis de nombreuses années montrent une plus forte proportion de FLSs en apoptose corrélée à une expression de FLIP plus faible (Catrina et coll., 2002).

Pap et coll. ont également montré que PTEN qui est une phosphatase capable d'inhiber la voie anti-apoptotique contrôlée par la PI3 kinase et Akt (Waite et Eng, 2002), n'est exprimée que dans 40% des FLSs rhumatoïdes *in vitro* et n'est pas exprimée dans les FLSs rhumatoïdes envahissant le cartilage dans le modèle de la souris SCID (Pap et coll., 2000). La voie de la PI3 kinase et Akt semble jouer un rôle important dans la survie des FLSs et il a été montré que : i) Akt est fortement exprimée par les FLSs rhumatoïdes, ii) le TNF- $\alpha$  augmente l'activité kinase de Akt (Zhang et coll., 2001).

Enfin de nombreuses mutations entraînant une altération de la fonction de p53 ont été observées chez des patients atteints de PR (Firestein et coll., 1997). Ce facteur de transcription

régule différents gènes dont les produits d'expression interviennent dans l'apoptose : protéines pro-apoptotiques Bax et Fas/Apo-1, protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Hickman et coll., 2002). Une modulation de l'expression de ces protéines pourrait donc contribuer à un défaut de l'apoptose dans ces cellules et prolonger la survie des FLSs rhumatoïdes.



**Figure 8 : Voies de signalisation contribuant à la survie/résistance à l'apoptose des FLSs rhumatoïdes** d'après (Baier et coll., 2003)

## 2.3 Activation des FLSs

Les FLSs expriment une grande variété de récepteurs qui leur permettent d'être activés par des stimuli très divers.

### 2.3.1 Activation des FLSs par l'environnement rhumatoïde

Des facteurs de croissance (PDGF, TGF- $\beta$ , FGF, EGF) et des cytokines pro-inflammatoires, tels l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , présents en grandes quantités dans l'articulation rhumatoïde contribuent à l'activation des FLSs du pannus (Konttinen et coll., 2000) et donc à la synthèse de médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, prostanoïdes, ...) et de la destruction (enzymes dégradant le cartilage : MMPs, cathepsines, ...).

Les FLSs sont également capables d'être activés par interaction directe avec des cellules présentes *in situ*, tels les macrophages, les PNNs, les lymphocytes, les mastocytes, les

polynucléaires éosinophiles et les ostéoblastes. Ainsi, différentes études ont montré qu'un contact cellulaire direct entre les LT et les FLSs était nécessaire à la synthèse de cytokines et de MMPs par les FLSs : l'interaction entre ces deux types cellulaires via des cytokines membranaires (IL-1 $\alpha$  et TNF- $\alpha$ ) augmente la synthèse de MMP-1 et de PGE<sub>2</sub> (Burger et coll., 1998) et la liaison LFA-1/ICAM-1 conduit à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 et à la libération de cette cytokine pro-inflammatoire (Nakatsuka et coll., 1997). En outre, un contact cellulaire direct entre les LT stimulés par le collagène de type II et les FLSs rhumatoïdes est nécessaire à la synthèse d'IL-15, d'IL-18 et de TNF- $\alpha$  par les FLSs (Cho et coll., 2004). Cette interaction est en partie médiée par le CD40 (Cho et coll., 2004).

Les FLSs et les macrophages peuvent interagir après liaison du CD55 (DAF) des FLSs au CD97 des macrophages (Hamann et coll., 1999). Ces interactions ont essentiellement lieu dans la couche bordante, ce qui suggère qu'elles puissent contribuer à l'activation des cellules mais ceci reste encore à déterminer. En outre, l'interaction des macrophages et des FLSs faisant intervenir le CD14 et le CD13, participe à l'augmentation de la synthèse d'IL-6 par ces cellules (Chomarat et coll., 1995).

### **2.3.2 Activation des FLSs par l'environnement microbien**

Les FLSs expriment différentes familles de PRRs dont les plus étudiés appartiennent à la famille des TLRs. Kyburz et coll. ont démontré la présence de TLR-2 et TLR-4 au niveau de la membrane plasmique des FLSs de patients atteints de PR et d'arthrose et de TLR-9 au niveau intracellulaire (Kyburz et coll., 2003). Ces TLRs reconnaissent respectivement le PG, le LPS et les motifs CpG. Cependant, il n'est pas exclu qu'un plus grand nombre de TLRs soit exprimé par ces cellules, tels TLR-1, TLR-6 et TLR-10 qui forment des hétérodimères avec TLR-2.

Le PG et le LPS sont de puissants stimuli pro-inflammatoires des FLSs (Andreakos et coll., 2003; Kyburz et coll., 2003), indiquant que TLR-2 et TLR-4 jouent probablement un rôle important dans leur activation. Il a été également montré que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , le LPS et le PG augmentent l'expression de TLR-2 à la surface de FLSs mais pas celle de TLR-4 (Kyburz et coll., 2003; Seibl et coll., 2003). TLR-2 est plus particulièrement exprimé dans la couche bordante de la membrane synoviale rhumatoïde ainsi qu'aux sites d'invasion du cartilage alors que son expression est plus faible dans la membrane synoviale de patients atteints d'arthrose

(Seibl et coll., 2003), suggérant que ce PRR et son ligand, le PG, pourraient contribuer de façon prépondérante à l'activation des FLSs rhumatoïdes.

Bien que TLR-9 soit exprimé par les FLSs, l'ADN bactérien, qui stimule les lymphocytes et les CD (Hartmann et coll., 1999; Hartmann et Krieg, 2000), n'active pas les FLSs. Ceci pourrait s'expliquer par le très faible niveau d'expression de ce récepteur, dont l'expression n'est pas modulée après stimulation des FLSs par des cytokines pro-inflammatoires et des PAMPs (Kyburz et coll., 2003; Seibl et coll., 2003).

Les FLSs expriment également de façon basale d'autres PRRs, telles les intégrines : sous-unités  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 3$ . Rinaldi et coll. ont montré que l'expression de ces intégrines augmente au cours de la PR (Rinaldi et coll., 1994; Rinaldi et coll., 1997).

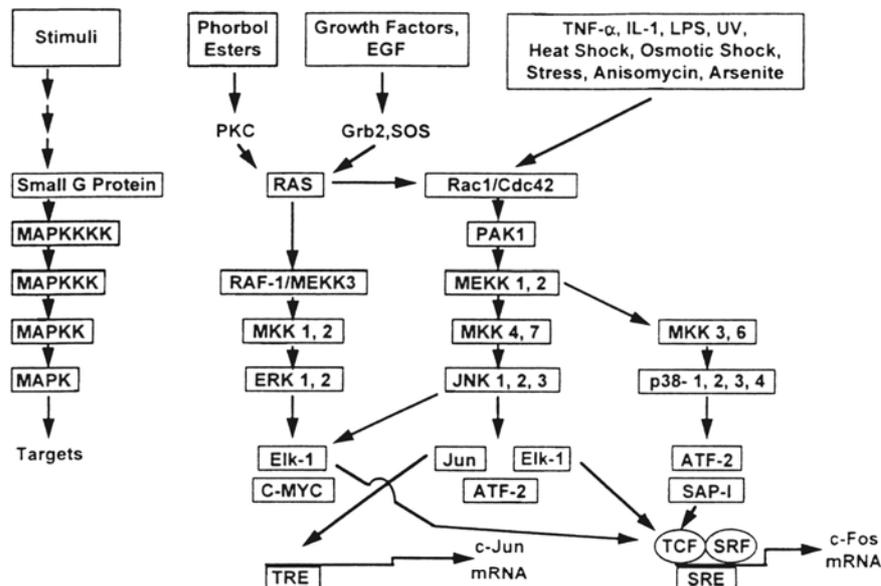
### **2.3.3 Voies de signalisation activées dans les FLSs**

Les FLSs rhumatoïdes présentent des modifications morphologiques et fonctionnelles qui résultent de la dérégulation de certaines voies de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription.

Ainsi, le facteur de transcription **AP-1** est activé de façon constitutive dans les FLSs rhumatoïdes (Asahara et coll., 1997; Han et coll., 1998). Ce facteur de transcription joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de cytokines, telles l'IL-6 et l'IL-8 et des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. AP-1 est également impliqué dans la transcription des gènes codant des MMPs, telles les MMP-1, MMP-3 et MMP-13.

AP-1 est composée de deux membres de la famille des facteurs de transcription Jun et Fos (c-Jun, Jun B, Jun D, c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2), qui forment des homo- et hétérodimères. La composition des dimères conditionne la modulation de la transcription de gènes : ainsi, c-Jun favorise la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, tandis que Jun D inhibe la synthèse des cytokines et des MMPs (Wakisaka et coll., 1998). L'activité de AP-1 est régulée par les membres de la famille des « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs). Il s'agit d'une famille de protéines kinases, composée de 3 sous-familles, les « c-Jun-N-terminal kinases » (JNKs), les « extracellular-regulated kinases » (ERKs) et les p38, qui phosphorylent des facteurs de transcription, tel Jun et contribuent à l'expression de facteurs de transcription, c-Jun et c-Fos. Les voies des MAPKs sont activées par des stimuli très divers, cytokines, facteurs de croissance et LPS, conduisant à des cascades de phosphorylation faisant intervenir des MAPK kinase

kinases (MAPKKKs) puis des MAPK kinases (MAPKKs) (figure 9). Des protéines phosphatases régulent négativement ces voies afin de rétablir l'homéostasie.



**Figure 9 : Voies de signalisation des MAPKs** (Firestein et Manning, 1999)

PKC : protéine kinase C, Grb2: growth factor receptor binding protein 2, SOS: son of sevenless, TRE: TPA-responsive element, PAK: p42-associated kinase, ATF-2: activating transcription factor, SAP-1: stress-activated protein 1, TCF: ternary complex factor, SRE: serum response element

Les trois sous-familles de MAPKs sont exprimées dans la membrane synoviale rhumatoïde et interviennent dans la transduction des signaux dans les FLSs. Selon les stimuli et les gènes cibles, leurs rôles peuvent être complémentaires ou distincts. Ainsi, les JNKs ont été plus particulièrement impliquées dans l'expression de MMPs, ERK1/2 dans la prolifération des FLSs et p38 dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

Bien que quatre isoformes de p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) aient été identifiées, p38- $\alpha$  semble être l'isoforme majoritairement impliquée dans la synthèse de cytokines. L'activité de cette MAPK est régulée par deux MAPKKs, MKK3 et MKK6, également activées dans la membrane synoviale rhumatoïde (Chabaud-Riou et Firestein, 2004). Il est intéressant de noter que p38 peut également contribuer à la modulation de voies de signalisation, notamment par la stabilisation d'ARNm (Tebo et coll., 2003).

Trois isoformes de JNK ont été identifiées : JNK1, JNK2, JNK3. JNK2 est l'isoforme prédominante dans les FLSs et semble être la principale MAPK impliquée dans l'expression de la MMP-1 (Han et coll., 1999). L'importance de JNK2 dans la destruction articulaire a été démontrée par l'utilisation de souris k. o. pour le gène codant JNK2. Ainsi, dans un modèle d'arthrite induite par le collagène, la destruction du cartilage est nettement diminuée chez les

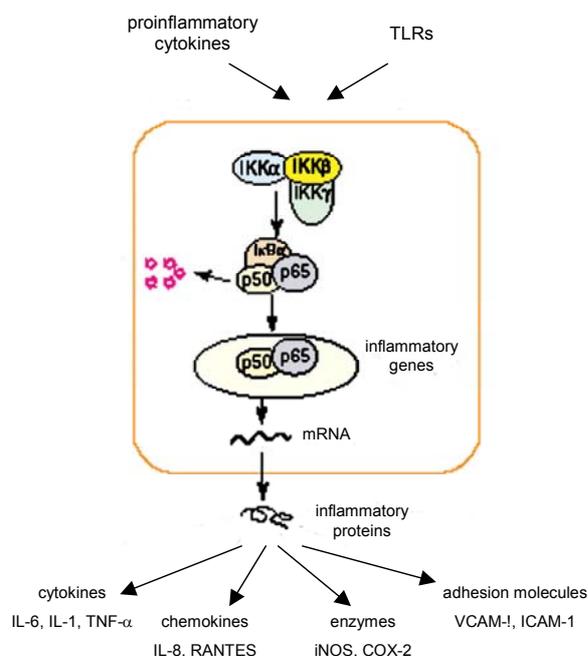
souris déficientes en JNK2, alors que l'absence de cette MAPK ne semble pas influencer l'intensité de l'inflammation synoviale (Han et coll., 2002). L'activité des JNKs est régulée par deux MAPKKs dans les FLSs, MKK4 et MKK7 (Sundarrajan et coll., 2003).

Les deux isoformes de ERK, ERK 1/2, sont exprimées dans les FLSs et contribuent à l'expression de cytokines et de MMPs. ERK 1/2 joue également un rôle dans la transduction de signaux de prolifération dans les FLSs (Lacey et coll., 2003). L'activité de ERK est régulée par MKK1 et MKK2.

**NF- $\kappa$ B** est un deuxième facteur de transcription constitutivement activé dans les FLSs rhumatoïdes. Comme AP-1, il joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion.

Il s'agit en réalité d'une famille de facteurs de transcription qui est constituée de cinq membres : NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), RelA (p65), Rel B et c-Rel, qui s'associent pour former des homo- et hétérodimères, le plus classique étant le dimère p50/p65. Chaque dimère a une fonction qui lui est propre : p50/p65 par exemple augmente l'expression du gène codant l'IL-6 dans les FLSs rhumatoïdes en réponse à l'IL-1 (Miyazawa et coll., 1998). La contribution de NF- $\kappa$ B à la synthèse de cytokines semble être particulièrement importante dans les FLSs. Ainsi, il a été montré que NF- $\kappa$ B est le principal facteur de transcription régulant la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 dans les FLSs après stimulation par l'IL-1, alors que c-Jun ne semble pas intervenir dans ce processus (Georganas et coll., 2000). A côté de son rôle dans l'inflammation, NF- $\kappa$ B a également été impliqué dans la résistance à l'apoptose des FLSs, suggérant sa contribution à l'hyperplasie synoviale rhumatoïde (Miyazawa et coll., 1998).

En l'absence de toute stimulation, NF- $\kappa$ B est associé dans le cytoplasme à un complexe de protéines I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  et I $\kappa$ B $\gamma$ . En réponse à divers stimuli (cytokines pro-inflammatoires, PAMPs), ces protéines peuvent être phosphorylées par des I $\kappa$ B kinases (IKKs) puis dégradées. NF- $\kappa$ B est alors transloqué dans le noyau et se lie à l'ADN (figure 10). Ainsi, il a été montré que la stimulation de TLR-2 à la surface des FLSs conduisait à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Seibl et coll., 2003).

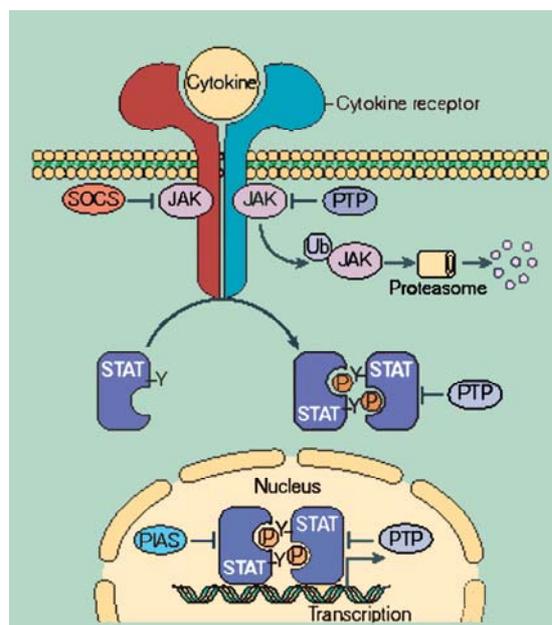


**Figure 10 : Activation de NF-κB** (Bonizzi et Karin, 2004)

Deux IKKs, IKK1 (IKK $\alpha$ ) et IKK2 (IKK $\beta$ ), ont été identifiées dans les FLSs (Aupperle et coll., 1999). Ces IKKs sont constitutivement exprimées par les FLSs et activées rapidement en réponse à l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . L'utilisation de dominants négatifs de ces IKKs a montré que IKK2 est le principal régulateur de l'activité de NF- $\kappa$ B dans ces cellules stimulées par des cytokines pro-inflammatoires (Aupperle et coll., 2001). Aupperle et coll. ont récemment mis en évidence une autre IKK, appelée IKK inducible (IKK-i ou IKK- $\epsilon$ ), dans les FLSs. Bien que qualifiée d'inductible, cette IKKi est exprimée constitutivement dans les FLSs, mais contrairement à IKK1 et IKK2, son expression augmente rapidement sous l'effet de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  (Aupperle et coll., 2001). Etant donné que l'expression de dominants négatifs d'IKK2 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B induite par IKK-i, il semble que IKK-i soit située en amont d'IKK2.

D'autres facteurs de transcription, tels les « signal transducers and activators of transcription » (STATs) sont également activés dans les FLSs mais ont été moins étudiés qu'AP-1 et NF- $\kappa$ B dans les FLSs. Il s'agit d'une famille de 7 facteurs de transcription, activés en réponse à la stimulation des cellules par des cytokines et des facteurs de croissance. Ils sont constitués d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine SH2 permettant leur interaction avec des récepteurs phosphorylés sur des résidus tyrosine. Cette interaction fait intervenir des tyrosine kinases de la famille des « janus kinases » (JAKs), qui s'associent avec les domaines intracellulaires des récepteurs de cytokines. Ceci conduit à la transphosphorylation des JAKs qui

phosphorylent à leur tour des résidus tyrosine des domaines intracellulaires des récepteurs de cytokines créant ainsi les sites de fixation pour les facteurs STATs. Ces derniers seront ensuite phosphorylés par les JAKs ce qui provoque leur dimérisation et translocation dans le noyau où ils activent la transcription de différents gènes, dont des gènes codant des molécules d'adhésion, tels la sélectine E et ICAM-1. Il existe plusieurs régulateurs de l'activation des facteurs STATs : les protéines tyrosine phosphatases (PTP) qui déphosphorylent les JAKs et les facteurs STATs, les « protein inhibitors of activated STAT » qui inhibent la liaison des facteurs STATs à l'ADN et les « suppressors of cytokine signalling » (SOCS) qui inhibent les JAKs (figure 11).



**Figure 11 : Voies de signalisation des facteurs STATs** (Shuai et Liu, 2003)

Trois membres de la famille des facteurs STATs sont exprimés par les FLSs: STAT1, STAT3 et IL-4 STAT (Müller-Ladner et coll., 2000; Shouda et coll., 2001). STAT1 est activé par l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  et STAT3 par des cytokines de la famille de l'IL-6, par l'EGF et le PDGF. Une étude récente a montré que les FLSs rhumatoïdes expriment fortement STAT1 alors que ceci n'est pas observé dans les FLSs de patients atteints d'arthrose (Kasperkovitz et coll., 2004). Kasperkovitz et coll. ont également démontré que si ce facteur de transcription est exprimé en l'absence de toute stimulation des FLSs rhumatoïdes, son activation nécessite une stimulation des cellules par des cytokines, tel l'IFN- $\beta$  (Kasperkovitz et coll., 2004). A l'inverse, STAT3 est activé dans la membrane synoviale rhumatoïde ce qui n'est pas observé dans des membranes synoviales de patients atteints d'arthrose (Shouda et coll., 2001). Des expériences utilisant des dominants négatifs de STAT3 suggèrent que ce facteur de transcription contribue à la

prolifération/résistance à l'apoptose des FLSs rhumatoïdes : en effet, Shouda et coll. ont observé que l'inhibition de STAT3 diminue la prolifération des FLSs rhumatoïdes (Shouda et coll., 2001) et Krause et coll. ont montré que l'inhibition de ce facteur de transcription conduit à l'apoptose des FLSs (Krause et coll., 2002). Il est intéressant de noter que l'inhibition de STAT3 ne semble avoir d'effet que sur la prolifération des FLSs rhumatoïdes, car la croissance des fibroblastes 3T3 n'est pas affectée après transfection par ces mêmes dominants négatifs (Shouda et coll., 2001). A l'inverse, IL-4 STAT est activé par la cytokine anti-inflammatoire IL-4, ce qui pourrait refléter la mise en place de mécanismes régulant l'activité pro-inflammatoire des FLSs.

Certains facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération des FLSs pourraient également contribuer à l'inflammation et la destruction articulaire. Outre son rôle dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, p53 régule l'inflammation synoviale, en diminuant l'expression de cytokines, telle l'IL-6 et de MMPs, telle la MMP-13. Les mutations de p53 observées chez certains patients atteints de PR peuvent donc contribuer à une surexpression de cytokines pro-inflammatoires et de MMPs par les FLSs rhumatoïdes : directement, car p53 possède des sites de fixation dans les promoteurs des gènes codant des MMPs et que certaines mutations de p53 augmentent l'expression de ces gènes (Sun et coll., 2000) et indirectement en diminuant l'activation de p21, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, qui diminue l'activité d'AP-1 (Perlman et coll., 2003).

Le suppresseur de tumeur p16 joue également un rôle dans la régulation de l'expression des MMPs. Dans le modèle de la souris SCID, il a été montré que les FLSs envahissant le cartilage surexpriment des MMPs et expriment également p16 (Kuenzler et coll., 2003) : p16 inhibe la liaison de kinases dépendantes des cyclines à la cycline D, ce qui empêche la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) qui diminue l'expression des MMPs. De plus, il a été montré que les FLSs rhumatoïdes expriment une isoforme inactive de la protéine Rb, ce qui pourrait favoriser l'expression de MMP-1 dans les FLSs rhumatoïdes (Bradley et coll., 2004). En effet, l'expression d'une forme active de la protéine Rb diminue l'expression de MMP-1 par un mécanisme dépendant de p38 (Bradley et coll., 2004). Ainsi, la régulation du cycle cellulaire des FLSs rhumatoïdes semble être étroitement corrélée à leur capacité à synthétiser des médiateurs inflammatoires et destructeurs.

## 2.4 Rôle des FLSs dans l'inflammation articulaire

### 2.4.1 Rôle pro-inflammatoire des FLSs

L'analyse de l'expression et de la libération de cytokines par les FLSs a permis de montrer que l'**IL-6** est la principale cytokine libérée par ces cellules (Hirth et coll., 2002). L'IL-6 est une cytokine à activité pléiotropique. Elle induit la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et contribue ainsi à une réponse inflammatoire systémique. Elle régule la différenciation des LB et la production des anticorps ainsi que la différenciation des LT en LT cytotoxiques et augmente l'activité des cellules natural killer (NK). L'IL-6 possède également une activité pro-angiogénique en augmentant l'expression du VEGF par les FLSs (Nakahara et coll., 2003). L'IL-6 peut de façon paradoxale contribuer à la réponse anti-inflammatoire en agissant sur les macrophages et les FLSs : induction de la synthèse de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra), diminution de la synthèse de MMPs et de molécules d'adhésion (Tilg et coll., 1994; Oh et coll., 1998; Silacci et coll., 1998). Elle exerce également un effet inhibiteur sur la prolifération des FLSs (Nishimoto et coll., 2000).

Le rôle de l'IL-6 dans la pathogénie de la PR résulte donc de la balance de ses effets pro- et anti-inflammatoires, effets qui peuvent être modulés par des médiateurs présents dans la cavité articulaire. L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont capables de moduler les effets anti-inflammatoires de l'IL-6 en bloquant les voies de signalisation STAT3 activées par l'IL-6 dans les FLSs rhumatoïdes. Les voies menant à STAT1 induits par l'IFN- $\gamma$  ne sont pas affectées, suggérant une modulation spécifique fine de ces voies de signalisation (Deon et coll., 2001). Les FLSs expriment également d'autres membres de la famille de l'IL-6 : le facteur inhibant les leucémies (LIF), l'oncostatine M et l'IL-11 (Okamoto et coll., 1997).

Harada et coll. ont montré que les FLSs rhumatoïdes constituent une source importante d'**IL-7** et d'**IL-15**, cytokines présentant une activité proche de celle de l'IL-2 (Harada et coll., 1999). Bien que Hirth et coll. n'aient pas mis en évidence la libération d'IL-15 par les FLSs (Hirth et coll., 2002), d'autres études ont confirmé la capacité de ces cellules à produire cette cytokine (Kurowska et coll., 2002). L'IL-15 peut contribuer à la pathogénie de la PR de différentes manières : en stimulant la migration de PNNs et de LT dans la cavité articulaire (McInnes et Liew, 1998), en protégeant ces cellules de l'apoptose (Girard et coll., 1996), en induisant la prolifération des LT et en stimulant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et l'IL-1) (Alleva et coll., 1997) qui peuvent à leur tour contribuer à augmenter la synthèse de l'IL-15 par les FLSs (Harada et coll., 1999). Mais l'IL-15 peut également agir de

manière autocrine sur les FLSs rhumatoïdes : il a été montré que l'IL-15 libérée par les FLSs contribue à la prolifération et à la résistance à l'apoptose des FLSs rhumatoïdes, par l'augmentation de l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> (Kurowska et coll., 2002).

Des concentrations importantes en **IL-16** ont été mises en évidence dans le liquide synovial de patients atteints de PR et les FLSs constituent la source majeure de cette cytokine (Franz et coll., 1998; Schuler et coll., 2003). L'IL-16 est chémoattractante pour les LT CD4, les monocytes et les polynucléaires éosinophiles. Cette cytokine peut cependant avoir des effets opposés sur les LT : elle contribue à l'anergie des LT synoviaux en inhibant la synthèse d'IL-2 (Ogasawara et coll., 1999) et active les LT via le CD3/TCR (Theodore et coll., 1996).

Le facteur inhibant la migration des macrophages (**MIF**) est une autre cytokine pro-inflammatoire abondamment sécrétée par les FLSs rhumatoïdes (Leech et coll., 1999). Le MIF induit la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages et joue le rôle de co-facteur dans l'activation des LT (Bernhagen et coll., 1994; Bacher et coll., 1996). Il est intéressant de noter que cette cytokine peut également contribuer à l'hyperplasie de la membrane synoviale rhumatoïde en augmentant la prolifération des FLSs (Lacey et coll., 2003) et en diminuant l'expression de p53, ce qui conduit à une diminution de l'apoptose des FLSs (Leech et coll., 2003).

L'efficacité des traitements visant à inhiber l'**IL-1** et le **TNF- $\alpha$**  souligne le rôle prépondérant de ces cytokines dans la pathogénie de la PR. Cependant, les FLSs contribuent assez faiblement à leur libération, ces deux cytokines étant essentiellement sécrétées par les macrophages. La libération de cytokines de la famille de l'IL-1, notamment l'IL-1 et l'**IL-18**, par les FLSs est actuellement controversée. Certaines études ont montré que les FLSs sécrétaient de faibles quantités d'IL-1 et d'IL-18 (Gracie et coll., 1999; Cho et coll., 2004). Ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres auteurs (Yamamura et coll., 2001; Maret et coll., 2004). Il a été également montré que l'expression des ARNm de ces cytokines n'est pas toujours corrélée à leur libération. Ainsi, l'ARNm de l'IL-1 a été mis en évidence dans les FLSs rhumatoïdes alors que ces cellules ne semblaient pas libérer cette cytokine (Maret et coll., 2004). Des résultats équivalents ont été obtenus avec l'IL-18 (Yamamura et coll., 2001; Hirth et coll., 2002) bien que Gracie et coll. aient mis en évidence la libération d'IL-18 par les FLSs rhumatoïdes après stimulation par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  (Gracie et coll., 1999). Il a été également démontré que l'ARNm du TNF- $\alpha$  augmente au cours des passages des FLSs *in vitro*, alors que sa sécrétion diminue (Hirth et coll., 2002). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de régulation

post-transcriptionnels et/ou post-translationnels, telle par exemple une régulation de la stabilité des ARNm et/ou des protéines synthétisées.

Les FLSs sont également une source importante de **chémokines** qui contribuent à la localisation de la réponse immunitaire au niveau articulaire par le recrutement de monocytes, de lymphocytes et de PNNs. Les FLSs expriment constitutivement de nombreuses chémokines, parmi lesquelles ont été identifiées l'IL-8, Gro- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, IP-10 et SDF-1 (Smith et coll., 1997). Il a été également montré que le PG augmente l'expression de certaines de ces chémokines dans les FLSs rhumatoïdes (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  et IL-8) (Pierer et coll., 2004). La nature des chémokines libérées par les FLSs et des récepteurs exprimés par les différents leucocytes vont conditionner le type de cellules recrutées dans l'articulation. Les LTh1 expriment préférentiellement les récepteurs de chémokines CXCR3 et CXCR5, interagissant respectivement avec IP-10 ainsi que RANTES et MIP-1 $\alpha$ , ce qui pourrait expliquer que la majorité des LT infiltrant la membrane synoviale soit des LTh1 (Qin et coll., 1998).

Les FLSs participent à la néoangiogenèse de la membrane synoviale par la sécrétion de nombreux **facteurs pro-angiogéniques**, tels le TGF- $\beta$ , l'IL-8, le PDGF, le GM-CSF, l'EGF, le FGF et le VEGF (Clavel et coll., 2003). La libération de ces médiateurs augmente après stimulation des FLSs par les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la sécrétion du VEGF par les FLSs augmente sous l'effet de l'IL-1 et de l'hypoxie (Jackson et coll., 1997) et le TNF- $\alpha$  induit l'expression d'angiogénine et d'angiopoïétine par les FLSs (Gravallese et coll., 2003).

Les FLSs libèrent également des **prostaglandines**, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  et 6-keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$ , qui sont de puissants médiateurs de l'inflammation. La PGE<sub>2</sub> est le prostanoïde majoritairement sécrété par les FLSs rhumatoïdes. Sa synthèse augmente sous l'effet de l'IL-1, du TNF- $\alpha$ , du MIF et du LPS (Hulkower et coll., 1994; Sampey et coll., 2001). De plus, la PGE<sub>2</sub> peut exercer un rétrocontrôle positif sur sa propre synthèse dans les FLSs en augmentant l'expression de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et en conduisant à une stabilisation de l'ARNm de la COX-2 par un mécanisme dépendant de p38 (Faour et coll., 2001).

Bien que la libération de **NO** par les FLSs soit controversée, il a été montré que les FLSs rhumatoïdes expriment la NO-synthase inductible (iNOS) et libèrent du NO constitutivement et après stimulation par l'entérotoxine B staphylococcique (McInnes et coll., 1996). Cette libération de NO pourrait contribuer à l'inflammation synoviale par l'induction de la synthèse de TNF- $\alpha$  par les macrophages synoviaux (McInnes et coll., 1996).

## 2.4.2 Rôle dans la survie des lymphocytes

Dans la PR, on observe une infiltration de LT et LB dans la membrane synoviale qui pourrait résulter d'une migration anormale de ces lymphocytes dans l'articulation, d'une prolifération *in situ* ou d'une inhibition de l'apoptose de ces cellules, conduisant à la persistance de la réponse inflammatoire et de la synthèse locale d'auto-anticorps.

Bien que les LT synoviaux aient un profil de cellules sensibles à l'apoptose (Bcl-2<sup>low</sup>, Bax<sup>high</sup>, Fas<sup>high</sup> et CD45RB<sup>dull</sup>), ces cellules ne meurent pas. Salmon et coll. ont montré que les FLSs contribuent probablement à la survie des LT en diminuant Bcl-2 et en maintenant Bcl-x<sub>L</sub>, qui est anti-apoptotique (Salmon et coll., 1997). Cet effet peut s'exercer directement par l'intermédiaire d'intégrines, car il est bloqué par la séquence RGD, ou indirectement par des médiateurs solubles (les surnageants de culture des FLSs sont également efficaces à prévenir l'apoptose). Il a été également montré que la chémokine SDF-1 $\alpha$  libérée par les FLSs est capable de promouvoir la migration des LT dans la synoviale et d'inhiber l'apoptose de ces cellules par un mécanisme dépendant de la PI3 kinase et de la voie des MAPKs (Nanki et coll., 2000; Suzuki et coll., 2001).

Les FLSs contribuent également à la survie des LB. Il existe dans la membrane synoviale de patients atteints de PR, des CDF (DRC-1 et 7D6) qui favorisent la transformation des LB en plasmocytes sécréteurs de FR et en LB mémoire (Lindhout et coll., 1999). Les FLSs rhumatoïdes acquièrent *in vitro* un phénotype de CDF (DRC-1 et 7D6) après stimulation par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . Cependant, des études réalisées avec des FLSs de patients atteints d'autres pathologies articulaires ont montré que cette propriété ne semble pas spécifique des FLSs rhumatoïdes. Par contre, seuls les FLSs rhumatoïdes ont la propriété de donner *in vitro* un signal de survie aux LB : les LB sont capables de se fixer aux FLSs rhumatoïdes, ce qui leur transmet un signal anti-apoptotique (Lindhout et coll., 1999). Reparón-Schuijt et coll. ont également montré que les FLSs sont capables de protéger les LB de l'apoptose par un mécanisme faisant intervenir un contact cellulaire direct via VCAM-1 (Reparón-Schuijt et coll., 2000). Cependant, étant donné que des résultats similaires ont été obtenus avec des FLSs de patients atteints d'arthrose, ces propriétés ne semblent pas directement liés au phénotype rhumatoïde des FLSs (Reparón-Schuijt et coll., 2000).

## **2.5 Rôle des FLSs dans la destruction articulaire**

### **2.5.1 Adhésion des FLSs au cartilage**

Une caractéristique fondamentale des FLSs rhumatoïdes est leur capacité à envahir la matrice extra-cellulaire et le cartilage puis à dégrader le cartilage et l'os. Ces deux propriétés sont liées à la capacité des FLSs à adhérer au cartilage par l'intermédiaire de molécules d'adhésion et d'intégrines (Wang et coll., 1997). Les intégrines à chaînes  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  et  $\beta 1$  ainsi que VCAM-1 et ICAM-1 sont surexprimées par les FLSs rhumatoïdes (Ishikawa et coll., 1996; Rinaldi et coll., 1997). Une autre molécule d'adhésion, l'ostéopontine, est synthétisée par les FLSs. Elle contribue non seulement à l'adhésion des FLSs au cartilage mais induit également la libération de MMP-1 par les chondrocytes, favorisant ainsi la dégradation du cartilage (Petrow et coll., 2000).

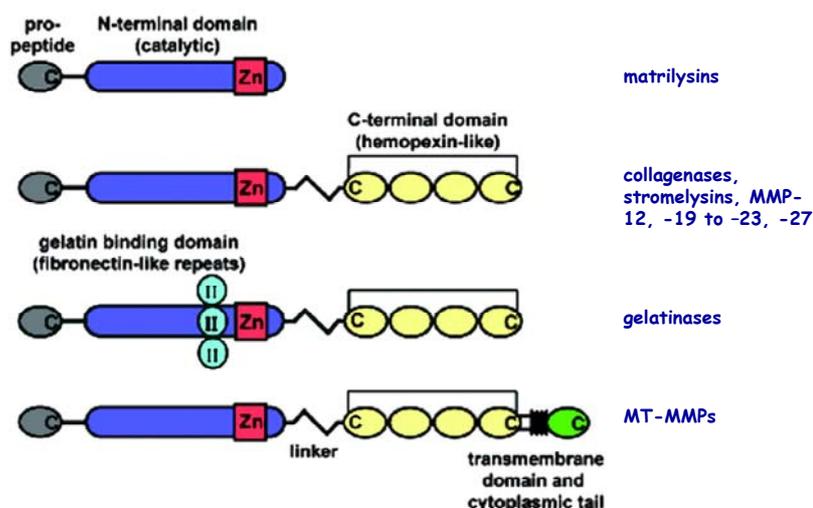
### **2.5.2 Rôle dans la libération de médiateurs de la destruction articulaire**

La dégradation de la matrice extra-cellulaire, du cartilage et de l'os est sous la dépendance de protéases, essentiellement des MMPs et des membres de la famille des adamalysines (ADAMs) ainsi que des cystéines protéases, telles les cathepsines libérées par les FLSs et les chondrocytes.

Les **MMPs** appartiennent à la superfamille des métalloprotéases à zinc. 25 MMPs ont été identifiées chez les vertébrés qui peuvent être regroupées en 5 sous-classes selon leur spécificité de substrat, leur structure et leur localisation : les collagénases (MMP-1, -8 et -13), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3, -10 et -11), les matrilysines (MMP-7) et les MMPs membranaires (MT-MMPs, MMP-14 à -17, ou MT1- à MT4-MMP, et MMP-24) (Visse et Nagase, 2003). Les MMPs possèdent de très nombreux substrats, essentiellement des protéines de la matrice extracellulaire mais également des cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$  membranaires) et des molécules d'adhésion (sélectine E) (Mengshol et coll., 2002). Les collagénases et la MT1-MMP sont les seules enzymes capables de cliver les fibres de collagènes de type I, II et III. Le collagène dénaturé (gélatine) ainsi généré peut ensuite être dégradé par les gélatinases et d'autres protéases.

Leur synthèse se fait d'abord sous forme de pro-MMPs inactives, nécessitant une activation par une MMP ou une autre protéase (Nagase, 1997). L'activité des MMPs matures est

régulée par des inhibiteurs naturels, tels l' $\alpha$ 2-macroglobuline et des inhibiteurs plus sélectifs : les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) qui lient irréversiblement les MMPs (Nagase et Woessner, 1999). La synthèse des TIMPs est parallèle à celle des MMPs : en effet, les mêmes stimuli induisent la libération de ces deux types de médiateurs par les mêmes cellules. Au cours de la PR, il existe un déséquilibre entre la synthèse de TIMPs et de MMPs, qui sont en large excès, favorisant ainsi la dégradation du cartilage (Firestein et Paine, 1992).



**Figure 12 : Représentation schématique de la structure des MMPs** (Murphy et coll., 2002)

La structure primaire des MMPs peut être subdivisée en plusieurs domaines (figure 12) : i) un peptide signal, nécessaire au transport intracellulaire et à la sécrétion des MMPs ; ii) un pro-domaine qui maintient l'activité enzymatique en phase latente ; iii) un domaine catalytique présentant un motif de liaison du zinc permettant la formation du site actif de l'enzyme ; et iv) une séquence analogue à l'hémopexine, qui est indispensable au clivage du collagène par les collagenases. Les MT-MMPs contiennent en plus un domaine transmembranaire qui permet leur insertion dans la membrane plasmique (Murphy et coll., 2002).

Les FLSs constituent une source importante de MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10 et -13 (Tolboom et coll., 2002). L'expression de certaines de ces MMPs est constitutive dans les FLSs, mais leur synthèse augmente après stimulation par divers médiateurs : ainsi, il a été montré que l'IL-1 augmente l'expression des MMP-1, -2 et -13 (Han et coll., 1999; Han et coll., 2001; Honda et coll., 2001) et que des fragments de fibronectine, tel le CS-1, ainsi que le PG sont également capables d'augmenter l'expression des MMP-1, -3 et -13 dans les FLSs rhumatoïdes (Kyburz et coll., 2003; Yasuda et coll., 2003). De la même manière, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sous forme membranaire peuvent augmenter l'expression de MMP-1 (Burger et coll., 1998).

Bien que l'ARNm codant 4 MT-MMPs, MT1 à MT4, ait été mis en évidence dans les FLSs rhumatoïdes, des études d'hybridation *in situ* ont montré que les MT1- et MT3-MMP sont les MT-MMPs majoritairement synthétisées par les FLSs (Pap et coll., 2000). Etant donné que la MT1-MMP est exprimée très fortement par les FLSs rhumatoïdes alors qu'elle n'est que peu exprimée par les FLSs sains, Pap et coll. ont suggéré que cette protéase puisse jouer un rôle important dans la destruction du cartilage au cours de la PR, soit directement par la dégradation de la matrice extracellulaire, soit indirectement par l'activation des MMP-2 et -13 (Pap et coll., 2000). D'autres expériences *in vitro* ont mis en évidence une corrélation entre l'expression des MMP-1, -3 et -10 et le pouvoir invasif des FLSs rhumatoïdes (Tolboom et coll., 2002) et il a été également suggéré que la MT1-MMP joue un rôle important dans l'invasion du cartilage par les FLSs rhumatoïdes dans le modèle de la souris SCID (Seemayer et coll., 2003).

L'expression des TIMPs par les FLSs a été nettement moins étudiée. Comme la MMP-1 et la MMP-3, TIMP-1 est exprimé par les FLSs rhumatoïdes aux sites d'adhésion au cartilage. Une étude récente a montré que la synthèse de TIMP-1 est régulée par le facteur de transcription Egr-1, dont l'expression particulièrement forte dans les FLSs rhumatoïdes est corrélée à celle de TIMP-1 (Aicher et coll., 2003). Aicher et coll. ont également montré qu'Egr-1 augmente l'expression de deux autres TIMPs, TIMP-2 et TIMP-3, mais pas TIMP-4 dans des lignées de FLSs (Aicher et coll., 2003).

Les **ADAMs** sont une famille de plus de 30 métalloprotéases essentiellement membranaires. Elles sont impliquées dans les interactions cellules/cellules (par leur domaine RGD capable d'interagir avec les intégrines), dans le clivage de protéines membranaires, tels le TNF- $\alpha$  ou le récepteur de l'IL-6, ainsi que dans la destruction du cartilage par la dégradation de l'aggrécane (Yamamoto et coll., 1999).

Böhm et coll. ont montré que l'ADAM15 (MDC15), bien que majoritairement exprimée par les macrophages, peut également être synthétisée par les FLSs rhumatoïdes, qui expriment plus d'ADAM15 que les FLSs isolés de patients atteints d'arthrose et que les FLSs sains (Bohm et coll., 2001). Des protéases solubles proches des ADAMs, appelées « a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs » (ADAMSTs), sont également exprimées par les membranes synoviales rhumatoïdes : des études immunohistochimiques ont mis en évidence l'ADAMST-5, encore appelée aggrecanase-2 ou ADAMST-11, dans la couche bordante, mais la nature des cellules exprimant cette protéase n'a pas été déterminée (Vankemmelbeke et coll., 2001). Il est intéressant de noter que, contrairement aux autres métalloprotéases, l'expression de

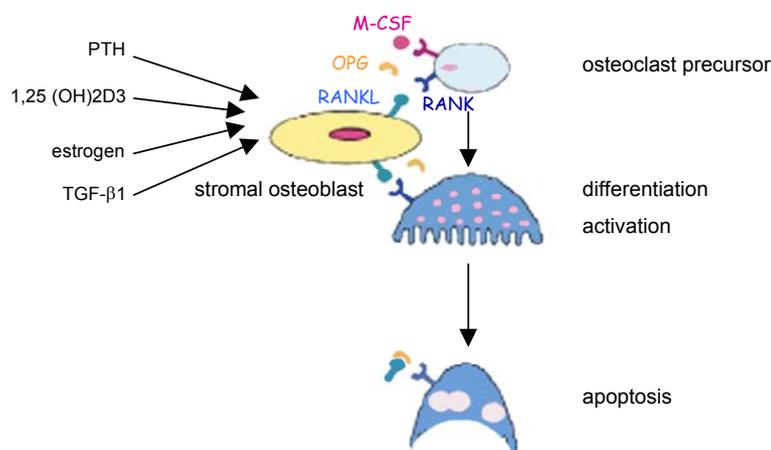
l'ADAMST-5 n'est pas influencée par l'IL-1. L'expression d'autres ADAMs par les FLSs et leur rôle dans la pathogénie de la PR n'est pas encore démontré.

Une autre grande famille de protéases responsables de la dégradation articulaire au cours de la PR sont les **cathepsines**. Il s'agit d'une famille d'au moins 11 cystéines protéases, capables de cliver un très grand nombre de protéines. Les FLSs expriment les cathepsine B, K et L (Keyszer et coll., 1995; Hummel et coll., 1998; Keyszer et coll., 1998). Ces protéases sont constitutivement exprimées par les FLSs et leur synthèse augmente sous l'effet de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  (Lemaire et coll., 1997). Les cathepsines B, K et L sont particulièrement exprimées dans la membrane synoviale aux sites d'invasion du cartilage et de l'os, ce qui suggère un rôle important pour ces protéases dans la destruction articulaire au cours de la PR (Hummel et coll., 1998; Cunnane et coll., 1999).

Les cytokines, les prostanoïdes et le NO peuvent également participer à la dégradation du cartilage. Ainsi, la PGE<sub>2</sub> contribue à la destruction du cartilage en inhibant l'expression et la synthèse de collagène par les chondrocytes (O'Keefe et coll., 1992), en augmentant la synthèse de MMPs par les chondrocytes et les FLSs (Mehindate et coll., 1995) et en favorisant l'apoptose des chondrocytes induite par le NO (Notoya et coll., 2000).

### **2.5.3 Rôle dans l'activation des ostéoclastes**

La destruction de l'os est principalement médiée par les ostéoclastes. Les précurseurs des ostéoclastes se différencient en ostéoclastes sous l'effet de cytokines, tels l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , le GM-CSF et RANKL. RANKL, exprimé par les ostéoblastes sous l'effet de différents médiateurs (vitamine D3, TGF- $\beta$ , ...) (Gravallese et coll., 2000), interagit avec son récepteur RANK à la surface des précurseurs des ostéoclastes. Cette liaison active des voies de signalisation complexes qui font intervenir les voies des MAPKs et de NF- $\kappa$ B, impliquées dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes, ainsi que les voies de la protéine kinase B (PKB)/Akt, qui empêchent leur apoptose (Darnay et coll., 1998; Wong et coll., 1999). L'OPG est un récepteur soluble de RANKL qui permet de réguler son activité en empêchant l'interaction RANK/RANKL, ce qui conduit à l'apoptose des ostéoclastes (Lacey et coll., 1998) (figure 13).



**Figure 13 : Différenciation des ostéoclastes induite par RANKL** d'après (Romas et coll., 2002)  
M-CSF: macrophage colony stimulating factor, PTH : parathormone, 1,25(OH<sub>2</sub>)D<sub>3</sub> : vitamine D3

L'utilisation de modèles animaux d'arthrites a permis de confirmer le rôle important du système RANK/RANKL dans la destruction osseuse : des souris k.o. pour le gène codant RANKL présentent moins d'érosions osseuses que les souris sauvages (Pettit et coll., 2001) et dans le modèle d'arthrite induite par adjuvant, l'administration d'OPG à des souris permet de bloquer les destructions osseuses observées chez les souris non traitées (Kong et coll., 1999).

Les FLSs participent à la différenciation et à l'activation des ostéoclastes en libérant des médiateurs ostéoclastogéniques: la PGE<sub>2</sub>, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Lader et Flanagan, 1998; Jimi et coll., 1999). Des études récentes ont montré que RANKL est également exprimé, sous forme membranaire et soluble, par les LT et les FLSs rhumatoïdes (Gravallese et coll., 2000). De plus, l'ARNm de RANKL est constitutivement exprimé par les FLSs rhumatoïdes alors que son niveau d'expression est très faible dans les FLSs de patients atteints d'arthrose (Haynes et coll., 2003; Harashima et coll., 2004). Inversement, l'OPG, qui bloque l'activité de RANKL, n'est pas exprimée dans les FLSs rhumatoïdes en l'absence de stimulation alors qu'elle est facilement détectable dans les FLSs de patients atteints d'arthrose (Harashima et coll., 2004). Ces résultats suggèrent que les FLSs contribuent à l'activation des ostéoclastes au cours de la PR.

L'ensemble de ces données montre que les FLSs rhumatoïdes, de par leur capacité à participer à la réaction inflammatoire synoviale, leurs propriétés intrinsèques qui leur permettent d'envahir et de détruire le cartilage, occupent une place particulièrement importante dans les phases d'initiation et de pérennisation de la PR.

Au cours de ce travail, nous avons choisi d'étudier le rôle des interactions PAMPs-PRRs dans l'activation des FLSs rhumatoïdes et nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la protéine I/II des streptocoques oraux. Il s'agit d'une adhésine de bactéries commensales de la cavité oro-pharyngée qui peuvent devenir pathogènes si elles disséminent dans l'organisme à la faveur d'une lésion buccale.

## 3 Les streptocoques oraux

### 3.1 Classification

Les streptocoques, bactéries à Gram positif, sont actuellement considérés comme faisant partie des agents étiologiques principaux des infections bactériennes les plus fréquentes et les plus sévères de la pathologie infectieuse humaine (Bouvet et coll., 1994). Parmi eux, les streptocoques oraux constituent un groupe de bactéries commensales, composants majeurs de la flore buccale.

Les streptocoques oraux font partie des streptocoques *stricto sensu*, actuellement classés à partir de la séquence de leur ARNr 16S, en espèces et sous-espèces réparties en quatre ensembles (tableau 3). Cette méthode a permis d'établir des relations phylogéniques entre les différentes espèces de streptocoques. En fonction de critères pratiques d'identification (caractères métaboliques, enzymatiques, antigéniques et génétiques) et de leur pathogénicité, les streptocoques oraux sont actuellement regroupés en six sous-ensembles (Or1 à 6) dont l'un (Or2) appartient désormais à un genre différent (*Abiotrophia*) mais de pathogénicité très proche (Bouvet et coll., 1994).

Le sous-ensemble Or1 est composé de 8 espèces : *Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis*, *S. peroris*, *S. infantis* et *S. australis*. Ce sont des bactéries commensales de la cavité buccale et des voies respiratoires hautes de l'Homme (Jacobs, 1997). Elles sont parfois responsables de bactériémies et d'endocardites. Par ailleurs, Costalonga et coll. ont récemment montré que l'injection sous-cutanée de *S. sanguis* à des souris était capable de réactiver une arthrite induite par le collagène (Costalonga et coll., 2002). Le pouvoir pathogène particulier des bactéries du sous-ensemble Or1 semble dépendre de l'expression de gènes spécifiques (Allen B. L., 1998; Kilic A. O., 1998; Versey P. M., 1998). Plusieurs gènes codant des adhésines impliquées dans l'adhésion précoce des bactéries, la colonisation des épithélia et

l'attachement aux valves cardiaques ont été caractérisés chez *S. gordonii* (Allen B. L., 1998). D'autre part, la colonisation de la cavité buccale par *S. mutans*, appartenant au sous-ensemble Or5, dépend également de la présence des antigènes HLA-DR4 (Wallengren et coll., 1991).

Le sous-ensemble Or3 comprend une seule espèce: *S. pneumoniae*. Cette bactérie commensale des voies aériennes supérieures peut être responsable d'infections graves : pneumonies aiguës, pleurésies, bactériémies, endocardites, méningites ou otites.

Le sous-ensemble Or4 est composé de 3 espèces : *S. anginosus*, *S. constellatus* et *S. intermedius*. Ces bactéries sont responsables d'infections pulmonaires et de suppurations profondes (Coykendall, 1989; Bouvet, 1997; Jacobs, 1997).

Le sous-ensemble Or5 comporte des espèces isolées chez l'Homme, *S. sobrinus* et *S. mutans*, impliquées dans la physiopathologie de la carie dentaire (Ogier, 1997) ou chez l'animal : *S. criceti*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. orisratti* et *S. ratti*.

Le sous-ensemble Or6 est constitué d'espèces rarement pathogènes : *S. salivarius* et *S. vestibularis*.

Pyogenes (py)	Groupe D et apparentés	Oraux (Or)	Non classés
<b>Sous-ensemble py1</b> <i>S. pyogenes</i>	<i>S. alactolyticus</i> ( <i>S. intestinalis</i> ) <i>S. equinus</i> (= <i>S. bovis</i> ) <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i> <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> <i>S. infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	<b>Sous-ensemble Or1</b> <i>S. gordonii</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. parasanguinis</i> <i>S. peroris</i> <i>S. infantis</i> <i>S. australis</i>	<i>S. acidominimus</i> <i>S. cristatus</i> <i>S. ovis</i> <i>S. suis</i>
<b>Sous-ensemble py2</b> <i>S. agalactiae</i> (= <i>S. difficilis</i> )		<b>Sous-ensemble Or3</b> <i>S. pneumoniae</i>	
<b>Sous-ensemble py3</b> <i>S. canis</i> <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i>		<b>Sous-ensemble Or4</b> <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> <i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> <i>S. intermedius</i>	
<b>Sous-ensemble py4</b> <i>S. porcinus</i> <i>S. uberis</i> <i>S. parauberis</i>		<b>Sous-ensemble Or5</b> <i>S. criceti</i> <i>S. downei</i> <i>S. ferus</i> <i>S. macacae</i> <i>S. mutans</i> <i>S. orisratti</i> <i>S. ratti</i> <i>S. sobrinus</i>	
<b>Sous-ensemble py5</b> <i>S. hyointestinalis</i> <i>S. iniae</i> (= <i>S. shiloi</i> ) <i>S. phocae</i>		<b>Sous-ensemble Or6</b> <i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>S. vestibularis</i>	
<b>non classés</b> <i>S. didelphis</i> <i>S. hyovaginalis</i> <i>S. pluranimalium</i> <i>S. thoraltensis</i> <i>S. urinalis</i>			

**Tableau 3 : Classification des streptocoques**

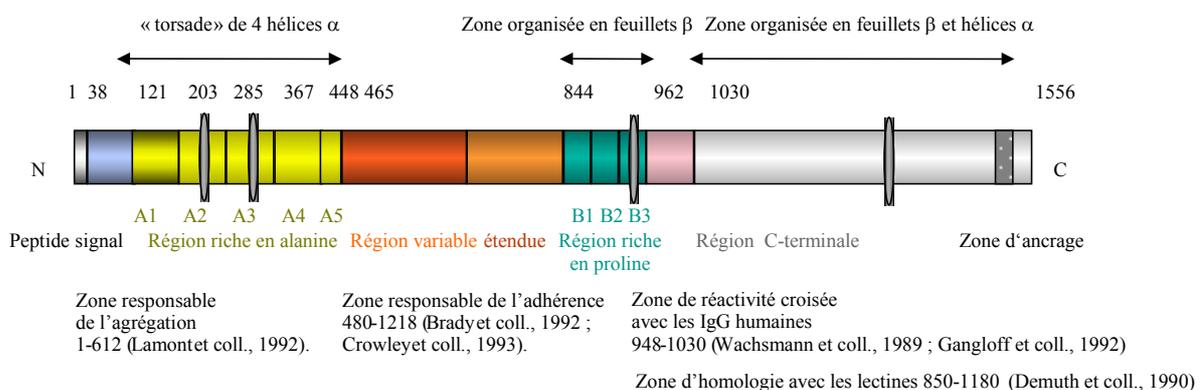
Ce tableau a été réalisé à partir d'une classification rassemblant l'ensemble des taxons valablement décrits, les synonymies ou les modifications de nomenclature ainsi que les références des publications originales (Bouvet et coll., 1994) (Euzéby, 1997). Cette liste est mise à jour mensuellement et consultable sur le site [www-sv.cict.fr/bacterio/](http://www-sv.cict.fr/bacterio/)

La première étape nécessaire à la colonisation des streptocoques oraux consiste en leur adhérence aux muqueuses ou à l'émail dentaire, directement ou par l'intermédiaire du film salivaire. Ce phénomène implique la reconnaissance spécifique de composants de l'hôte par l'intermédiaire de molécules bactériennes appelées adhésines. Les streptocoques oraux possèdent à leur surface différents types d'adhésines dont des adhésines de nature protéique, appelées protéines I/II, antigéniquement voisines, de haute masse moléculaire (180-210 kDa) et qui jouent un rôle essentiel dans la virulence de ces bactéries.

## 3.2 Les protéines I/II

### 3.2.1 Structure des protéines I/II

Cette famille de protéines regroupe les facteurs de virulence des streptocoques oraux les plus étudiés et les mieux caractérisés. Ces protéines présentent une structure complexe et des fonctions diverses. Les protéines I/II sont des adhésines multifonctionnelles qui contribuent à l'initiation et au développement du biofilm buccal en interagissant avec les constituants salivaires, avec les protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte et avec d'autres bactéries de la cavité orale. Les protéines I/II sont des protéines de 1500 à 1566 acides aminés (aa). L'analyse de la séquence primaire permet de distinguer sept régions différentes à partir de l'extrémité N-terminale : un peptide signal, une région N-terminale, un domaine composé de motifs répétitifs riches en alanine, un domaine central dit variable, un domaine composé de motifs répétitifs riches en proline, une région C-terminale et une séquence C-terminale d'ancrage à la paroi cellulaire bactérienne. La figure 14 présente la structure de la protéine I/II de *S. mutans* OMZ 175 de sérotype f.



**Figure 14: Représentation schématique de la structure de la protéine I/II de *S. mutans* OMZ 175 sérotype f et fonction des différents domaines**

### 3.2.1.1 Peptide signal (résidus 1-38)

Le côté N-terminal des protéines I/II, composé d'une séquence de 38 aa, présente les caractéristiques de peptide signal bactérien avec une prédominance de résidus basiques suivis d'une séquence hydrophobe.

### 3.2.1.2 Région N-terminale (résidus 39-120) et région A (résidus 121-465)

La région N-terminale située en aval du peptide signal se caractérise par une prédominance (55%) de résidus chargés (asparagine, glutamine, lysine) et hydroxylés (sérine et thréonine) suggérant un caractère fortement hydrophile. Le taux d'homologie de cette région est très faible (33%) entre les différentes protéines I/II. A l'heure actuelle, la fonction de cette région reste inconnue.

La région alanine (A) est caractérisée par une forte proportion de résidus alanine (23 à 30%), mais également de résidus chargés. Elle présente trois séquences répétées d'un motif de 82 aa (aa 203-448), nommées A2, A3 et A4. Chacune de ces séquences comporte 10 sous-séquences appelées heptamères car constituées chacune de 7 aa. Le motif principal de ces heptamères est YQXXLAX, X pouvant être soit un résidu chargé, soit une alanine. La présence de tels heptamères riches en alanine et ne contenant aucune proline permet de prédire une organisation de la région alanine en plusieurs hélices  $\alpha$ . L'alternance régulière de résidus polaires et non polaires est caractéristique d'un surenroulement en "torsade" d'hélices (coiled-coiled) de ces 4 hélices  $\alpha$ . Cette structure serait stabilisée par des liaisons hydrophobes entre des résidus tyrosine et leucine, ainsi que par des liaisons hydrogène entre des résidus tyrosine et asparagine (LaPolla et coll., 1991). Dans cette conformation en "torsade" d'hélices, les résidus alanine constituent une région hydrophobe continue, qui s'enroule autour de l'hélice alors que les résidus hydrophiles sont répartis sur la face opposée (LaPolla et coll., 1991). Ces trois séquences répétitives sont suivies d'une courte séquence nommée A5 (aa 449 à 465), également organisée en heptamères et dont la partie terminale présente un appauvrissement significatif en résidus alanine. La séquence A1 (aa 121 à 202) est localisée en amont des précédentes mais est peu décrite du fait de la dégénérescence de sa séquence et de la faible conservation des heptamères. Du fait de sa grande conservation parmi les streptocoques oraux, de sa structure particulière et de sa position N-terminale qui, dans l'hypothèse probable d'un ancrage C-terminal, en fait la région la plus exposée et donc la plus accessible de la protéine I/II, la région A est l'une des régions les plus étudiées des protéines I/II.

### **3.2.1.3 La région variable étendue (résidus 466-844)**

Cette région qui a été qualifiée de “variable” ne présente cependant une grande variabilité qu’entre les protéines I/II de *S. mutans* et de *S. gordonii* (Jenkinson et Demuth, 1997). Cependant si la région variable de la protéine SspB de *S. gordonii* M5 ne présente que 22% d’homologie avec les protéines I/II de *S. mutans*, la seconde protéine I/II de *S. gordonii*, la SspA, présente une forte homologie de séquence avec les protéines I/II de *S. mutans* (Demuth et coll., 1996). De fortes homologies apparaissent lors de l’étude des séquences des régions variables des protéines I/II des *S. mutans* de sérotypes c, g, et f, alors qu’une certaine variabilité est observée au niveau des 150 derniers aa situés en amont de la région proline adjacente entre les protéines SspB et SspA de *S. gordonii* M5 (Demuth et coll., 1996). Troffer-Charlier et coll. ont cristallisé la région variable de la protéine I/II de *S. mutans* puis analysé sa structure (Troffer-Charlier et coll., 2002) : les aa 464 à 840 présentent un repliement de type lectine qui révèle un site potentiel (préformé) de fixation de sucres stabilisé par un ion métal. Ce site pourrait jouer un rôle dans la dissémination de la bactérie.

### **3.2.1.4 Région riche en proline (résidus 845-962)**

Cette région comporte une forte proportion de résidus proline (environ 35%) s’organise en trois motifs de 39 aa chacun (B1, B2 et B3). A l’exception de celle de *S. sobrinus* 6715 qui ne possède que deux des trois motifs répétitifs, cette région est très conservée parmi les protéines I/II des streptocoques oraux. Les prédictions de la structure secondaire de cette région suggèrent une organisation en feuillet  $\beta$ . La richesse en proline et en aa chargés (23%) indique qu’elle est fortement hydrophile et par conséquent, très exposée dans le milieu extracellulaire. Cette probable surexposition explique la grande immunogénicité de cette région. Ceci a été confirmé par la mise en évidence au niveau de cette région d’épitopes B et T identifiés au moyen de peptides synthétiques (Kelly et coll., 1995). Par ailleurs, Brady et coll. ont montré que la suppression de cette région inhibe l’exportation de la protéine I/II à la paroi, conséquence d’une perturbation du repliement normal de cette protéine (Brady et coll., 1998).

### **3.2.1.5 Région C-terminale (résidus 950-1520)**

Cette région qui chevauche la précédente est la plus complexe des protéines I/II. L’analyse de sa structure secondaire prédit une organisation composée d’un mélange d’hélices  $\alpha$  et de feuillet  $\beta$  présentant plusieurs enroulements suggérant une structure globulaire (Jenkinson

et Demuth, 1997). Les aa 948 à 1030 de la protéine I/II de *S. mutans* OMZ 175 présente des homologies avec les IgG humaines (IgG2 et IgG4) ce qui pourrait jouer un rôle dans la synthèse d'anticorps anti-IgG (Wachsmann et coll., 1989) : des alignements de séquences ont fait apparaître une homologie avec les aa 111 à 190 de la chaîne  $\alpha 2$  des immunoglobulines G humaines (figure 15). A l'exception de *S. ratti*, cette homologie de séquence a été retrouvée au niveau de toutes les protéines I/II des streptocoques du groupe *mutans* (Moisset et coll., 1994).

```

I/II (948)      PTPPTPTPDQPE- PNKPVEPTYEVI PTPPTDP VYQDLPTPPS VPT VHFHY
                P: PP : P : P KP :T : :TP : V D:: : : P: V: F
γ2 (111)      PAPPVAGPSVFLFPPKPKD- TLMI SRTPEVTCVVVDVS- HED- PEVQFNW

                FKLAVQP QVNKEI RNNNDVNI DRTL VAKQSVV I/II (1030)
                : : V: : :K: :::: N : : : V: VV
                YVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVS VLTVV γ2 (190)

```

**Figure 15 : Zone d'homologie entre la protéine I/II et la chaîne  $\alpha 2$  des IgG humaines**

### 3.2.1.6 Région d'ancrage

La région d'ancrage des protéines I/II permet leur attachement à la paroi bactérienne. Elle présente les caractéristiques typiques des protéines de surface des streptocoques (Fischetti, 1991) et de la plupart des bactéries à Gram positif. L'extrémité C-terminale de la protéine contient une séquence d'ancrage dans la membrane cytoplasmique LPNTG, comparable à la séquence LPXTG conservée chez la plupart des protéines de cocci à Gram positif (Koga et coll., 2002) suivie d'une autre séquence hydrophobe formée de 18 aa et d'une courte partie intracellulaire très hydrophile de sept aa. A l'exception de la protéine SpaA de *S. sobrinus* 6715 (sérotypage g) et de la protéine de 155 kDa de *S. mutans* GS-5 (sérotypage c), cette organisation est présente dans la séquence de toutes les protéines I/II des streptocoques oraux (Murakami et coll., 1997).

### 3.2.2 Fonctions des protéines I/II

Les protéines I/II jouent un rôle important dans différents processus tels la colonisation (Jenkinson et Lamont, 1997), la dissémination bactérienne (Jenkinson et Demuth, 1997) et la modulation du système immunitaire (Vernier et coll., 1996).

En interagissant avec les constituants salivaires, avec les protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte et avec d'autres bactéries de la cavité orale, les protéines I/II contribuent à l'initiation et au développement du biofilm buccal. Les protéines I/II sont capables d'interagir avec de nombreux composants salivaires : l'amylase salivaire, le lysozyme, le groupe des protéines riches en proline (Russell et Mansson-Rahemtulla, 1989), une agglutinine salivaire de nature glycoprotéique (SAG) (Demuth et coll., 1990; Brady et coll., 1992), les IgA sécrétoires (Rundegren et Arnold, 1987) ainsi que le composant sécrétoire (Ackermans F, 1988) qui ont la propriété de se lier fortement à l'hydroxyapatite pour former la pellicule salivaire acquise. L'adhérence des streptocoques aux composants de la pellicule salivaire représente l'une des premières étapes de la colonisation de la cavité buccale par les streptocoques oraux. De plus, de nombreuses études ont montré que la protéine I/II médiait les interactions avec d'autres micro-organismes de la cavité orale tels ceux du genre *Actinomyces* (Demuth et coll., 1996; Eglund et coll., 2001), *Porphyromonas gingivalis* (Chung et coll., 2000; Demuth et coll., 2001) et *Candida albicans* (Holmes et coll., 1996) favorisant ainsi la colonisation secondaire de la cavité buccale. D'autre part, les protéines I/II interagissent également avec les constituants de la matrice extracellulaire l'hôte, tels le collagène, la fibronectine et la laminine (Love et coll., 1997; Sciotti et coll., 1997; Love et coll., 2000), ce qui suggère que ces bactéries ou certains de leurs constituants pourraient non seulement disséminer mais également persister *in situ* et contribuer au développement de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques.

Par ailleurs, les protéines I/II sont capables d'interagir de façon spécifique avec différents types cellulaires et de moduler certaines de leurs fonctions en particulier celles impliquées dans le développement de la réaction inflammatoire. Ainsi, il a été montré que la protéine I/II de *S. mutans* se fixe sur des glycoprotéines membranaires des monocytes, des cellules épithéliales et endothéliales humaines, par l'intermédiaire d'interactions de type lectine faisant intervenir l'acide N-acétyl neuraminique (NANA) et le fucose et induit la production par ces cellules de cytokines pro-inflammatoires : TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 et IL-8 par les monocytes humains (Soell et coll., 1994), IL-8 par les cellules épithéliales et IL-6 et IL-8 par les cellules endothéliales humaines (Vernier et coll., 1996) et par les FLSs (Gourieux et coll., 2001). L'importance de la protéine I/II dans l'adhésion cellulaire et la stimulation d'une réponse pro-inflammatoire par les cellules humaines a été confirmée par l'utilisation de souches de *S. mutans* n'exprimant pas la protéine I/II : l'adhésion de ces bactéries aux cellules monocytaires THP-1 et aux fibroblastes pulpaire est diminuée et l'activité pro-inflammatoire de ces mutants est également plus faible (Engels-Deutsch et coll., 2003). D'autre part, il a été montré que la région riche en alanine et la

région variable étendue de la protéine I/II sont les deux régions responsable de l'induction de la production de TNF- $\alpha$  par les cellules THP-1 (Chatenay-Rivauday et coll., 1998). En outre, si l'adhésion aux cellules humaines est indispensable, l'internalisation de la protéine I/II n'est pas nécessaire à son activité moduline (Engels-Deutsch et coll., 2003).

La protéine I/II est également capable d'induire l'expression de molécules d'adhésion, telles la sélectine E et VCAM-1 par les cellules endothéliales humaines et d'augmenter l'expression d'ICAM-1 par ces cellules, favorisant ainsi la migration transendothéliale des PNNs vers les zones inflammatoires (Vernier et coll., 1996).

## 4 Objectifs du travail

Si de nombreuses cellules participent à l'inflammation synoviale rhumatoïde, les FLSs jouent un rôle particulier dans ce phénomène. Contrairement aux monocytes, lymphocytes, PNNs et CD infiltrants, les FLSs sont des cellules résidentes de la membrane synoviale. Ce ne sont pas des cellules intervenant classiquement dans la réponse immunitaire, mais ils deviennent des acteurs importants de la réaction inflammatoire en réponse à l'environnement rhumatoïde. Leur rôle se distingue de celui des macrophages dans la mesure où ces derniers constituent la source majeure d'un large éventail de médiateurs de l'inflammation (IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$ , NO, ...) alors que les FLSs libèrent un nombre plus restreint de cytokines. Les FLSs sont également les principales cellules médiant la destruction articulaire au cours de la PR.

Les stimuli à l'origine de cette activation des FLSs rhumatoïdes sont très divers. L'immunité innée tient une place importante dans la pathogénie de la PR et de nombreux micro-organismes et PAMPs pourraient participer à l'initiation et/ou à l'entretien de l'inflammation synoviale rhumatoïde. Le laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années au rôle des streptocoques oraux dans les pathologies humaines. Etant donné que l'ARNr de streptocoques oraux a été mis en évidence dans des membranes synoviales de patients atteints de PR et qu'une association entre des infections dentaires et des poussées de PR a été observée, nous avons choisi d'étudier le rôle éventuel de ces bactéries dans l'inflammation synoviale rhumatoïde. L'objectif de ce travail a été de déterminer dans quelle mesure la stimulation des FLSs rhumatoïdes par la voie PAMP-PRR pourrait contribuer à l'acquisition du phénotype « agressif » (pro-inflammatoire et prolifératif) de ces cellules. Nous avons utilisé la protéine I/II des streptocoques oraux, protéine purifiée au laboratoire et connue pour stimuler une réponse inflammatoire par

différentes cellules humaines, pour activer les FLSs isolés à partir de membranes synoviales de patients atteints de PR.

Dans une première partie, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la capacité des FLSs ainsi stimulés à développer une réaction inflammatoire (synthèse de cytokines pro-inflammatoires) et destructrice (synthèse de MMPs). Nous avons ensuite souhaité déterminer les voies de signalisation intracellulaire, qui constituent actuellement une cible thérapeutique intéressante en pathologie humaine, impliquées dans la réponse des FLSs rhumatoïdes à la protéine I/II. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a été identifiée au laboratoire comme un récepteur de ce PAMP à la surface des cellules endothéliales et il a été montré que la « focal adhesion kinase » (FAK) et ERK1/2 sont phosphorylées dans ces cellules en réponse à la stimulation par la protéine I/II. Nous avons donc voulu déterminer si ces protéines sont également impliquées dans l'activation des FLSs rhumatoïdes par la protéine I/II.

Afin de déterminer si les mécanismes mis en évidence sont dépendants du phénotype particulier des FLSs rhumatoïdes, des FLSs isolés à partir de membranes synoviales de patients atteints d'arthrose ont été également étudiés. L'arthrose est définie comme une arthropathie non inflammatoire même s'il existe des arguments pour un rôle des composants inflammatoires dans la pathogénie de cette maladie (Hedbom et Hauselmann, 2002). L'arthrose se caractérise par une destruction focalisée et progressive du cartilage avec une perte de la masse osseuse dans l'os sous le cartilage, par la croissance d'ostéophytes et par une augmentation de l'épaisseur de l'os subchondral. L'arthrose est une pathologie multifactorielle. Des lésions mécaniques sembleraient être impliquées dans l'initiation de la maladie et des facteurs génétiques et biochimiques permettraient la progression de la pathologie. L'arthrose est très souvent utilisée comme pathologie de référence dans les études portant sur la PR.

# 1 Activité pro-inflammatoire et destructrice de la protéine I/II

## 1.1 Etude de la synthèse et de la libération d'IL-6 et d'IL-8

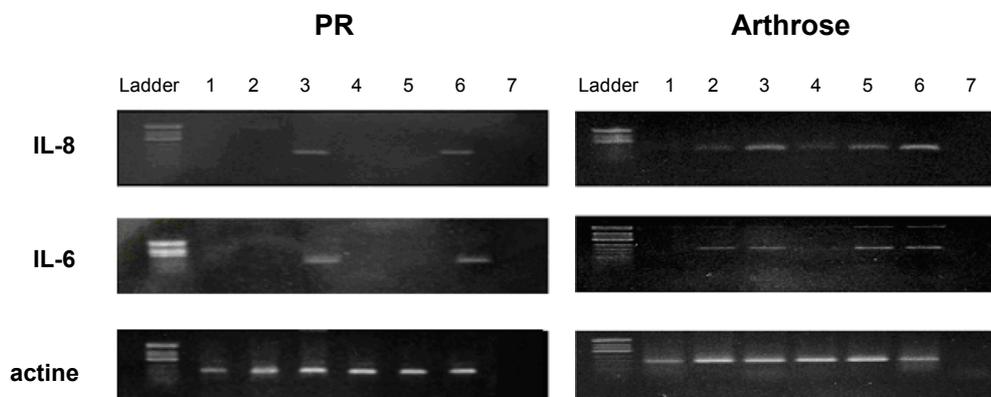
Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que la protéine I/II était capable d'induire la libération d'IL-6 et d'IL-8 de manière dose-dépendante par les FLSs rhumatoïdes alors que ces cellules ne libèrent pas d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  en réponse à la stimulation par cette moduline (Gourieux et coll., 2001). La réponse pro-inflammatoire des FLSs de patients atteints d'arthrose après activation par la protéine I/II n'avait pas encore été étudiée (résultats complémentaires).

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet immunomodulateur de la protéine I/II sur les FLSs et étudié la capacité de la protéine I/II à induire la synthèse d'IL-6 et d'IL-8, deux cytokines particulièrement importantes dans l'inflammation : l'IL-8 est un puissant chémoattracteur des PNNs ; l'IL-6 constitue un excellent marqueur de l'inflammation et la cytokine pro-inflammatoire majoritairement sécrétée par les FLSs.

### 1.1.1 Résultats

#### 1.1.1.1 Expression des ARNm de l'IL-6 et l'IL-8 par les FLSs

Nous avons stimulé les FLSs avec la protéine I/II (125 pM) pendant 1 h et 3 h puis analysé l'expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 par RT-PCR. Les FLSs stimulés avec le LPS (1  $\mu$ g/mL, 5% de sérum) pendant les mêmes temps ont été utilisés comme contrôle d'activation. Les résultats sont représentatifs des expériences réalisées avec les FLSs isolés de trois patients différents.

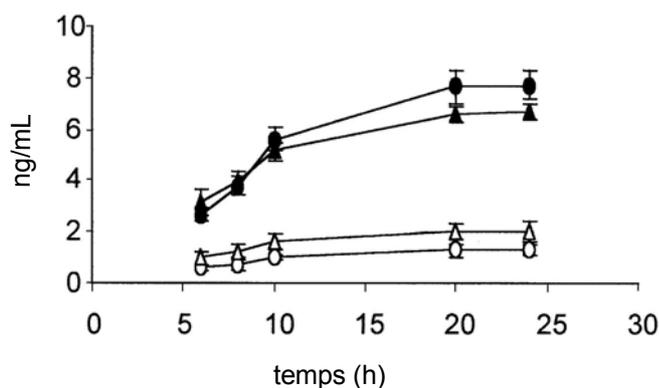


**Figure 16 : Expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 dans les FLSs rhumatoïdes et les FLSs arthrosiques activés ou non par la protéine I/II pendant 1 h et 3 h**  
1 : RPMI (1 h), 2 : protéine I/II (1 h), 3 : protéine I/II (3 h), 4 : RPMI (3 h), 5 : LPS (1 h), 6 : LPS (3 h), 7 : mix

La figure 16 montre que, dans nos conditions expérimentales, les taux d'ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 sont indétectables dans les FLSs rhumatoïdes non activés et que la protéine I/II induit l'expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes après 3 h de stimulation. L'activation des FLSs rhumatoïdes avec le LPS conduit également à une expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8. L'expression homogène de l'ARNm de l'actine montre la présence d'ADNc dans chaque échantillon étudié et valide les expériences. Des résultats similaires ont été observés avec des FLSs de patients atteints d'arthrose.

### 1.1.1.2 Cinétique de libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs

Nous avons ensuite étudié la cinétique de libération de ces cytokines par les FLSs. Les FLSs ont été activés par la protéine I/II (125 pM) pendant des temps allant de 6 h à 24 h. L'IL-6 et l'IL-8 ont ensuite été dosées dans les surnageants de culture par un test ELISA double sandwich. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué afin de valider les expériences. Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne de trois expériences et sont représentatifs des résultats obtenus avec les FLSs isolés de trois patients différents.



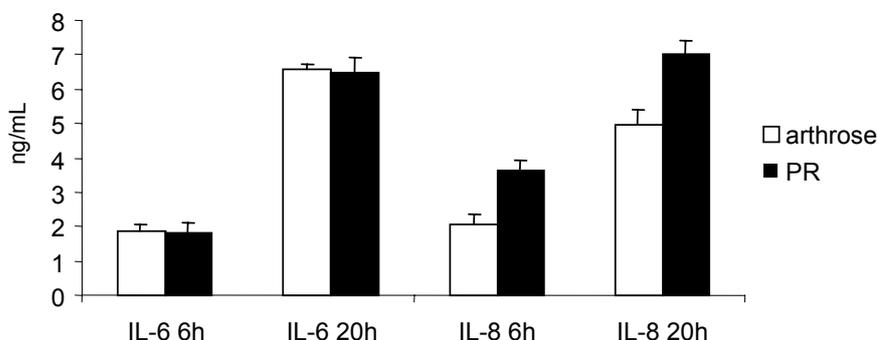
**Figure 17 : Cinétique de libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes activés ou non par la protéine I/II (Neff et coll., 2001)**

○ IL-6 en l'absence de toute stimulation ; ● IL-6 après stimulation par la protéine I/II ; △ IL-8 en l'absence de toute stimulation ; ▲ IL-8 après stimulation par la protéine I/II

Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

La figure 17 montre une libération basale d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes qui n'est pas modifiée avec le temps. Après incubation des FLSs rhumatoïdes avec la protéine I/II, la libération d'IL-6 et d'IL-8 augmente : la concentration en IL-6 et en IL-8 dans le surnageant est d'environ 3 ng/mL après 6 h d'activation et atteint un plateau à environ 7 ng/mL et 8 ng/mL respectivement après 20 h d'activation.

Des résultats comparables ont été obtenus avec des FLSs de patients atteints d'arthrose, hormis une libération d'IL-8 significativement plus faible après 20 h d'activation par la protéine I/II (5 ng/mL) (figure 18).



**Figure 18 : Libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes et les FLSs de patients atteints d'arthrose activés par la protéine I/II pendant 6 h et 20 h.**  
Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

*L'ensemble de ces résultats montre que la protéine I/II induit la synthèse et la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes.*

### 1.1.2 Discussion

Les FLSs rhumatoïdes sont donc des cellules activables par des PAMPs de différentes origines : en effet, des résultats équivalents ont été obtenus par Kyburz et coll. après stimulation des FLSs rhumatoïdes par le PG, ligand de TLR-2 (Kyburz et coll., 2003). Ce sont des cellules qui répondent également à des cytokines présentes dans l'articulation rhumatoïde, tels l'IL-1 $\beta$  et le TGF- $\beta$ , qui contribuent à l'activation des FLSs au cours de la PR (Inoue et coll., 2001; Cheon et coll., 2002). Ainsi, les FLSs comme d'autres cellules résidentes (cellules endothéliales, cellules épithéliales) sont capables de détecter un signal danger et d'y répondre en initiant une réponse inflammatoire qui pourrait, dans certaines conditions comme la PR, se pérenniser et devenir pathologique. Les résultats concernant les FLSs rhumatoïdes ont fait l'objet d'une publication dans Cellular Microbiology (2001) présentée au chapitre 2.1 des résultats.

Nous avons montré que les FLSs de patients atteints d'arthrose répondent également à la protéine I/II : mêmes cytokines libérées (IL-6 et IL-8) avec la même cinétique de libération. La synthèse d'IL-8 reste cependant significativement plus faible que celle obtenue avec les FLSs rhumatoïdes. Il est à noter que la réponse des FLSs *in vitro* n'est pas forcément corrélée à ce qui est observé *in vivo*. En effet, Pierer et coll. ont montré que deux chémokines, la GCP-2 et MCP-

2, sont sécrétées par les FLSs rhumatoïdes et les FLSs de patients atteints d'arthrose en réponse à la stimulation par le PG *in vitro*, mais que seuls les FLSs rhumatoïdes libèrent ces cytokines *in vivo* (Pierer et coll., 2004) et ceci bien que le PG soit présent dans la membrane synoviale des patients atteints de PR et des patients atteints d'arthrose (van der Heijden et coll., 2000). Ceci pourrait être dû à l'expression plus forte de TLR-2 par les FLSs dans les membranes synoviales rhumatoïdes (Seibl et coll., 2003) alors que l'expression de ce récepteur par les FLSs rhumatoïdes et arthrosiques est similaire *in vitro* (Kyburz et coll., 2003).

## 1.2 Etude de la synthèse et de la libération d'IL-18

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle que pourraient jouer les FLSs dans la production d'IL-18. Cette cytokine appartient à la famille de cytokines dont l'exemple type est l'IL-1 et comme l'IL-1, elle est d'abord synthétisée sous forme de précurseur inactif, la pro-IL-18, qui est ensuite clivée par la caspase-1 en une glycoprotéine biologiquement active de 18 kDa (Gu et coll., 1997).

Au cours de la PR, on trouve des concentrations sériques en IL-18 significativement plus élevées qu'au cours de l'arthrose (Gracie et coll., 1999) et l'expression de cette cytokine est corrélée à la phase inflammatoire de la PR (Joosten et coll., 2003).

Sur le plan expérimental, Gracie et coll. ont montré que l'administration d'IL-18 à des souris DBA/1 présentant une arthrite induite par le collagène, accélère le développement et la sévérité de l'arthrite (Gracie et coll., 1999). L'IL-18 joue également un rôle très précoce dans l'inflammation articulaire, dans le modèle murin d'arthrite induite par l'administration de parois de streptocoques : des concentrations en IL-18 élevées sont observées dans le liquide synovial des souris dès la 2<sup>ème</sup> heure après injection de cet antigène (Joosten et coll., 2000). A l'inverse, l'administration d'anticorps neutralisant l'IL-18 ou de l'inhibiteur naturel de l'IL-18, l'IL-18-BP, conduit à une amélioration de la synovite et à une diminution de la libération des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Joosten et coll., 2000; Plater-Zyberk et coll., 2001; Banda et coll., 2003).

Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que cette cytokine induit la libération d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes (Puren et coll., 1998) et de NO par les chondrocytes (Olee et coll., 1999). Elle participe également à la différenciation des lymphocytes T en LTh1 et possède des propriétés chémoattractrices vis-à-vis des LT CD4 (Komai-Koma et coll., 2003).

L'ARNm de l'IL-18 est exprimé dans de nombreuses cellules, tels les macrophages, les CD, les ostéoblastes, les LT et les LB, mais les macrophages semblent constituer la source majeure d'IL-18 mature dans l'articulation rhumatoïde. Gracie et coll. ont montré que l'ARNm de l'IL-18 augmente dans les FLSs rhumatoïdes sous l'effet de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$  (Gracie et coll., 1999), mais la capacité des FLSs à libérer de l'IL-18 en réponse à ces cytokines est actuellement controversée (Yamamura et coll., 2001).

Le but de notre travail a été d'étudier la capacité d'un PAMP, la protéine I/II, à induire l'expression, la maturation et la libération de l'IL-18 par les FLSs isolés de patients atteints de PR et de patients atteints d'arthrose. Nous avons étudié en parallèle la synthèse et la libération

d'IL-18 par la lignée monocyttaire THP-1 en réponse à la protéine I/II, les monocytes étant connus pour sécréter de l'IL-18 en réponse à divers stimuli.

### **1.2.1 Publication : Cellular Microbiology (2004)**

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans Cellular Microbiology (2004) présentée ci-dessous.

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Mirjam B. Zeisel**, Laurence A. Neff, John Randle, Jean-Paul Klein, Jean Sibia and Dominique Wachsmann

**Impaired release of IL-18 from fibroblast-like synoviocytes activated with protein I/II, a pathogen-associated molecular pattern from oral streptococci, results from defective translation of IL-18 mRNA in pro-IL-18.**

Cellular Microbiology 6, 593-598 (2004)

Pages 593-598 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.1462-5822.2004.00385.x/full/>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## 1.2.2 Discussion

Au cours de cette étude, nous avons dans un premier temps montré que la protéine I/II induit l'expression de l'ARNm de l'IL-18 et la libération d'IL-18 mature par les cellules THP-1. Ces résultats sont en accord avec d'autres expériences démontrant que les monocytes produisent de l'IL-18 en réponse à divers stimuli, en particulier bactériens tels *Streptococcus pyogenes* et *S. pneumoniae* (Miettinen et coll., 1998).

Nous avons ensuite étudié l'expression et la libération de cette cytokine par les FLSs. Il a été montré que l'expression de l'ARNm de l'IL-18 augmente dans la membrane synoviale des patients atteints de PR sous l'effet de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  (Gracie et coll., 1999; Yamamura et coll., 2001). La protéine I/II, comme le LPS, induit également l'expression de l'ARNm de l'IL-18 dans ces cellules. Cependant, le dosage de l'IL-18 mature dans les surnageants de cultures cellulaires a montré que, contrairement aux cellules THP-1, les FLSs ne libèrent pas l'IL-18 mature après stimulation par la protéine I/II. Cet effet ne semble pas être dépendant du stimulus dans la mesure où ni l'IL-1, ni le TNF- $\alpha$ , ni le LPS n'induisent la sécrétion d'IL-18 par ces cellules. Ceci a été également observé par Yamamura et coll. qui, ayant détecté de l'ARNm de l'IL-18 dans les FLSs et les macrophages de patients atteints de PR et de patients atteints d'arthrose après stimulation par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , ont montré que seuls les macrophages libéraient de l'IL-18 mature (Yamamura et coll., 2001). Pour Gracie et coll. il existerait cependant une population de FLSs rhumatoïdes capables d'exprimer de l'IL-18 mature *in situ* (Gracie et coll., 1999). Il est à noter que d'autres cellules sont capables d'exprimer l'ARNm de l'IL-18 sans qu'il y ait libération de cette cytokine : la stimulation d'ostéoblastes murins par *Staphylococcus pneumoniae* et *Salmonella* conduit à l'expression de l'ARNm de l'IL-1 et de l'IL-18 mais pas à la sécrétion de ces cytokines (Marriott et coll., 2002).

Différentes hypothèses pouvaient être envisagées pour expliquer l'absence de libération d'IL-18 par les FLSs : i) des anomalies dans le processus de sécrétion, ii) un défaut d'activation de la caspase-1 ou iii) une non-translation de l'ARNm en pro-IL-18.

L'utilisation d'un dosage ELISA détectant spécifiquement la forme mature de l'IL-18 nous a permis de mettre en évidence cette cytokine bioactive dans les lysats de cellules THP-1 stimulées par la protéine I/II. Celle-ci n'ayant pas été retrouvée dans les lysats de FLSs activés par la protéine I/II (limite de détection : 12,5 pg/mL), un défaut de sécrétion ne pouvait pas être responsable de l'absence de libération de l'IL-18 par ces cellules. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Möller et coll. qui ont identifié de l'IL-18 mature intracellulaire dans des FLSs cultivés pendant plusieurs passages (Möller et coll., 2001). Cependant, ces auteurs

indiquent que l'origine des FLSs conditionne le niveau d'expression intracellulaire de cette cytokine : si les FLSs isolés du liquide synovial contiennent de grandes quantités d'IL-18 intracellulaire, les FLSs isolés de membranes synoviales en contiennent très peu (Möller et coll., 2001).

Il était également envisageable que les FLSs aient une faible capacité à activer la caspase-1 en réponse à la protéine I/II. En effet, la protéine I/II n'augmente pas l'ARNm de la caspase-1 dans les FLSs (résultats obtenus par cDNA array, Zeisel et coll. 2004). Cependant, l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre la pro-IL-18 nous permettait de valider la troisième hypothèse : ce précurseur n'étant pas synthétisé par les FLSs en réponse à la protéine I/II, un défaut d'activation de la caspase-1 ne pouvait pas être à l'origine de l'absence de sécrétion d'IL-18 par les FLSs. Ces résultats suggéraient donc que l'ARNm pouvait ne pas être traduit en pro-IL-18.

La stabilité et/ou la dégradation des ARNm de cytokines pro-inflammatoires est contrôlée par différents mécanismes. Il a été montré, par exemple, que la dégradation de l'ARNm du TNF- $\alpha$  est sous la dépendance d'une séquence AURE située dans la région 3' non traduite (UTR) (Kontoyiannis et coll., 1999). Bien que la présence d'une telle séquence n'ait pas été identifiée dans l'ARNm de l'IL-18, une instabilité de l'ARNm de cette cytokine dans les FLSs pouvait être à l'origine du défaut de libération de l'IL-18 par ces cellules. L'incubation des FLSs activés par la protéine I/II en présence d'actinomycine D, qui est un inhibiteur de la transcription, nous a permis de montrer que l'ARNm de l'IL-18 est dégradé très rapidement dans ces cellules. Il est indétectable dès la première heure de traitement avec l'actinomycine D alors que sa dégradation est progressive dans les THP-1 (ARNm encore détectable après 4 h d'incubation en présence d'actinomycine D). L'ARNm de l'IL-18 semble donc être très instable dans les FLSs activés par la protéine I/II, ce qui pourrait expliquer l'absence de synthèse de pro-IL-18 et de sécrétion d'IL-18 mature par ces cellules.

Nous avons obtenu des résultats comparables avec les FLSs rhumatoïdes et les FLSs de patients atteints d'arthrose, suggérant que la réponse des FLSs à la protéine I/II n'est pas pathologie-dépendante.

Ces résultats confirment que si les FLSs sont capables de participer à la réponse inflammatoire (libération d'IL-6 et d'IL-8), ils ne libèrent pas toutes les cytokines en réponse aux divers stimuli.

### **1.3 Etude de la synthèse et de la libération de MMPs**

Nos travaux se sont poursuivis par l'étude de la transcription de gènes dont les produits d'expression sont plus particulièrement impliqués dans la prolifération cellulaire et la destruction ostéo-articulaire. La dégradation de la matrice extracellulaire, du cartilage et de l'os est sous la dépendance de différentes enzymes et nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux MMPs.

Nous avons utilisé une technique de cDNA array qui permet l'étude simultanée de nombreux gènes : des membranes de nylon comportant les ADN complémentaires (ADNc) correspondant à 588 gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, l'inflammation et la communication cellulaire et incluant les ADNc correspondant aux MMP-1 à -3 ainsi qu'aux MMP-7 à -18.

Le principe de ce cDNA array est celui d'une hybridation complémentaire d'acides nucléiques : les ADNc de gènes définis sont immobilisés sur un support solide (nylon) de manière ordonnée. Ils sont ensuite hybridés avec des ADNc marqués (radioactifs) correspondant à la population totale d'ARN d'un échantillon de FLSs. Il est ainsi possible de comparer les profils d'expression génique de deux populations de FLSs : des FLSs de référence (non stimulés) et des FLSs stimulés par la protéine I/II. Deux étapes limitantes de cette technique sont i) la quantité et la qualité des ARN et ii) l'hybridation des sondes radioactives. Afin d'obtenir des résultats fiables, il est indispensable de vérifier l'expression différentielle des gènes par d'autres techniques sur des ARN différents. Nous avons donc choisi de confirmer l'expression des ARNm par RT-PCR quantitative et l'expression des protéines par ELISA.

Les FLSs ont été stimulés par la protéine I/II pendant un temps assez court (4 h) afin de pouvoir analyser la réponse précoce des FLSs rhumatoïdes et des FLSs arthrosiques à ce PAMP. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une modulation autocrine de l'expression de certains gènes.

#### **1.3.1 Publication : Arthritis Research and Therapy (2004)**

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans Arthritis Research and Therapy (2004). Le manuscrit est présenté ci-dessous.

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Mirjam B. Zeisel, Vanessa A. Druet, Dominique Wachsmann and Jean Sibia**

**MMP-3 expression and release by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes induced with a bacterial ligand of integrin  $\alpha 5\beta 1$**

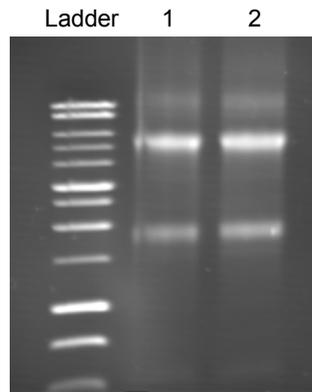
Arthritis Research & Therapy 2005, 7 :R118-R126

Le lien « open access » vers l'article est le suivant :

<http://arthritis-research.com/content/7/1/R118>

### 1.3.2 Résultats complémentaires

Dans un premier temps, nous avons vérifié la qualité des ARN extraits des FLSs stimulés ou non par la protéine I/II (125 pM) pendant 4 h par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (1 µg d'ARN total, 100 V, 30 min).



**Figure 19 : Profil électrophorétique de l'ARN total extrait de FLSs rhumatoïdes stimulés ou non par la protéine I/II pendant 4 h**

1 : RPMI (4 h), 2 : protéine I/II (4 h)

Ces résultats sont représentatifs des résultats obtenus avec les ARN isolés de FLSs rhumatoïdes (n=3) et de FLSs de patients atteints d'arthrose (n=3)

Les résultats présentés figure 19 montrent des ARN de bonne qualité (bande 28S environ 2x plus intense que la bande 18S) qui ont ensuite été utilisés pour les expériences de cDNA array. Bien que des variations de 1,6x dans l'expression génique soient prises en compte par le logiciel d'analyse de cDNA array (AtlasImage), nous avons choisi de ne considérer que les gènes dont l'expression était modulée au moins 3x afin de détecter les gènes fortement modulés par la protéine I/II.

### 1.3.3 Discussion

L'analyse de la réponse des FLSs rhumatoïdes à la protéine I/II réalisée par cDNA array montre que la protéine I/II module fortement ( $\geq 3x$ ) l'expression d'environ 6% des gènes dans les FLSs isolés des trois patients atteints de PR (l'expression de 29 gènes est augmentée et l'expression de 5 gènes est diminuée). L'expression de 6 gènes est modulée de façon constante dans les FLSs des trois patients atteints de PR étudiés : outre ceux codant les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et LIF, nous avons observé une augmentation de la transcription des gènes

codant le facteur de transcription IRF-1, le facteur de croissance des fibroblastes FGF-5 et la MMP-3.

Les ADNc de IL-1 à l'IL-17 (hormis les ADNc correspondant à l'IL-8 et à l'IL-16) et de membres de la famille du TNF- $\alpha$  et des IFNs étaient représentés sur la membrane. Les FLSs rhumatoïdes sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires en réponse à divers stimuli, mais la protéine I/II ne module l'expression que d'un nombre très restreint de cytokines pro-inflammatoires : l'IL-6 et le LIF. Ces résultats confirment les résultats antérieurs obtenus au laboratoire, montrant l'absence de libération d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  par les FLSs rhumatoïdes en réponse à la stimulation par la protéine I/II (Gourieux et coll., 2001).

La protéine I/II induit également l'expression du gène codant la MMP-3, alors que l'expression des gènes codant d'autres MMPs n'est pas modulée. Comme pour les cytokines pro-inflammatoires, le profil d'expression des gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation du cartilage est très restreint dans les FLSs rhumatoïdes stimulés par la protéine I/II. On peut cependant préciser que la MMP-3 joue un rôle majeur dans la destruction du cartilage au cours de la PR et qu'elle est associée au pouvoir invasif de cellules tumorales (Mercapide et coll., 2003). Il est intéressant de noter que la protéine I/II n'induit pas l'expression de TIMPs, suggérant que cette moduline puisse contribuer au déséquilibre MMPs/TIMPs au cours de la PR.

Kyburz et coll. ont montré que le PG, un ligand de TLR-2, est également capable d'induire l'expression des gènes codant l'IL-6, l'IL-8 et la MMP-3 par les FLSs (Kyburz et coll., 2003). Cependant, le PG augmente également l'expression de gènes codant d'autres MMPs, telles la MMP-1, la MMP-9 et la MMP-13 (Kyburz et coll., 2003). De plus, la stimulation des FLSs par ce PAMP conduit à l'expression d'ARNm d'un large éventail de chémokines, dont RANTES et MCP-1 (Pierer et coll., 2004), qui n'ont pas été inclus sur les cDNA arrays que nous avons utilisés dans cette étude.

La protéine I/II augmente l'expression des gènes codant IRF-1, le FGF-5 et la vimentine, qui peuvent jouer un rôle dans la prolifération cellulaire. Le facteur de transcription IRF-1 conduit à l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans l'inflammation, telles la COX-2 et la caspase-1, mais également de protéines intervenant dans l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Kroger et coll., 2002). A l'inverse, le FGF-5 et la vimentine ont été associés à une augmentation de la prolifération, de la mobilité et de l'invasion cellulaire (Sommers et coll., 1994; Clase et coll., 2000). En modulant l'expression de ces gènes, la protéine I/II pourrait donc contribuer à la régulation de l'apoptose et/ou de la prolifération des FLSs rhumatoïdes.

Nous avons constaté d'autre part, la diminution de l'expression d'un seul gène, l'IGFBP4, protéine régulatrice de l'IGF qui contribue au maintien de l'équilibre entre la synthèse et la

dégradation des constituants de la matrice extracellulaire. Le rôle que pourrait jouer l'IGFBP4 dans la pathogénie de la PR n'est pas encore connu. Une forte expression d'un autre membre de la famille des IGFBPs, IGFBP5, a été décrite dans les FLSs rhumatoïdes (Seki et coll., 1998), mais la protéine I/II ne module pas son expression.

Les résultats obtenus avec les FLSs de patients atteints d'arthrose sont très différents des résultats obtenus avec les FLSs rhumatoïdes : la protéine I/II ne module qu'un seul gène chez les trois patients étudiés, le gène codant l'IL-6, dont l'expression est augmentée. Ces résultats confirment nos résultats précédents montrant une augmentation de la synthèse et de la libération d'IL-6 par ces cellules. Cependant, les profils d'expression des trois patients atteints d'arthrose ne sont pas homogènes : la réponse des FLSs du patient OA3 à la stimulation par la protéine I/II se distingue de celles des patients OA1 et OA2. L'analyse du dossier clinique de ce patient a révélé que cette personne souffrait également d'une PR qui était en phase de rémission.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Kyburz et coll. qui n'ont pas observé de différences dans l'expression de la MMP-3 entre les FLSs rhumatoïdes et les FLSs de patients atteints d'arthrose stimulés par le PG (Kyburz et coll., 2003).

L'ensemble des résultats de cette étude suggère que la protéine I/II pourrait participer au développement et à la pérennisation du comportement agressif des FLSs de patients atteints de PR en modulant un certain nombre de gènes pouvant contribuer à la prolifération cellulaire et à la dégradation de la matrice extracellulaire, notamment par l'augmentation de l'expression et de la libération de MMP-3.

## **2 Voies de signalisation activées par la protéine I/II**

### **2.1 Voies de signalisation des MAPKs/AP-1 et de NF- $\kappa$ B**

Après avoir démontré que les FLSs stimulés par la protéine I/II développent une réaction inflammatoire et destructrice, nous avons souhaité étudier les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la réponse des FLSs. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que la libération d'IL-8 par les cellules endothéliales activées par la protéine I/II impliquait l'activation de ERK1/2 (Al-Okla et coll., 1999). Les cascades de phosphorylation faisant intervenir les MAPKs constituent un lien important entre les événements membranaires et le noyau. Elles régulent l'activité de différents facteurs de transcription, qui modulent l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Nous avons donc étudié le rôle que pourraient jouer les trois familles de MAPKs, ERK1/2, JNKs et p38, dans la libération de cytokines pro-inflammatoires par les FLSs stimulés avec la protéine I/II.

Les promoteurs des gènes de l'IL-6 et de l'IL-8 possèdent en commun des sites de liaison pour NF- $\kappa$ B et AP-1, deux facteurs de transcription particulièrement activés dans les FLSs rhumatoïdes. Comme les MAPKs régulent l'activité d'AP-1 (Karin, 1996) et que la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs stimulés par l'IL-1 $\beta$  (Georganas et coll., 2000) fait intervenir NF- $\kappa$ B, nous avons également étudié l'implication de ces deux facteurs de transcription dans la libération de cytokines pro-inflammatoires induite par la protéine I/II.

#### **2.1.1 Publication : Cellular Microbiology (2001)**

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans Cellular Microbiology (2001) présentée ci-dessous.

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

Laurence A. Neff, **Mirjam B. Zeisel**, Jean Sabilia, Marie Schöller-Guinard, Jean-Paul Klein and Dominique Wachsmann

**NF- $\kappa$ B and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci.**

Cellular Microbiology 3, 703-712 (2001)

Pages 703-712 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1462-5822.2001.00148.x/full/>

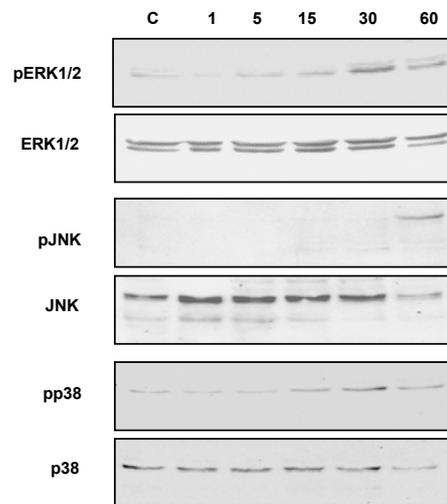
Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## 2.1.2 Résultats complémentaires

### 2.1.2.1 Phosphorylation des MAPKs dans les FLSs arthrosiques

Nous avons également étudié l'implication de la voie des MAPKs dans la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs de patients atteints d'arthrose stimulés par la protéine I/II.

Dans un premier temps, nous avons étudié la cinétique de phosphorylation de ERK1/2, JNKs et p38 dans les FLSs de patients atteints d'arthrose stimulés par la protéine I/II. Les FLSs ont été activés par la protéine I/II (125 pM) pendant 15 et 30 min. Un contrôle a été effectué en incubant les cellules pendant 30 min sans protéine I/II (figure 20).



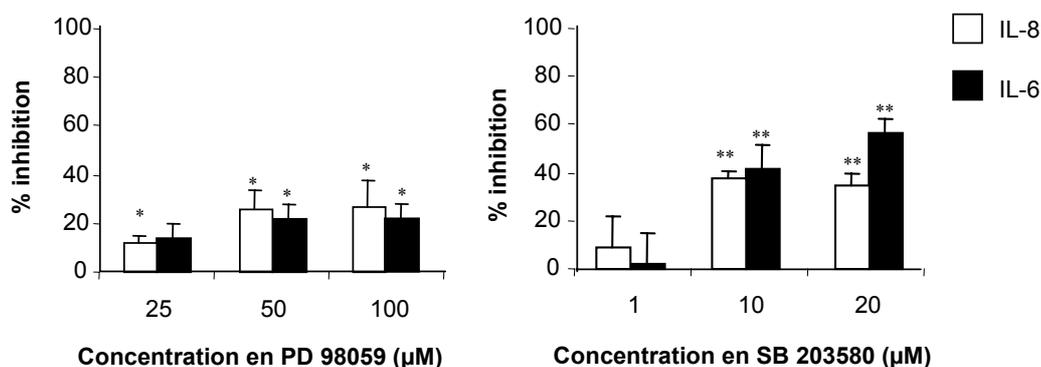
**Figure 20 : Cinétique de phosphorylation de ERK1/2, JNKs et p38 dans les FLSs de patients atteints d'arthrose stimulés par la protéine I/II pendant 1 à 60 min**  
Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus avec les FLSs isolés de trois patients différents.

Les résultats montrent que ces trois familles de MAPKs sont phosphorylées dans les FLSs de patients atteints d'arthrose stimulés par la protéine I/II avec cependant des cinétiques différentes des FLSs rhumatoïdes : la phosphorylation de ERK1/2 et de p38 débute après 30 min de stimulation (FLSs rhumatoïdes : 15 min) et se prolonge jusqu'à 60 min. La protéine I/II induit également la phosphorylation des JNKs après 60 min de stimulation (FLSs rhumatoïdes : 30 min).

*La protéine I/II induit la phosphorylation de ERK1/2, JNKs et p38 dans les FLSs de patients atteints d'arthrose.*

### 2.1.2.2 Implication des MAPKs dans la libération de cytokines par les FLSs arthrosiques

Nous avons ensuite étudié l'implication de ces trois familles de MAPKs dans la synthèse et la libération d'IL-6 et d'IL-8 induite par la protéine I/II dans les FLSs de patients atteints d'arthrose. Les FLSs ont été prétraités par deux inhibiteurs avant d'être activés par la protéine I/II pendant 6 h : le PD98059, inhibiteur spécifique de MEK1 et MEK2 qui bloque la voie de signalisation de ERK1/2 et le SB203580, un inhibiteur sélectif de p38 à faible concentration (1  $\mu$ M), mais qui inhibe également les JNKs à plus forte concentration (10 à 20  $\mu$ M) (Clerk et Sugden, 1998). Un contrôle avec les inhibiteurs, sans activation par la protéine I/II, est effectué afin de vérifier que les inhibiteurs seuls n'ont aucun effet sur la libération de cytokines. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué afin de vérifier que les inhibiteurs n'affectent pas la viabilité cellulaire.



**Figure 21 : Inhibition par le PD98059 et le SB203580 de la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs de patients atteints d'arthrose**

Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

Les résultats présentés figure 21 montrent que le PD98059 induit une inhibition de la libération d'IL-6 et d'IL-8 de 20%, pour une concentration de 100  $\mu$ M de PD98059. A la concentration de 1  $\mu$ M, le SB203580 n'exerce aucun effet sur la libération d'IL-6 et d'IL-8, alors qu'à la concentration de 20  $\mu$ M nous observons une inhibition d'environ 35% et 60% de la libération d'IL-6 et d'IL-8, respectivement.

*Ces résultats indiquent que ERK1/2 et les JNKs jouent un rôle dans la libération de cytokines par les FLSs de patients atteints d'arthrose stimulés par la protéine I/II.*

### 2.1.3 Discussion

L'ensemble de ces résultats indique que, même si les trois familles de MAPKs sont phosphorylées en réponse à la stimulation par la protéine I/II, seules ERK1/2 et JNKs interviennent dans la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs de patients atteints d'arthrose. Hormis une inhibition de la libération de cytokines plus faible en présence de PD98059 (20% contre 35 à 40%), nous avons obtenu des résultats comparables à ceux observés avec les FLSs rhumatoïdes : p38 qui est phosphorylée dans les FLSs de patients atteints d'arthrose, ne joue aucun rôle dans la libération d'IL-6 et d'IL-8.

Nos résultats diffèrent des résultats obtenus par d'autres auteurs, qui ont suggéré que p38 serait la MAPKs la plus particulièrement impliquée dans la réponse inflammatoire. En effet, Miyazawa et coll. ont démontré que p38 joue un rôle essentiel dans la synthèse d'IL-6 par les FLSs (Miyazawa et coll., 1998). De façon identique, la libération d'IL-8 par les PNNs stimulés par des streptocoques du groupe B de type III, est supprimée en présence de SB203580, mais faiblement inhibée par le PD98059 (Albanyan et coll., 2000). Cependant, Han et coll. ont également suggéré que les JNKs et dans une moindre mesure ERK1/2 jouent un rôle majeur dans les voies de signalisation activées par l'IL-1 dans les FLSs rhumatoïdes et conduisant à la synthèse de MMP-1 (Han et coll., 1999). Cependant, ces auteurs ont observé des différences dans les voies de signalisation activées par l'IL-1 dans les FLSs rhumatoïdes et les FLSs de patients atteints d'arthrose : les JNKs sont phosphorylées en réponse à l'IL-1 uniquement dans les FLSs rhumatoïdes (Han et coll., 1999).

Nous avons ensuite étudié les mécanismes par lesquels l'expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 est augmentée dans les FLSs rhumatoïdes stimulés par la protéine I/II. Il a été montré que les MAPKs sont capables de stabiliser certains ARNm (Tebo et coll., 2003). Nous ne pouvons pas exclure la contribution des MAPKs à l'augmentation des ARNm de cytokines pro-inflammatoires par un tel mécanisme.

ERK1/2 et JNKs activent AP-1, hétérodimère c-Jun/c-Fos. En effet, ERK1/2 phosphoryle le facteur de transcription Elk-1 qui régule l'expression du gène codant c-Fos et c-Jun est un substrat des JNKs. Nous avons étudié l'activité de liaison d'AP-1 dans les FLSs stimulés par la protéine I/II et montré que ce PAMP augmente l'activité de liaison de ce facteur de transcription. Nous avons également montré que la protéine I/II induit la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B dans les FLSs rhumatoïdes. Ces résultats suggèrent que ces deux facteurs de transcription interviennent dans l'expression des gènes codant l'IL-6 et l'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes activés par la protéine I/II.

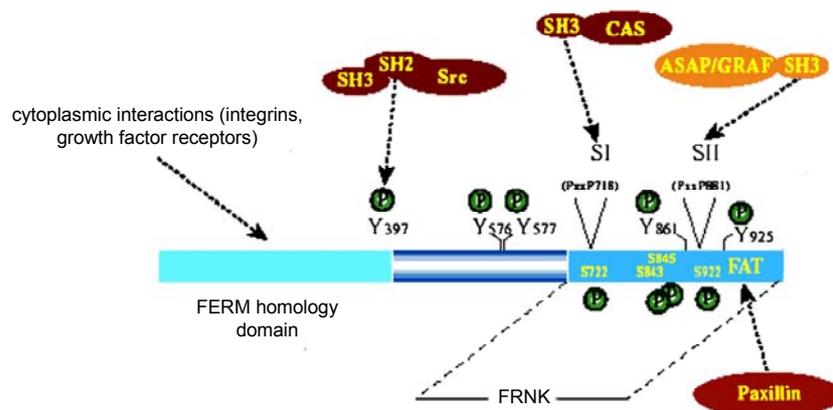
Pour déterminer si NF- $\kappa$ B joue un rôle dans cette libération de cytokines pro-inflammatoires par les FLSs rhumatoïdes stimulés par la protéine I/II, nous avons utilisé trois inhibiteurs de ce facteur de transcription : le curcumin et la sulfasalazine, qui sont des inhibiteurs non spécifiques de NF- $\kappa$ B car ils inhibent également les JNKs, ainsi que le peptide L-6-L qui est plus sélectif de NF- $\kappa$ B. Ce peptide comprend le domaine de liaison au peptide NEMO du complexe IKK qui phosphoryle I $\kappa$ B, ce qui conduit à la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau. Nos résultats indiquent que NF- $\kappa$ B est impliqué dans la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes stimulés par la protéine I/II. Ces résultats sont en accord avec ceux de Georganas et coll. qui ont montré que la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes stimulés par l'IL-1 dépend de NF- $\kappa$ B (Georganas et coll., 2000). Cependant, d'après ces auteurs, AP-1 ne jouerait aucun rôle dans ce processus (Georganas et coll., 2000). A l'inverse, dans d'autres cellules, AP-1 et NF- $\kappa$ B sont nécessaires à la synthèse d'IL-8 en réponse à des stimuli viraux : le virus HTLV-1 active la transcription du gène codant l'IL-8 via AP-1 et NF- $\kappa$ B dans les cellules JPX-9 et Murayama et coll. ont montré que ces deux facteurs de transcription sont également nécessaires à la synthèse d'IL-8 par les cellules THP-1 stimulés par le CMV (Murayama et coll., 1997; Mori et coll., 1998). En l'absence d'expérience d'inhibition sélective, nous ne pouvons conclure à ce jour quant au rôle d'AP-1 dans la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes stimulés par la protéine I/II.

L'ensemble des résultats de cette étude montre que la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs en réponse à la stimulation par la protéine I/II est dépendante des MAPKs ERK1/2 et JNKs ainsi que de NF- $\kappa$ B. Le rôle exact joué par ces MAPKs est encore inconnu : stabilisation des ARNm des cytokines et/ou activation d'AP-1 ? D'autre part, les éventuelles relations entre la voies des MAPKs/AP-1 et la voie de NF- $\kappa$ B restent à préciser : activation de NF- $\kappa$ B indépendante de l'activation des MAPKs et/ou contribution des MAPKKs MEKK1, 2 et 3 à la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau via l'activation des IKKs (Lee et coll., 1998; Zhao et Lee, 1999) ?

## 2.2 Voies de signalisation reliant les évènements précoces membranaires à l'activation des MAPKs

Nous avons ensuite étudié les mécanismes qui relient les évènements précoces membranaires à l'activation des MAPKs. Des études antérieures réalisées au laboratoire sur des cellules endothéliales ont montré que la libération d'IL-8 induite par la protéine I/II implique la liaison de ce PAMP à l'intégrine  $\alpha5\beta1$  et l'activation de protéines tyrosine kinases (PTKs). Les mécanismes par lesquels les intégrines conduisent à l'activation des MAPKs sont complexes et ne sont pas encore tout à fait définis. Deux voies majeures permettant l'activation de ERK1/2 et des JNKs ont été proposées : l'une fait intervenir la FAK et l'autre la protéine adaptatrice Shc (Barberis, 2000).

La **FAK** est une PTK cytoplasmique localisée dans les régions de la cellule attachées à la matrice extracellulaire, appelées contacts focaux. Elle est composée de trois domaines majeurs : le domaine N-terminal, le domaine central catalytique et le domaine C-terminal (figure 22).



**Figure 22 : Organisation des domaines de la FAK** d'après (Parsons, 2003)

Le domaine N-terminal comporte des homologies avec des membres de la famille de protéines FERM. Le domaine central constitue le domaine catalytique. Le domaine C-terminal comporte des sites de liaison (SI et SII) pour de nombreuses protéines. La tyrosine 397 est le site d'autophosphorylation et d'interaction avec Src. La région FAT est responsable de la localisation de la FAK au niveau des contacts focaux et permet l'interaction avec la paxilline. La région C-terminale (FRNK) peut être exprimée de manière autonome par les cellules et fonctionne comme un dominant négatif de la FAK.

Le domaine C-terminal comprend la séquence « focal adhesion targeting » (FAT) constituée par les 140 aa C-terminaux de la protéine et la région localisée entre cette séquence et le domaine catalytique. La séquence FAT est responsable de la localisation de la FAK au niveau des contacts focaux et permet l'interaction avec la paxilline. La région située entre la séquence FAT et le domaine catalytique contient des sites de fixation pour des protéines à domaines SH3 et permet ainsi le recrutement de différentes protéines, telles Cas, ASAP et GRAF. Le domaine C-terminal de la FAK peut être exprimé de manière indépendante par les cellules : il est appelé

« FAK-related non kinase » (FRNK) et fonctionne comme un régulateur de l'activité de la FAK (Richardson et Parsons, 1996). Dans la plupart des cellules, la surexpression de FRNK inhibe la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la transmission des signaux à partir de récepteurs de facteurs de croissance aux MAPKs (Hauck et coll., 2001; Taylor et coll., 2001). Ce domaine peut donc fonctionner comme un dominant négatif. Sa surexpression entraîne l'inhibition de la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 et des substrats du complexe FAK/Src.

Le domaine N-terminal comporte des homologies avec les domaines « erythrocyte band four.1-ezrin-radixin-moesin » (FERM), domaines très conservés. Ces domaines sont retrouvés dans des protéines, telles la taline et les JAKs. Le domaine FERM de la FAK intervient dans la liaison de la FAK aux sous-unité  $\beta 1$  des intégrines et à la partie intracellulaire des récepteurs de facteurs de croissance (Sieg et coll., 2000). Si ce domaine est capable d'interagir avec le domaine catalytique de la FAK pour exercer un rôle inhibiteur de l'activation de la FAK (Cooper et coll., 2003), Dunty et coll. ont démontré récemment qu'il intervient également dans l'activation de la FAK après adhésion cellulaire (Dunty et coll., 2004).

La FAK est exprimée de manière assez ubiquiste alors que l'expression de la « proline-rich tyrosine kinase 2 » (Pyk2), protéine appartenant à la même famille de PTKs que la FAK, est plus restreinte (cerveau, foie, rein, rate, poumon et cellules d'origine hématopoïétique). La FAK joue un rôle clé dans les voies de signalisation des intégrines. Elle est située à l'intersection de nombreuses voies de signalisation : elle peut être activée par les intégrines, mais également par des récepteurs couplés aux protéines G et des récepteurs de facteurs de croissance. La FAK est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques : elle intervient dans la migration, la prolifération et la survie cellulaire et peut jouer un rôle dans le développement de cancers et de métastases.

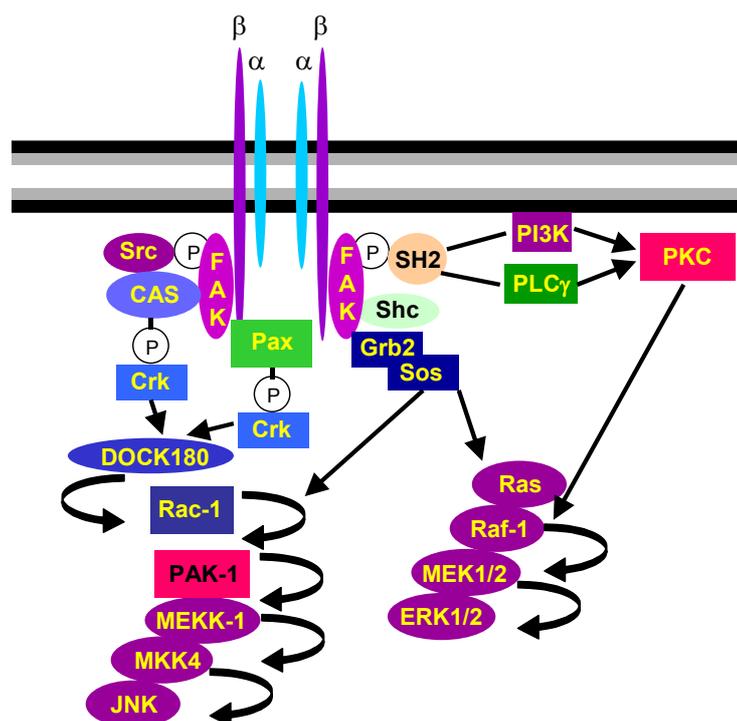
Différents sites de phosphorylation sur des résidus tyrosine : Tyr-397, Tyr-925 et Tyr-861 interviennent dans la régulation de l'activité de la FAK. L'agrégation des intégrines résulte en la liaison du domaine N-terminal de la FAK à la partie intracytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des intégrines puis en la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 qui est le site d'autophosphorylation de la FAK. La phosphorylation du résidu Tyr-397 est indispensable à l'activité kinase de la FAK, mais pas suffisante : la FAK existe sous forme phosphorylée dans des fibroblastes adhérents sevrés en sérum mais ne présente qu'une activité kinase faible (Schlaepfer et coll., 1998). Elle permet le recrutement de :

- Src qui contribue à la phosphorylation de la FAK sur d'autres résidus, tel le résidu Tyr-925 (Owen et coll., 1999),
- la PI3 kinase,
- la phospholipase C  $\gamma$  (PLC  $\gamma$ ).

La phosphorylation de la FAK sur ses résidus Tyr-397 et Tyr-925 crée un site de fixation du complexe Grb2-Sos. La FAK est ensuite phosphorylée sur son résidu Tyr-861 qui contribue à renforcer la phosphorylation sur son résidu Tyr-397 (Leu et Maa, 2002).

De nombreuses voies de signalisation ont été proposées pour relier la FAK à l'activation de ERK1/2 et des JNKs par l'intermédiaire de la voie Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2, PAK1/MEKK-1/MKK4/JNK et Rap1/b-Raf/MEK1/2/ERK1/2 (figure 23). L'activation de la FAK peut conduire au recrutement de :

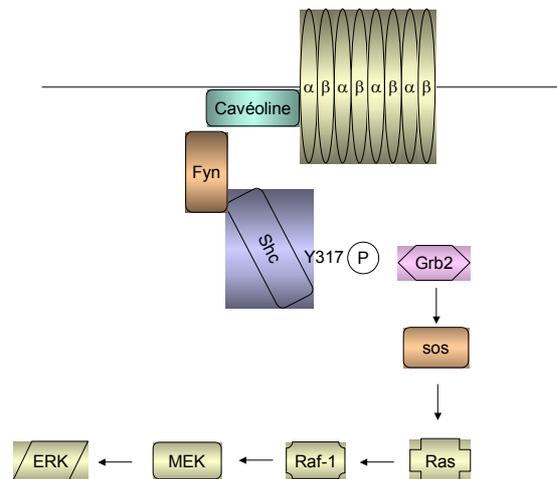
- Grb2-Sos directement via le résidu Tyr-925 ou par l'intermédiaire de Shc. Ce complexe permet l'activation de Ras.
- Crk via p130<sup>CAS</sup> ou la paxilline. Crk active les voies de Rap1, Ras, Rac1 et PAK1 par l'intermédiaire de protéines échangeuses de GTP (C3G, Sos, DOCK180).
- La protéine kinase C (PKC) par l'intermédiaire de la PI3 kinase ou la PLC $\gamma$  (Cheng et coll., 2001).



**Figure 23 : Voies de signalisation reliant la FAK aux MAPKs** d'après (Parsons, 2003)

La protéine adaptatrice **Shc** permet également de relier les intégrines aux MAPKs. La famille de Shc est composée de trois isoformes (p46, p52 et p66) qui possèdent un domaine PTB (N-terminal) et un domaine SH2 (C-terminal). Le domaine PTB permet la localisation de Shc au niveau membranaire. Le domaine SH2 peut se lier au résidu Tyr-397 phosphorylé de la FAK et conduire à la cascade d'activation des MAPKs. La voie de Shc peut également être activée par

certaines intégrines ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ) indépendamment de la FAK : par exemple, dans les fibroblastes primaires, la cavéoline-1 sert d'adaptateur membranaire qui lie la sous-unité  $\alpha$  des intégrines à Fyn, PTK de la famille de Src. Fyn activée interagit avec le domaine riche en proline de Shc par l'intermédiaire de son domaine SH3. Shc est alors phosphorylée sur son résidu Tyr-317, ce qui permet la liaison du complexe Grb2-Sos-Ras et l'activation des MAPKs. Yes, Lck ou Lyn peuvent jouer ce rôle dans les cellules n'exprimant pas Fyn (Wary et coll., 1998).



**Figure 24 : Activation des MAPKs par Shc indépendamment de la FAK**

Il a été montré que les intégrines sont capables de fonctionner comme PRRs. Cependant il existe peu de données concernant les voies de signalisation activées par la liaison des pathogènes aux intégrines et conduisant à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, si le rôle de la FAK dans les voies de signalisation menant à la survie cellulaire/l'apoptose et la migration cellulaire en réponse aux interactions des cellules avec les protéines de la matrice extracellulaire et les facteurs de croissance a fait l'objet de différentes études, l'intervention potentielle de la FAK dans la réponse inflammatoire induite par les interactions PAMPs-PRRs n'a pas encore été étudiée.

Le but de notre étude était donc de déterminer si la FAK et/ou Shc jouent un rôle dans les voies de signalisation activées par la protéine I/II et conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

### 2.2.1 Publication : Journal of Biological Chemistry (2003)

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Biological Chemistry (2003) présentée ci-dessous.

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

Laurence A. Neff, **Mirjam B. Zeisel**, Vanessa Druet, Ken Takeda, Jean-Paul Klein, Jean Sibilila and Dominique Wachsmann

**ERK  $\frac{1}{2}$ -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.**

The Journal of Biological Chemistry 278, 27721-27728 (2003)

Pages 27721-27728 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

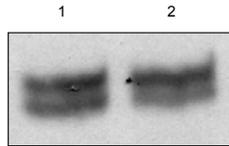
<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/278/30/27721>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## 2.2.2 Résultats complémentaires

### 2.2.2.1 Expression de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines par les FLSs

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression des intégrines à chaîne  $\beta 1$  à la surface des FLSs par Western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la sous-unité  $\beta 1$ .



**Figure 25 : Expression de la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines à la surface des FLSs**

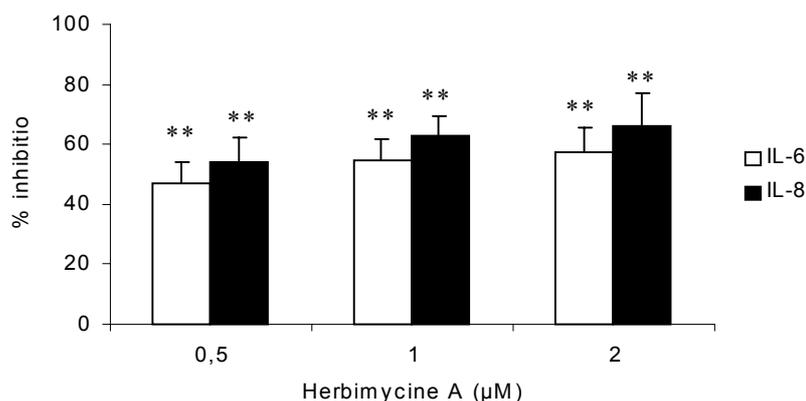
1 : FLSs rhumatoïdes, 2 : FLSs arthrosiques

Les résultats présentés figure 25 montrent que les FLSs isolés à partir de membranes synoviales de patients atteints de PR et d'arthrose expriment les intégrines à chaîne  $\beta 1$ .

### 2.2.2.2 Implication des PTKs de la famille de Src

Les intégrines font appel à d'autres protéines telles les PTKs ou les protéines G pour transmettre le signal induit par la liaison du ligand. Nous avons dans ce but recherché une implication éventuelle des PTKs dans les voies de signalisation activées par la protéine I/II dans les FLSs rhumatoïdes, en étudiant l'effet de l'herbimycine A sur la libération d'IL-6 et d'IL-8. L'herbimycine A est un inhibiteur plus sélectif des PTKs de la famille Src (Src, Fyn Lck) avec une  $CI_{50}$  de 0,9  $\mu M$ . Les FLSs rhumatoïdes ont été prétraités par l'herbimycine A (0,5, 1 et 2  $\mu M$ ) pendant 2 h puis activés pendant 20 h avec la protéine I/II (125 pM). Un contrôle avec l'herbimycine A, sans activation par la protéine I/II, est effectué afin de vérifier que cet inhibiteur seul n'a aucun effet sur la libération de cytokines. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué afin de vérifier que l'herbimycine A n'affecte pas la viabilité cellulaire.

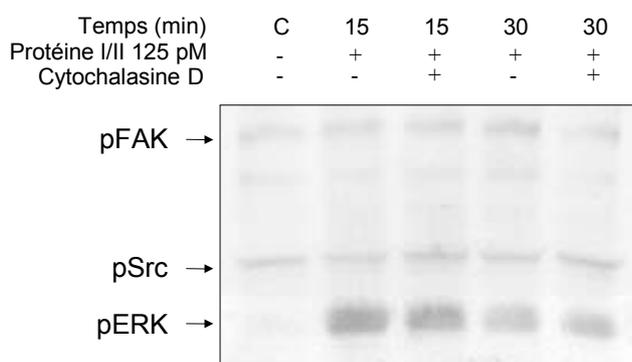
Les résultats montrent que l'herbimycine A induit une inhibition de la libération d'IL-6 et d'IL-8 de l'ordre de 60% (figure 26), indiquant que des PTKs de la famille de Src interviennent dans les voies de signalisation induites par la protéine I/II et conduisant à la libération d'IL-6 et d'IL-8. Il est intéressant de noter que le curcumin, que nous avons utilisé en tant qu'inhibiteur non spécifique de NF- $\kappa B$  et qui a réduit de 90% la libération d'IL-6 et d'IL-8 induite par la protéine I/II, est également capable d'inhiber directement l'activation de Src, de Shc et de la FAK (Leu et coll., 2003).



**Figure 26 : Inhibition par l'herbimycine A de la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes stimulés par la protéine I/II**

Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes. \* $p < 0,5$ , test *t*

La FAK est généralement associée à Src et c'est le complexe FAK/Src qui phosphoryle les effecteurs de la voie de signalisation menant aux MAPKs. Src est recrutée par le résidu Tyr-397 phosphorylé de la FAK puis phosphoryle le résidu Tyr-925 de la FAK. La phosphorylation de ce résidu permet le recrutement du complexe Grb2/Sos et l'activation des MAPKs. Nous avons étudié la phosphorylation de Src sur le résidu Tyr-418, forme activée de Src. En parallèle nous avons étudié la phosphorylation de la FAK sur le résidu Tyr-925 ainsi que l'effet de la cytochalasine D sur ces phosphorylations. Les FLSs rhumatoïdes ont été activés par la protéine I/II pendant 15 et 30 min. Un contrôle a été effectué en incubant les cellules pendant 15 min sans protéine I/II.



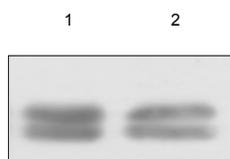
**Figure 27: Phosphorylation de la FAK sur le résidu Tyr-925, de Src et de ERK1/2**

Nous observons une phosphorylation de Src sur son résidu Tyr-418 et de la FAK sur son résidu Tyr-925 en l'absence de toute stimulation qui n'est pas augmentée après incubation des cellules avec la protéine I/II (figure 27). De plus, si Src et la FAK sont phosphorylées dans les cellules non activées, ERK1/2 ne l'est pas. Ceci confirme que, dans les conditions où ERK1/2 est bien phosphorylée, il n'y a aucune augmentation de la phosphorylation de Src et de la FAK sur son résidu Tyr-925, éliminant l'hypothèse d'une absence d'activation des cellules dans ces

expériences. D'autre part, nous n'observons aucun effet de la cytochalasine D sur la phosphorylation de la FAK sur le résidu Tyr-925. Ces résultats indiquent que l'activation des MAPKs induite par la protéine I/II ne fait pas intervenir Src ni le résidu Tyr-925 de la FAK.

### 2.2.2.3 Expression de la cavéoline-1 par les FLSs

Shc est une autre protéine qui permet de relier les intégrines aux MAPKs. Dans les fibroblastes primaires et les cellules endothéliales, la cavéoline-1 sert d'adaptateur membranaire : elle lie la sous-unité  $\alpha$  des intégrines à Fyn. Avant d'étudier l'implication éventuelle de Shc dans les voies de signalisation activées par la protéine I/II, nous avons vérifié par Western blot la présence de la cavéoline-1 dans les membranes plasmiques des FLSs rhumatoïdes et arthrosiques.



**Figure 28: Expression de la cavéoline-1 par les FLSs**

1 : FLSs rhumatoïdes 2 : FLSs arthrosiques

Les résultats présentés figure 28 montrent que les FLSs expriment la cavéoline 1.

### 2.2.3 Discussion

Nous avons tout d'abord montré que la libération d'IL-6 et d'IL-8 est dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les FLSs stimulés par la protéine I/II. Nous avons ensuite étudié le rôle que pourrait jouer la FAK dans les voies de signalisation conduisant à l'activation de ERK1/2 et des JNKs et à la synthèse d'IL-6 et d'IL-8. La stimulation des FLSs par la protéine I/II induit la phosphorylation du résidu Tyr-397, le site d'autophosphorylation de la FAK. En outre, l'utilisation de fibroblastes de souris k.o. pour le gène *fak* (fibroblastes FAK<sup>-/-</sup>) ainsi que la transfection de fibroblastes de souris (fibroblastes FAK<sup>+/+</sup>) et de FLSs rhumatoïdes avec un plasmide codant FRNK (dominant négatif de la FAK), nous a permis de montrer que la FAK est indispensable à la phosphorylation de ERK1/2 ainsi qu'à la synthèse et libération d'IL-6 et d'IL-8. Il est intéressant de noter que Pyk2, exprimé par les fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> n'est pas capable de pallier l'absence de la FAK, comme cela avait été suggéré par Sieg et coll. (Sieg et coll., 1998).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Gemba et coll. qui ont montré que la FAK joue un rôle important dans la voie de signalisation des MAPKs conduisant à la synthèse de NO par les chondrocytes stimulés par un fragment de fibronectine (Gemba et coll., 2002). De même, la FAK et ERK1/2 interviennent dans la synthèse de MMP-9 après activation des intégrines à la surface des cellules de carcinome ovarien (Hauck et coll., 2001). A l'inverse, Barberis et coll. ont montré que ERK1/2 peut être activée dans des fibroblastes primaires en l'absence de la FAK (Barberis et coll., 2000). Cependant, il est peu probable que les mêmes voies soient impliquées dans toutes les cellules en réponse à des stimuli très divers ce qui expliquerait les résultats différents obtenus par ces auteurs. Barberis et coll. proposent que dans certaines cellules primaires, l'activation de ERK1/2 peut se faire par l'intermédiaire de Shc et indépendamment de la FAK (Barberis et coll., 2000). Ainsi, les fibroblastes  $Shc^{-/-}$  présentent une phosphorylation de ERK1/2 diminuée par rapport aux fibroblastes  $Shc^{+/+}$  après stimulation des intégrines par des protéines de la matrice extracellulaire (Lai et Pawson, 2000). L'étude de la phosphorylation de Shc dans les cellules stimulées par la protéine I/II a montré que celle-ci n'augmente pas la phosphorylation de Shc. Par ailleurs, les FLSs rhumatoïdes transfectés par un dominant négatif de Shc libèrent toujours de l'IL-6 et de l'IL-8 après activation par la protéine I/II. Ces résultats démontrent que la libération d'IL-6 et d'IL-8 induite par la protéine I/II est indépendante de Shc.

Nous avons ensuite voulu déterminer les mécanismes par lesquels la FAK intervient dans les voies de signalisation conduisant aux cytokines pro-inflammatoires. Nous avons utilisé la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, qui inhibe la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397. Nos résultats montrent que la cytochalasine D qui empêche la phosphorylation de la FAK sur le résidu Tyr-397 n'a pas d'effet sur la phosphorylation de ERK1/2 et des JNKs induite par la protéine I/II. De plus, les FLSs rhumatoïdes préincubés avec les concentrations en cytochalasine D qui empêchent la phosphorylation de la FAK, libèrent toujours de l'IL-6 et de l'IL-8 en réponse à la stimulation par la protéine I/II, suggérant que, dans les FLSs rhumatoïdes activés par la protéine I/II, la phosphorylation du résidu Tyr-397 de la FAK n'est pas indispensable à l'activation des MAPKs et à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Il est également intéressant de noter que la PI3 kinase, dont l'activation est dépendante de la phosphorylation du résidu Tyr-397 de la FAK, n'intervient pas dans les voies de signalisation activées par la protéine I/II conduisant à la libération d'IL-6 et d'IL-8.

Il a été démontré que la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 n'est pas forcément corrélée à son activité kinase. Par exemple, Tachibana et coll. ont montré que des mutants FAK-Y397F sont toujours capables d'activer les protéines Cas mais que le domaine kinase est indispensable à ce mécanisme (Tachibana et coll., 1997). Nos résultats sont en accord avec ceux de Tachibana et coll. puisque l'expression de FRNK, qui ne possède pas le domaine

kinase de la FAK, inhibe la libération de cytokines pro-inflammatoires par les FLSs alors que la cytochalasine D, qui empêche la phosphorylation de la FAK mais ne modifie pas son activité kinase, ne modifie pas la libération d'IL-6 et d'IL-8 induite par la protéine I/II.

Au cours de ce travail, nous avons montré i) que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est un récepteur de la protéine I/II à la surface des FLSs rhumatoïdes impliquée dans la transmission des signaux menant à la libération d'IL-6 et d'IL-8 et ii) que la FAK, mais pas la phosphorylation de son résidu Tyr-397, est indispensable à la transmission de ces signaux intracellulaires qui ne font pas intervenir Shc, Src et la PI3 kinase. Le rôle précis joué par la FAK dans les mécanismes de transduction de signaux intracellulaires conduisant à la libération de cytokines pro-inflammatoires reste à élucider.

Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été obtenus avec les FLSs de patients atteints d'arthrose, suggérant que ces voies de signalisation ne sont pas pathologie-dépendantes.

## 2.3 Voies de signalisation des TLRs

Les voies de signalisation activées par les TLRs sont actuellement très étudiées. Il existe une voie de signalisation commune aux récepteurs de l'IL-1, de l'IL-18 et aux différents TLRs ainsi que des voies spécifiques à certains membres de la famille des TLRs autorisant l'obtention de réponses cellulaires différentes. L'interaction TLR-ligand permet dans une première étape, le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 (interactions entre les domaines TIR) qui s'associe ensuite par son « death domain » aux protéines kinases IRAK-4 et IRAK-1. Pendant la formation de ce complexe, IRAK-4 est activée et phosphoryle IRAK-1 qui peut alors recruter la protéine adaptatrice TRAF-6. La formation de ce complexe induit un changement conformationnel entraînant le désengagement de ce complexe et son association ultérieure à un groupe de protéines composé d'une MAPKKK, TAK1 et de deux protéines adaptatrices : TAB1 et TAB2. Au cours de cette interaction TAB2 et TAK1 sont phosphorylées puis transloquées avec TAB1 et TRAF-6 dans le cytoplasme. TAK1 active ensuite i) les IKKs, ce qui conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B et ii) les MAPKs (JNKs et p38) (Akira, 2003) (figure 29). TLR-3 est le seul TLR connu qui n'active pas cette voie de signalisation.

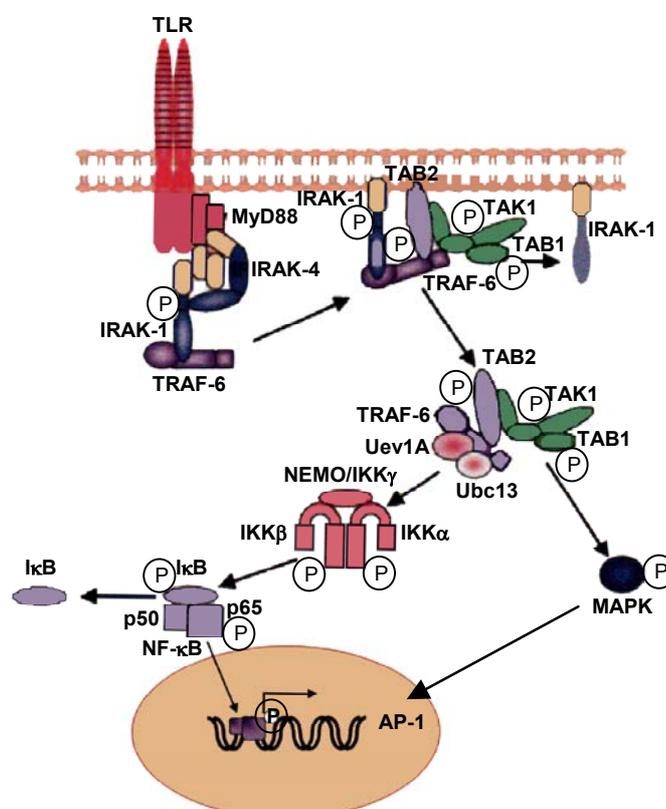
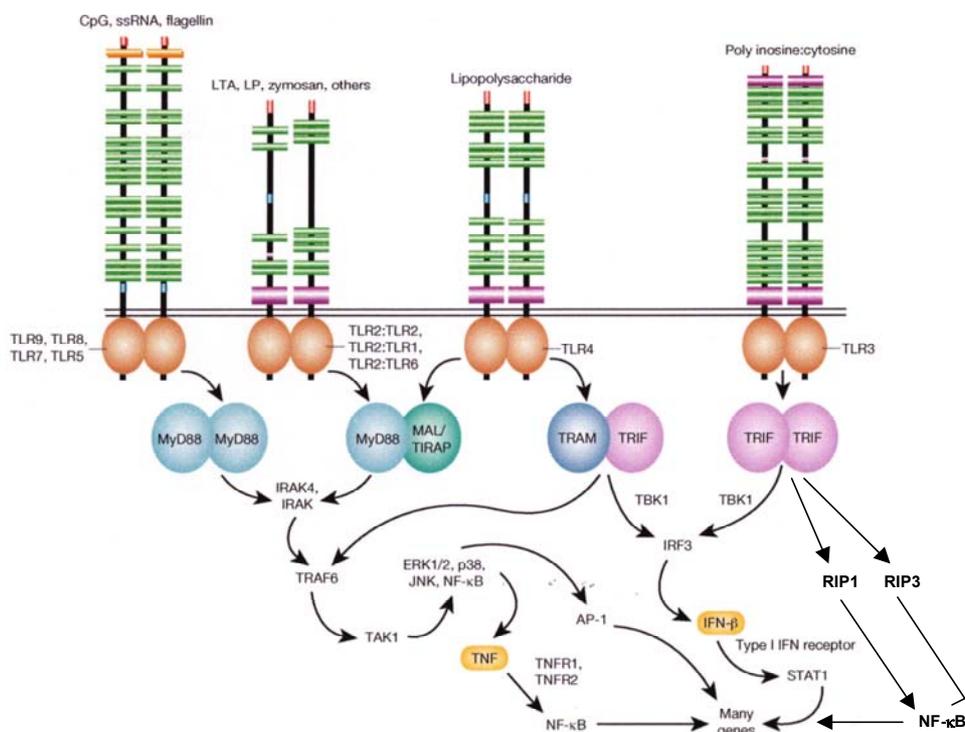


Figure 29 : Voie de signalisation commune aux récepteurs de l'IL-1/IL-18 et aux TLRs d'après (Akira, 2003)

L'activation de TLR-4 et de TLR-3 peut également conduire à l'induction du promoteur de l'IFN- $\beta$  par le facteur de transcription IRF-3, indépendamment de MyD88. Cette voie fait intervenir la molécule adaptatrice TRIF (ou TICAM), qui active IRF-3 et NF- $\kappa$ B (Yamamoto et coll., 2002; Oshiumi et coll., 2003; Yamamoto et coll., 2003). Meylan et coll. ont montré récemment que TRIF peut s'associer aux kinases RIP1 et RIP3 : RIP1 intervient dans l'activation de NF- $\kappa$ B tandis que RIP3 jouerait un rôle de régulateur en empêchant l'interaction de RIP1 et de NF- $\kappa$ B (Meylan et coll., 2004) (figure 30).

Il existe trois autres protéines adaptatrices des TLRs, MAL (ou TIRAP) qui intervient dans les voies de signalisation MyD88-dépendantes activées par TLR-2 et TLR-4 (Horng et coll., 2002; Yamamoto et coll., 2002), TRAM, qui comme TRIF conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B et d'IRF-3, ainsi que SARM, dont le rôle reste à définir.



**Figure 30 : Voies de signalisation des TLRs MyD88-dépendantes et MyD88-indépendantes** d'après (Barton et Medzhitov, 2004; Beutler, 2004)

La dimérisation des TLRs peut être suffisante pour activer ces voies de signalisation intracellulaires mais il a été également suggéré que leur activation optimale nécessite l'association des TLRs à d'autres protéines membranaires et la formation de complexes de signalisation dans des microdomaines de la membrane plasmique riches en sphingolipides et en cholestérol, appelés radeaux lipidiques (lipid rafts). Ainsi, si le CD14, MD-2 et TLR-4 sont indiscutablement impliqués dans l'activation de TLR-4 par le LPS, d'autres molécules pourraient également jouer un rôle : Triantafilou et coll. ont identifié un complexe protéique, composé de la

HSP70, la HSP90, le GDF-5, le CD11b/CD18 et du récepteur de chémokine CXCR4, qui pourrait contribuer à la signalisation induite par le LPS (Triantafilou et coll., 2001).

Des études récentes ont montré que la FAK pouvait être également associée à des voies de signalisation intracellulaire activées par des récepteurs autres que les intégrines ou les récepteurs de facteurs de croissance. Deux catégories de récepteurs ont été décrites : les TLRs et les récepteurs du TNF- $\alpha$ . En effet la FAK est activée par le LPS dans les macrophages (Monick et coll., 2002) et elle est indispensable à la libération d'IL-6 par fibroblastes stimulés par le TNF- $\alpha$  (Funakoshi-Tago et coll., 2003). Il a été également démontré que des ligands de TLR-2 et de TLR-4 induisent la phosphorylation de Pyk2 et de la paxilline (Hazeki et coll., 2003).

Au cours de cette étude nous avons essayé de répondre aux deux questions suivantes : l'activation cellulaire par la protéine I/II fait-elle intervenir d'autres récepteurs que l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (l'inhibition par les anticorps anti-sous-unité  $\beta 1$  de la libération de cytokines est d'environ 45%) qui pourrait être impliquée dans un complexe protéique membranaire en particulier avec les TLRs? Existe-t-il des interactions entre les messagers impliqués dans la voie TLR et ceux activés par la protéine I/II?

### 2.3.1 Matériel et méthodes complémentaires

Les expériences décrites ci-dessous ont été réalisées à l'Institut de Transgénèse du CNRS à Orléans.

#### 2.3.1.1 Culture des macrophages exprimant ou non TLR-2, TLR-4, TLR-6 et MyD88

Les souris utilisées sont déficientes pour une ou plusieurs des molécules suivantes: TLR-2, TLR-4, TLR-6 ou MyD88. Les différentes souris déficientes ont été obtenues par recombinaison homologue par l'équipe du Dr. C. Kirschning de l'Institut de Microbiologie Médicale de Munich pour les TLR-2 k. o. (Michelsen et coll., 2001) et par l'équipe du Dr. S. Akira de l'Institut de recherche sur les maladies microbiennes d'Osaka pour les TLR-4 (Hoshino et coll., 1999), TLR-6 (Takeuchi et Akira, 2001) et MyD88 k. o. (Kawai et coll., 1999). Les souris issues de la génération F1 (issues de croisement des souris portant une seule copie de la délétion) sont de fond génétique 129 et hétérozygotes pour la mutation. Elles ont été croisées entre elles pour obtenir des souris homozygotes pour la mutation, puis croisées plusieurs fois avec des souris C57BL/6 afin d'obtenir la mutation sur un fond génétique C57BL/6 maximum (BC6 # 99%). Les souris sont élevées à l'Institut de Transgénèse, en conditions «Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique» (EOPS).

Les fémurs des souris sont prélevés stérilement. Ils sont ensuite débarrassés de la moelle osseuse à l'aide d'une aiguille de 22G et de 1 mL de PBS. Les agrégats sont désagrégés par plusieurs passages dans l'aiguille. Les cellules sont ensuite comptées puisensemencées à  $10^6$  cellules/mL dans des boîtes de Pétri (Sterilin) favorables à la culture des macrophages avec du milieu DMEM (Sigma) complétement en L-glutamine 5 mM, Pénicilline/Streptomycine 100U/mL, HEPES 25 mM, 20% de sérum de cheval et 30% de surnageant de cellules L929 contenant le facteur de différenciation des macrophages (M-CSF) (Muller et coll., 1996). Au jour 7 de la culture, les cellules sont décollées à l'aide de PBS froid pendant 15 à 20 min à 4°C. Elles sont centrifugées à 200 g pendant 10 min puis réensemencées dans du milieu frais. Au jour 10, les cellules constituent une population homogène de macrophages (coloration Giemsa et expression de CD11b) et sont décollées comme au jour 7, comptées puis stimulées avec la protéine I/II en plaques 96 puits ( $10^5$  cellules/puits) dans du DMEM contenant de la L-glutamine 2 mM et du  $\beta$ -mercapto-éthanol  $2 \times 10^{-5}$  M. Des cellules non stimulées sont utilisées comme contrôle. Des cellules stimulées avec du LPS de *E. coli* sérotype O111:B4 (Sigma, St Louis, MO) ou un lipopeptide bactérien synthétique, le BLP ou Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> ([S-[2,3-bis-(palmitoyloxy)-

(2-*RS*)-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-Cys-(*S*)-Ser-Lys<sub>4</sub>-OH], trihydro-chloride, EMC Microcollections, Tübingen, Allemagne) ont été utilisés comme témoin positif d'activation. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué.

### 2.3.1.2 Dosage du TNF- $\alpha$

Les concentrations en TNF- $\alpha$  dans les surnageants de culture cellulaire ont été évaluées à l'aide d'un kit ELISA double sandwich commercial (R&D, Abingdon, Grande-Bretagne) selon les indications du fournisseur.

### 2.3.1.3 Dosage du NO

Les surnageants de culture cellulaire (50  $\mu$ L) sont incubés à température ambiante pendant 30 min en présence de 25  $\mu$ L de réactif de Griess 1 (sulfanilamide 1%, acide phosphorique 2,5%) et de 25  $\mu$ L de réactif de Griess 2 (N-naphtylendiamine dichlorique 0,1%, acide phosphorique 2,5%). L'absorbance est déterminée à 540 nm et la concentration en nitrites (signe d'une libération de NO) est évaluée par rapport à une gamme d'étalonnage de NaNO<sub>2</sub> (Green et coll., 1982).

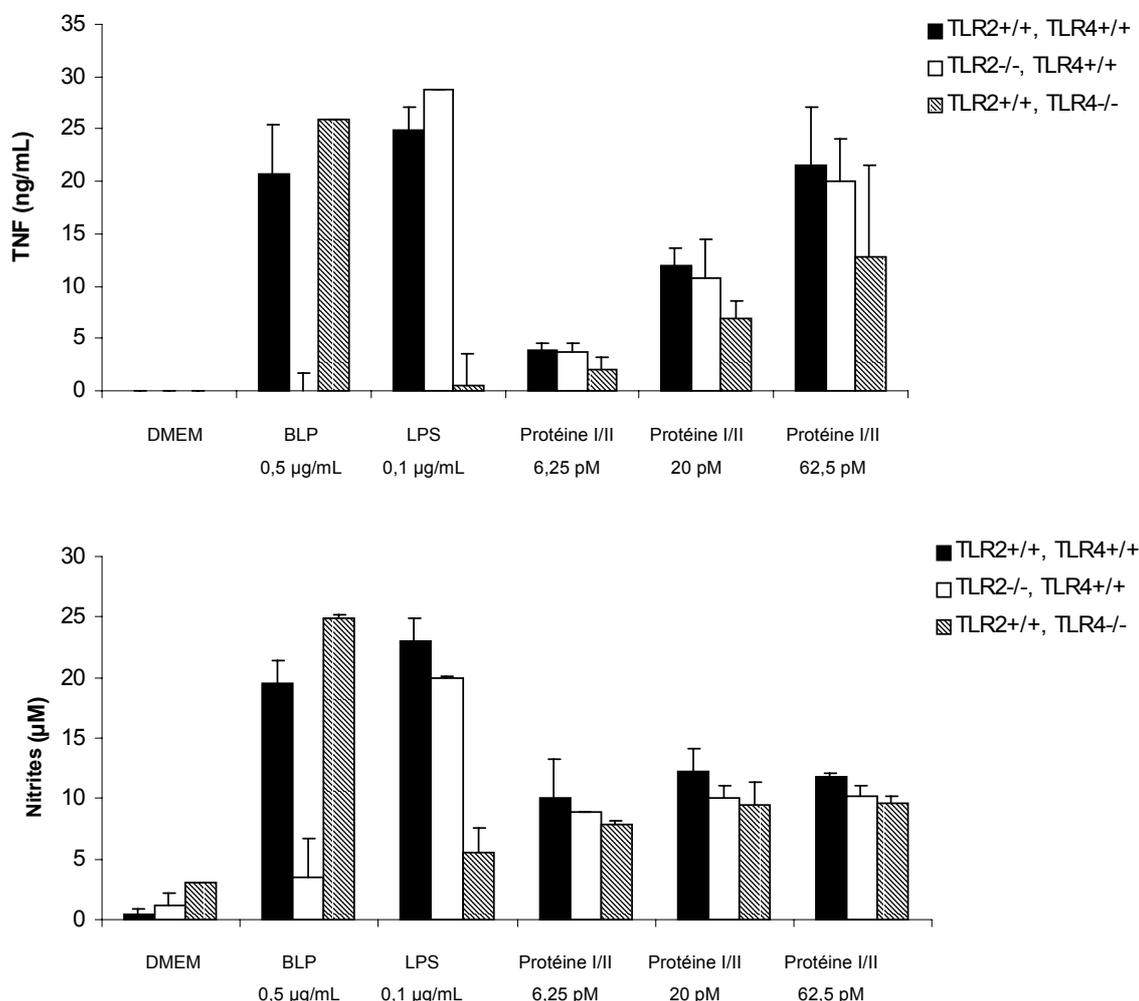
## 2.3.2 Résultats

### 2.3.2.1 Rôle des TLRs dans la libération de médiateurs de l'inflammation

Il est actuellement bien établi que les TLRs jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance de composants bactériens variés et dans le développement d'une réponse immunitaire innée en activant de nombreuses voies de signalisation. Il a été également montré qu'au niveau membranaire les TLRs pourraient faire partie de complexes faisant intervenir différents récepteurs : intégrines, récepteurs de cytokines, HSPs. Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés au rôle éventuel que pourraient jouer les TLRs dans l'activation cellulaire induite par la protéine I/II. Nous avons plus particulièrement étudié le rôle éventuel de TLR-2 et TLR-4 qui sont deux TLRs reconnaissant des PAMPs de bactéries à Gram positif et négatif ainsi que des ligands de nature protéique, tels la fibronectine et des HSPs.

Nous avons, dans un premier temps, étudié la libération de TNF- $\alpha$  par des macrophages de souris k.o pour les gènes codant TLR-2 ou TLR-4. Des macrophages TLR-2<sup>+/+</sup>/TLR-4<sup>+/+</sup>, isolés de souris contrôle, ainsi que des macrophages TLR-2<sup>-/-</sup> ou TLR-4<sup>-/-</sup>, isolés de souris k. o. pour le gène codant TLR-2 ou TLR-4, ont été activés par la protéine I/II (6,25, 20 et 62,5 pM) pendant

18 h. Des contrôles ont été réalisés en activant les cellules par un lipopeptide bactérien synthétique, le BLP (0,5 µg/mL), ligand connu de TLR-2 et le LPS (0,1 µg/mL), ligand de TLR-4 (figure 31).



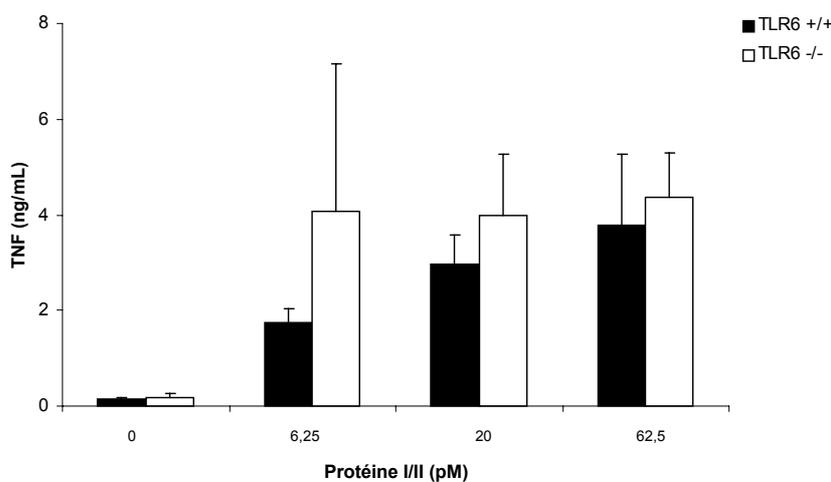
**Figure 31 : Libération de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages TLR-2<sup>+/+</sup>/TLR4<sup>+/+</sup>, les macrophages TLR2<sup>-/-</sup> et les macrophages TLR-4<sup>-/-</sup> activés par la protéine I/II**  
 Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'une expérience représentative de trois expériences.

Les résultats montrent que la protéine I/II induit de manière dose-dépendante la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages TLR-2<sup>+/+</sup>/TLR-4<sup>+/+</sup>. Les concentrations en TNF- $\alpha$  obtenues après activation sont d'environ 20 ng/mL pour 62,5 pM de protéine I/II. Des concentrations comparables sont obtenues après activation des macrophages TLR-2<sup>-/-</sup> ou TLR-4<sup>-/-</sup> par la protéine I/II, alors que ces cellules ne libèrent plus de TNF- $\alpha$  en réponse au BLP et au LPS respectivement. Ces résultats indiquent que TLR-2 et TLR-4 ne semblent pas intervenir dans la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés par la protéine I/II. Cependant, en l'absence d'expériences réalisées avec des macrophages de souris double k. o. pour TLR-2 et TLR-4, nous

ne pouvons pas exclure une éventuelle compensation de l'absence d'un TLR par l'activation d'un autre TLR comme cela a été suggéré par Henneke et coll. (Henneke et coll., 2002).

Nous avons réalisé des expériences complémentaires en évaluant la libération de NO par les macrophages TLR-2<sup>+/+</sup>/TLR-4<sup>+/+</sup> ainsi que par les macrophages TLR-2<sup>-/-</sup> ou TLR-4<sup>-/-</sup> (figure 31). La protéine I/II induit de manière dose-dépendante la libération de NO par les macrophages TLR-2<sup>+/+</sup>/TLR-4<sup>+/+</sup>. Les concentrations en nitrites obtenues après activation de ces cellules sont d'environ 12  $\mu$ M pour 62,5 pM de protéine I/II. Des concentrations comparables sont obtenues après activation des macrophages TLR-2<sup>-/-</sup> ou TLR-4<sup>-/-</sup> par la protéine I/II, alors que ces cellules ne libèrent plus de NO en réponse au BLP et au LPS respectivement. La libération de NO induite par la protéine I/II ne semble donc pas être dépendante de TLR-2 et TLR-4.

Nous avons également étudié l'éventuelle implication de TLR-6 qui forme des hétérodimères avec TLR-2. Nous avons stimulé des macrophages TLR6<sup>+/+</sup>, isolés de souris contrôle et des macrophages TLR6<sup>-/-</sup>, isolés de souris k. o. pour le gène codant TLR-6 par la protéine I/II (6,25, 20 et 62,5 pM) pendant 18 h (figure 32).

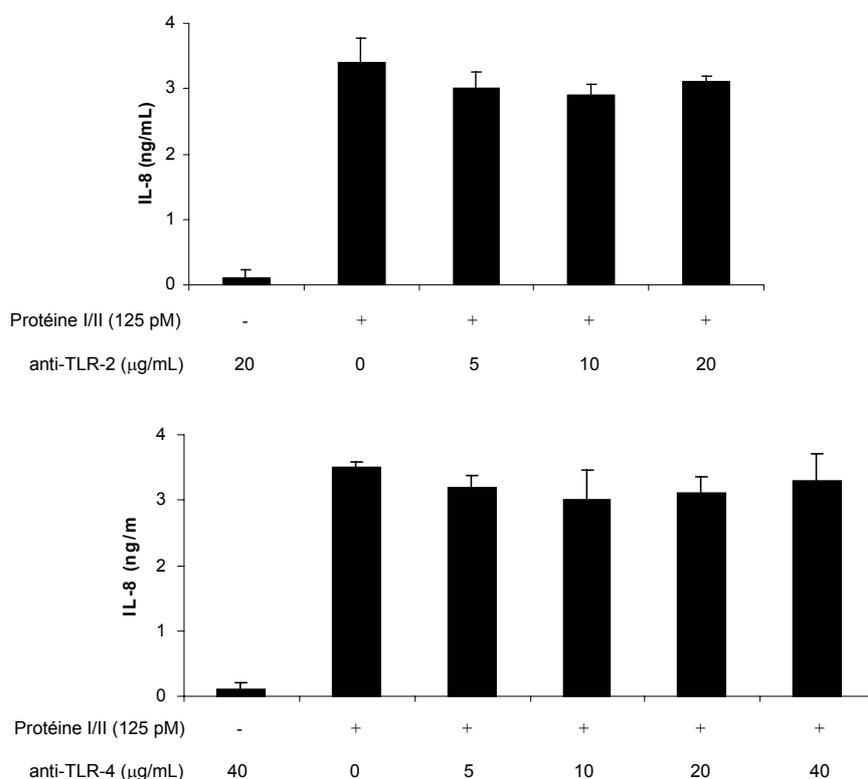


**Figure 32 : Libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages TLR-6<sup>+/+</sup> et les macrophages TLR6<sup>-/-</sup> activés par la protéine I/II**

Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'une expérience.

Les résultats montrent que la protéine I/II induit de manière dose-dépendante la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages TLR-6<sup>+/+</sup> : la concentration en TNF- $\alpha$  obtenue après stimulation de ces cellules avec la protéine I/II à 62,5 pM est d'environ 4 ng/mL. Des résultats comparables ont été obtenus avec les macrophages TLR6<sup>-/-</sup>, suggérant donc que TLR-6, comme TLR-2 et TLR-4, ne joue aucun rôle dans la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés par la protéine I/II.

Nous avons également étudié l'éventuel rôle de TLR-2 et TLR-4 dans l'activation des FLSs rhumatoïdes, en utilisant des anticorps bloquants dirigés contre TLR-2 et TLR-4 (Serotec, Cergy-Saint Christophe, France). Ces anticorps bloquent l'activation cellulaire par le BLP ou le LPS. Les FLSs rhumatoïdes ont été préincubés avec des anticorps anti-TLR-2 (5, 10, et 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et anti-TLR-4 (5, 10, 20 et 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pendant 2 h puis activés par la protéine I/II (125 pM) pendant 6 h (figure 33). Un contrôle a été réalisé en incubant les FLSs rhumatoïdes i) avec les anticorps anti-TLR-2 et anti-TLR-4 en l'absence de stimulation par la protéine I/II et ii) avec des anticorps de même isotype de spécificité non déterminée. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué afin de vérifier que les anticorps n'affectent pas la viabilité cellulaire.



**Figure 33 : Libération d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes activés par la protéine I/II en l'absence ou en présence d'anticorps anti-TLR-2 et anti-TLR-4**

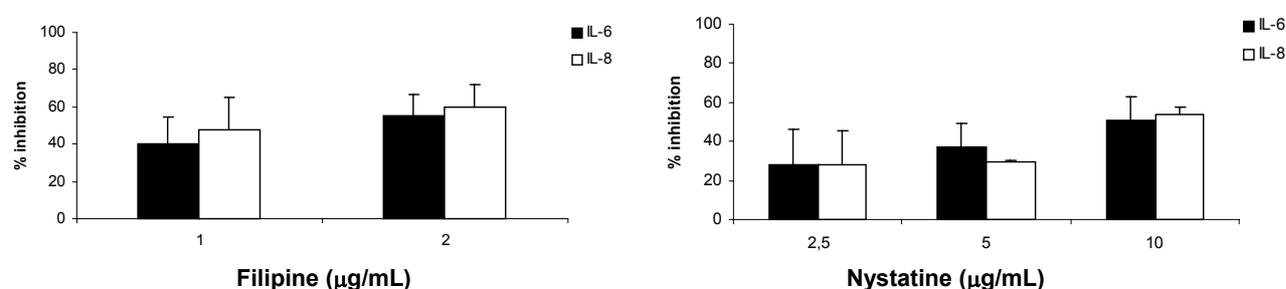
Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

Les résultats montrent que le prétraitement des FLSs rhumatoïdes avec les différentes concentrations en anticorps anti-TLR-2 et anti-TLR-4 n'a aucun effet sur la libération d'IL-8 induite par la protéine I/II qui est d'environ 3 ng/mL. Ces résultats suggèrent donc comme dans le modèle précédemment étudié, que TLR-2 et TLR-4 ne jouent aucun rôle dans la libération de cytokines par les FLSs rhumatoïdes activés par la protéine I/II.

*L'ensemble de ces résultats indique que l'activation des macrophages et des FLSs rhumatoïdes par la protéine I/II ne fait pas intervenir TLR-2, TLR-4 et TLR-6.*

### 2.3.2.2 Rôle de l'intégrité de la membrane plasmique dans la libération de cytokines

Nous avons également étudié l'effet de la filipine et de la nystatine sur la libération de cytokines par les FLSs rhumatoïdes. La filipine et la nystatine désorganisent la membrane plasmique en se liant au cholestérol et empêchent le rapprochement de récepteurs et de molécules adaptatrices au sein de radeaux lipidiques. Les FLSs rhumatoïdes ont été prétraités par la filipine (1 et 2  $\mu\text{g/mL}$ ) ou par la nystatine (2,5, 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$ ) puis activés par la protéine I/II (125 pM) pendant 6 h (figure 34). Un contrôle avec les inhibiteurs, sans activation par la protéine I/II, est effectué afin de vérifier que la filipine et la nystatine seule n'ont aucun effet sur la libération de cytokines. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué afin de vérifier que ces inhibiteurs n'affectent pas la viabilité cellulaire.



**Figure 34 : Inhibition par la filipine et la nystatine de la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes activés par la protéine I/II**

Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

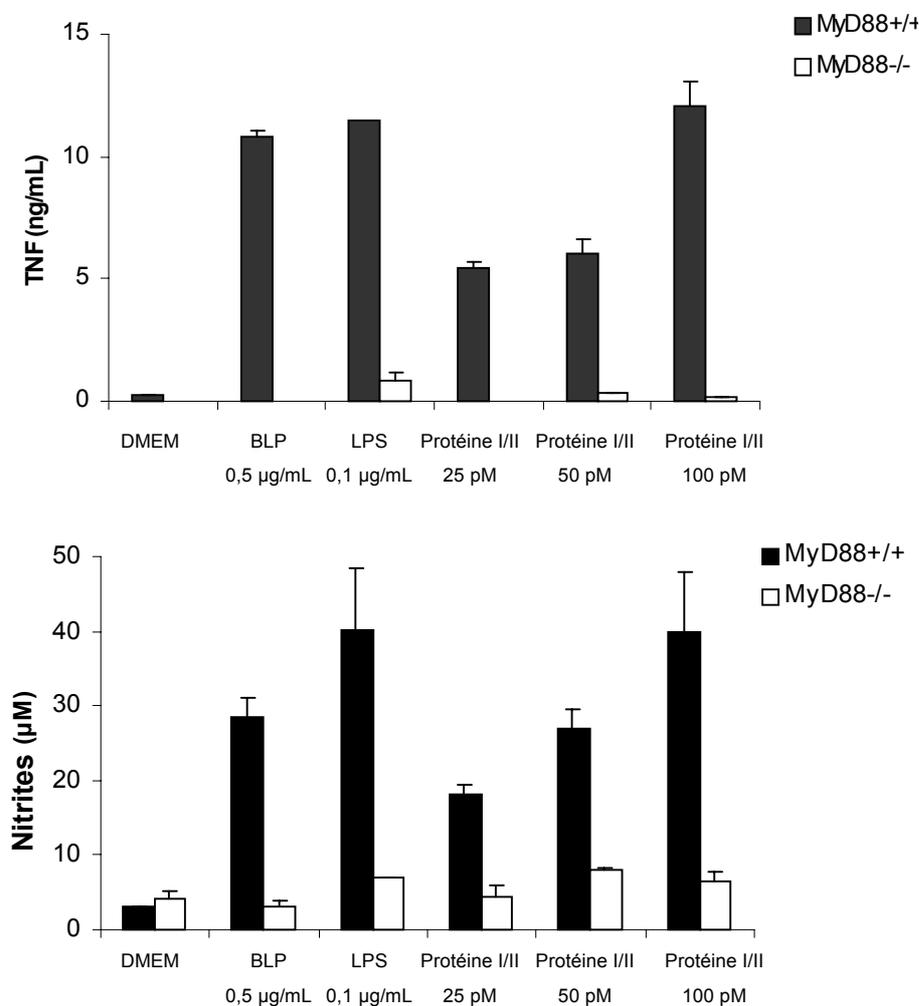
Les résultats montrent que la filipine à 2  $\mu\text{g/mL}$  et la nystatine à 10  $\mu\text{g/mL}$ , concentrations maximales en inhibiteurs n'affectant pas la viabilité cellulaire, entraînent une inhibition de la libération d'IL-6 et d'IL-8 d'environ 60% et 50% respectivement. Ces résultats suggèrent que l'activation des FLSs rhumatoïdes par la protéine I/II nécessite l'intégrité de la membrane plasmique.

Des résultats équivalents ont été obtenus avec le LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ , 5% sérum) en présence de filipine. La filipine à 2  $\mu\text{g/mL}$  inhibe la libération d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes stimulés par le LPS d'environ 40%.

*Si la synthèse de médiateurs de l'inflammation induite par la protéine I/II ne fait pas intervenir les récepteurs TLR-2, TLR-4 et TLR-6, les inhibitions observées avec la filipine ou la nystatine suggèrent cependant que d'autres récepteurs ou des molécules de signalisation appartenant à des voies différentes pourraient intervenir au sein d'un complexe de signalisation conduisant à la synthèse de cytokines sous l'effet de la protéine I/II.*

### 2.3.2.3 Rôle de MyD88 dans la libération de médiateurs de l'inflammation

MyD88 est une protéine adaptatrice clé de la voie de signalisation commune aux récepteurs de l'IL-1/IL-18 et aux TLRs, permettant la transmission du signal d'activation vers les MAPKs et NF- $\kappa$ B. Cette protéine constitue un véritable carrefour des voies de signalisation et a été impliquée dans l'activation cellulaire en réponse à divers stimuli bactériens. Afin de déterminer si MyD88 joue un rôle dans la libération de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages activés par la protéine I/II, nous avons stimulé des macrophages MyD88<sup>+/+</sup>, isolés de souris contrôle et des macrophages MyD88<sup>-/-</sup>, isolés de souris k.o. pour le gène codant MyD88, par la protéine I/II (25, 50 et 100 pM) pendant 18 h. Des contrôles ont été réalisés en activant ces cellules par le BLP (0,5  $\mu$ g/mL) et le LPS (0,1  $\mu$ g/mL).



**Figure 35 : Libération de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages MyD88<sup>+/+</sup> et les macrophages MyD88<sup>-/-</sup> stimulés par la protéine I/II**

Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'une expérience représentative de trois expériences.

Les résultats montrent que la protéine I/II induit de manière dose-dépendante la libération de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages MyD88<sup>+/+</sup> (figure 35). Les concentrations en TNF- $\alpha$  et en nitrites obtenues après activation de ces cellules par la protéine I/II à 100 pM sont d'environ 12 ng/mL de TNF- $\alpha$  et 40  $\mu$ M de nitrites. On observe une très forte diminution de la libération de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages MyD88<sup>-/-</sup> stimulés par la protéine I/II, indiquant que la libération de ces médiateurs par les macrophages activés par la protéine I/II est dépendante de MyD88.

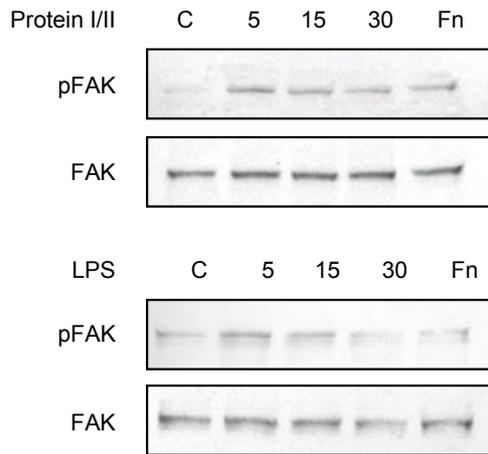
*L'ensemble de ces résultats indique que, de manière étonnante, la libération de médiateurs de l'inflammation par les macrophages est dépendante de MyD88 alors qu'elle est indépendante de TLR-2, TLR-4 et TLR-6.*

#### **2.3.2.4 Phosphorylation de la FAK induite par le LPS**

Nos résultats ayant suggéré que MyD88 et la FAK sont nécessaires à la transmission du signal induit par l'interaction entre la protéine I/II et l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, nous avons décidé d'étudier le rôle de la FAK dans les voies de signalisation dépendantes de MyD88. En effet, des études récentes ont montré que le LPS est capable d'induire la phosphorylation de la FAK et que des ligands de TLR-2 et TLR-4 régulent l'activité de la paxilline, une protéine adaptatrice des voies de signalisation de la FAK.

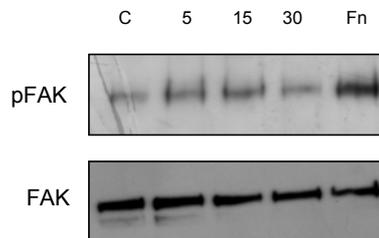
Afin de déterminer si la FAK est impliquée dans l'activation des cellules par le LPS, nous avons étudié la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les macrophages MyD88<sup>+/+</sup> stimulés par le LPS (1  $\mu$ g/mL) pendant 5, 15 et 30 min. Un contrôle a été réalisé en incubant les macrophages pendant 15 min en l'absence de toute stimulation. Les macrophages stimulés par la fibronectine (10  $\mu$ g/mL) pendant 20 min ont été utilisés comme témoin d'activation de la FAK. Ces expériences ont été également réalisées avec la protéine I/II (125 pM) afin de vérifier que la FAK est bien activée en réponse à ce stimulus dans ces cellules. L'homogénéité des dépôts a été vérifiée par la révélation de la FAK totale.

Les résultats montrent une phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 en l'absence de toute stimulation qui est augmentée après 5 min de stimulation par le LPS et se prolonge après 15 min de stimulation (figure 36). Des résultats similaires ont été obtenus en stimulant les macrophages par la protéine I/II. La stimulation des macrophages par le LPS conduit donc à la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397.



**Figure 36 : Phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les macrophages MyD88<sup>+/+</sup> stimulés par la protéine I/II et le LPS**

Ces expériences ont été également réalisées avec les FLSs rhumatoïdes stimulés par le LPS (1 µg/mL, 5% sérum) pendant 5, 15 et 30 min (figure 37). Un contrôle a été réalisé en incubant les FLSs rhumatoïdes avec du sérum à 5% pendant 15 min afin de vérifier que le sérum seul n'a aucun effet sur la phosphorylation de la FAK. Les FLSs stimulés par la fibronectine (10 µg/mL) pendant 20 min ont été utilisés comme témoin d'activation de la FAK. L'homogénéité des dépôts a été vérifiée par la révélation de la FAK totale.



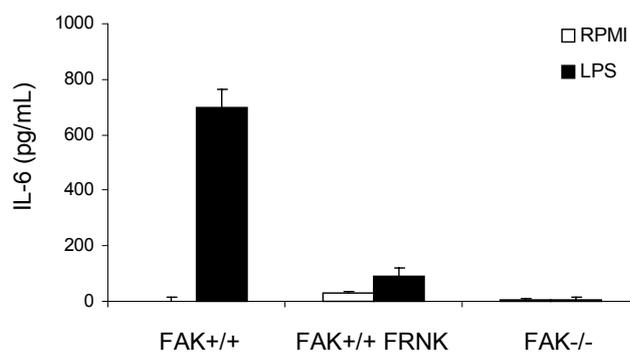
**Figure 37 : Phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les FLSs rhumatoïdes stimulés par le LPS**

Les résultats montrent une phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 en l'absence de toute stimulation qui est augmentée après 5 min de stimulation par le LPS et se prolonge après 15 min de stimulation. La stimulation des FLSs rhumatoïdes par le LPS conduit donc à la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397.

*L'ensemble de ces résultats montre que le LPS induit la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397.*

### 2.3.2.5 Implication de la FAK dans la libération de cytokines induite par le LPS

Afin de déterminer si la FAK est impliquée dans la libération de cytokines induite par le LPS, nous avons étudié la libération d'IL-6 par les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup>, isolés d'embryons de souris contrôle et de fibroblastes FAK<sup>-/-</sup>, isolés d'embryons de souris k. o. pour le gène codant la FAK. Les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> et FAK<sup>-/-</sup> ont été stimulés par le LPS (1 µg/mL, 5% sérum) pendant 18 h. Pour confirmer que les résultats obtenus ne sont pas dus à une inhibition non spécifique d'autres fonctions cellulaires, la libération d'IL-6 a été également étudiée dans des fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> transfectés de façon stable avec un plasmide codant FRNK, le domaine C-terminal de la FAK dont la surexpression empêche l'activation de la FAK. Un contrôle a été réalisé en transfectant les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> avec un plasmide contrôle afin de vérifier que la transfection seule n'a pas d'effet sur la libération d'IL-6. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué afin de vérifier la viabilité cellulaire.



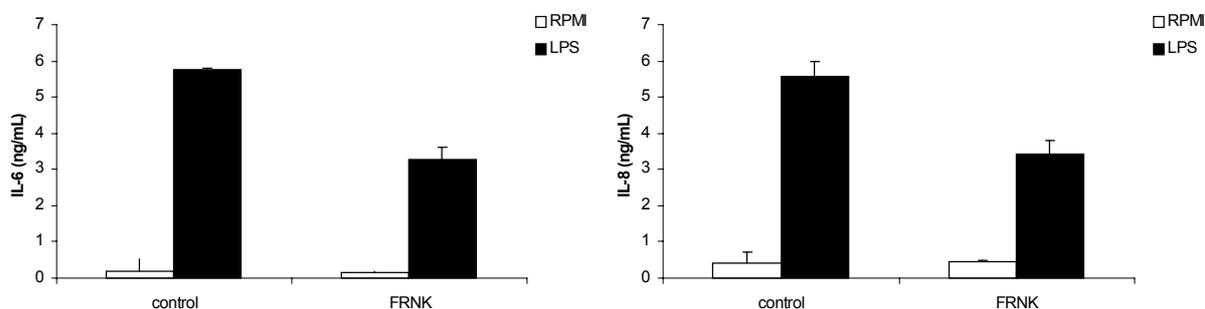
**Figure 38 : Libération d'IL-6 par les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> transfectés ou non avec FRNK et les fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> stimulés par le LPS**

Les résultats représentent la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes.

Les résultats montrent que le LPS induit la libération d'IL-6 par les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> : les concentrations obtenues sont d'environ 700 pg/mL (figure 38). Les fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> ne libèrent pas d'IL-6 en réponse à la stimulation par le LPS, suggérant que la FAK est indispensable à la libération de cette cytokine. Ces résultats sont confirmés par les résultats obtenus avec les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> transfectés avec FRNK : la surexpression de FRNK dans les cellules FAK<sup>+/+</sup> conduit à une forte inhibition de la sécrétion d'IL-6 par ces cellules stimulés par le LPS. La FAK est donc nécessaire à la libération d'IL-6 par les fibroblastes en réponse au LPS.

Ces expériences ont été également réalisées avec les FLSs rhumatoïdes. Les FLSs rhumatoïdes transfectés ou non avec FRNK de manière transitoire, ont été stimulés par le LPS (1 µg/mL, 5% sérum) pendant 18 h (figure 39). Un contrôle a été réalisé en transfectant les cellules

avec un plasmide contrôle afin de vérifier que la transfection seule n'a pas d'effet sur la libération d'IL-6. Après chaque activation, un test de viabilité au MTT est effectué afin de vérifier que la transfection n'affecte pas la viabilité cellulaire.



**Figure 39 : Libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes transfectés ou non avec FRNK stimulés par le LPS**

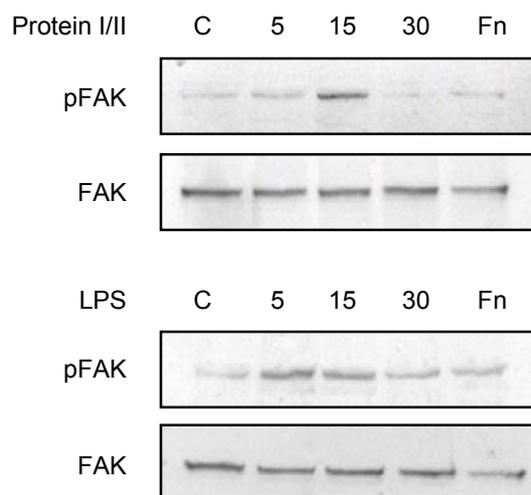
Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

Les résultats montrent que la surexpression de FRNK inhibe la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les FLSs rhumatoïdes stimulés par le LPS d'environ 40%. Ces résultats indiquent que la FAK joue un rôle dans la libération de cytokines par les FLSs rhumatoïdes en réponse au LPS.

*L'ensemble de ces résultats indique que la FAK est nécessaire à la libération de cytokines par les fibroblastes stimulés par le LPS.*

### 2.3.2.6 Rôle de MyD88 dans la phosphorylation de la FAK

Afin de déterminer si MyD88 est nécessaire à l'activation de la FAK, nous avons étudié la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les macrophages MyD88<sup>-/-</sup>. Les macrophages ont été stimulés par la protéine I/II (125 pM) et le LPS (1  $\mu$ g/mL) pendant 5, 15 et 30 min (figure 40). Un contrôle a été réalisé en incubant les macrophages MyD88<sup>-/-</sup> pendant 15 min en l'absence de toute stimulation. Les macrophages stimulés par la fibronectine (10  $\mu$ g/mL) pendant 20 min ont été utilisés comme témoin d'activation de la FAK. L'homogénéité des dépôts a été vérifiée par la révélation de la FAK totale.



**Figure 40 : Phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 dans les macrophages MyD88<sup>-/-</sup> stimulés par la protéine I/II et le LPS**

Les résultats montrent une phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 en l'absence de toute stimulation qui est augmentée après 15 min de stimulation par la protéine I/II. Des résultats similaires ont été obtenus avec le LPS qui augmente la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 après 5 min et cette phosphorylation se prolonge après 15 min de stimulation. Ces résultats indiquent que l'activation des macrophages par la protéine I/II et par le LPS conduit à la phosphorylation de la FAK sur son résidu Tyr-397 en l'absence de MyD88, suggérant que MyD88 n'est pas indispensable à l'activation de la FAK.

*L'ensemble de ces résultats indique que la FAK et MyD88 sont indispensables à la libération de médiateurs de l'inflammation induite par la protéine I/II et que l'activation de la FAK est indépendante de MyD88.*

### 2.3.3 Discussion

Au cours de travaux précédents nous avons montré que la protéine I/II induit la libération de cytokines pro-inflammatoires en interagissant avec différentes cellules humaines, cellules endothéliales, épithéliales, monocytes/macrophages, fibroblastes via l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Cette libération de cytokines fait intervenir ERK1/2 et les JNKs ainsi que les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B.

AP-1 et NF- $\kappa$ B sont des facteurs de transcription qui jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse inflammatoire, première étape de la réponse immunitaire innée. De

nombreux PAMPs appartenant aussi bien à des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et à des virus sont capables de les activer après interaction avec des PRRs appartenant à des familles variées. La complexité de ces mécanismes est encore augmentée par le fait que de très nombreuses protéines intracellulaires appartenant souvent à des voies de signalisation différentes peuvent participer à cette réponse. Des travaux récents ont également suggéré que la réponse innée pourrait faire intervenir une association transitoire de différents récepteurs (CD14, intégrines, HSPs...) localisés dans des microdomaines de la membrane appelés radeaux lipidiques. Dans ces conditions il est fort probable qu'un rôle important puisse être attribué aux TLRs qui reconnaissent des PAMPs très divers et dont les travaux de Triantafilou et coll. viennent de confirmer la présence au niveau des radeaux lipidiques (Triantafilou et coll., 2004). Nos expériences avec la nystatine et la filipine suggèrent également que la libération de cytokines induite par la protéine I/II via l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  fait intervenir des associations de récepteurs.

Au cours de cette étude, nous nous sommes donc intéressés au rôle que pourraient jouer les TLRs dans la réponse pro-inflammatoire induite par la protéine I/II. Nous avons utilisé des macrophages de souris TLR-2<sup>-/-</sup> et de souris TLR6<sup>-/-</sup>, dans la mesure où ces récepteurs reconnaissent essentiellement des bactéries à Gram positif et certains de leurs composants. Nous avons également testé des macrophages de souris TLR-4<sup>-/-</sup>. Bien que TLR-4 ait pour ligand majeur le LPS, PAMP des bactéries à Gram négatif, il est également capable de reconnaître des molécules endogènes telle la fibronectine, ligand physiologique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . De ce fait nous avons inclus ces cellules dans notre étude. Les résultats obtenus après activation par la protéine I/II ont montré que la libération de TNF- $\alpha$  induite par la protéine I/II n'est pas modifiée dans les cellules déficientes en TLR4, TLR2 ou TLR6. Des résultats équivalents ont été obtenus avec le NO. En accord avec ces résultats nous avons également observé que la libération de cytokines telle l'IL-8 par les FLSs qui expriment TLR4 et TLR2, n'est pas inhibée par des anticorps bloquant anti-TLR4 et anti-TLR2. Ces résultats suggèrent que ces TLRs ne jouent aucun rôle dans l'activité pro-inflammatoire de la protéine I/II. Cependant, il n'est pas impossible qu'un phénomène de compensation puisse intervenir. Dans ces conditions, en l'absence d'expériences effectuées avec des macrophages de souris double k. o. pour TLR-2 et TLR-4 par exemple, nous ne pouvons pas totalement exclure l'implication de ces récepteurs dans la réponse pro-inflammatoire induite par la protéine I/II.

Nous avons également étudié le rôle éventuel de MyD88 dans l'activation des macrophages par la protéine I/II. Les TLRs présentent au niveau intracellulaire un domaine TIR qui leur permet de recruter par des interactions homophiles, différentes protéines adaptatrices : MyD88, TRIF, MAL. MyD88 joue cependant un rôle clé dans les voies de signalisation activées par les

différents TLRs menant à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dans la mesure où elle est associée aux différents TLRs sauf TLR3. Contrairement à nos résultats précédents et de façon surprenante nous avons montré que la libération de TNF- $\alpha$  induite par la protéine I/II est totalement inhibée en l'absence de MyD88. Des résultats comparables ont été obtenus avec le NO. MyD88 joue donc un rôle essentiel dans l'activité pro-inflammatoire de la protéine I/II. De nombreux PAMPs obtenus sous forme recombinante peuvent être contaminés par du LPS exogène qui pourrait être responsable de la réponse pro-inflammatoire observée (Gao et Tsan, 2003). Nous avons travaillé avec des préparations de protéine I/II dont la concentration en endotoxine était inférieure à 0,02 ng/mL. Dans la mesure où nous n'avons pas observé d'inhibition de la libération de médiateurs inflammatoires avec les macrophages de souris TLR4<sup>-/-</sup>, le rôle indispensable de MyD88 dans la libération de TNF- $\alpha$  et de NO ne pouvait pas être du à une contamination de la protéine I/II par des endotoxines.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à émettre deux hypothèses : i) la libération de médiateurs de l'inflammation induite par la protéine I/II pourrait faire intervenir un ou plusieurs TLR(s), qui serai(en)t alors très probablement distinct(s) de TLR-2, TLR-4 et TLR-6 et ii) MyD88 pourrait être recrutée au niveau intracellulaire après activation par la protéine I/II par un mécanisme indépendant des TLRs. En l'absence d'expériences réalisées avec des cellules de souris k. o pour d'autres TLRs, nous ne pouvons pas conclure quant à l'interaction de la protéine I/II avec un membre de la famille des TLRs. Cependant, l'internalisation de la protéine I/II n'étant pas nécessaire à son activité moduline, il paraît peu probable que des TLRs endosomaux (TLR-7, TLR-8 et TLR-9) soient impliqués dans la réponse pro-inflammatoire induite par ce PAMP (Engels-Deutsch et coll., 2003).

La seconde hypothèse attribuerait un rôle à MyD88 en l'absence de signalisation par les TLRs. MyD88 participe également à la signalisation des récepteurs de l'IL-1/IL-18. La protéine I/II induit la libération d'IL-1 et d'IL-18 par les macrophages, nous ne pouvons donc pas exclure l'existence d'une stimulation autocrine MyD88-dépendante par ces cytokines mais ce phénomène ne peut être responsable de l'absence quasi totale de libération de TNF- $\alpha$  observée au cours de nos expériences. Il pourrait donc exister une autre voie de signalisation conduisant au recrutement de MyD88. En accord avec nos expériences, Henneke et coll. ont également montré que la libération de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages en réponse à une fraction purifiée de constituants de paroi de streptocoques du groupe B est dépendante de MyD88 mais indépendante de TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6 et TLR-9 (Henneke et coll., 2001; Henneke et coll., 2002).

Nous avons montré précédemment avec les fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> et les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> transfectés avec FRNK que la FAK est indispensable à la libération de cytokines induite par la protéine I/II. L'ensemble de ces résultats indique donc que la FAK et MyD88 sont essentielles à la libération de médiateurs de l'inflammation induite par la protéine I/II.

La FAK se situe à l'intersection de différentes voies de signalisation (intégrines, récepteurs de facteurs de croissance, ...) et des études récentes suggèrent que cette PTK pourrait être impliquée dans la libération de cytokines pro-inflammatoires après activation d'autres récepteurs, tel le TNF-R : en effet, la FAK est indispensable à la translocation de NF-κB et à la libération d'IL-6 induite par le TNF-α (Funakoshi-Tago et coll., 2003). Les expériences que nous avons réalisées avec le LPS attribuent également un rôle important à la FAK dans les voies de signalisation de TLR-4 : en effet, les fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> ne libèrent pas d'IL-6 en réponse à la stimulation par le LPS. Ceci n'est pas dû à une modification d'autres fonctions cellulaires puisque la surexpression de FRNK dans les fibroblastes FAK<sup>+/+</sup> et les FLSs conduit également à une diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules. Ces résultats sont en accord avec d'autres expériences démontrant un rôle important de PTK dans l'activation des macrophages par le LPS (Meng et Lowell, 1997) et des ligands de TLR-2 (Hazeki et coll., 2003). L'ensemble de ces résultats suggère que les voies de signalisation des TLRs dépendantes de MyD88 et conduisant à la libération de cytokines pro-inflammatoires pourraient faire intervenir la FAK. Nous avons montré que la FAK est toujours phosphorylée dans les macrophages MyD88<sup>-/-</sup> en réponse à la stimulation par la protéine I/II ou le LPS, suggérant que la FAK se situe en amont de MyD88. Des résultats comparables ont été obtenus par Hazeki et coll. démontrant que la phosphorylation de la paxilline en réponse à une stimulation de TLR-2 et de TLR-4 est indépendante de MyD88 (Hazeki et coll., 2003).

La FAK ne possède pas de domaine TIR ni de « death domain » qui lui permettrait d'interagir directement avec MyD88. Dans la mesure où MyD88 est phosphorylée après recrutement par les TLRs, il est envisageable que la FAK puisse jouer un rôle dans ce processus, directement en interagissant avec MyD88 par des domaines différents des domaines TIR et des « death domain » ou indirectement en recrutant une autre kinase. Il a été montré depuis longtemps que de PTK sont activées en réponse au LPS mais la nature des kinases responsables de la libération de cytokines pro-inflammatoires n'a pas été identifiée (Meng et Lowell, 1997). Plus récemment, Jefferies et coll. ont montré que la Bruton tyrosine kinase (Btk) est essentielle à la translocation de NF-κB en réponse au LPS dans les cellules myéloïdes (Jefferies et coll., 2003). La Btk interagit avec les domaines TIR de TLR-4, TLR-6, TLR-8 et TLR-9 ainsi qu'avec MyD88, MAL et IRAK-1 mais la nature de ces interactions n'est pas encore définie (Jefferies et coll., 2003). Elle possède également des domaines SH2 et SH3 qui lui permettent d'interagir

avec de nombreuses autres protéines (Jefferies et O'Neill, 2004). L'activation de la Btk nécessite sa phosphorylation par des kinases, qui pourraient appartenir à la famille de Src mais il a été également suggéré que d'autres PTKs activées en réponse à la stimulation par le LPS, tel Vav et la FAK pourraient jouer un rôle dans ce processus (Jefferies et O'Neill, 2004). Dans la mesure où la FAK est indispensable à la libération de cytokines induite par le LPS, la FAK pourrait i) conduire à l'activation de la Btk et à l'association avec MyD88 dans les cellules myéloïdes où la Btk est nécessaire à la signalisation du LPS et ii) conduire à la phosphorylation de MyD88, directement ou indirectement, dans les cellules n'exprimant pas la Btk.

L'association de MyD88 avec des kinases dont la nature reste à déterminer ne concerne pas seulement les voies de signalisation conduisant au TNF- $\alpha$  et au NO mais également les voies MyD88-dépendantes menant à la synthèse d'IFN. Ainsi, Kawai et coll. ont montré récemment que MyD88 interagit avec des kinases, distinctes de TBK1 et IKKi, pour recruter IRF-7 et conduire à la synthèse d'IFN- $\alpha$  (Kawai et coll., 2004).

L'ensemble de ces résultats montre que la FAK et MyD88 jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée, mais la nature exacte de leur contribution aux voies de signalisation menant à la libération de médiateurs de l'inflammation reste à déterminer.

Au cours de ce travail, nous avons démontré que la protéine I/II interagit avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sur les FLSs et induit la synthèse et la libération de cytokines impliquées plus particulièrement dans l'activation et le recrutement cellulaire. Avec la protéine I/II, nous avons confirmé d'autres travaux indiquant que les FLSs ne libèrent pas ou peu de TNF- $\alpha$  ni d'IL-1 ou d'IL-18, cytokines qui seraient donc essentiellement d'origine macrophagique. Nous avons également montré que la protéine I/II stimule l'expression de plusieurs gènes pouvant contribuer au caractère agressif des FLSs de patients atteints de PR, notamment l'expression et la libération de MMP-3, protéase clé de la destruction du cartilage. L'interaction de la protéine I/II avec les FLSs pourrait donc contribuer aux deux phénomènes pathogéniques de la PR, l'inflammation et la destruction articulaire.

L'étude des voies de signalisation nous a permis de définir un nouveau rôle pour la FAK qui jusqu'à présent était surtout associée à des fonctions telles l'adhésion, la différenciation cellulaire et l'apoptose. La FAK est un élément clé dans les voies de signalisation conduisant à la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 induite par la protéine I/II et ceci par un mécanisme d'action qui est indépendant de son site d'autophosphorylation considéré jusqu'à présent comme incontournable. Nous avons également montré que Shc, Src et la PI3 kinase ne sont pas impliquées dans la transduction de ce signal. Il serait maintenant intéressant d'étudier le ou les mécanisme(s) par lesquels la FAK transmet le signal indépendamment du résidu Tyr-397. L'utilisation de formes mutées de la FAK sur le résidu Lys-454, indispensable à l'activité kinase de la FAK, permettra sans doute de déterminer si sa fonction kinase est nécessaire au recrutement d'une ou de plusieurs autre(s) protéine(s) intervenant dans cette cascade de signalisation. Le rôle éventuel joué par les différents domaines de la FAK pourra être étudié en transfectant les fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> avec des formes tronquées de la FAK ( $\Delta$ C-FAK, N-FAK,  $\Delta$ N-FAK) et en analysant l'éventuelle restauration de la synthèse et de la libération de cytokines. Il sera également intéressant de déterminer la localisation cellulaire de la FAK après stimulation des cellules par la protéine I/II : la translocation de la FAK vers les contacts focaux semble jouer un rôle clé lors de l'activation de cette kinase par des protéines de la matrice extracellulaire. Existe-il des différences dans l'activation de la FAK après stimulation des cellules par des constituants de la matrice extracellulaire et après stimulation par la protéine I/II ? Dans la mesure où la cytochalasine D, qui désorganise le réseau d'actine, n'inhibe pas la synthèse de cytokines induite par la protéine I/II, l'hypothèse d'une nécessité de translocation de la FAK est peu probable.

Si la FAK est indispensable à la libération de cytokines induites par la protéine I/II, nous avons attribué un rôle tout aussi important à MyD88, alors que TLR-2, TLR-4 et TLR-6 n'interviennent pas dans cette transmission du signal menant aux cytokines. Un autre membre de la famille des TLRs serait-il un récepteur de la protéine I/II ? Au vu de la structure des ligands

connus de ces TLRs et/ou de leur localisation cellulaire, cela semble peu probable mais il serait nécessaire d'étudier la libération de cytokines par des cellules déficientes en d'autres TLRs après stimulation par la protéine afin d'exclure toute interaction avec un membre de la famille des TLRs.

Les mécanismes par lesquels les voies de la FAK et de MyD88 contribuent à la réponse pro-inflammatoire restent à définir. Comment ces deux protéines apparemment indépendantes sont-elles chacune indispensable à la libération de cytokines induite par la protéine I/II ? Ces deux voies de signalisation mènent à l'activation des MAPKs/AP-1 et à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. Nous avons montré que la protéine I/II induit la phosphorylation de ERK1/2, JNKs et p38 et augmente la liaison à l'ADN d'AP-1 et de NF- $\kappa$ B. Il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure les voies de la FAK et de MyD88 sont impliquées dans la transduction du ou des signal(aux) menant à la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires. AP-1 et NF- $\kappa$ B sont-ils activés par les mêmes voies de signalisation ? Comment la coopération de ces deux voies a-t-elle lieu ? La FAK ne possédant pas de domaine TIR ni de « death domain » une interaction directe entre ces deux protéines est-elle envisageable ? Nous avons montré que la FAK est toujours phosphorylée sur son résidu Tyr-397 en l'absence de MyD88, ce qui suggère que l'activation de la FAK est indépendante de MyD88. Cependant il est envisageable que la phosphorylation de MyD88 soit dépendante de la FAK. Il serait intéressant de déterminer si la FAK pourrait jouer un rôle dans ce processus directement par son activité kinase ou indirectement en recrutant une autre kinase, ce phénomène pourrait être indépendant ou non de l'activité kinase de la FAK. Des expériences de colocalisation permettraient de mettre en évidence une éventuelle interaction entre ces deux protéines. Par ailleurs, la Btk pourrait constituer un lien entre la FAK et MyD88 dans les cellules myéloïdes. L'utilisation de macrophages isolés de patients atteints d'agammaglobulinémie n'exprimant pas de Btk fonctionnelle permettrait de déterminer si la Btk est également indispensable à la libération de cytokines induite par la protéine I/II. Si la Btk devait jouer un rôle dans les cellules myéloïdes, par quelle(s) protéine(s) de signalisation seraient-elle alors remplacée dans d'autres cellules ?

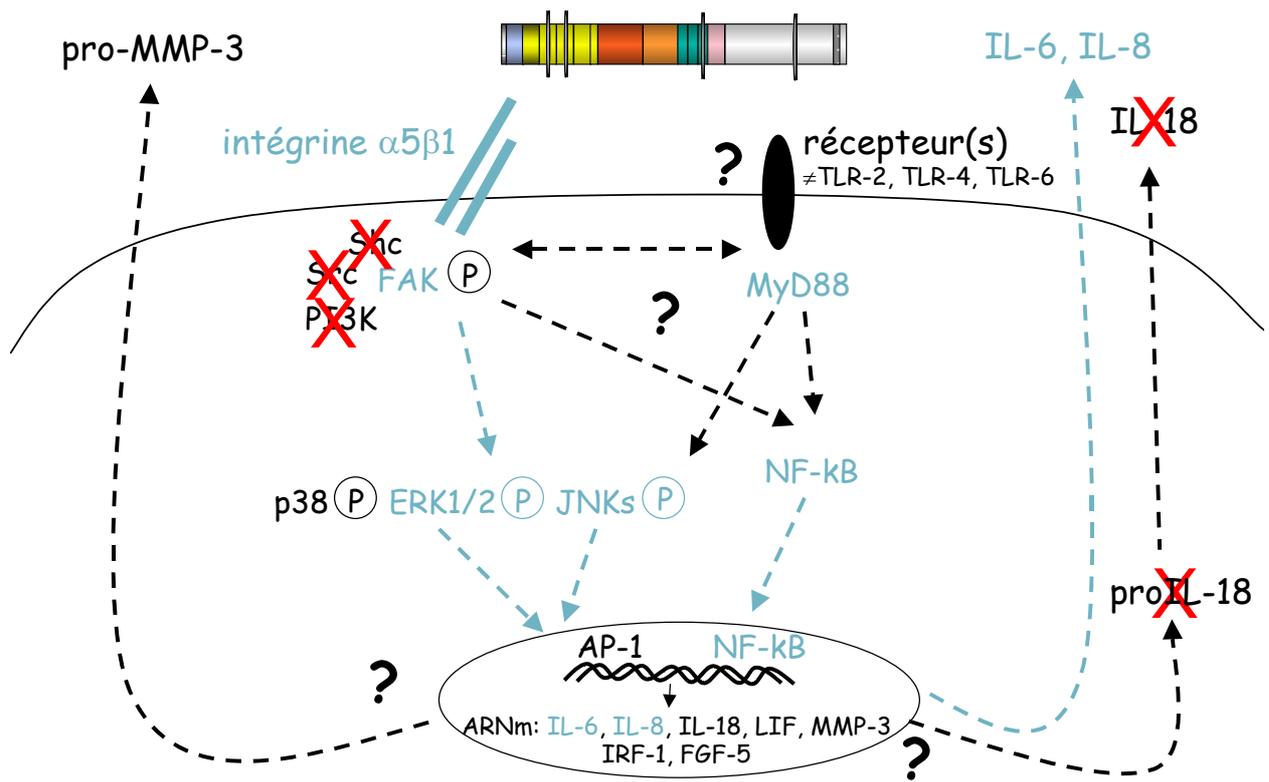
Ces voies de signalisation induites par la protéines I/II et menant à la synthèse de cytokines pourraient également être impliquées dans la synthèse d'autres médiateurs, telle la MMP-3, dont les promoteurs possèdent des sites de fixation d'AP-1 et il a été montré que NF- $\kappa$ B est également capable de participer à la synthèse de MMPs. Il serait intéressant de déterminer si cette synthèse de MMP-3 induite par la protéine I/II est également dépendante de la FAK et de MyD88.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé en parallèle des FLSs rhumatoïdes et des FLSs de patients atteints d'arthrose afin de déterminer si les réponses cellulaires observées étaient dépendantes de l'origine des FLSs. Avec la protéine I/II, nous avons confirmé d'autres résultats

indiquant que les FLSs de patients atteints d'arthrose sont capable de répondre à des stimuli très divers en libérant des cytokines pro-inflammatoires. Les différences observées dans la synthèse de cytokines entre ces deux types de FLSs sont quantitatives plutôt que qualitatives. Cependant, en étudiant la réponse transcriptionnelle des FLSs après stimulation par la protéine I/II, nous avons montré que les profils d'expression géniques des FLSs rhumatoïdes et des FLSs arthrosiques sont très différents et que seuls les FLSs rhumatoïdes libèrent significativement plus de MMP-3 en réponse à la stimulation par la protéine I/II. Cette réponse des FLSs rhumatoïdes ne s'explique pas par des différences dans les voies de signalisation que nous avons étudiées, mais nous ne pouvons exclure une contribution différente de certains éléments de signalisation et/ou la mise en jeu d'autres voies de signalisation dans les FLSs rhumatoïdes et les FLSs arthrosiques.

Les comparaisons des réponses *in vitro* des FLSs rhumatoïdes et des FLSs de patients atteints d'arthrose constitue un outil pour étudier les propriétés intrinsèques des FLSs mais l'interprétation des résultats reste difficile puisque ces expériences font abstraction de l'environnement rhumatoïde qui contribue à l'activation des FLSs rhumatoïdes *in vivo*. Il serait intéressant d'étudier le rôle éventuel de la protéine I/II dans un modèle animal d'arthrite, mais les quantités de protéine I/II nécessaires rendent ces expériences pratiquement irréalisables.

L'ensemble de nos résultats indique que des interactions PAMPs-PRRs variées pourraient contribuer à l'activation *in situ* des FLSs et constituer un événement majeur dans l'initiation de l'inflammation synoviale et de sa réactivation chez des personnes présentant des prédispositions génétiques à développer une PR. Cette hypothèse implique donc non pas un antigène spécifique mais une variété d'antigènes qui favoriseraient par stimulation de l'immunité innée le recrutement, l'activation des LT et la rupture de la tolérance au soi.



**Figure 41 : Schéma récapitulatif**

En bleu : Voie(s) de signalisation activées par la protéine I/II et menant aux cytokines pro-inflammatoires

## BIBLIOGRAPHIE

### A

- Ackermans F, V. C. S. D. K. J. (1988). Affinity purification of salivary components interacting with *Streptococcus mutans* serotype f 74 kDa SR cell wall protein. *FEMS Microbiol Lett* 55: 279-282.
- Ahrens, D., Koch, A. E., Pope, R. M., Stein-Picarella, M. and Niedbala, M. J. (1996). Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39(9): 1576-87.
- Aicher, W. K., Alexander, D., Haas, C., Kuchen, S., Pagenstecher, A., Gay, S., Peter, H. H. and Eibel, H. (2003). Transcription factor early growth response 1 activity up-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 48(2): 348-59.
- Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15(1): 5-11.
- Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278(40): 38105-8.
- Albanyan, E. A., Vallejo, J. G., Smith, C. W. and Edwards, M. S. (2000). Nonopsonic binding of type III Group B Streptococci to human neutrophils induces interleukin-8 release mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun* 68(4): 2053-60.
- Allen B. L., H. M. (1998). Viridans streptococcal adherence to laminin: potential role in binding to human cardiac valve tissue and early characterization of putative laminin adhesin. 98th congress of the ASM, Atlanta, GA, USA.
- Alleva, D. G., Kaser, S. B., Monroy, M. A., Fenton, M. J. and Beller, D. I. (1997). IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J Immunol* 159(6): 2941-51.
- Al-Okla, S., Chatenay-Rivauday, C., Klein, J. P. and Wachsmann, D. (1999). Involvement of alpha5beta1 integrins in interleukin 8 production induced by oral viridans streptococcal protein I/II in cultured endothelial cells. *Cell Microbiol* 1(2): 157-68.
- Andreakos, E., Smith, C., Kiriakidis, S., Monaco, C., de Martin, R., Brennan, F. M., Paleolog, E., Feldmann, M. and Foxwell, B. M. (2003). Heterogeneous requirement of IkappaB kinase 2 for inflammatory cytokine and matrix metalloproteinase production in rheumatoid arthritis: implications for therapy. *Arthritis Rheum* 48(7): 1901-12.
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L. and Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25(2): 187-91.
- Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H., Luthra, H. S. and et al. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31(3): 315-24.

Asahara, H., Fujisawa, K., Kobata, T., Hasunuma, T., Maeda, T., Asanuma, M., Ogawa, N., Inoue, H., Sumida, T. and Nishioka, K. (1997). Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 40(5): 912-8.

Aupperle, K., Bennett, B., Han, Z., Boyle, D., Manning, A. and Firestein, G. (2001). NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol* 166(4): 2705-11.

Aupperle, K. R., Bennett, B. L., Boyle, D. L., Tak, P. P., Manning, A. M. and Firestein, G. S. (1999). NF-kappa B regulation by I kappa B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 163(1): 427-33.

Aupperle, K. R., Yamanishi, Y., Bennett, B. L., Mercurio, F., Boyle, D. L. and Firestein, G. S. (2001). Expression and regulation of inducible IkappaB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cell Immunol* 214(1): 54-9.

## B

Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T. and Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7849-54.

Baeten, D., Peene, I., Union, A., Meheus, L., Sebbag, M., Serre, G., Veys, E. M. and De Keyser, F. (2001). Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum* 44(10): 2255-62.

Baier, A., Meineckel, I., Gay, S. and Pap, T. (2003). Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15(3): 274-9.

Banda, N. K., Vondracek, A., Kraus, D., Dinarello, C. A., Kim, S. H., Bendele, A., Senaldi, G. and Arend, W. P. (2003). Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein. *J Immunol* 170(4): 2100-5.

Barberis, L., Wary, K. K., Fiucci, G., Liu, F., Hirsch, E., Brancaccio, M., Altruda, F., Tarone, G. and Giancotti, F. G. (2000). Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem* 275(47): 36532-40.

Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2004). Toll signaling: RIPping off the TNF pathway. *Nat Immunol* 5(5): 472-4.

Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A. and Bucala, R. (1994). Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 33(47): 14144-55.

Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430(6996): 257-63.

Bohm, B. B., Aigner, T., Blobel, C. P., Kalden, J. R. and Burkhardt, H. (2001). Highly enhanced expression of the disintegrin metalloproteinase MDC15 (metargidin) in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 44(9): 2046-54.

Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25(6): 280-8.

Bouvet, A. (1997). [Invasive infections by *Streptococcus viridans* (oral streptococci) excluding pneumococci]. *Presse Med* 26(37): 1768-73.

Bouvet, A., Geslin, P., Kriz-Kuzemenska, P., Blanc, V., Devine, C. and Grimont, F. (1994). Restricted association between biotypes and serotypes within group A streptococci. *J Clin Microbiol* 32(5): 1312-7.

Bradley, K., Scatizzi, J. C., Fiore, S., Shamiyeh, E., Koch, A. E., Firestein, G. S., Gorges, L. L., Kuntsman, K., Pope, R. M., Moore, T. L., Han, J. and Perlman, H. (2004). Retinoblastoma suppression of matrix metalloproteinase 1, but not interleukin-6, through a p38-dependent pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 50(1): 78-87.

Brady, L. J., Cvitkovitch, D. G., Geric, C. M., Addison, M. N., Joyce, J. C., Crowley, P. J. and Bleiweis, A. S. (1998). Deletion of the central proline-rich repeat domain results in altered antigenicity and lack of surface expression of the *Streptococcus mutans* P1 adhesin molecule. *Infect Immun* 66(9): 4274-82.

Brady, L. J., Piacentini, D. A., Crowley, P. J., Oyston, P. C. and Bleiweis, A. S. (1992). Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. *Infect Immun* 60(3): 1008-17.

Burger, D., Rezzonico, R., Li, J. M., Modoux, C., Pierce, R. A., Welgus, H. G. and Dayer, J. M. (1998). Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum* 41(10): 1748-59.

## C

Catrina, A. I., Ulfgren, A. K., Lindblad, S., Grondal, L. and Klareskog, L. (2002). Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 61(10): 934-6.

Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J. L. and Miossec, P. (1998). Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 161(1): 409-14.

Chabaud, M., Page, G. and Miossec, P. (2001). Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* 167(10): 6015-20.

Chabaud-Riou, M. and Firestein, G. S. (2004). Expression and activation of mitogen-activated protein kinase kinases-3 and -6 in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 164(1): 177-84.

Chan, O. T., Hannum, L. G., Haberman, A. M., Madaio, M. P. and Shlomchik, M. J. (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189(10): 1639-48.

- Chatenay-Rivauday, C., Yamodo, I., Sciotti, M. A., Ogier, J. A. and Klein, J. P. (1998). The A and the extended V N-terminal regions of streptococcal protein I/II<sub>f</sub> mediate the production of tumour necrosis factor alpha in the monocyte cell line THP-1. *Mol Microbiol* 29(1): 39-48.
- Cheema, G. S., Roschke, V., Hilbert, D. M. and Stohl, W. (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 44(6): 1313-9.
- Chen, T., Rimpilainen, M., Luukkainen, R., Mottonen, T., Yli-Jama, T., Jalava, J., Vainio, O. and Toivanen, P. (2003). Bacterial components in the synovial tissue of patients with advanced rheumatoid arthritis or osteoarthritis: analysis with gas chromatography-mass spectrometry and pan-bacterial polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 49(3): 328-34.
- Cheng, J. J., Wung, B. S., Chao, Y. J. and Wang, D. L. (2001). Sequential activation of protein kinase C (PKC)-alpha and PKC-epsilon contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. *J Biol Chem* 276(33): 31368-75.
- Cheon, H., Yu, S. J., Yoo, D. H., Chae, I. J., Song, G. G. and Sohn, J. (2002). Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clin Exp Immunol* 127(3): 547-52.
- Cho, M. L., Yoon, C. H., Hwang, S. Y., Park, M. K., Min, S. Y., Lee, S. H., Park, S. H. and Kim, H. Y. (2004). Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 50(3): 776-84.
- Choe, J. Y., Crain, B., Wu, S. R. and Corr, M. (2003). Interleukin 1 receptor dependence of serum transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. *J Exp Med* 197(4): 537-42.
- Chomarat, P., Rissoan, M. C., Pin, J. J., Banchereau, J. and Miossec, P. (1995). Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. *J Immunol* 155(7): 3645-52.
- Chung, W. O., Demuth, D. R. and Lamont, R. J. (2000). Identification of a Porphyromonas gingivalis receptor for the Streptococcus gordonii SspB protein. *Infect Immun* 68(12): 6758-62.
- Clase, K. L., Mitchell, P. J., Ward, P. J., Dorman, C. M., Johnson, S. E. and Hannon, K. (2000). FGF5 stimulates expansion of connective tissue fibroblasts and inhibits skeletal muscle development in the limb. *Dev Dyn* 219(3): 368-80.
- Clavel, G., Bessis, N. and Boissier, M. C. (2003). Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 70(5): 321-6.
- Clerk, A. and Sugden, P. H. (1998). The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Lett* 426(1): 93-6.
- Constantin, A., Dieude, P., Lauwers-Cances, V., Jamard, B., Mazieres, B., Cambon-Thomsen, A., Cornelis, F. and Cantagrel, A. (2004). Tumor necrosis factor receptor II gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50(3): 742-7.

Constantin, A., Lauwers-Cances, V., Navaux, F., Abbal, M., van Meerwijk, J., Mazieres, B., Cambon-Thomsen, A. and Cantagrel, A. (2002). Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms: Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. *Arthritis Rheum* 46(7): 1754-62.

Constantin, A., Navaux, F., Lauwers-Cances, V., Abbal, M., van Meerwijk, J. P., Mazieres, B., Cambon-Thomsen, A. and Cantagrel, A. (2001). Interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 358(9298): 2051-2.

Cooper, L. A., Shen, T. L. and Guan, J. L. (2003). Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 23(22): 8030-41.

Costalonga, M., Hodges, J. S. and Herzberg, M. C. (2002). Streptococcus sanguis modulates type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *J Immunol* 169(4): 2189-95.

Coykendall, A. L. (1989). Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev* 2(3): 315-28.

Cunnane, G., FitzGerald, O., Hummel, K. M., Gay, R. E., Gay, S. and Bresnihan, B. (1999). Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38(1): 34-42.

Cvetkovic, J. T., Wallberg-Jonsson, S., Stegmayr, B., Rantapaa-Dahlqvist, S. and Lefvert, A. K. (2002). Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. *J Rheumatol* 29(2): 212-9.

## D

Darnay, B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A. and Aggarwal, B. B. (1998). Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 273(32): 20551-5.

Dellacasagrande, J., Ghigo, E., Hammami, S. M., Toman, R., Raoult, D., Capo, C. and Mege, J. L. (2000). alpha(v)beta(3) integrin and bacterial lipopolysaccharide are involved in Coxiella burnetii-stimulated production of tumor necrosis factor by human monocytes. *Infect Immun* 68(10): 5673-8.

Demuth, D. R., Duan, Y., Brooks, W., Holmes, A. R., McNab, R. and Jenkinson, H. F. (1996). Tandem genes encode cell-surface polypeptides SspA and SspB which mediate adhesion of the oral bacterium Streptococcus gordonii to human and bacterial receptors. *Mol Microbiol* 20(2): 403-13.

Demuth, D. R., Golub, E. E. and Malamud, D. (1990). Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a Streptococcus sanguis receptor for a human salivary glycoprotein. *J Biol Chem* 265(13): 7120-6.

Demuth, D. R., Irvine, D. C., Costerton, J. W., Cook, G. S. and Lamont, R. J. (2001). Discrete protein determinant directs the species-specific adherence of Porphyromonas gingivalis to oral streptococci. *Infect Immun* 69(9): 5736-41.

Deng, G. M., Nilsson, I. M., Verdrengh, M., Collins, L. V. and Tarkowski, A. (1999). Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 5(6): 702-5.

Deon, D., Ahmed, S., Tai, K., Scaletta, N., Herrero, C., Lee, I. H., Krause, A. and Ivashkiv, L. B. (2001). Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* 167(9): 5395-403.

Dooley, S., Herlitzka, I., Hanselmann, R., Ermis, A., Henn, W., Remberger, K., Hopf, T. and Welter, C. (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.

Dunty, J. M., Gabarra-Niecko, V., King, M. L., Ceccarelli, D. F., Eck, M. J. and Schaller, M. D. (2004). FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Mol Cell Biol* 24(12): 5353-68.

## E

Edinger, J. W., Bonneville, M., Scotet, E., Houssaint, E., Schumacher, H. R. and Posnett, D. N. (1999). EBV gene expression not altered in rheumatoid synovia despite the presence of EBV antigen-specific T cell clones. *J Immunol* 162(6): 3694-701.

Edwards, J. C. (2000). Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res* 2(5): 344-7.

Edwards, J. C., Leigh, R. D. and Cambridge, G. (1997). Expression of molecules involved in B lymphocyte survival and differentiation by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 108(3): 407-14.

Edwards, J. C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D. R., Stevens, R. M. and Shaw, T. (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350(25): 2572-81.

Eerola, E., Mottonen, T., Hannonen, P., Luukkainen, R., Kantola, I., Vuori, K., Tuominen, J. and Toivanen, P. (1994). Intestinal flora in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 33(11): 1030-8.

Egland, P. G., Du, L. D. and Kolenbrander, P. E. (2001). Identification of independent *Streptococcus gordonii* SspA and SspB functions in coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun* 69(12): 7512-6.

Engels-Deutsch, M., Pini, A., Yamashita, Y., Shibata, Y., Haikel, Y., Scholler-Guinard, M. and Klein, J. P. (2003). Insertional inactivation of pac and rmlB genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect Immun* 71(9): 5169-77.

Euzeby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47(2): 590-2.

## F

- Faour, W. H., He, Y., He, Q. W., de Ladurantaye, M., Quintero, M., Mancini, A. and Di Battista, J. A. (2001). Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 276(34): 31720-31.
- Firestein, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423(6937): 356-61.
- Firestein, G. S., Echeverri, F., Yeo, M., Zvaifler, N. J. and Green, D. R. (1997). Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10895-900.
- Firestein, G. S. and Manning, A. M. (1999). Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 42(4): 609-21.
- Firestein, G. S. and Paine, M. M. (1992). Stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 140(6): 1309-14.
- Firestein, G. S. and Zvaifler, N. J. (2002). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 46(2): 298-308.
- Fischetti, V. A. (1991). Streptococcal M protein. *Sci Am* 264(6): 58-65.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomar, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J. and Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183(6): 2593-603.
- Franz, J. K., Kolb, S. A., Hummel, K. M., Lahrtz, F., Neidhart, M., Aicher, W. K., Pap, T., Gay, R. E., Fontana, A. and Gay, S. (1998). Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 28(9): 2661-71.
- Franz, J. K., Pap, T., Hummel, K. M., Nawrath, M., Aicher, W. K., Shigeyama, Y., Müller-Ladner, U., Gay, R. E. and Gay, S. (2000). Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(3): 599-607.
- Funakoshi-Tago, M., Sonoda, Y., Tanaka, S., Hashimoto, K., Tago, K., Tominaga, S. and Kasahara, T. (2003). Tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappaB activation is impaired in focal adhesion kinase-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* 278(31): 29359-65.

## G

- Galdiero, M., D'Isanto, M., Vitiello, M., Finamore, E. and Peluso, L. (2001). Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induce TNF-alpha, IL-6 and IL-8 release by CD14-independent and CD11a/CD18-dependent mechanisms. *Microbiology* 147(Pt 10): 2697-704.

- Gao, B. and Tsan, M. F. (2003). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* 278(1): 174-9.
- Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y. and Turka, L. A. (2004). Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* 172(10): 6065-73.
- Gemba, T., Valbracht, J., Alsalameh, S. and Lotz, M. (2002). Focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinases are involved in chondrocyte activation by the 29-kDa amino-terminal fibronectin fragment. *J Biol Chem* 277(2): 907-11.
- Georganas, C., Liu, H., Perlman, H., Hoffmann, A., Thimmapaya, B. and Pope, R. M. (2000). Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol* 165(12): 7199-206.
- Gerard, H. C., Wang, Z., Wang, G. F., El-Gabalawy, H., Goldbach-Mansky, R., Li, Y., Majeed, W., Zhang, H., Ngai, N., Hudson, A. P. and Schumacher, H. R. (2001). Chromosomal DNA from a variety of bacterial species is present in synovial tissue from patients with various forms of arthritis. *Arthritis Rheum* 44(7): 1689-97.
- Girard, D., Paquet, M. E., Paquin, R. and Beaulieu, A. D. (1996). Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88(8): 3176-84.
- Gong, J. H., Ratkay, L. G., Waterfield, J. D. and Clark-Lewis, I. (1997). An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J Exp Med* 186(1): 131-7.
- Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. (2004). T-cell regulation in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16(3): 212-7.
- Goto, M., Yoshinoya, S., Miyamoto, T., Sasano, M., Okamoto, M., Nishioka, K., Terato, K. and Nagai, Y. (1988). Stimulation of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta release from human monocytes by cyanogen bromide peptides of type II collagen. *Arthritis Rheum* 31(12): 1508-14.
- Gourieux, B., Al-Okla, S., Scholler-Guinard, M., Klein, J., Sibilica, J. and Wachsmann, D. (2001). Pro-inflammatory cytokine production by synoviocytes following exposure to protein I/II, a modulin from oral streptococci. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30(1): 13-9.
- Gracie, J. A., Forsey, R. J., Chan, W. L., Gilmour, A., Leung, B. P., Greer, M. R., Kennedy, K., Carter, R., Wei, X. Q., Xu, D., Field, M., Foulis, A., Liew, F. Y. and McInnes, I. B. (1999). A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 104(10): 1393-401.
- Grant, E. P., Picarella, D., Burwell, T., Delaney, T., Croci, A., Avitahl, N., Humbles, A. A., Gutierrez-Ramos, J. C., Briskin, M., Gerard, C. and Coyle, A. J. (2002). Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J Exp Med* 196(11): 1461-71.
- Gravallese, E. M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E. and Goldring, S. R. (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43(2): 250-8.

Gravallese, E. M., Pettit, A. R., Lee, R., Madore, R., Manning, C., Tsay, A., Gaspar, J., Goldring, M. B., Goldring, S. R. and Oettgen, P. (2003). Angiopoietin-1 is expressed in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and is induced by tumour necrosis factor alpha. *Ann Rheum Dis* 62(2): 100-7.

Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1): 131-8.

Gregersen, P. K., Silver, J. and Winchester, R. J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30(11): 1205-13.

Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M. A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R. A., Sato, V., Harding, M. W., Livingston, D. J. and Su, M. S. (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275(5297): 206-9.

## H

Hamann, J., Wishaupt, J. O., van Lier, R. A., Smeets, T. J., Breedveld, F. C. and Tak, P. P. (1999). Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 42(4): 650-8.

Han, Z., Boyle, D. L., Aupperle, K. R., Bennett, B., Manning, A. M. and Firestein, G. S. (1999). Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 291(1): 124-30.

Han, Z., Boyle, D. L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., Manning, A. M. and Firestein, G. S. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108(1): 73-81.

Han, Z., Boyle, D. L., Manning, A. M. and Firestein, G. S. (1998). AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 28(4): 197-208.

Han, Z., Chang, L., Yamanishi, Y., Karin, M. and Firestein, G. S. (2002). Joint damage and inflammation in c-Jun N-terminal kinase 2 knockout mice with passive murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46(3): 818-23.

Harada, S., Yamamura, M., Okamoto, H., Morita, Y., Kawashima, M., Aita, T. and Makino, H. (1999). Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42(7): 1508-16.

Harashima, S. I., Tsukamoto, H. and Horiuchi, T. (2004). Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand expression in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 43(3): 396-7; author reply 397.

Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164(2): 944-53.

Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M. (1999). CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9305-10.

- Hashiramoto, A., Sano, H., Maekawa, T., Kawahito, Y., Kimura, S., Kusaka, Y., Wilder, R. L., Kato, H., Kondo, M. and Nakajima, H. (1999). C-myc antisense oligodeoxynucleotides can induce apoptosis and down-regulate Fas expression in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 42(5): 954-62.
- Hauck, C. R., Sieg, D. J., Hsia, D. A., Loftus, J. C., Gaarde, W. A., Monia, B. P. and Schlaepfer, D. D. (2001). Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res* 61(19): 7079-90.
- Haynes, D. R., Barg, E., Crotti, T. N., Holding, C., Weedon, H., Atkins, G. J., Zannettino, A., Ahern, M. J., Coleman, M., Roberts-Thomson, P. J., Kraan, M., Tak, P. P. and Smith, M. D. (2003). Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology (Oxford)* 42(1): 123-34.
- Hazeki, K., Masuda, N., Funami, K., Sukenobu, N., Matsumoto, M., Akira, S., Takeda, K., Seya, T. and Hazeki, O. (2003). Toll-like receptor-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol* 33(3): 740-7.
- Hedbom, E. and Hauselmann, H. J. (2002). Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 59(1): 45-53.
- Henneke, P., Takeuchi, O., Malley, R., Lien, E., Ingalls, R. R., Freeman, M. W., Mayadas, T., Nizet, V., Akira, S., Kasper, D. L. and Golenbock, D. T. (2002). Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against group B streptococcus involve parallel myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling pathways. *J Immunol* 169(7): 3970-7.
- Henneke, P., Takeuchi, O., van Strijp, J. A., Guttormsen, H. K., Smith, J. A., Schromm, A. B., Espevik, T. A., Akira, S., Nizet, V., Kasper, D. L. and Golenbock, D. T. (2001). Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. *J Immunol* 167(12): 7069-76.
- Hickman, E. S., Moroni, M. C. and Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 60-6.
- Hill, J. A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A. M., Bell, D. A. and Cairns, E. (2003). Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171(2): 538-41.
- Hirohata, S., Yanagida, T., Itoh, K., Nakamura, H., Yoshino, S., Tomita, T. and Ochi, T. (1996). Accelerated generation of CD14<sup>+</sup> monocyte-lineage cells from the bone marrow of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 39(5): 836-43.
- Hirth, A., Skapenko, A., Kinne, R. W., Emmrich, F., Schulze-Koops, H. and Sack, U. (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.

Holmes, A. R., McNab, R. and Jenkinson, H. F. (1996). *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. *Infect Immun* 64(11): 4680-5.

Honda, S., Migita, K., Hirai, Y., Origuchi, T., Yamasaki, S., Kamachi, M., Shibatomi, K., Fukuda, T., Kita, M., Hida, A., Ida, H., Aoyagi, T., Kawakami, A., Kawabe, Y., Oizumi, K. and Eguchi, K. (2001). Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 126(1): 131-6.

Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. and Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420(6913): 329-33.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162(7): 3749-52.

Hulkower, K. I., Wertheimer, S. J., Levin, W., Coffey, J. W., Anderson, C. M., Chen, T., DeWitt, D. L., Crowl, R. M., Hope, W. C. and Morgan, D. W. (1994). Interleukin-1 beta induces cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. Evidence for their roles in the production of prostaglandin E2. *Arthritis Rheum* 37(5): 653-61.

Hummel, K. M., Petrow, P. K., Franz, J. K., Müller-Ladner, U., Aicher, W. K., Gay, R. E., Bromme, D. and Gay, S. (1998). Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol* 25(10): 1887-94.

## I

Inoue, H., Takamori, M., Nagata, N., Nishikawa, T., Oda, H., Yamamoto, S. and Koshihara, Y. (2001). An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 50(2): 65-72.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. and Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388(6638): 190-5.

Ishikawa, H., Hirata, S., Andoh, Y., Kubo, H., Nakagawa, N., Nishibayashi, Y. and Mizuno, K. (1996). An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 16(2): 53-60.

Iwahashi, M., Yamamura, M., Aita, T., Okamoto, A., Ueno, A., Ogawa, N., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P. J. and Makino, H. (2004). Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50(5): 1457-67.

## J

Jackson, J. R., Minton, J. A., Ho, M. L., Wei, N. and Winkler, J. D. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta. *J Rheumatol* 24(7): 1253-9.

Jacobs, M. R. (1997). Respiratory tract infection: epidemiology and surveillance. *J Chemother* 9 Suppl 3: 10-7.

Jefferies, C. A., Doyle, S., Brunner, C., Dunne, A., Brint, E., Wietek, C., Walch, E., Wirth, T. and O'Neill, L. A. (2003). Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 278(28): 26258-64.

Jefferies, C. A. and O'Neill, L. A. (2004). Bruton's tyrosine kinase (Btk)-the critical tyrosine kinase in LPS signalling? *Immunol Lett* 92(1-2): 15-22.

Jenkinson, H. F. and Demuth, D. R. (1997). Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol* 23(2): 183-90.

Jenkinson, H. F. and Lamont, R. J. (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 8(2): 175-200.

Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D. M., Hofhuis, F. M., Boackle, S. A., Takahashi, K., Holers, V. M., Walport, M., Gerard, C., Ezekowitz, A., Carroll, M. C., Brenner, M., Weissleder, R., Verbeek, J. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C. and Mathis, D. (2002). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16(2): 157-68.

Jimi, E., Nakamura, I., Duong, L. T., Ikebe, T., Takahashi, N., Rodan, G. A. and Suda, T. (1999). Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* 247(1): 84-93.

Joao, C., Ogle, B. M., Gay-Rabinstein, C., Platt, J. L. and Cascalho, M. (2004). B cell-dependent TCR diversification. *J Immunol* 172(8): 4709-16.

Joosten, L. A., Koenders, M. I., Smeets, R. L., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M. M., Takeda, K., Akira, S., Lubberts, E., van de Loo, F. A. and van den Berg, W. B. (2003). Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 171(11): 6145-53.

Joosten, L. A., Radstake, T. R., Lubberts, E., van den Bersselaar, L. A., van Riel, P. L., van Lent, P. L., Barrera, P. and van den Berg, W. B. (2003). Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(2): 339-47.

Joosten, L. A., van De Loo, F. A., Lubberts, E., Helsen, M. M., Netea, M. G., van Der Meer, J. W., Dinarello, C. A. and van Den Berg, W. B. (2000). An IFN-gamma-independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. *J Immunol* 165(11): 6553-8.

Jovanovic, D. V., Di Battista, J. A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F. C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F. and Pelletier, J. P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160(7): 3513-21.

Jovanovic, D. V., Martel-Pelletier, J., Di Battista, J. A., Mineau, F., Jolicoeur, F. C., Benderdour, M. and Pelletier, J. P. (2000). Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(5): 1134-44.

## K

Karin, M. (1996). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351(1336): 127-34.

Kasperkovitz, P. V., Verbeet, N. L., Smeets, T. J., van Rietschoten, J. G., Kraan, M. C., van der Pouw Kraan, T. C., Tak, P. P. and Verweij, C. L. (2004). Activation of the STAT1 pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63(3): 233-9.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11(1): 115-22.

Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J. I., Uematsu, S., Takeuchi, O. and Akira, S. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*.

Kelly, C. G., Todryk, S., Kendal, H. L., Munro, G. H. and Lehner, T. (1995). T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. *Infect Immun* 63(9): 3649-58.

Kempell, K. E., Cox, C. J., Hurle, M., Wong, A., Wilkie, S., Zanders, E. D., Gaston, J. S. and Crowe, J. S. (2000). Reverse transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritis synovial tissue. *Infect Immun* 68(10): 6012-26.

Keyszer, G., Redlich, A., Haupl, T., Zacher, J., Sparmann, M., Engethum, U., Gay, S. and Burmester, G. R. (1998). Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum* 41(8): 1378-87.

Keyszer, G. M., Heer, A. H., Kriegsmann, J., Geiler, T., Trabandt, A., Keysser, M., Gay, R. E. and Gay, S. (1995). Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, by in situ hybridization. *Arthritis Rheum* 38(7): 976-84.

Kilic A. O., H. M. C., Zhao X, Meyer M. W., Tao L. (1998). 98th annual congress of the ASM, Atlanta, GA, USA.

Kim, G., Jun, J. B. and Elkon, K. B. (2002). Necessary role of phosphatidylinositol 3-kinase in transforming growth factor beta-mediated activation of Akt in normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46(6): 1504-11.

- Kinne, R. W., Brauer, R., Stuhlmuller, B., Palombo-Kinne, E. and Burmester, G. R. (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2(3): 189-202.
- Klimiuk, P. A., Yang, H., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. (1999). Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol* 90(1): 65-78.
- Koga, T., Oho, T., Shimazaki, Y. and Nakano, Y. (2002). Immunization against dental caries. *Vaccine* 20(16): 2027-44.
- Komai-Koma, M., Gracie, J. A., Wei, X. Q., Xu, D., Thomson, N., McInnes, I. B. and Liew, F. Y. (2003). Chemoattraction of human T cells by IL-18. *J Immunol* 170(2): 1084-90.
- Kong, Y. Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E. R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., Lacey, D. L., Fish, E., Boyle, W. J. and Penninger, J. M. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402(6759): 304-9.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F. and Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10(3): 387-98.
- Konttinen, Y. T., Li, T. F., Hukkanen, M., Ma, J., Xu, J. W. and Virtanen, I. (2000). Fibroblast biology. Signals targeting the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res* 2(5): 348-55.
- Korganow, A. S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J. L., Benoist, C. and Mathis, D. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10(4): 451-61.
- Koshy, P. J., Henderson, N., Logan, C., Life, P. F., Cawston, T. E. and Rowan, A. D. (2002). Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* 61(8): 704-13.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., Martin, T. J. and Suda, T. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103(9): 1345-52.
- Kraan, M. C., Haringman, J. J., Weedon, H., Barg, E. C., Smith, M. D., Ahern, M. J., Smeets, T. J., Breedveld, F. C. and Tak, P. P. (2004). T cells, fibroblast-like synoviocytes, and granzyme B+ cytotoxic cells are associated with joint damage in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63(5): 483-8.
- Krause, A., Scaletta, N., Ji, J. D. and Ivashkiv, L. B. (2002). Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol* 169(11): 6610-6.
- Kremer, J. M., Westhovens, R., Leon, M., Di Giorgio, E., Alten, R., Steinfeld, S., Russell, A., Dougados, M., Emery, P., Nuamah, I. F., Williams, G. R., Becker, J. C., Hagerty, D. T. and Moreland, L. W. (2003). Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 349(20): 1907-15.

Kroger, A., Koster, M., Schroeder, K., Hauser, H. and Mueller, P. P. (2002). Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* 22(1): 5-14.

Kuenzler, P., Kuchen, S., Rihoskova, V., Michel, B. A., Gay, R. E., Neidhart, M., Gay, S. and Seemayer, C. A. (2003). Induction of p16 at sites of cartilage invasion in the SCID mouse coimplantation model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(7): 2069-73.

Kurowska, M., Rudnicka, W., Kontny, E., Janicka, I., Chorazy, M., Kowalczewski, J., Ziolkowska, M., Ferrari-Lacraz, S., Strom, T. B. and Maslinski, W. (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.

Kyburz, D., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Gay, R. E., Carson, D. A. and Gay, S. (2003). Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum* 48(3): 642-50.

## L

Lacey, D., Sampey, A., Mitchell, R., Bucala, R., Santos, L., Leech, M. and Morand, E. (2003). Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 48(1): 103-9.

Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W. J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2): 165-76.

Lader, C. S. and Flanagan, A. M. (1998). Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 139(7): 3157-64.

Lai, K. M. and Pawson, T. (2000). The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev* 14(9): 1132-45.

LaPolla, R. J., Haron, J. A., Kelly, C. G., Taylor, W. R., Bohart, C., Hendricks, M., Pyati, J. P., Graff, R. T., Ma, J. K. and Lehner, T. (1991). Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*. *Infect Immun* 59(8): 2677-85.

Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416(6881): 603-7.

Lee, D. M., Friend, D. S., Gurish, M. F., Benoist, C., Mathis, D. and Brenner, M. B. (2002). Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 297(5587): 1689-92.

Lee, F. S., Peters, R. T., Dang, L. C. and Maniatis, T. (1998). MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9319-24.

- Leech, M., Lacey, D., Xue, J. R., Santos, L., Hutchinson, P., Wolvetang, E., David, J. R., Bucala, R. and Morand, E. F. (2003). Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 48(7): 1881-9.
- Leech, M., Metz, C., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S. R., Bucala, R. and Morand, E. F. (1999). Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 42(8): 1601-8.
- Lemaire, R., Huet, G., Zerimech, F., Grard, G., Fontaine, C., Duquesnoy, B. and Flipo, R. M. (1997). Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol* 36(7): 735-43.
- Leu, T. H. and Maa, M. C. (2002). Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *Oncogene* 21(46): 6992-7000.
- Leu, T. H., Su, S. L., Chuang, Y. C. and Maa, M. C. (2003). Direct inhibitory effect of curcumin on Src and focal adhesion kinase activity. *Biochem Pharmacol* 66(12): 2323-31.
- Lindhout, E., van Eijk, M., van Pel, M., Lindeman, J., Dinant, H. J. and de Groot, C. (1999). Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *J Immunol* 162(10): 5949-56.
- Liote, F., Boval-Boizard, B., Weill, D., Kuntz, D. and Wautier, J. L. (1996). Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol* 106(1): 13-9.
- Liu, Z. Q., Deng, G. M., Foster, S. and Tarkowski, A. (2001). Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis. *Arthritis Res* 3(6): 375-80.
- Love, R. M., McMillan, M. D. and Jenkinson, H. F. (1997). Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun* 65(12): 5157-64.
- Love, R. M., McMillan, M. D., Park, Y. and Jenkinson, H. F. (2000). Coinvasion of dentinal tubules by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii* depends upon binding specificity of streptococcal antigen I/II adhesin. *Infect Immun* 68(3): 1359-65.
- Lu, J., Kasama, T., Kobayashi, K., Yoda, Y., Shiozawa, F., Hanyuda, M., Negishi, M., Ide, H. and Adachi, M. (2000). Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 164(11): 5922-7.

## M

- Mackay, F. and Browning, J. L. (2002). BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2(7): 465-75.
- Mackay, F. and Mackay, C. R. (2002). The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity. *Trends Immunol* 23(3): 113-5.

- Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J. and Browning, J. L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190(11): 1697-710.
- Mangialaio, S., Ji, H., Korganow, A. S., Kouskoff, V., Benoist, C. and Mathis, D. (1999). The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a model of spontaneous arthritis. *Arthritis Rheum* 42(12): 2517-23.
- Maret, M., Chicheportiche, R., Dayer, J. M. and Gabay, C. (2004). Production of intracellular IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1Ra isoforms by activated human dermal and synovial fibroblasts: phenotypic differences between human dermal and synovial fibroblasts. *Cytokine* 25(5): 193-203.
- Marriott, I., Hughes, F. M., Jr. and Bost, K. L. (2002). Bacterial infection of osteoblasts induces interleukin-1beta and interleukin-18 transcription but not protein synthesis. *J Interferon Cytokine Res* 22(10): 1049-55.
- Matsumoto, I., Maccioni, M., Lee, D. M., Maurice, M., Simmons, B., Brenner, M., Mathis, D. and Benoist, C. (2002). How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 3(4): 360-5.
- Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 286(5445): 1732-5.
- Matsumoto, S., Müller-Ladner, U., Gay, R. E., Nishioka, K. and Gay, S. (1996). Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 23(8): 1345-52.
- Mattey, D. L., Nixon, N. B., Dawes, P. T., Ollier, W. E. and Hajeer, A. H. (2004). Association of matrix metalloproteinase 3 promoter genotype with disease outcome in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 5(2): 147-9.
- McInnes, I. B., al-Mughales, J., Field, M., Leung, B. P., Huang, F. P., Dixon, R., Sturrock, R. D., Wilkinson, P. C. and Liew, F. Y. (1996). The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2(2): 175-82.
- McInnes, I. B., Leung, B. P., Field, M., Wei, X. Q., Huang, F. P., Sturrock, R. D., Kinninmonth, A., Weidner, J., Mumford, R. and Liew, F. Y. (1996). Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 184(4): 1519-24.
- McInnes, I. B., Leung, B. P., Sturrock, R. D., Field, M. and Liew, F. Y. (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 3(2): 189-95.
- McInnes, I. B. and Liew, F. Y. (1998). Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 19(2): 75-9.
- Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med* 343(5): 338-44.

- Mehindate, K., al-Daccak, R., Dayer, J. M., Kennedy, B. P., Kris, C., Borgeat, P., Poubelle, P. E. and Mourad, W. (1995). Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E2. Evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2. *J Immunol* 155(7): 3570-7.
- Meng, F. and Lowell, C. A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 185(9): 1661-70.
- Mengshol, J. A., Mix, K. S. and Brinckerhoff, C. E. (2002). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark? *Arthritis Rheum* 46(1): 13-20.
- Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Castresana, J. S. and Klein-Szanto, A. J. (2003). Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. *Int J Cancer* 106(5): 676-82.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. and Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 5(5): 503-7.
- Miagkov, A. V., Kovalenko, D. V., Brown, C. E., Didsbury, J. R., Cogswell, J. P., Stimpson, S. A., Baldwin, A. S. and Makarov, S. S. (1998). NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13859-64.
- Michelsen, K. S., Aicher, A., Mohaupt, M., Hartung, T., Dimmeler, S., Kirschning, C. J. and Schumann, R. R. (2001). The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem* 276(28): 25680-6.
- Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M. and Julkunen, I. (1998). Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 66(12): 6058-62.
- Miotla, J., Maciewicz, R., Kendrew, J., Feldmann, M. and Paleolog, E. (2000). Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis. *Lab Invest* 80(8): 1195-205.
- Miyazawa, K., Mori, A., Miyata, H., Akahane, M., Ajisawa, Y. and Okudaira, H. (1998). Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273(38): 24832-8.
- Miyazawa, K., Mori, A., Yamamoto, K. and Okudaira, H. (1998). Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1. *Am J Pathol* 152(3): 793-803.
- Mohr, W., Hummler, N., Pelster, B. and Wessinghage, D. (1986). Proliferation of pannus tissue cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 6(3): 127-32.

- Moisset, A., Schatz, N., Lepoivre, Y., Amadio, S., Wachsmann, D., Scholler, M. and Klein, J. P. (1994). Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. *Infect Immun* 62(1): 184-93.
- Möller, B., Kukoc-Zivojnov, N., Kessler, U., Rehart, S., Kaltwasser, J. P., Hoelzer, D., Kalina, U. and Ottmann, O. G. (2001). Expression of interleukin-18 and its monokine-directed function in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 40(3): 302-9.
- Monick, M. M., Powers, L., Butler, N., Yarovinsky, T. and Hunninghake, G. W. (2002). Interaction of matrix with integrin receptors is required for optimal LPS-induced MAP kinase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(2): L390-402.
- Mori, N., Mukaida, N., Ballard, D. W., Matsushima, K. and Yamamoto, N. (1998). Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates human interleukin 8 gene through acting concurrently on AP-1 and nuclear factor-kappaB-like sites. *Cancer Res* 58(17): 3993-4000.
- Mousavi-Jazi, M., Bostrom, L., Lovmark, C., Linde, A., Brytting, M. and Sundqvist, V. A. (1998). Infrequent detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 25(4): 623-8.
- Muller, M., Eugster, H. P., Le Hir, M., Shakhov, A., Di Padova, F., Maurer, C., Quesniaux, V. F. and Ryffel, B. (1996). Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. *Mol Med* 2(2): 247-55.
- Müller-Ladner, U., Judex, M., Ballhorn, W., Kullmann, F., Distler, O., Schlottmann, K., Gay, R. E., Scholmerich, J. and Gay, S. (2000). Activation of the IL-4 STAT pathway in rheumatoid synovium. *J Immunol* 164(7): 3894-901.
- Müller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B. N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R. E. and Gay, S. (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.
- Murakami, Y., Nakano, Y., Yamashita, Y. and Koga, T. (1997). Identification of a frameshift mutation resulting in premature termination and loss of cell wall anchoring of the PAc antigen of *Streptococcus mutans* GS-5. *Infect Immun* 65(2): 794-7.
- Murayama, T., Ohara, Y., Obuchi, M., Khabar, K. S., Higashi, H., Mukaida, N. and Matsushima, K. (1997). Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol* 71(7): 5692-5.
- Murphy, G., Knauper, V., Atkinson, S., Butler, G., English, W., Hutton, M., Stracke, J. and Clark, I. (2002). Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S39-49.
- Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378(3-4): 151-60.

## N

- Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274(31): 21491-4.

Nagashima, M., Tanaka, H., Takahashi, H., Tachihara, A., Tanaka, K., Ishiwata, T., Asano, G. and Yoshino, S. (2002). Study of the mechanism involved in angiogenesis and synovial cell proliferation in human synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis using SCID mice. *Lab Invest* 82(8): 981-8.

Nakahara, H., Song, J., Sugimoto, M., Hagihara, K., Kishimoto, T., Yoshizaki, K. and Nishimoto, N. (2003). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(6): 1521-9.

Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H. and Sakai, H. (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.

Nakatsuka, K., Tanaka, Y., Hubscher, S., Abe, M., Wake, A., Saito, K., Morimoto, I. and Eto, S. (1997). Rheumatoid synovial fibroblasts are stimulated by the cellular adhesion to T cells through lymphocyte function associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1. *J Rheumatol* 24(3): 458-64.

Nanki, T., Hayashida, K., El-Gabalawy, H. S., Suson, S., Shi, K., Girschick, H. J., Yavuz, S. and Lipsky, P. E. (2000). Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 165(11): 6590-8.

Neumann, E., Barnum, S. R., Turner, I. H., Echols, J., Fleck, M., Judex, M., Kullmann, F., Mountz, J. D., Scholmerich, J., Gay, S. and Müller-Ladner, U. (2002). Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 46(4): 934-45.

Nieto, A., Caliz, R., Pascual, M., Mataran, L., Garcia, S. and Martin, J. (2000). Involvement of Fc gamma receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(4): 735-9.

Nishimoto, N., Ito, A., Ono, M., Tagoh, H., Matsumoto, T., Tomita, T., Ochi, T. and Yoshizaki, K. (2000). IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor. *Int Immunol* 12(2): 187-93.

Notoya, K., Jovanovic, D. V., Reboul, P., Martel-Pelletier, J., Mineau, F. and Pelletier, J. P. (2000). The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 165(6): 3402-10.

## O

Ogasawara, H., Takeda-Hirokawa, N., Sekigawa, I., Hashimoto, H., Kaneko, Y. and Hirose, S. (1999). Inhibitory effect of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4+ T cells. *Immunology* 96(2): 215-9.

Ogier, J. A., Klein J. P. (1997). Aspects infectieux des pathologies dentaires et parodontales. *Med Ther* 3: 158-182.

O'Gradaigh, D., Ireland, D., Bord, S. and Compston, J. E. (2004). Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor alpha, interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclasts. *Ann Rheum Dis* 63(4): 354-9.

Oh, J. W., Van Wagoner, N. J., Rose-John, S. and Benveniste, E. N. (1998). Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression. *J Immunol* 161(9): 4992-9.

Okamoto, H., Yamamura, M., Morita, Y., Harada, S., Makino, H. and Ota, Z. (1997). The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40(6): 1096-105.

O'Keefe, R. J., Crabb, I. D., Puzas, J. E. and Rosier, R. N. (1992). Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 7(4): 397-404.

Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C. F., Chang, H. M. and Yeh, E. T. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157(10): 4277-81.

Olee, T., Hashimoto, S., Quach, J. and Lotz, M. (1999). IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 162(2): 1096-100.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. and Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4(2): 161-7.

Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W. and Hanks, S. K. (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* 19(7): 4806-18.

## P

Pap, T., Aupperle, K. R., Gay, S., Firestein, G. S. and Gay, R. E. (2001). Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. *Arthritis Rheum* 44(3): 676-81.

Pap, T., Franz, J. K., Hummel, K. M., Jeisy, E., Gay, R. and Gay, S. (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.

Pap, T., Shigeyama, Y., Kuchen, S., Fernihough, J. K., Simmen, B., Gay, R. E., Billingham, M. and Gay, S. (2000). Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(6): 1226-32.

Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116(Pt 8): 1409-16.

Peltonen, R., Nenonen, M., Helve, T., Hanninen, O., Toivanen, P. and Eerola, E. (1997). Faecal microbial flora and disease activity in rheumatoid arthritis during a vegan diet. *Br J Rheumatol* 36(1): 64-8.

Perlman, H., Bradley, K., Liu, H., Cole, S., Shamiyeh, E., Smith, R. C., Walsh, K., Fiore, S., Koch, A. E., Firestein, G. S., Haines, G. K., 3rd and Pope, R. M. (2003). IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J Immunol* 170(2): 838-45.

Petrow, P. K., Hummel, K. M., Schedel, J., Franz, J. K., Klein, C. L., Müller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Chang, P. L., Prince, C. W., Gay, R. E. and Gay, S. (2000). Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 43(7): 1597-605.

Pettit, A. R., Ji, H., von Stechow, D., Muller, R., Goldring, S. R., Choi, Y., Benoist, C. and Gravallese, E. M. (2001). TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 159(5): 1689-99.

Pierer, M., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Brentano, F., Wagner, U., Hantzschel, H., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S. and Kyburz, D. (2004). Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol* 172(2): 1256-65.

Plater-Zyberk, C., Hoogewerf, A. J., Proudfoot, A. E., Power, C. A. and Wells, T. N. (1997). Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. *Immunol Lett* 57(1-3): 117-20.

Plater-Zyberk, C., Joosten, L. A., Helsen, M. M., Sattouet-Roche, P., Siegfried, C., Alouani, S., van De Loo, F. A., Graber, P., Aloni, S., Cirillo, R., Lubberts, E., Dinarello, C. A., van Den Berg, W. B. and Chvatchko, Y. (2001). Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. *J Clin Invest* 108(12): 1825-32.

Plows, D., Kontogeorgos, G. and Kollias, G. (1999). Mice lacking mature T and B lymphocytes develop arthritic lesions after immunization with type II collagen. *J Immunol* 162(2): 1018-23.

Pufe, T., Bartscher, M., Petersen, W., Tillmann, B. and Mentlein, R. (2003). Expression of pleiotrophin, an embryonic growth and differentiation factor, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(3): 660-7.

Puren, A. J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M. S. and Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-18 (IFN $\gamma$ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 $\beta$  via TNF $\alpha$  production from non-CD14 $^{+}$  human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 101(3): 711-21.

## Q

Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B. and Mackay, C. R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101(4): 746-54.

Qu, Z., Garcia, C. H., O'Rourke, L. M., Planck, S. R., Kohli, M. and Rosenbaum, J. T. (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.

Quinones, M. P., Ahuja, S. K., Jimenez, F., Schaefer, J., Garavito, E., Rao, A., Chenux, G., Reddick, R. L., Kuziel, W. A. and Ahuja, S. S. (2004). Experimental arthritis in CC chemokine receptor 2-null mice closely mimics severe human rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 113(6): 856-66.

## R

Radstake, T. R., Franke, B., Hanssen, S., Netea, M. G., Welsing, P., Barrera, P., Joosten, L. A., van Riel, P. L. and van den Berg, W. B. (2004). The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum* 50(3): 999-1001.

Rantapaa-Dahlqvist, S., de Jong, B. A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U. and van Venrooij, W. J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(10): 2741-9.

Reparon-Schuijt, C. C., van Esch, W. J., van Kooten, C., Rozier, B. C., Levarht, E. W., Breedveld, F. C. and Verweij, C. L. (2000). Regulation of synovial B cell survival in rheumatoid arthritis by vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) expressed on fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 43(5): 1115-21.

Richardson, A. and Parsons, T. (1996). A mechanism for regulation of the adhesion-associated proteintyrosine kinase pp125FAK. *Nature* 380(6574): 538-40.

Rinaldi, N., Barth, T., Henne, C., Mechterscheimer, G. and Moller, P. (1994). Synoviocytes in chronic synovitis in situ and cytokine stimulated synovial cells in vitro neo-express alpha 1, alpha 3 and alpha 5 chains of beta 1 integrins. *Virchows Arch* 425(2): 171-80.

Rinaldi, N., Schwarz-Eywill, M., Weis, D., Leppelmann-Jansen, P., Lukoschek, M., Keilholz, U. and Barth, T. F. (1997). Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis* 56(1): 45-51.

Romas, E., Gillespie, M. T. and Martin, T. J. (2002). Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 30(2): 340-6.

Rundegren, J. L. and Arnold, R. R. (1987). Bacteria-agglutinating characteristics of secretory IgA and a salivary agglutinin. *Adv Exp Med Biol* 216B: 1005-13.

Russell, M. W. and Mansson-Rahemtulla, B. (1989). Interaction between surface protein antigens of *Streptococcus mutans* and human salivary components. *Oral Microbiol Immunol* 4(2): 106-11.

## S

Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. V., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16): 2861-74.

- Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S. and Sakaguchi, S. (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426(6965): 454-60.
- Salmon, M., Scheel-Toellner, D., Huissoon, A. P., Pilling, D., Shamsadeen, N., Hyde, H., D'Angeac, A. D., Bacon, P. A., Emery, P. and Akbar, A. N. (1997). Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 99(3): 439-46.
- Sampey, A. V., Hall, P. H., Mitchell, R. A., Metz, C. N. and Morand, E. F. (2001). Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 44(6): 1273-80.
- Schedel, J., Gay, R. E., Kuenzler, P., Seemayer, C., Simmen, B., Michel, B. A. and Gay, S. (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.
- Schlaepfer, D. D., Jones, K. C. and Hunter, T. (1998). Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol* 18(5): 2571-85.
- Schmidt, D., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. (1996). CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest* 97(9): 2027-37.
- Schonland, S. O., Lopez, C., Widmann, T., Zimmer, J., Bryl, E., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. (2003). Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13471-6.
- Schrijver, I. A., Melief, M. J., Tak, P. P., Hazenberg, M. P. and Laman, J. D. (2000). Antigen-presenting cells containing bacterial peptidoglycan in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients coexpress costimulatory molecules and cytokines. *Arthritis Rheum* 43(10): 2160-8.
- Schuler, M. K., Sell, S. and Aicher, W. K. (2003). Protein kinase signals activate interleukin 16 encoding transcripts in rheumatoid arthritis versus osteoarthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 62(2): 182-3.
- Schulze-Koops, H., Davis, L. S., Haverty, T. P., Wacholtz, M. C. and Lipsky, P. E. (1998). Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a non-depleting humanized monoclonal antibody to CD4. *J Rheumatol* 25(11): 2065-76.
- Sciotti, M. A., Yamodo, I., Klein, J. P. and Ogier, J. A. (1997). The N-terminal half part of the oral streptococcal antigen I/II<sub>f</sub> contains two distinct binding domains. *FEMS Microbiol Lett* 153(2): 439-45.
- Seemayer, C. A., Kuchen, S., Kuenzler, P., Rihoskova, V., Rethage, J., Aicher, W. K., Michel, B. A., Gay, R. E., Kyburz, D., Neidhart, M. and Gay, S. (2003). Cartilage destruction mediated by synovial fibroblasts does not depend on proliferation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 162(5): 1549-57.

- Seemayer, C. A., Kuchen, S., Neidhart, M., Kuenzler, P., Rihoskova, V., Neumann, E., Pruschy, M., Aicher, W. K., Müller-Ladner, U., Gay, R. E., Michel, B. A., Firestein, G. S. and Gay, S. (2003). p53 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts at sites of invasion. *Ann Rheum Dis* 62(12): 1139-44.
- Seibl, R., Birchler, T., Loeliger, S., Hossle, J. P., Gay, R. E., Saurenmann, T., Michel, B. A., Seger, R. A., Gay, S. and Lauener, R. P. (2003). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 162(4): 1221-7.
- Seki, T., Selby, J., Haupl, T. and Winchester, R. (1998). Use of differential subtraction method to identify genes that characterize the phenotype of cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 41(8): 1356-64.
- Shouda, T., Yoshida, T., Hanada, T., Wakioka, T., Oishi, M., Miyoshi, K., Komiya, S., Kosai, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Nagata, K. and Yoshimura, A. (2001). Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108(12): 1781-8.
- Shuai, K. and Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3(11): 900-11.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H. and Schlaepfer, D. D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2(5): 249-56.
- Sieg, D. J., Ilic, D., Jones, K. C., Damsky, C. H., Hunter, T. and Schlaepfer, D. D. (1998). Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. *Embo J* 17(20): 5933-47.
- Silacci, P., Dayer, J. M., Desgeorges, A., Peter, R., Manueddu, C. and Guerne, P. A. (1998). Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. *J Biol Chem* 273(22): 13625-9.
- Skapenko, A., Wendler, J., Lipsky, P. E., Kalden, J. R. and Schulze-Koops, H. (1999). Altered memory T cell differentiation in patients with early rheumatoid arthritis. *J Immunol* 163(1): 491-9.
- Smith, R. S., Smith, T. J., Blieden, T. M. and Phipps, R. P. (1997). Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 151(2): 317-22.
- Soell, M., Holveck, F., Scholler, M., Wachsmann, R. D. and Klein, J. P. (1994). Binding of *Streptococcus mutans* SR protein to human monocytes: production of tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6. *Infect Immun* 62(5): 1805-12.
- Sommers, C. L., Byers, S. W., Thompson, E. W., Torri, J. A. and Gelmann, E. P. (1994). Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 31(2-3): 325-35.

Sone, H., Sakauchi, M., Takahashi, A., Suzuki, H., Inoue, N., Iida, K., Shimano, H., Toyoshima, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Matsuo, K. and Yamada, N. (2001). Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity. *Life Sci* 69(16): 1861-9.

Steuer, A., Blomley, M., Cosgrove, D., Maini, R. and Taylor, P. (2000). Combined power colour doppler and greyscale ultrasound demonstrate an association between vascularity and erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(Suppl): S152.

Sun, Y., Cheung, J. M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., Wenger, L., Altman, R. D., Howell, D. S. and Cheung, H. S. (2000). Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). *J Biol Chem* 275(15): 11327-32.

Sundarrajan, M., Boyle, D. L., Chabaud-Riou, M., Hammaker, D. and Firestein, G. S. (2003). Expression of the MAPK kinases MKK-4 and MKK-7 in rheumatoid arthritis and their role as key regulators of JNK. *Arthritis Rheum* 48(9): 2450-60.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34(4): 395-402.

Suzuki, Y., Rahman, M. and Mitsuya, H. (2001). Diverse transcriptional response of CD4(+) T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4(+) T cells. *J Immunol* 167(6): 3064-73.

Svelander, L., Erlandsson Harris, H., Lorentzen, J. C., Trollmo, C., Klareskog, L. and Bucht, A. (2004). Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce T cell-dependent arthritis in rats. *Arthritis Rheum* 50(1): 297-304.

## T

Tachibana, K., Urano, T., Fujita, H., Ohashi, Y., Kamiguchi, K., Iwata, S., Hirai, H. and Morimoto, C. (1997). Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J Biol Chem* 272(46): 29083-90.

Takahashi, Y., Murai, C., Shibata, S., Munakata, Y., Ishii, T., Ishii, K., Saitoh, T., Sawai, T., Sugamura, K. and Sasaki, T. (1998). Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8227-32.

Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P. J., Cofield, R. H., O'Fallon, W. M., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. (2001). Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 167(2): 1072-80.

Takemura, S., Klimiuk, P. A., Braun, A., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167(8): 4710-8.

- Takeuchi, O. and Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 1(4): 625-35.
- Tamamura, H., Fujisawa, M., Hiramatsu, K., Mizumoto, M., Nakashima, H., Yamamoto, N., Otaka, A. and Fujii, N. (2004). Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett* 569(1-3): 99-104.
- Taylor, J. M., Mack, C. P., Nolan, K., Regan, C. P., Owens, G. K. and Parsons, J. T. (2001). Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 21(5): 1565-72.
- Tebo, J., Der, S., Frevel, M., Khabar, K. S., Williams, B. R. and Hamilton, T. A. (2003). Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements. *J Biol Chem* 278(14): 12085-93.
- Theodore, A. C., Center, D. M., Nicoll, J., Fine, G., Kornfeld, H. and Cruikshank, W. W. (1996). CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 157(5): 1958-64.
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A. and Mier, J. W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83(1): 113-8.
- Toivanen, P., Vaahtovuori, J. and Eerola, E. (2001). Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infect Immun* 69(4): 2372-7.
- Tolboom, T. C., Pieterman, E., van der Laan, W. H., Toes, R. E., Huidekoper, A. L., Nelissen, R. G., Breedveld, F. C. and Huizinga, T. W. (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.
- Triantafyllou, K., Triantafyllou, M. and Dedrick, R. L. (2001). A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2(4): 338-45.
- Triantafyllou, M., Morath, S., Mackie, A., Hartung, T. and Triantafyllou, K. (2004). Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci* 117(Pt 17): 4007-14.
- Troffer-Charlier, N., Ogier, J., Moras, D. and Cavarelli, J. (2002). Crystal structure of the V-region of *Streptococcus mutans* antigen I/II at 2.4 Å resolution suggests a sugar preformed binding site. *J Mol Biol* 318(1): 179-88.
- Tsokos, G. C. (2004). B cells, be gone--B-cell depletion in the treatment of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350(25): 2546-8.

## V

- van der Heijden, I. M., Wilbrink, B., Tchvetverikov, I., Schrijver, I. A., Schouls, L. M., Hazenberg, M. P., Breedveld, F. C. and Tak, P. P. (2000). Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum* 43(3): 593-8.

van Gaalen, F. A., Linn-Rasker, S. P., van Venrooij, W. J., de Jong, B. A., Breedveld, F. C., Verweij, C. L., Toes, R. E. and Huizinga, T. W. (2004). Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 50(3): 709-15.

van Gaalen, F. A., Toes, R. E., Ditzel, H. J., Schaller, M., Breedveld, F. C., Verweij, C. L. and Huizinga, T. W. (2004). Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50(2): 395-9.

van Gaalen, F. A., van Aken, J., Huizinga, T. W., Schreuder, G. M., Breedveld, F. C., Zanelli, E., van Venrooij, W. J., Verweij, C. L., Toes, R. E. and de Vries, R. R. (2004). Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50(7): 2113-21.

Vankemmelbeke, M. N., Holen, I., Wilson, A. G., Ilic, M. Z., Handley, C. J., Kelner, G. S., Clark, M., Liu, C., Maki, R. A., Burnett, D. and Buttle, D. J. (2001). Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem* 268(5): 1259-68.

Vernier, A., Diab, M., Soell, M., Haan-Archipoff, G., Beretz, A., Wachsmann, D. and Klein, J. P. (1996). Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infect Immun* 64(8): 3016-22.

Versey P. M., H. S. D. (1998). ASM conference on streptococcal genetics, Vichy, France.

Visse, R. and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8): 827-39.

Vossenaar, E. R., Despres, N., Lapointe, E., Van Der Heijden, A., Lora, M., Senshu, T., Van Venrooij, W. J. and Menard, H. A. (2004). Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 6(2): R142-50.

## W

Wachsmann, D., Ackermans, F., Vincenzotto, C., Scholler, M., Bazin, H., Ogier, J. and Klein, J. P. (1989). Human IgG and *Streptococcus mutans* SR protein contain cross-reactive epitopes. *J Immunol* 143(12): 4257-62.

Waite, K. A. and Eng, C. (2002). Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 70(4): 829-44.

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

Wallengren, M. L., Ericson, D., Forsberg, B. and Johnson, U. (1991). Human leukocyte antigens in relation to colonization by mutans streptococci in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 6(5): 292-4.

Wang, A. Z., Wang, J. C., Fisher, G. W. and Diamond, H. S. (1997). Interleukin-1beta-stimulated invasion of articular cartilage by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by antibodies to specific integrin receptors and by collagenase inhibitors. *Arthritis Rheum* 40(7): 1298-307.

Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C. and Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94(5): 625-34.

Watanabe, N., Ando, K., Yoshida, S., Inuzuka, S., Kobayashi, M., Matsui, N. and Okamoto, T. (2002). Gene expression profile analysis of rheumatoid synovial fibroblast cultures revealing the overexpression of genes responsible for tumor-like growth of rheumatoid synovium. *Biochem Biophys Res Commun* 294(5): 1121-9.

Wilkinson, N. Z., Kingsley, G. H., Jones, H. W., Sieper, J., Braun, J. and Ward, M. E. (1999). The detection of DNA from a range of bacterial species in the joints of patients with a variety of arthritides using a nested, broad-range polymerase chain reaction. *Rheumatology (Oxford)* 38(3): 260-6.

Wipke, B. T. and Allen, P. M. (2001). Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167(3): 1601-8.

Wipke, B. T., Wang, Z., Kim, J., McCarthy, T. J. and Allen, P. M. (2002). Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography. *Nat Immunol* 3(4): 366-72.

Wong, B. R., Besser, D., Kim, N., Arron, J. R., Vologodskaya, M., Hanafusa, H. and Choi, Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 4(6): 1041-9.

Woodruff, T. M., Strachan, A. J., Dryburgh, N., Shiels, I. A., Reid, R. C., Fairlie, D. P. and Taylor, S. M. (2002). Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. *Arthritis Rheum* 46(9): 2476-85.

## Y

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301(5633): 640-3.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420(6913): 324-9.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169(12): 6668-72.

Yamamoto, M., Takeda, K. and Akira, S. (2004). TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 40(12): 861-8.

Yamamoto, S., Higuchi, Y., Yoshiyama, K., Shimizu, E., Kataoka, M., Hijiya, N. and Matsuura, K. (1999). ADAM family proteins in the immune system. *Immunol Today* 20(6): 278-84.

Yamamura, M., Kawashima, M., Taniyai, M., Yamauchi, H., Tanimoto, T., Kurimoto, M., Morita, Y., Ohmoto, Y. and Makino, H. (2001). Interferon-gamma-inducing activity of interleukin-18 in the joint with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44(2): 275-85.

Yang, H., Rittner, H., Weyand, C. M. and Goronzy, J. J. (1999). Aberrations in the primary T-cell receptor repertoire as a predisposition for synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Investig Med* 47(5): 236-45.

Yasuda, T., Shimizu, M., Nakagawa, T., Julovi, S. M. and Nakamura, T. (2003). Matrix metalloproteinase production by COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment in rheumatoid synovial cells. *Lab Invest* 83(2): 153-62.

Yoshino, S., Sasatomi, E., Mori, Y. and Sagai, M. (1999). Oral administration of lipopolysaccharide exacerbates collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 163(6): 3417-22.

Yudoh, K., Matsuno, H., Nakazawa, F., Yonezawa, T. and Kimura, T. (2000). Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(3): 617-27.

## Z

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303(5663): 1522-6.

Zhang, H. G., Wang, Y., Xie, J. F., Liang, X., Liu, D., Yang, P., Hsu, H. C., Ray, R. B. and Mountz, J. D. (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, X., Rimpilainen, M., Simelyte, E. and Toivanen, P. (2001). Characterisation of Eubacterium cell wall: peptidoglycan structure determines arthritogenicity. *Ann Rheum Dis* 60(3): 269-74.

Zhang, X., Rimpilainen, M., Simelyte, E. and Toivanen, P. (2001). Enzyme degradation and proinflammatory activity in arthritogenic and nonarthritogenic Eubacterium aerofaciens cell walls. *Infect Immun* 69(12): 7277-84.

Zhao, Q. and Lee, F. S. (1999). Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 274(13): 8355-8.