

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

ANNÉE 1996

NUMERO D'ORDRE:

Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé

**Présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de
Docteur en Biologie Cellulaire**

par

Raphaël LEMAIRE



**ETUDE DU PHENOTYPE TRANSFORME DES CELLULES
SYNOVIALES DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE**

soutenue le 9 décembre 1996 devant le jury composé de:

**Rapporteurs: Monsieur le Professeur Robert Lafyatis
Monsieur le Professeur Jacques Tebib**

**Examineurs: Monsieur le Professeur Benoni Boilly
Madame le Docteur Guillemette Huet**

Directeur de thèse: Monsieur le Professeur René-Marc Flipo

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Département de Rhumatologie (Hôpital Roger Salengro) au sein du Laboratoire de Culture Cellulaire (Faculté de Médecine) et de Biochimie (Hôpital Huriez), CH et U de Lille. Il a été soutenu financièrement par la D.R.E.D, l'Association de Recherche sur la Polyarthrite rhumatoïde (A.R.P.), le Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais et la Commission Mixte de Recherche Hospitalo-Universitaire (CH et U, Lille).

A Monsieur le Professeur René-Marc Flipo

C'est avec beaucoup de gentillesse que vous m'avez accueilli en acceptant de superviser mes recherches. Je vous remercie de m'avoir offert l'opportunité de présenter cette thèse. Vous m'avez donné tous les moyens pour réaliser mes recherches dans un cadre de totale liberté. Soyez assuré de l'expression de ma profonde reconnaissance et de toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Robert Lafyatis

C'est vous qui m'avait offert l'opportunité de débiter dans le domaine de la recherche. Nombre de choses j'ai apprises à votre contact. Vous êtes *ma* référence. Je vous remercie d'avoir accepté sans l'ombre d'une hésitation de participer au jury de cette thèse. Je tiens à vous exprimer mon respect et toute ma sympathie.

A Monsieur le Professeur Jacques Tebib

Malgré un emploi du temps chargé, vous avez accepté de juger ce travail. Je suis particulièrement sensible à cet honneur, et je tiens à vous en remercier. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de ma profonde estime.

A Monsieur le Professeur Benoni Boilly

Connaissant vos compétences scientifiques ainsi que l'étendue de vos connaissances, je tenais beaucoup à ce vous soyez membre de mon jury pour cette thèse. C'est avec beaucoup d'enthousiasme et de gentillesse que vous avez accepté. Je tenais à vous en remercier.

A Madame le Docteur Guillemette Huet

Notre collaboration a été un élément clé de la réalisation de ce travail. C'est grâce à vos connaissances dans le domaine des cathepsines que ce travail a pu aboutir. Soyez remerciée de votre collaboration et trouvez ici le témoignage de toute ma gratitude.

Merci également au **Professeur Degand** qui s'est souvent préoccupé de moi et de ma situation tout le long de ces trois années de thèse. Je lui témoigne ici toute ma sympathie.

Merci à **Georges Grard, Evelyne Dacquembronne, Farid Zerimech, Caroline Bisiaux et Alain Plockyn** pour leur aide technique: je leur dois certainement beaucoup.

Merci au **Professeur Anne Janin** qui par ses grandes compétences dans le domaine immunohistochimique m'a permis de valoriser ce travail de thèse.

Merci au **Professeur Fontaine** et au **Docteur Migaud** pour m'avoir régulièrement mis à disposition le fameux tissu synovial.

Merci au **Professeur Jean Lefèbvre** pour m'avoir permis l'utilisation de produits radioactifs sous sa responsabilité, et au **Professeur Jean Paul Dessaint** de m'avoir offert la possibilité de faire cette thèse.

Je tiens également à remercier **Julie Kerr-Conte** qui m'accueilli avec gentillesse et enthousiasme au Laboratoire de Culture Cellulaire. Son aide m'a été précieuse et souvent même indispensable.

Un grand merci également, et surtout, à **Annie Plé** et **Valéry Gmyr**, aussi bien pour leur aide que pour leur bonne humeur. Je me souviendrais longtemps des joyeux moments passés ensemble.

Merci à **Houcine Amrouni** qui m'a soutenu moralement en certains moments délicats.

Merci à ma famille, et en particulier à mes parents qui ont toujours répondu présent lorsque le besoin s'en faisait sentir.

Merci à tous ceux qui ont eu une influence positive sur mon travail...et même au-delà. Je sais qui ils sont, et eux seront se reconnaître.

Annick, merci.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I. GENERALITES SUR LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE	2
1. Présentation de la maladie	2
2. Historique de la PR	2
3. Diagnostic de la PR	2
4. PR et arthrose	3
5. Pathogénie de la PR	3
5.1. Agents prédisposants à la PR	4
5.2. Causes directes de la PR	5
5.2.1. Les agents infectieux	5
5.2.2. Les protéines de choc thermique	7
5.2.3. Le collagène de type II	7
5.2.4. Les facteurs rhumatoïdes	8
5.3. Migration des lymphocytes dans la synoviale rhumatoïde	9
II. TRANSFORMATION CELLULAIRE ET POLYARTHRITE RHUMATOIDE	15
1. Introduction	15
2. Rôle des cellules synoviales dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde	16
3. Caractère transformé des cellules synoviales du pannus	18
3.1. Métalloprotéases; collagénase et stromelysine	20
3.2. Cystéine protéases: cathepsines B et L	21
4. Transformation cellulaire et cytokines	22

PREMIERE PARTIE: REGULATION PAR LES CYTOKINES DE L'EXPRESSION ET DE LA SECRETION DES CATHEPSINES B ET L CHEZ LES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE	25
1. GENERALITES SUR LES CATHEPSINES B ET L	27
1.1. Trafic intracellulaire des cathepsines B et L	27
1.2. Cathepsines et transformation cellulaire	27
1.3. Cathepsines B et L dans la PR	29
2. INTRODUCTION	31
3. MATERIELS ET METHODES	33
3.1. Cytokines	33
3.2. Culture cellulaire et traitement par les cytokines	33
3.3. Dosage des cathepsines B et L en ELISA	34
3.4. Mesure des activités de type cathepsine B ou L	34
3.5. Northern blot et hybridation	35
3.6. Synthèse des sondes ADNc de cathepsine B et L	36
3.7. Western blot	36
3.8. Immunofluorescence	37
3.9. Microscopie électronique	37
3.10. RT-PCR de la région 5' de l'ARNm de la cathepsine B	38
4. RESULTATS	39
4.1. Régulation par les cytokines de la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique	39
4.1.1. Effet du TNF- α sur la sécrétion de cathepsine B	39
4.1.2. Effet du PDGF sur la sécrétion de cathepsine B	40
4.1.3. Effet du bFGF sur la sécrétion des cathepsines B et L	40
4.1.4. Effet de l'IFN- γ sur la sécrétion des cathepsines B et L	41
4.2. Régulation par les cytokines de la synthèse des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique	46
4.3. distribution intracellulaire des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique	47
4.4. Localisation ultrastructurale des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique	47
4.5. Régulation par les cytokines de l'expression des ARNm de cathepsine B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique	48
4.6. Analyse par Western blot des cathepsines B et L synthétisées et sécrétées par les cellules synoviales de type fibroblastique	49
4.7. Régulation par les cytokines de l'expression des ARNm délétés de l'exon 2 ou des exons 2 et 3 de la cathepsine B chez les cellules synoviales de type fibroblastique	50
5. DISCUSSION	59

DEUXIEME PARTIE: ETUDE DE L'EPISSAGE ALTERNATIF DE LA REGION 5'	
DU PRE-mRNA DE LA CATHEPSINE B	
DANS LE TISSU SYNOVIAL	
	69
1. INTRODUCTION	70
2. MATERIELS ET METHODES	72
2.1. Tissus synoviaux	72
2.2. Sonde ADNc de la cathepsine B	72
2.3. RT-PCR de la région 5' non traduite de la cathepsine B	72
2.4. Northern blot	73
3. RESULTATS	74
3.1. Identification des variants 5' de l'ARNm de la cathepsine B dans le tissu synovial humain	74
3.2. Quantification des variants 5' de l'ARNm de la cathepsine B dans le tissu synovial humain	74
3.3. Analyse de la région 3' non traduite de l'ARNm de cathepsine B	76
4. DISCUSSION	79
 TROISIEME PARTIE: ETUDE DES SIGNAUX INTRACELLULAIRES ASSOCIES	
A L'EXPRESSION DU PHENOTYPE TRANSFORME	
DES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE	
DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE	
	85
1. GENERALITES SUR L'ACTIVATION ONCOGENIQUE DANS LA PR	86
1.1. Contribution des oncogènes à la pathogénie de la PR	86
1.2. Induction oncogénique des cystéine protéases dans la PR: rôle de ras dans l'expression des cathepsines B et L	86
1.3. Induction oncogénique des métalloprotéases dans la PR: rôle de c-fos et ras dans l'expression de la collagénase	87
1.4. Oncogènes modulant la croissance cellulaire dans la PR: rôle de c-fos, c-ras et Rb dans le contrôle de la prolifération	88
1.5. Facteurs d'activation des oncogènes dans la PR	89
1.5.1. Rétrovirus et activation oncogénique	89
1.5.2. Cytokines et activation oncogénique	90

2. INTRODUCTION	95
3. MATERIELS ET METHODES	98
3.1. Obtention et culture des cellules synoviales humaines	98
3.2. Plasmides	98
3.3. Transfection	99
3.4. Test de prolifération cellulaire	100
3.5. Cytokines	100
3.6. Test de croissance cellulaire sans ancrage	100
3.7. Test de tumorigénicité	101
3.8. Analyse immunohistochimique	101
4. RESULTATS	
4.1. Transfection des cellules synoviales de type fibroblastique	102
4.2. Caractérisation des cellules synoviales transfectées	103
4.3. Réponse des cellules synoviales transfectées aux facteurs de croissance	104
4.4. analyse des capacités de croissance sans ancrage des cellules synoviales transfectées	107
4.5. Expression des ARNm de la collagénase et des cathepsines B et L chez les cellules synoviales transfectées	108
4.6. Régulation par les cytokines de la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales transfectées	109
4.7. Analyse par Western blot des cathepsines B et L synthétisées et sécrétées par les cellules synoviales de type fibroblastique	111
4.8. Distribution intracellulaire et localisation ultrastructurale des cathepsines B et L chez les cellules synoviales transfectées	112
4.9. Capacité des cellules synoviales transfectées à former des tumeurs chez des souris immunodéficientes	112
5. DISCUSSION	124
 BIBLIOGRAPHIES	 132
 ANNEXES	 153

INTRODUCTION

I. GENERALITES SUR LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

1. Présentation de la maladie.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) se définit comme une maladie systémique chronique d'étiologie inconnue dont la manifestation la plus sévère est la destruction progressive des articulations. Elle constitue le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques: la PR affecte en effet près de 1% de la population adulte mondiale, soit environ 50 millions de personnes, et un demi-million en France. Etant donné son caractère particulièrement invalidant, la PR est devenue de nos jours une cause importante de handicap. Elle est par ailleurs responsable d'une réduction de l'espérance de vie de 5 à 10 années.

2. Historique de la PR.

En relation sans doute avec la complexité de l'étiologie de la PR, l'origine historique de la PR apparaît assez controversée. En effet, les premiers écrits faisant références à des cas potentiels de PR semblent difficiles à interpréter. Ainsi, alors que certains historiens ne voient en la PR qu'une maladie au développement récent, décrite notamment depuis la thèse de A. Landre-Beauvais en 1800, d'autres font de la PR une maladie relativement ancienne, se référant notamment à un cas probable de PR décrit par Soranus dès le deuxième siècle de notre ère (1, 2) ou à des descriptions paléopathologiques.

3. Diagnostic de la PR.

Le diagnostic de la PR repose sur une série de critères édictés par l'American Rheumatism Association (ARA). La première version de ces critères fut publiée en 1958. Elle fut critiquée pendant 30 ans (3) avant d'être révisée en 1987 (4). Désormais, un patient est déclaré atteint de PR

s'il satisfait au moins à quatre des sept critères décrits **tableau 1**. Les critères 1 à 4 doivent être constatés au moins pendant 6 semaines.

4. PR et arthrose.

Bien que l'arthrose débute par une altération du cartilage articulaire, contrairement à la PR qui débute par une inflammation au niveau de la synoviale (hypothèse que l'on privilégiera ici), ces deux maladies semblent avoir des processus similaires dans leur progression. Dans l'arthrose, suite à l'atteinte du cartilage, une synovite réactionnelle se développe le plus souvent. Dans la PR, le pannus rhumatoïde provoque une destruction secondaire du cartilage et de l'os. Par ailleurs, l'évolution terminale d'une arthrite rhumatoïde peut se faire par le développement de phénomènes de type arthrosique (arthrite dite "vieillesse"). Toutefois, nombre d'éléments permettent de distinguer ces deux affections, souvent opposées de façon schématique (**tableau 2**).

5. Pathogénie de la PR.

Le développement de la maladie au niveau de l'articulation (**figure 1**) se conçoit classiquement en trois phases successives.

Dans la **première phase**, un antigène, encore inconnu de nos jours, atteint spécifiquement la membrane synoviale par la circulation systémique. Cette antigène initie une réponse immunitaire localisée à la synoviale, avec notamment accumulation de lymphocytes T CD4+ mémoires.

Dans la **seconde phase**, une inflammation chronique se développe dans la synoviale, impliquant nombre de cellules infiltrantes et cytokines. Rapport à cette inflammation, une prolifération cellulaire se développe, aboutissant à la formation d'une hyperplasie synoviale, appelée pannus rhumatoïde.

Dans la **troisième phase**, une destruction du cartilage articulaire et de l'os périarticulaire se produit, provoquant des dégâts et des déformations irréversibles de l'articulation. Trois types d'agents effecteurs sont potentiellement responsables de la destruction articulaire de par la

sécrétion de médiateurs impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire: {1} agents effecteurs de l'inflammation, {2} chondrocytes, {3} cellules synoviales du pannus rhumatoïde. Alors que la destruction articulaire dans la PR était décrite initialement comme un processus essentiellement inflammatoire, les dernières vues sur la pathogénie de la PR font désormais état des cellules synoviales du pannus rhumatoïde comme agents majeurs de la destruction du cartilage. Ce dernier concept de la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde constituant l'hypothèse de départ de notre travail, celui-ci sera développé en détail par la suite.

5.1. Agents prédisposants à la PR.

L'étiologie exacte de la PR reste encore de nos jours une inconnue. Néanmoins, des facteurs immunogénétiques semblent prédisposer un individu à développer une PR. Comme dans la plupart des maladies rhumatismales, la susceptibilité génétique est un membre important d'un ensemble de trois types de facteurs impliqués dans la pathogénie d'une maladie. Comme le décrit la **figure 2**, si la contribution génétique est un déterminant important de la susceptibilité d'un individu à développer une maladie, elle n'agit pas seule. L'étude de concordance entre jumeaux homo et dizygotes permet ainsi d'évaluer à 30% le rôle des facteurs génétiques dans le déterminisme de la PR, le système HLA intervenant pour la moitié de ces facteurs génétiques. Des contributions environnementales, notamment infectieuse (inconnues pour la plupart des maladies rhumatismales dont la PR) et développementales doivent agir de concert avec les contributions génétiques pour déclencher la maladie. A cause de cette nécessité d'interaction avec d'autres facteurs étiologiques de la PR, la plupart des individus qui portent les gènes connus de susceptibilité à la PR ne développent pas cette maladie. En d'autres termes beaucoup d'individus sont génétiquement "à risque" mais se trouvent en dehors de la zone d'intersection des trois types de facteurs déclenchants.

La susceptibilité génétique d'un individu à développer une PR fait référence principalement à la prévalence dans cette maladie des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II HLA-DR4 (DRB1*0101, 0401, 0404, 0405, 0408, 1001, 1406) et HLA-DR1 (5). Ces différents génotypes, selon la population concernée, conduisent à la présence d'une séquence

connue d'acides aminés située sur le 3^e segment hypervariable de la chaîne β . C'est la théorie dite de l'épitope partagé développée depuis 1987 par Gregersen et al. L'homo ou hétérozygotie pour ces allèles dits de susceptibilité interviendrait en termes de sévérité de la maladie. Parmi les autres facteurs actuellement connus, intervenant dans le déterminisme de la maladie elle-même ou de sa sévérité potentielle, on peut mentionner le rôle du polymorphisme de HLA-DQ, du TCRA (ACR 1996)

Le sexe de l'individu semble également jouer un rôle dans le déclenchement de la PR. La PR est une des nombreuses maladies autoimmunes qui prédomine chez la femme puisque le sex-ratio femme/homme atteints de PR se situe entre 2 et 4. Bien que significatif ce chiffre n'est pas aussi haut que ceux trouvés dans d'autres maladies autoimmunes comme le SLE (9:1) ou le diabète de type 1 (5:1) (6).

5.2. Causes directes possibles de la PR.

Comme précédemment décrit, plusieurs facteurs génétiques prédisposent un individu à développer une PR. De la même façon qu'il est improbable que toutes les bactéries ou virus communs soient capables de provoquer une synovite polyarticulaire, il est improbable qu'un seul agent environnemental (infectieux ou non infectieux) puisse déclencher la maladie. Une hypothèse est que plusieurs stimulus environnementaux, probablement des virus, infectent un individu, et que, par l'intermédiaire de certains mécanismes, la réponse inflammatoire se focalise au niveau des articulations. La synovite pouvant persister par la suite en l'absence de l'agent étiologique puisque le phénomène d'autoimmunité peut permettre à la maladie de se perpétuer.

5.2.1. Les Agents infectieux.

Les Bactéries.

Il n'existe pas de réelles données démontrant qu'une bactérie ou mycobactérie soit la cause de la PR. Néanmoins, la similitude des modifications histopathologiques constatées au niveau des

articulations de malades atteints de PR et de maladie de Lyme (maladie provoquée par le spirochète *Borrelia burgdorferi*) laisse ouverte la possibilité qu'un organisme soit l'agent déclenchant de la PR. L'identification dans la synoviale de chlamydia ou autres germes intracellulaires (mycoplasmes) par biologie moléculaire peut conforter cette hypothèse (ACR 96).

Le Virus d'Epstein-Barr

Le rôle du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans la PR est assez controversé. En effet, alors que la fréquence de lymphocytes B infectés par EBV apparaît anormalement élevée dans le sang des malades atteints de PR. (7), chez les malades à PR précoce, le titre d'anticorps dirigés contre un antigène nucléaire associé à EBV ou un antigène de la capside virale n'est pas élevé (8). L'infection d'EBV apparaît donc plus une conséquence qu'une cause de la PR.

Néanmoins, certains autres faits semblent impliquer EBV dans la pathogénie de la PR. En effet, une étude a démontré des niveaux plus élevés d'anticorps contre les antigènes d'EBV chez des malades atteints de PR que chez des individus sains (9, 10). Une autre étude a mis en évidence un lien moléculaire entre HLA-DR4 et DR-1 et la glycoprotéine gp110 d'EBV. Ainsi des individus à sérologie positive pour la gp110 ont des anticorps dirigés contre l'épitope (QKKAA) se trouvant sur les sous-groupes d'HLA-DR4 (Dw4 et Dw14) et sur DR1 et qui ont une susceptibilité à la PR (11, 12). A partir de là, on pourrait en déduire que la reconnaissance par les lymphocytes T d'épitopes d'EBV chez des individus à HLA-Dw4, HLA-Dw14, ou HLA-DR1 mènerait au développement d'une PR, alors que chez les individus aux allèles HLA de classe II autres, aucune réaction croisée avec les protéines d'EBV n'existerait. Toutefois, une étude récente en terme de PCR, hybridation in situ, sérologie et immunohistochimie faites sur un grand nombre d'individus n'a pu établir une quelconque relation entre PR et virus d'Epstein-Barr (ACR 1995).

Le Parvovirus

Bien que le parvovirus ait été détecté au niveau de cellules synoviales de différents individus atteints de PR, mais pas d'individus atteints d'une simple arthrose, on ne peut être certain qu'il soit un agent initiateur possible de la PR. Bien que l'on dénote deux cas de PR précoce avec infection récente par le parvovirus humain B19, ceux-ci restent des cas anecdotiques:

sur un total de 69 individus atteints de PR, seuls quatre étaient infectés par le parvovirus au début de leur PR (13).

Le Virus HTLV-1 (Human T cell leukemia virus type I)

Les souris transgéniques pour HTLV-1 montrent une inflammation synoviale associée à un pannus érosif (14). L'expression transcriptionnelle de HTLV-1 dans les articulations affectées de ces souris transgéniques se trouve être cinq à dix fois plus forte que chez des souris transgéniques contrôles. De plus, Tax, un activateur transcriptionnel codé par le virus, est également exprimé au niveau de ces articulations. HTLV-1 pourrait donc être un agent déclenchant de la PR.

5.2.2. Les protéines de choc thermique.

Ces protéines sont produites par les cellules de toutes espèces en réponse au stress. Les HSP faciliteraient le "folding" et la translocation des protéines ayant un rôle protecteur vis à vis des blessures occasionnées notamment par la chaleur, les bactéries ou encore les radicaux libres. Il existerait en l'occurrence des liens entre ces protéines de choc thermique (HSP) et la PR. En effet, certains malades atteints de PR ont des niveaux élevés d'anticorps anti HSP de mycobactérium (15), en particulier dans le liquide synovial (16). De plus des lymphocytes T spécifiquement dirigés contre des HSP de mycobactéries sont présents dans les liquides synoviaux rhumatoïdes (17). Ces HSP possèdent des séquences d'acides aminés bien conservées: certaines HSP de *Mycobacterium tuberculosis* ont 65% d'homologie de séquence avec les HSP humaines. Une réaction croisée entre les épitopes des HSP humaines et ceux des bactéries pourrait être un élément important de la pathogénie de la PR en entretenant la réaction inflammatoire au niveau de la synoviale.

5.2.3. Le collagène de type II.

La découverte que le collagène de type II pouvait causer de l'arthrite chez certaines lignées de rats ou des souris a permis de mettre en évidence un épitope immunogénique et arthritogénique

majeur de la molécule de collagène type II (18). Mais dans la PR humaine, on s'accorde à penser que la production d'anticorps dirigés contre le collagène de type II n'est pas la cause de cette maladie, mais une conséquence qui amplifie sans doute la réponse inflammatoire. Des anticorps monoclonaux contre la forme native du collagène type II réagissent au niveau de la synoviale invasive à la jonction pannus-cartilage (19). Ces anticorps ne se retrouvent pas au niveau du cartilage d'individus atteints d'arthrose (20). Le sérum des malades rhumatoïdes contient un titre d'anticorps dirigé contre la forme dénaturée du collagène type II, plus élevé que chez les individus contrôles (21); cependant, il n'y a pas de différence notable dans les titres d'anticorps dirigés contre la forme native du collagène type II. Ceci suggère que la forme dénaturée générée par la destruction du tissu connectif sert bien d'agent immunogène. A noter par ailleurs, les résultats controversés du traitement de la PR chez l'homme par le collagène de type II (induction de tolérance orale)

5.2.4. Les facteurs rhumatoïdes.

Les facteurs rhumatoïdes (RF) sont des autoanticorps dirigés contre la partie Fc des IgG. Les facteurs rhumatoïdes ne sont pas spécifiques de la PR. Ils sont détectés dans la sérum d'individus atteints d'autres maladies rhumatismales et autres maladies inflammatoires chroniques, ainsi que chez des individus apparemment normaux (22). Néanmoins, le titre de RF reste plus élevé chez les individus atteints de PR que chez les individus non rhumatisants. Le rôle des RF dans la PR reste encore obscure: sont-ils des agents déclenchants ou effecteur de la PR. L'hypothèse la plus répandue fait référence à une contribution des RF à l'amplification de la synovite rhumatoïde au travers de l'activation du complément et de la formation de complexes immuns qui sont phagocytés par les neutrophiles dans le liquide synovial. Est-il possible, cependant, que les RF jouent un rôle majeur dans l'étiologie de la PR?, qu'une réponse immune impliquant les lymphocytes T se développe contre les IgG?, et qu'aucun agent infectieux ou autre stimulation antigénique ne soit nécessaire au déclenchement de la PR? Certaines données le laissent penser. Les RF des PR apparaissent hétérogènes (23, 24). Ils contiennent des chaînes lourdes et légères se répartissant parmi tous les sous-groupes de régions variables et toutes les

classes IgM, IgG, IgA. L'analyse des différentes séquences montrent que ces RF sont issues de multiples clones lymphocytes B, dont les gènes codant les immunoglobulines ont subi beaucoup de mutations somatiques. Tous ces résultats sont caractéristiques d'une réponse immune antigène dépendante et conduite par les lymphocytes T. La réponse autoimmune anti IgG pourrait donc être un facteur déclenchant de la PR.

5.3. Migration des lymphocytes T dans la synoviale rhumatoïde.

Une inconnue majeure dans la pathogénie de la PR est la raison pour laquelle l'inflammation débute et perpétue dans les articulations, sans impliquer la plupart du temps d'autres organes. Cette spécificité de l'inflammation pour la synoviale pourrait s'expliquer par l'anatomie unique en son genre de l'articulation diarthrodiale (**figure 1**).

L'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et de ligands complémentaires à la surface des leucocytes circulants semblent jouer un rôle critique dans la détermination du site d'émigration leucocytaire et la nature des leucocytes migrant dans le tissu inflammatoire. La reconnaissance leucocytes-cellules endothéliales requiert au moins trois étapes: {1} adhésion transitoire, {2} activation des leucocytes, {3} liaison stable en rapport avec l'état d'activation des leucocytes, suivie d'une trans-migration (25). L'interaction leucocytes cellules-endothéliales est déterminée par des combinaisons bien spécifiques molécules d'adhésion-ligand, interaction se produisant à chacune des étapes. Il semble que la combinaison sélectine-ligand carbohydrate régisse l'étape d'adhésion transitoire pour les neutrophiles (26, 27). De fait, une expression constitutive de la sélectine ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule type 1), et expression accrue après exposition à l'IL-1 (interleukine-1) (28), a été démontrée chez les cellules endothéliales issues de malades polyarthritiques.

L'interaction de LFA-1 (leucocyte function associated antigen 1) avec son ligand ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) joue, elle, probablement un rôle clé dans la migration transendothéliale des lymphocytes T (29). ICAM-1 est aussi exprimée par les cellules endothéliales de malades rhumatoïdes, et sujet à une régulation par l'IL-1 (28). Il a été également

démontré que l'interaction VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) avec son ligand vasculaire VLA-1 (very late antigen 4) prédomine dans la liaison stable des lymphocytes T avec les cellules transendothéliales exposées à l'IL-1, alors que l'interaction LFA-1-ICAM apparaît déterminant pour la transmigration des lymphocytes T (30).

La prédominance des lymphocytes T mémoires dans la synoviale rhumatoïde est pensée-t-on le reflet d'une activation in situ des lymphocytes T. L'expression accrue des intégrines (y-compris VLA-4) à la surface des lymphocytes T mémoires (CD45RO+) par rapport aux lymphocytes vierges (CD45RO-), pourrait pourtant amener une migration sélective des cellules mémoires dans la synoviale rhumatoïde. En effet, les lymphocytes T CD45RO+ adhèrent mieux aux cellules endothéliales que les CD45RO- (31). La rétention de ces cellules dans la synoviale est probablement renforcée par l'interaction qui s'en suit entre les molécules d'adhésion et les ligands moléculaires de la matrice tels que VLA-4 et fibronectine. La libération de cytokines telles que IL-1 et IL-8 avec l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion qui s'en suit sur les cellules endothéliales favorise la liaison et transmigration des cellules T mémoires dans la synoviale rhumatoïde. Il se peut donc qu'une fraction non négligeable des lymphocytes T s'infiltrant dans la synoviale soit des lymphocytes T initialement quiescents. Cette possibilité peut expliquer la difficulté que l'on a à détecter les cytokines directement dérivées des lymphocytes T dans la synoviale, comme l'IL-2 (voir partie à venir traitant des cytokines) dans la PR.

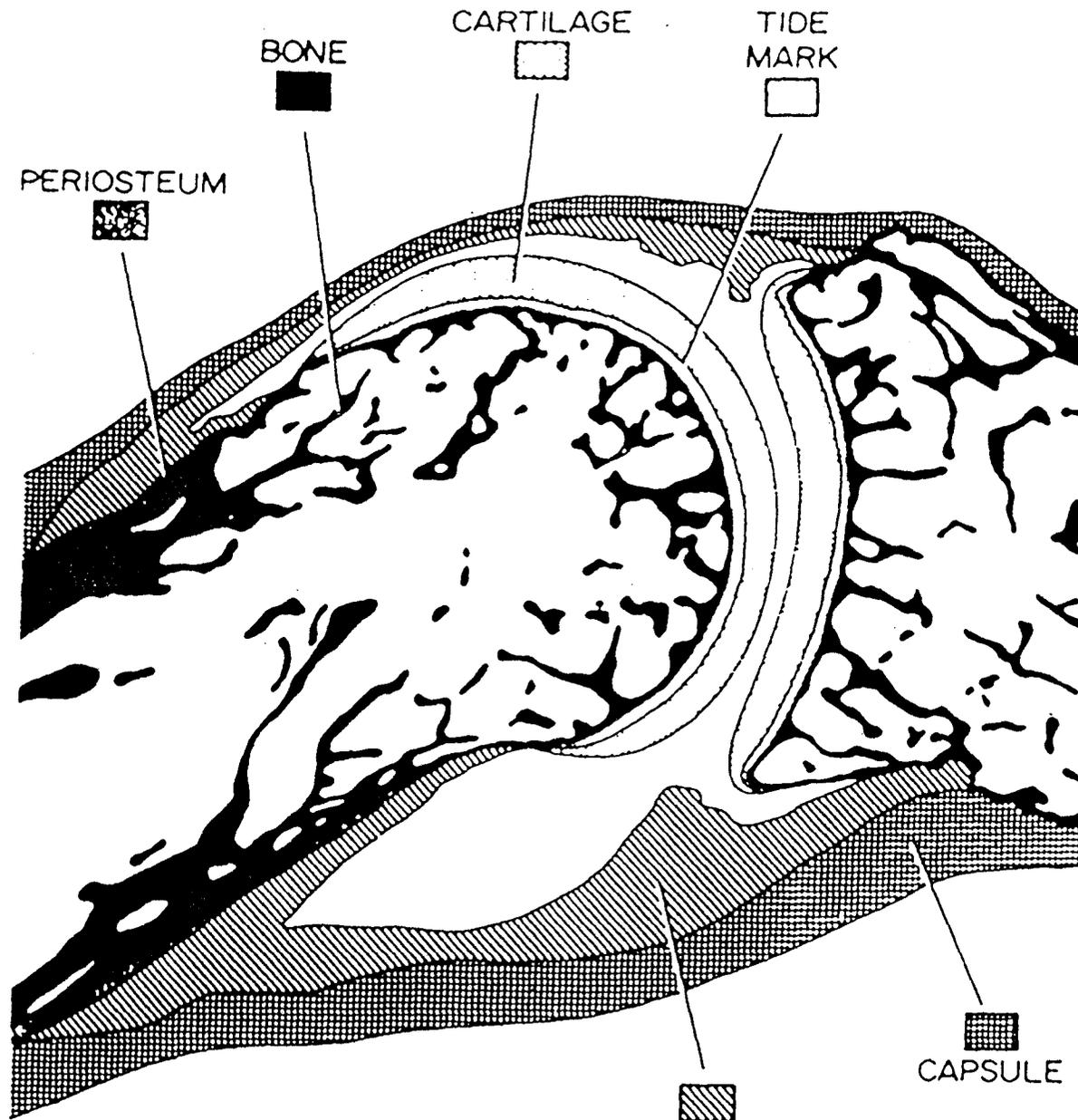


FIGURE 1. DIAGRAMME D'UNE ARTICULATION INTERPHALANGIENNE HUMAINE EN COUPE SAGITTALE.

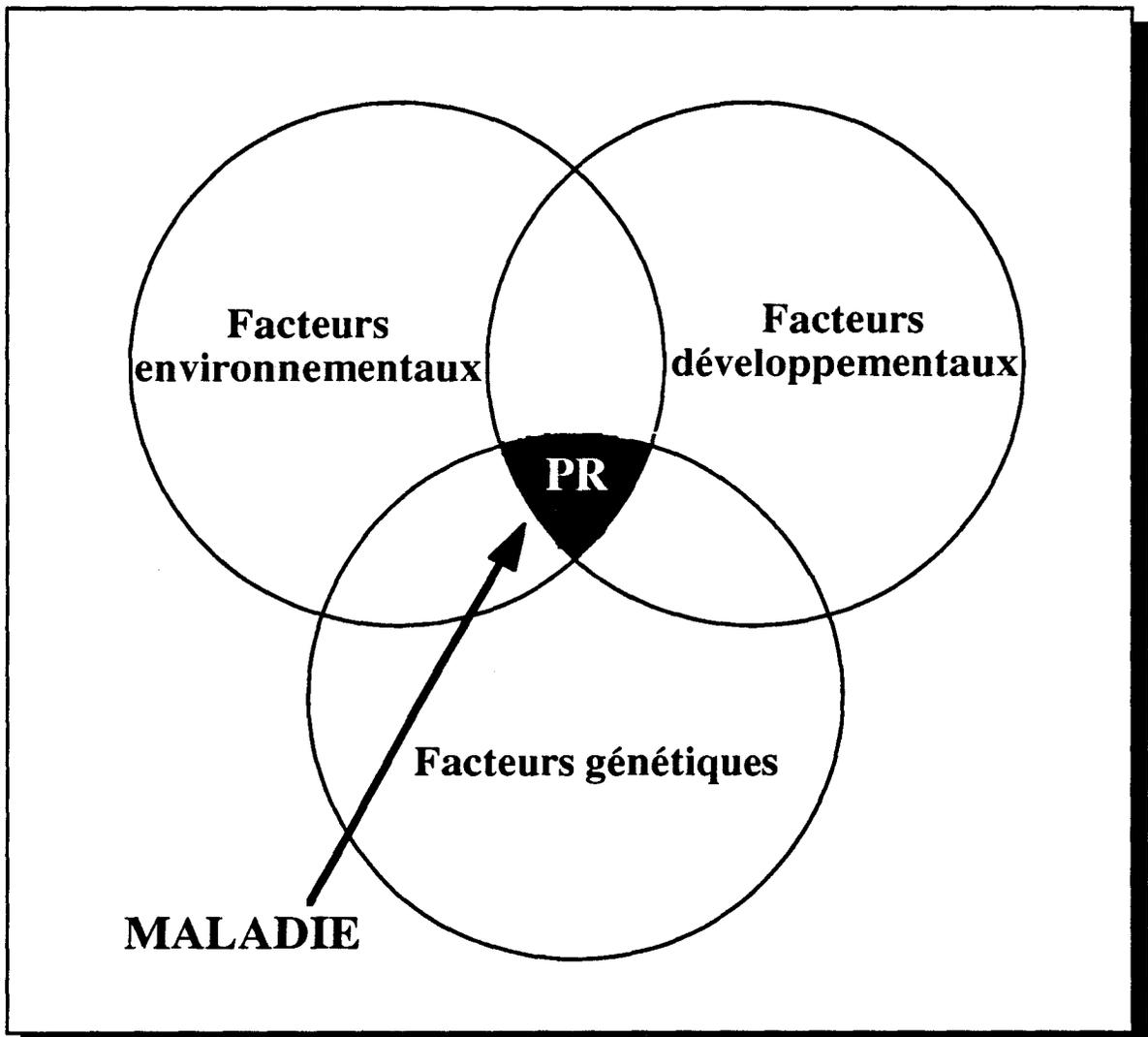


Figure 2. Illustration schématique du rôle des facteurs génétiques dans la susceptibilité d'un individu à développer une maladie auto-immune comme la PR, et interactions avec les autres facteurs déclenchants.

Critère	Définition
Raideur matinale	Raideur matinale au niveau des articulations au moins pendant 1 heure avant de constater une nette amélioration
Arthrite au niveau d'au moins trois articulations	Au moins trois zones articulaires voient un gonflement de leur tissu mou ou une accumulation de liquide. Les 14 articulations possibles sont (droite ou gauche) celles des métacarpophalangiennes, interphalangiennes proximales, poignet, coude, genou, cheville et métatarsiennes
Arthrite des articulations de la main	Au moins une zone articulaire enflée comme décrit au dessus dans les articulations des poignets, des métacarpophalangiennes et des interphalangiennes proximales
Arthrite symétrique	atteinte simultanée des mêmes zones articulaires sur les deux côtés du corps
Nodules rhumatoïdes	Nodules sous cutanés
Facteurs rhumatoïdes dans le sérum	Démonstration d'un taux pathologique de facteur rhumatoïde dans le sérum.
Signes radiographiques	Signestypiques de la PR au niveau des articulations de la main et du poignet, devant inclure érosion et raréfaction osseuse.

Tableau 1. Critères révisés 1987 de l'ARA pour la classification de la polyarthrite rhumatoïde.

	Polyarthrite rhumatoïde	Arthrose
Age de survenue	Enfance et adultes - pic entre 50 et 60 ans.	Augmente avec l'âge
Facteurs prédisposants	HLA-DR4, DR1	Traumatisme, malformations congénitales
Symptômes précoces	Raideurs matinales Réveils nocturnes	Les douleurs s'accroissent tout au long de la journée, et avec le travail
Articulations impliquées	Articulations des MCP, poignets, interphalangiennes et presque jamais les articulations des interphalangiennes distales	Articulations supportant les charges (hanches, poignet): atteinte des IPP et des IPD
Anomalies physiques	Synovite-arthrite et déformations spécifiques	déformations progressives
Anomalies radiologiques	Ostéopénie périarticulaire, érosions marginales	Sclérose sous-chondrale, ostéophytes
Anomalies sanguines	Vitesse de sédimentation élevée, anémie, facteurs rhumatoïdes et autres autoanticorps	Aucune

Tableau 2. Facteurs pour différencier la polyarthrite rhumatoïde de l'arthrose.

II. TRANSFORMATION CELLULAIRE ET POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

1. Introduction.

Bien que les stades initiaux et d'états de la PR puissent impliquer des processus distincts, l'articulation affectée de patients symptomatiques exhibe de façon caractéristique les manifestations de trois phénomènes pathobiologiques (figure 3):

L'**inflammation** apparait être à la base de la douleur articulaire et de plusieurs manifestations systémiques. Un grand nombre de médiateurs inflammatoires comme les métabolites de l'acide arachidonique, certaines amines vaso-actives, et neuropeptides ont été identifiés dans les articulations rhumatoïdes. Des cytokines telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha), l'IL-1 et IL-6 sont particulièrement impliquées dans la génèse de la synovite rhumatoïde (32).

Une **réponse cellulaire et humorale anormale** représente une autre marque de la PR. Des autoanticorps, tels les facteurs rhumatoïdes ou anticorps dirigés contre le collagène de type II sont souvent présents. De plus, une accumulation de lymphocytes T, particulièrement ceux exprimant le phénotype mémoire CD4+, CDw29, se produit au niveau de la synoviale. Certains de ces lymphocytes expriment des marqueurs d'activation à leur surface.

L'**hyperplasie synoviale** (appelée aussi pannus) est caractérisée par des cellules synoviales proliférantes d'apparence transformée (33), et d'une infiltration de macrophages (34).

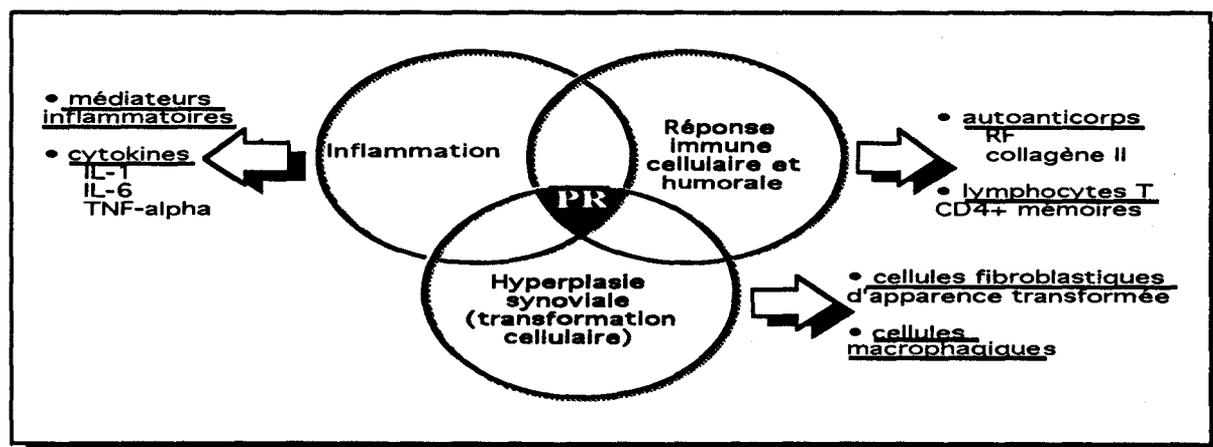


Figure 3. Interaction de trois phénomènes pathobiologiques au niveau de l'articulation rhumatoïde.

2. Rôle des cellules synoviales du pannus dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde.

L'interaction exacte de ces trois types de phénomènes dans l'articulation rhumatoïde reste encore à établir. Il conviendrait ainsi de pouvoir répondre à la question suivante: quelle est l'étape initiale dans la pathogénie de la PR? L'association de certaines molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II avec la PR a ainsi été démontrée à maintes reprises (voir partie précédente présentant la PR). Comme ces molécules du CMH de classe II sont connues pour leur rôle dans la présentation restreinte de peptides antigéniques aux lymphocytes CD4+ (35), dans la constitution du répertoire des récepteurs des lymphocytes T CD4+ (36), ainsi que dans la présentation des superantigènes à ces lymphocytes TCD4+ (37), le lymphocyte T est présumé jouer un rôle clé dans la pathogénie de la PR. Harris, par exemple, associe directement les lymphocytes T avec le "stade1" de la PR (38).

Au contraire, Firestein et Zvaifer remettent en cause l'importance des lymphocytes T dans l'initiation de la PR en argumentant que le niveau de lymphokines spécifiques aux lymphocytes T (IL-2, IL-3, IL-4, IFN- γ (Interféron-gamma, TNF- β) détectées dans l'articulation rhumatoïde est négligeable (39). Certains éléments laissent à penser que la destruction du cartilage dans la PR pourrait d'abord s'effectuer au travers de voies indépendantes de l'inflammation classique. Notamment, il a été démontré une non corrélation de la présence de fragments de collagène type II dans les phagocytes synoviaux avec le nombre de leucocytes du liquide synovial (40). De manière plus notable encore, chez les souris MLR/l, souris développant spontanément une arthropathie de type PR, la destruction initiale de l'os et du cartilage articulaire se produit essentiellement en absence d'infiltration de cellules inflammatoires, incluant lymphocytes et leucocytes polynucléaires (41-43). De même la souris transgénique c-fos développe une arthrite destructive sans infiltration de lymphocytes (44). Le développement d'une PR sans infiltration lymphocytaire a également été reporté chez un "sidéen" (ACR). De telles données relèguent donc l'infiltration lymphocytaire à un rôle secondaire dans la pathogénie de la destruction des articulations dans la PR. En fait, les expériences d'hybridation in situ affirment bien le rôle des cellules synoviales du pannus dans la pathogénie de la PR: en même temps que les cytokines produites par les lymphocytes sont

diminuées dans la PR, les cytokines générées par les macrophages et fibroblastes se trouvent augmentées (tableau 3).

Sources cellulaires	Niveau de production dans la synoviale rhumatoïde
Lymphocytes T	
Interleukine-2	-
Interleukine-3	-
Interleukine-4	-
Interleukine-6	-
Interféron-gamma	-
TNF-alpha	-
TNF-béata	-
GM-CSF	-
Macrophages	
Interleukine-1	+++
Interleukine-6	+
Interleukine-8	++
TNF-alpha	++
M-CSF	+
GM-CSF	+
TGF-béata	++
Interféron-alpha	±
Fibroblastes	
Interleukine-6	+++
GM-CSD	+
FGF	+

Tableau 3. Niveau de production des cytokines synoviales dans la polyarthrite rhumatoïde selon la source cellulaire. "-", moins que la normale; "+", plus que la normale(45).

Des éléments sans cesse plus nombreux font désormais référence aux cellules du pannus rhumatoïde en tant qu'agent primaire de la destruction des articulations rhumatoïdes. En effet, dans la PR, l'érosion typique du cartilage articulaire apparaît essentiellement au niveau des zones contiguës au front de cellules synoviales proliférantes d'apparence transformée qui constituent l'hyperplasie synoviale, ces cellules étant en fait directement attachées au cartilage articulaire (33). Ces données suggèrent que les cellules synoviales du pannus rhumatoïde libèrent des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire, en particulier le collagène du cartilage et de l'os. Certaines études récentes étayent parfaitement cette hypothèse en mettant en avant le rôle des cystéine protéases (46, 47) et des métalloprotéases (48) dans la destruction de l'os et du cartilage de l'articulation rhumatoïde.

L'apparente faculté de ces cellules synoviales proliférantes à reproduire le processus classique d'invasion tumorale, c'est à dire adhésion à la matrice extracellulaire et "protéolyse" (49), suggère qu'un processus analogue à la transformation cellulaire néoplasique se produit dans les cellules synoviales du pannus rhumatoïde.

3. Caractère transformé des cellules synoviales du pannus.

Les observations histomorphologiques ont démontré que la destruction des structures du cartilage articulaire constatée classiquement dans la PR est directement liée à la présence de cellules synoviales proliférantes. Ces cellules, d'origine mésenchymateuse, s'organisent en un pannus dont le front est invasif et destructeur. L'examen ultrastructural de ces cellules synoviales proliférantes démontre une morphologie transformée caractérisée par un large noyau à multiples nucléoles et un cytoplasme très abondant (33). La notion de transformation introduite dans la PR sur la base de la morphologie et du type de croissance de ces cellules se voit confirmer, et même amplifier, par certains éléments qui font passer le phénomène de transformation d'une position plutôt marginale et secondaire dans la pathogénie de cette maladie à une position majeure. En effet, comme l'illustre la **figure 4**, on peut parler de **transformation** complète, et donc signifier un processus de tumorigénèse, en ce qui concerne les cellules du pannus synovial, puisque ces

cellules en plus de leur **prolifération** acquièrent une capacité à reproduire deux étapes importantes du mécanisme d'invasion tumorale: **interactions avec la matrice extracellulaire et protéolyse** (49). Ainsi on peut observer l'adhésion de ces cellules synoviales d'apparence transformée à la matrice du cartilage en cours d'érosion (33). De même, on peut détecter au niveau des zones érodées de l'articulation rhumatoïde, à la jonction pannus-cartilage, les métalloprotéases (collagénase et stromelysine), ainsi que les cystéine protéases (cathepsines B et L), enzymes protéolytiques capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire du cartilage et de l'os (**tableau 4**). L'expression marquée d'oncogènes comme ras, fos ou c-myc, la détection de séquences rétrovirales ou le faible taux de cellules apoptotiques détectées dans la synoviale rhumatoïde sont autant de faits qui plaident en la faveur d'un phénomène de transformation dans la PR ((50) et troisième partie de ce mémoire traitant de l'activation oncogénique dans la PR).

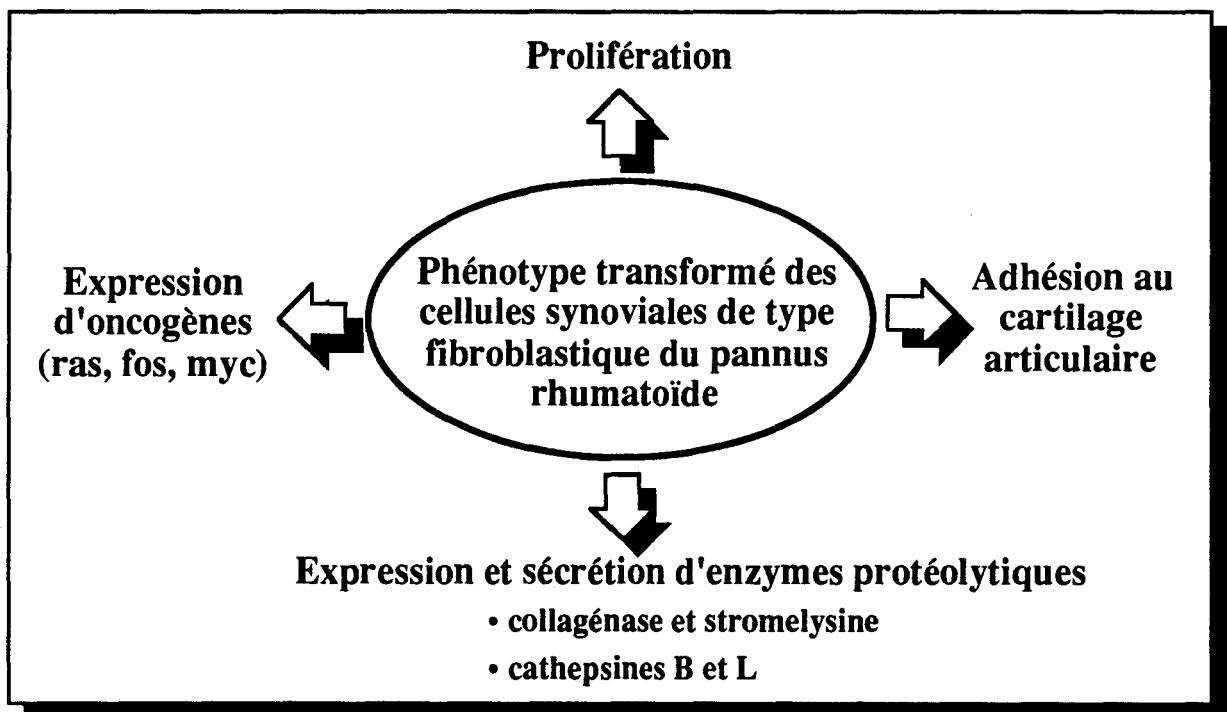


Figure 4. Expression d'un phénotype transformé par les cellules synoviales rhumatoïdes.

Composants de la matrice extracellulaire	Cystéine protéases		Métalloprotéases interstitielles	
	Cathepsine B	Cathepsine L	Collagénase (MP1)	Stromelysine (MP3)
Collagène de type I	+	+	+	+
II	+	+	+	+
III	+	+	+	0
IV	+	+	0	+
V	+	+	0	+
VI	ND	ND	ND	ND
VII	ND	ND	+	+
VIII	ND	ND	+	ND
IX	+	+	ND	+
X	ND	ND	+	+
XI	+	+	ND	+
Laminine	+	+	0	+
Fibronectine	+	+	0	+
Protéoglycanes	+	+	0	+
Elastine	+	+	0	+

Tableau 4. Spécificité de dégradation des composants de la matrice extracellulaire de l'os et du cartilage par les métalloprotéases et cystéine protéases in vitro. "ND", non déterminé; "+", activité; "-", pas d'activité (51).

3.1. Métalloprotéases: collagénase (MP1) et stromelysine (MP3).

La métalloprotéase collagénase (MP1), capable de cliver la triple hélice de la molécule du collagène interstitiel I à III natif, est un élément majeur de la dégradation de la matrice de ostéocartilagineuse dans la PR (52). Cette collagénase intersticielle fut décrite il y a quinze ans à la jonction pannus rhumatoïde-cartilage en regard des zones érodées du cartilage articulaire (53). Plus récemment, la collagénase fut détectée dans les cellules synoviales proliférantes du front du pannus lors du stade initial de l'arthropathie chez la souris MRL/l (48). Certaines études in vitro ont démontré la capacité de bon nombre de cellules à exprimer cette collagénase de type fibroblastique: fibroblastes, macrophages, ostéoblastes, chondrocytes, cellules épithéliales, et même cellules endothéliales (54). Cependant, des études en hybridation in situ ont indiqué que la

production des métalloprotéases dans la PR se localisait essentiellement au niveau des cellules de la bordure synoviale (55).

La stromelysine (MP3), autre métalloprotéase susceptible de dégrader la matrice, est également détectée dans le tissu synovial rhumatoïde (56, 57). Cette enzyme est homologue de la transine, une protéine dont l'expression est associée à la transformation et l'invasion du tissu dans les tumeurs (58).

Le fait que ces métalloprotéases aient une activité optimum au pH physiologique neutre, et que l'expression de leurs inhibiteurs (les TIMPs) dans la synoviale rhumatoïde apparaissent moins intense que leur propre expression explique l'intérêt premier porté sur ces enzymes dans la PR (59).

3.2. Cystéine protéases: cathepsines B et L.

Si les métalloprotéases comme la collagénase et la stromelysine ont jusqu'ici retenues la plus grande attention eu égard à leur rôle potentiel dans la dégradation du cartilage, plusieurs observations suggèrent une réelle contribution des cystéine protéases lysosomiales, cathepsine L et cathepsine B au niveau des processus de dégradation dans la PR. Les cathepsines B et L sont capables de dégrader *in vitro* les collagènes de type I, II, IX, XI (60), ainsi que les protéoglycanes (61), deux éléments fondamentaux de la matrice extracellulaire de l'os et du cartilage. La cathepsine B a été détectée dans des explants de synoviale rhumatoïde et dans les milieux de culture (62). De plus, Van Noorden a montré que dans le cas d'arthrites induites chez le rat il existe une augmentation conséquente d'une activité cathepsine B au niveau des synoviocytes et de la matrice du cartilage articulaire (63). Le traitement de ces rats avec un inhibiteur spécifique de la cathepsine B réduit significativement les dommages causés au cartilage. La cathepsine L a aussi été décrite comme intervenant dans les processus de dégradation de l'os et du cartilage. Dans l'arthrite expérimentale du lapin, Etherington a démontré une augmentation du niveau de cathepsine L dans la membrane synoviale (64). Le rôle potentiel des cathepsines B et L dans la dégradation de la matrice extracellulaire articulaire dans la PR a été également suggéré par Trabandt lorsqu'il a mis

en évidence un haut niveau des messagers de ces deux cathepsines dans les cellules synoviales, ainsi qu'une immunolocalisation de ces deux mêmes protéases dans les cellules du tissu synovial au site de destruction de l'os et du cartilage (46, 47).

D'autres études ont démontré que la rigidité compressive du cartilage se trouve significativement réduite quand la portion des protéoglycanes du cartilage articulaire est dégradée par les cathepsines lysosomiales (65). Ceci laisse à penser que l'action des cathepsines pourrait accélérer le processus de dégradation en déstabilisant les agrégats de protéoglycanes et les fibres de collagène dans l'articulation rhumatoïde, et par la même compléter l'action de la collagénase qui, si elle est considérée comme l'élément majeur de la destruction de l'articulation rhumatoïde (52), n'a qu'un effet limité sur la rigidité compressive du cartilage (66).

4. Transformation cellulaire et cytokines.

Les cytokines, incluant facteurs de croissance et interleukines, sont généralement considérées comme d'importants médiateurs de l'inflammation et de la destruction des articulations dans la PR. L'IL-1 (67, 68), le TNF- α (69), l'IFN- γ (70, 71), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (72), et le TGF- β (Transforming growth factor) (73) sont les principales cytokines présentes dans le liquide synovial d'individus atteints de PR. L'IL-1, le TNF- α (74) et le bFGF (75) ont également été détectées dans le tissu synovial à la jonction pannus-cartilage. Ces cytokines sont probablement impliquées dans phénotype transformé et destructeur des cellules synoviales de type fibroblastique du pannus rhumatoïde. En effet, IL-1, TNF- α , PDGF, bFGF, IFN- γ et TGF- β ont montré dans différentes études induire *in vitro* plusieurs caractéristiques du phénotype transformé pathologique des cellules synoviales de type fibroblastique exprimé dans le tissu rhumatoïde *in vivo* (**figure 5**). Néanmoins, la régulation par les cytokines de l'expression et de la sécrétion des cathepsines B et L reste encore très mal caractérisée dans le cadre de la PR.

INTERLEUKINE-1

Source: monocytes/macrophages

L'IL-1 stimule l'expression et la sécrétion de la collagénase et de la stromelysine, ainsi que de la prostaglandine E₂ par les cellules synoviales de type fibroblastique (76, 77). Notre groupe a précédemment démontré les capacités de l'IL-1 à stimuler la sécrétion d'une activité cystéine protéase de type cathepsine B (78). L'IL-1 semble aussi être un agent effecteur de la prolifération des cellules synoviales (79).

TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA

Source: monocytes/macrophages

Le TNF- α est essentiellement produit par les monocytes/macrophages. Le TNF- α a des effets similaires à l'IL-1 in vitro puisqu'il stimule chez les cellules synoviales de type fibroblastique la sécrétion de la collagénase et de la prostaglandine E₂ (80), ainsi que d'une activité cystéine protéase de type cathepsine B (78). De même, il semble stimuler la prolifération cellulaire (79). Sa surexpression par des souris transgéniques provoque une arthrite destructrice, comparable à la PR chez l'homme (81).

PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR

Source: macrophages, cellules endothéliales

Le PDGF stimule la croissance avec ou sans ancrage des cellules synoviales de type fibroblastique (82). Ce mode de croissance apparaît fortement associé à la croissance cellulaire transformée, ce qui laisse à penser que le PDGF, ou un facteur similaire, est en partie responsable de la croissance de type tumoral du tissu synovial (83).

BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR

Source: macrophages, cellules endothéliales, fibroblastes

Le bFGF stimule la prolifération des cellules synoviales de type fibroblastique in vitro (84).

INTERFERON-GAMMA

Source: lymphocytes T, cellules NK

L'IFN- γ stimule l'expression des molécules du CMH de classe II des cellules synoviales de type fibroblastique (85). L'IFN- γ inhibe l'effet stimulant du TNF- α sur la prolifération et la sécrétion de la collagénase (79).

TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA

Source: macrophages, lymphocytes T, fibroblastes

Le TGF- β a un effet modérateur sur la dégradation de la matrice extracellulaire. Ainsi, il induit la transcription des gènes du collagène et de la fibronectine, ainsi que la sécrétion d'inhibiteurs de protéases. Dans le même temps, le TGF- β réprime le phénotype transformé et destructeur des cellules synoviales dans la PR: il inhibe non seulement l'expression de la collagénase stimulée par l'IL-1 et le TNF- α , mais inhibe aussi partiellement la croissance cellulaire sans ancrage (82, 86).

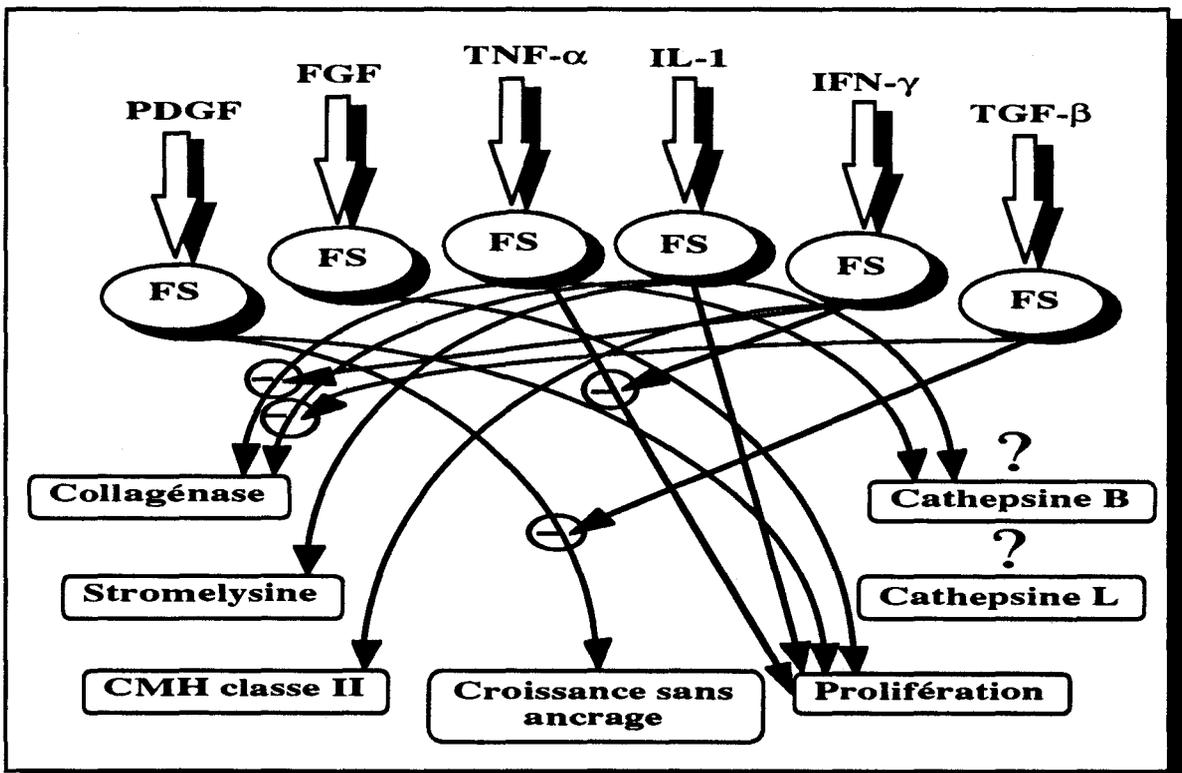


Figure 5. Régulation du phénotype transformé des cellules synoviales de type fibroblastique (FS) par les diverses cytokines présentes dans la synoviale rhumatoïde. ("-", effet inhibiteur).

Bien que les cytokines aient d'importantes fonctions dans les processus cellulaires normaux, une production excessive ou une inhibition inadéquate au niveau de la synoviale rhumatoïde pourraient les impliquer directement dans la pathophysiologie de la PR. De par leurs capacités à réguler les interactions cellulaires, les cytokines apparaissent en tous les cas les éléments le plus à même à effectuer le lien entre les deux grands processus pathologiques intervenant au niveau des articulations rhumatoïdes: "inflammation" et "transformation" des synoviocytes du pannus rhumatoïde. La **figure 6** décrit un modèle hypothétique de contrôle paracrine des cellules synoviales de type fibroblastique par les cytokines issues du processus inflammatoire. Dans ce modèle, les cellules présentatrices d'antigènes stimulent les lymphocytes T à sécréter l'IFN- γ et autres cytokines, qui ont pour effet de stimuler à leur tour les macrophages à synthétiser et sécréter l'IL-1, le TNF- α ou encore le PDGF et bFGF. La présence de ces cytokines inflammatoires au niveau du tissu synovial rhumatoïde engendrerait chez les cellules synoviales de type fibroblastique un phénotype que l'on peut considérer comme transformé et invasif de par leurs capacités nouvelles à proliférer et à sécréter des enzymes protéolytiques.

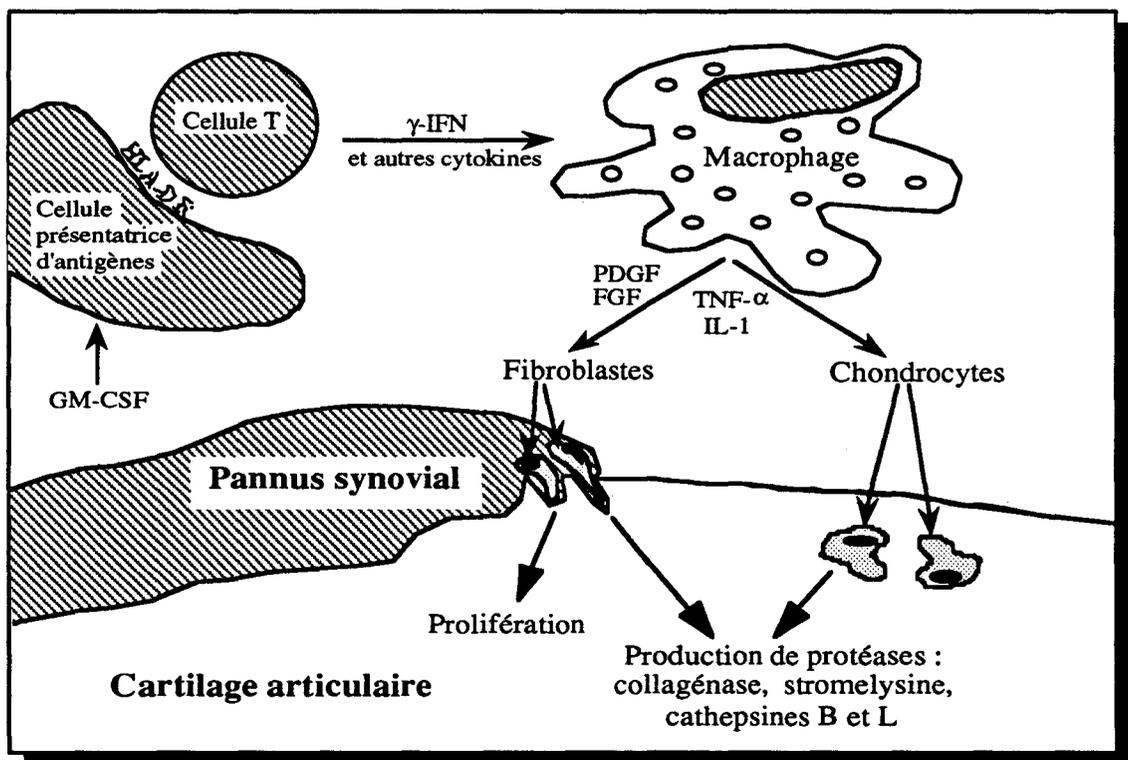


Figure 6. Cytokines et interactions cellulaires dans la synovite rhumatoïde. Macrophages, lymphocytes T, et fibroblastes sont des cellules toutes présentes dans le pannus rhumatoïde.

Première partie:

**REGULATION PAR LES CYTOKINES DE
L'EXPRESSION ET DE LA SECRETION DES
CATHEPSINES B ET L CHEZ LES CELLULES
SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE**

1. GÉNÉRALITÉS SUR LES CATHEPSINES B ET L

1.1. Trafic intracellulaire des cathepsines B et L.

Dans des conditions non pathologiques, la localisation des cathepsines est généralement intracellulaire, et plus précisément le compartiment endosomal/lysosomal. Le pH acide des lysosomes (pH 5-6) permet aux cathepsines B et L d'exercer de manière optimale leur rôle au niveau du "turnover" des protéines intracellulaires (87). Ces deux cathepsines jouent également un rôle au niveau du "processing" de certaines protéines comme celle du CMH de classe II (88, 89). Dans des conditions pathologiques, ces protéases lysosomiales peuvent se retrouver dans le milieu extracellulaire, comme il semble que ce soit la cas dans la PR.

Les cystéine protéases cathepsines B et L sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs de haut poids moléculaire, avant d'être activées sous leur forme mature dans le compartiment lysosomal. Un modèle de trafic intracellulaire des cathepsines B et L est présenté à la **figure (7)**. Les cathepsines B et L sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique sous forme de prépropeptide contenant dans la partie amino-terminale un peptide signal ("pré") et un peptide d'activation ("pro"). Après clivage du peptide signal (17 acides aminés) à leur entrée dans le réticulum endoplasmique, et selon leur séquence nucléotidique, les procathepsines B et L seraient des protéines respectivement de 36 kDa (90) et 35 kDa (91). Le propeptide subit ensuite des glycolysations dans ce même réticulum endoplasmique puis dans l'appareil de Golgi. Au niveau du cis-Golgi, le marqueur mannose 6-P (Man-6P) est synthétisé sur la proenzyme. A leur arrivée dans le trans-Golgi, les procathepsines B et L sont des glycoprotéines respectivement d'environ 46 kDa et 39 kDa, ces tailles étant sujettes à variations suivant le type cellulaire (fibroblastes ou cellules épithéliales) ou l'espèce (humaine ou murine) (78, 92-95). C'est au niveau du trans-Golgi que le devenir de la proenzyme se décide. La première possibilité est la voie de sécrétion constitutive: elle permet à la procathepsine B de 46 kDa et la procathepsine L de 39 kDa d'être dirigées vers le milieu extracellulaire à partir du trans-Golgi. Cette voie *par défaut*

reste cependant une voie très *mineure* dans le trafic intracellulaire des cathepsines. Ainsi seul 5% de la cathepsine B chez des fibroblastes humains d'origine dermique se retrouvent dans le milieu extracellulaire sous forme immature (92). De même 11% de la cathepsine L nouvellement synthétisée chez les fibroblastes NIH3T3 de souris sont sécrétées (96). En fait, pour la plus grande partie, les procathepsines B et L sont *sélectivement* dirigées vers les lysosomes après avoir été "sélectionnée" par les récepteurs Man-6P au niveau du trans-Golgi. C'est la voie *majeure* de transport des cathepsines B et L, et des protéases lysosomiales en général. La proenzyme subit alors au niveau du compartiment lysosomal un processus protéolytique visant à son activation. Cette activation se fait notamment par le clivage du peptide d'activation. La forme mature simple chaîne de l'enzyme qui en résulte peut être transformée en une forme mature double chaîne de l'enzyme par clivage assymétrique. La taille de la forme mature simple chaîne respectivement des cathepsines B et L se situe en règle générale autour de 33 kDa et 29 kDa. Celle des formes doubles chaînes respectivement des cathepsines B et L est d'environ 27 kDa et 20 kDa pour la chaîne lourde et 5 kDa pour la chaîne légère (78, 92, 94, 95, 97).

1.2. Cathepsines et transformation cellulaire.

L'accroissement de l'expression et de la sécrétion des cathepsines, ainsi qu'une altération de leur distribution intracellulaire est souvent décrite dans les cas de transformation maligne chez les humains et les rongeurs. Ainsi une augmentation de l'expression de la cystéine protéase *cathepsine L* (au niveau de l'ARNm et de la protéine) et de la sécrétion de son précurseur (procathepsine L ou MEP major excreted protein) a été observée chez les fibroblastes murins NIH3T3 transformés par les esters de phorbol (98, 99), les facteurs de croissance (100-102), les virus (96, 99, 103) ou la transfection avec l'oncogène ras (91, 104). Dans le cas de tumeurs humaines du colon, une corrélation entre la caractère malin et la sécrétion de la forme mature de la cathepsine L, plutôt que la forme immature, a été établie (105). De la même manière, la sécrétion de la cystéine protéase *cathepsine B* se trouve être directement associée au caractère malin du carcinome humain du sein (106-108). La sécrétion de la forme mature de la cathepsine B (105,

106) ou de la forme immature procathepsine B (107-110) accompagne la progression maligne des tumeurs humaines ou animales. L'augmentation de la sécrétion de la cathepsine B se trouve souvent corrélée à sa distribution au niveau de la membrane plasmique ou des endosomes. Ce phénomène se retrouve aussi bien dans les tumeurs humaines ou animales, que chez les cellules transformées (pour revues voir (111, 112)). Un accroissement des transcrits de la cathepsine B a été reporté chez les fibroblastes NIH3T3 transformées par ras (113, 114), ainsi que dans les tumeurs humaines et animales (97, 110, 115).

1.3. Cathepsines B et L dans la PR.

Le phénotype de la cellule synoviale dans la PR s'apparente à celui d'une cellule transformée. En effet, comme chez cette dernière, la cellule synoviale exprime et sécrète de manière très marquée les cystéine protéases cathepsines B et L. La cathepsine B a été détectée dans des explants de synoviale rhumatoïde et dans les milieux de culture (62). Van Noorden a également montré que dans le cas d'arthrite induite chez le rat il existe une augmentation conséquente d'une activité cathepsine B au niveau des synoviocytes et de la matrice du cartilage articulaire (63). Dans l'arthrite induite expérimentalement dans le lapin, Etherington a démontré une augmentation du niveau de cathepsine L dans la membrane synoviale (64). En relation avec une immunolocalisation dans les cellules synoviales aux sites de destruction de l'os et du cartilage, une activité transcriptionnelle élevée pour les deux cathepsines B et L a été détectée dans ces mêmes cellules synoviales (46, 47).

Dans la mesure où les cathepsines B et L sont capables de dégrader les collagènes de type I, II, IX, XI (60), ainsi que les protéoglycanes (61), deux éléments importants de la matrice extracellulaire de l'os et du cartilage, ces deux enzymes sont potentiellement des agents importants du processus de dégradation articulaire dans la PR. La caractérisation des cathepsines B et L, notamment au niveau de la régulation de leur expression, trafic intracellulaire et sécrétion, apparaît donc être un élément important de l'étude du phénotype transformé et destructeur des cellules synoviales de type fibroblastique dans la PR.

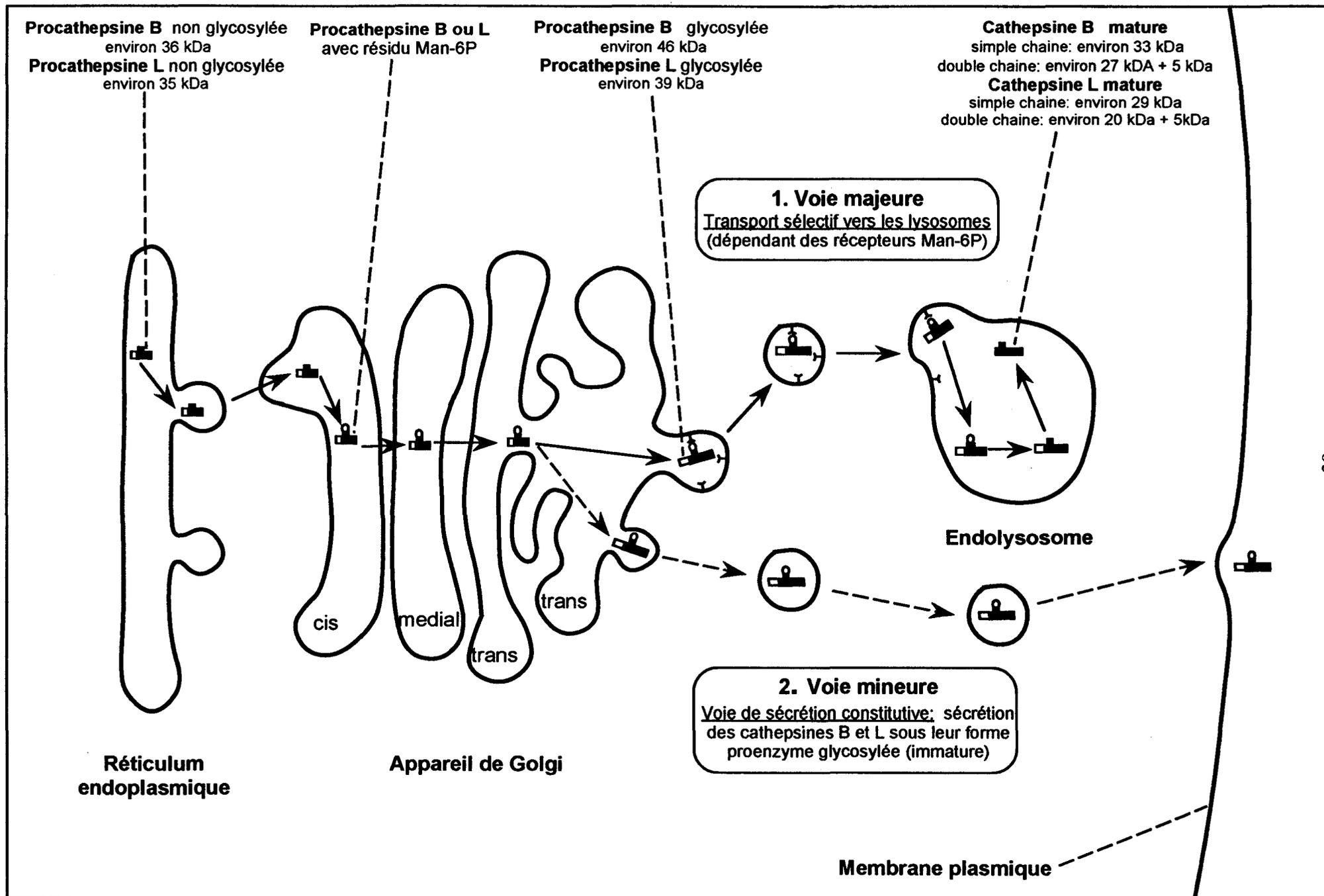


FIGURE 7. Modèle de trafic intracellulaire normale des cathepsines B et L

2. INTRODUCTION

Les études histomorphologiques ont montré que l'érosion typique du cartilage articulaire dans la PR prédomine dans les zones contigües à un front de cellules synoviales proliférantes d'apparence transformée qui composent le pannus rhumatoïde (33). Ces cellules sont de type fibroblastique ou macrophagique (44). Les cellules synoviales de type fibroblastique sont généralement considérées comme les agents effecteurs majeurs de la destruction de l'articulation rhumatoïde. Ces cellules sécrètent des enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéases interstitielles collagénase et stromelysine (116-119). Notre équipe a également mis en évidence chez ces mêmes cellules synoviales une sécrétion de cystéine protéases (78). Ce phénotype destructeur des cellules synoviales de type fibroblastique dans la PR est probablement régulé par les cytokines inflammatoires présentes à l'interface pannus-cartilage.

Diverses cytokines, incluant facteurs de croissance et interleukines, sont connues dans la PR pour être présentes au niveau du liquide synovial et à l'interface pannus-cartilage: l'IL-1, le TNF- α , l'IFN- γ , le bFGF et le PDGF. Ces cytokines stimulent *in vitro* plusieurs caractéristiques du phénotype pathologique et destructeur exprimé par les cellules synoviales de type fibroblastique dans le tissu rhumatoïde *in vivo*: sécrétion d'enzymes protéolytiques et prolifération cellulaire (partie détaillée dans la partie II de l'introduction décrivant le phénomène de transformation cellulaire dans la PR).

La régulation potentielle du phénotype transformé et destructeur des cellules synoviales de type fibroblastique par les cytokines n'a pas été pleinement étudiée. En effet, les recherches se sont essentiellement focalisées sur les métalloprotéases collagénase et stromelysine, enzymes considérés comme les agents majeurs de la destruction du cartilage de l'articulation rhumatoïde. Très peu d'études ont été entreprises en ce qui concerne les cystéine protéases. En effet, on considère généralement que les protéases lysosomiales ne peuvent être effectives dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans la mesure où le pH auquel elles ont une activité optimale se trouve être en dessous de celui généralement trouvé dans le milieu extracellulaire. Cependant, certains travaux ont montré que la cathepsine B reste active assez longtemps à pH neutre pour initier la dégradation

du tissu (62). De plus, d'autres études faites *in vitro* ont suggérées que le microenvironnement à l'interface pannus cartilage est de pH acide, et donc approprié à une action optimale des enzymes lysosomiales (120). Ceci renforce le rôle potentiel des cystéine protéases lysosomiales, cathepsines B et L, dans la destruction de l'articulation rhumatoïde.

Comme certaines cytokines inflammatoires présentes au niveau de la synoviale rhumatoïde apparaissent réguler spécifiquement le phénotype transformé invasif des cellules synoviales de type fibroblastique dans la PR, la régulation potentielle par les cytokines de l'expression et sécrétion des cathepsines B et L a été étudiée chez ces cellules. Notre équipe avait déjà démontré dans une étude préliminaire que le TNF- α et l'IL-1 stimulent la sécrétion d'une activité cystéine protéase latente chez les cellules synoviales de type fibroblastique (78). Dans cette étude nous avons examiné l'effet potentiel de cytokines telles que le TNF- α , PDGF, bFGF et IFN- γ sur la sécrétion et l'expression des cystéine protéases cathepsines B et L chez ces mêmes cellules synoviales de type fibroblastique.

3. MATRIELS ET METHODES

3.1. Cytokines. Le TNF α , l'IFN γ et le bFGF, tous recombinant humain, étaient fournis par la société Calbiochem (San Diego, CA). Le PDGF recombinant humain par la société Genzyme (Cambridge, MA).

3.2. Culture cellulaire et traitement par les cytokines. Le tissu synovial était obtenu lors d'une intervention chirurgicale pour arthroplastie totale chez des sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde. Bien que cela ne fut pas étudié systématiquement, aucune différence significative ne fut notée dans les paramètres étudiées dans ce travail entre les lignées cellulaires établies à partir de différents patients. Les cellules synoviales de type fibroblastique étaient ensuite isolées comme décrit précédemment (82). Brièvement, le tissu synovial était haché très finement, puis dissocié enzymatiquement pendant 4 heures à 37°C dans du Milieu de Dulbecco Modifié par Iscove (IMDM) (Life Technologie, Cergy Pontoise) sous l'action de la collagénase (type III, Worthington, freehold, NJ) à raison de 4 mg/ml. Après digestion, les cellules libérées et les fragments de tissu digérés étaient recueillis par centrifugation à 500 G pendant 10 minutes, puis resuspendus dans du milieu complet (IMDM + 10% de sérum de veau foetal (FBS), 50 U/ml de pénicilline, et 50 microgrammes/ml de streptomycine. Les cellules étaient cultivées à 37°C dans 5% de CO $_2$, et passées à une dilution de 1 pour 3 jusqu'à la première utilisation, en général au passage numéro 3 ou 4. A ce stade, 99% des cellules en culture étaient des cellules de type fibroblastique (121).

Les cellules étaient ensuite cultivées presque à confluence dans des plaques 6 puits (Costar), puis placées dans du milieu sans sérum pendant 24 heures. Après cette période de privation, le milieu sans sérum était renouvelé (1 ml). Les cellules étaient alors traitées par diverses cytokines (TNF- α , PDGF, bFGF et IFN- γ) à différentes concentrations et suivant des temps variables (4, 8, 12 et 24 heures).

Après traitement par les cytokines, le milieu de culture et les cellules étaient collectés. Le test d'exclusion du bleu trypan a toujours démontré que le traitement par les cytokines n'influence pas la viabilité cellulaire (viabilité toujours supérieure à 95%). Les suspensions cellulaires étaient

centrifugées, et les culots cellulaires lysés par ultrasonication dans du sucrose à 0,25 M (200 µl pour 10⁶ cellules). Le dosage des protéines cellulaires étaient pratiqué selon la méthode de Peterson (122).

3.3. Dosage des cathepsines B et L en ELISA. Le dosage par ELISA des cathepsines B et L était fait à partir de kit vendu par la société BioAss (Dießen, Allemagne). Selon le protocole, les formes précurseurs et matures des cathepsines étaient détectées aussi bien pour la L que la B. Le complexe que ces deux cathepsines peuvent former avec leurs inhibiteurs endogènes respectifs est également détecté. En bref, 100 µl du milieu de culture étaient ajoutés à l'anticorps polyclonal anti-cathepsine B ou L immobilisés au fond de puits de plaques de microtitration. Après 2 heures d'incubation à 37°C, et plusieurs lavages, une incubation de 2 heures à 37°C était faite avec un second anticorps anti-cathepsine B ou L marqué à la peroxidase. Après révélation, l'intensité de la réaction colorimétrique était mesurée au spectrophotomètre à 450 nm. La concentration des cathepsines B et L était directement proportionnelle à l'intensité de la coloration et exprimée en ng/g de protéine cellulaire.

3.4. Mesure des activités de type cathepsine B ou L. L'activité cathepsine B était mesurée à partir du substrat fluorogène Z-Arg-Arg-AMC (Bachem, Bubendorf, Suisse) en présence de l'inhibiteur spécifique E-64 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). L'activité latente était activée par traitement à la trypsine comme décrit par Quian (110). L'activité cathepsine B était déterminé à l'aide d'un Cobas Fara II Centrifugal Analyzer selon une procédure bien précise.(123). Brièvement, pour chaque test, l'appareil distribuait successivement (a) 12.5 µl de l'échantillon et 214 µl de tampon 0.05 M MES (2{N-Morpholino}etanesulphonic acid), pH 5.2 contenant du dithiothreitol et 2.5 mM EDTA; (b) 12.5 µl de pepsine (0.9 mg/ml) en tampon 0.05 M acetate pH 4.2 ou 12.5 µl de tampon seul; (c) 12.5 µl d'aminométhylcoumarine (0.25 mM dilué 100 fois avec du tampon 0.05 M Mes pH 5.2); (d) 31 µl de substrat (0.25 mM dans 1 g/l Brij 35 aqueux); (e) 20 µl de E-64 {1-(L-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamino)-4-guanidinobutane} (0.033 mM dans 1 g/l Brij 35 aqueux). L'activité cathepsine B était déterminée à partir de la différence

entre les activités mesurés avec et sans E 64, et exprimée en mU/g de protéine cellulaire (1 mU d'activité correspond à la libération de 1 nmole d'aminométhylcoumarine par minute).

L'activité cathepsine L était mesurée à partir du substrat Z-Phe-Arg-AMC (Bachem) en présence et en absence de l'inhibiteur sélectif Z-Phe-Phe-CHN₂ (124). La concentration finale (0.7 μM) de l'inhibiteur, qui permet l'inhibition complète de l'activité cathepsine L sans affecter celle de la cathepsine B, était choisie à partir du dosage de cathepsine B et L purifiées (Calbiochem, La Jolla, CA). A 100 μl de l'échantillon, 200 μl de tampon 0.05 M MES pH 5.2 avec ou sans Z-Phe-Phe-CHN₂ sont ajoutés, puis incubés à 37°C pendant 30 minutes. L'activité enzymatique était déterminée à partir du Cobas Fara II selon la même procédure que pour la cathepsine B. L'activité cathepsine B était déterminée à partir de la différence entre les activités mesurés avec et sans Z-Phe-Phe-CHN₂, et exprimée en mU/g de protéine cellulaire (1 mU d'activité correspond à la libération de 1 nmole d'aminométhylcoumarine par minute)

3.5. Northern blot et hybridation. L'ARN total était préparé à partir de la lyse de 2.10⁶ cellules par ml de RNazol (Bioprobe Systems, Montreuil, France). L'ARN était ensuite extrait deux fois par du chloroforme et précipité par de l'isopropanol pendant 45 minutes à -20°C. Le culot lavé dans de l'éthanol à 70% était alors repris dans 20 microlitres d'eau. L'ARN était alors quantifié par mesure de la DO à 260 nm. Après dénaturation pendant 2 mn à 95°C, l'ARN total (5 μg) était séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1%/1.1M formaldéhyde en tampon MOPS (Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique). L'ARN était ensuite transféré par capillarité en tampon 10X SSC (NaCl 3 M, citrate trisodium 0.3 M) sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham, Les Ulis, France), puis fixé par séchage à 80°C pendant 2 heures. Les sondes ADNc étaient marquées avec de l'³²Pα-dCTP selon la méthode de l'amorçage au hasard (Megaprime DNA labelling system - Amersham). Préhybridation, hybridation et lavages de la membrane étaient effectués selon un protocole modifié de Church et Gilbert (125). Brièvement, la membrane était préhybridée 5 minutes à 65°C, puis hybridée sur la nuit à 65°C avec la sonde radioactive à raison de 2.10⁶ cpm par ml de tampon d'hybridation. Tampon de préhybridation et d'hybridation sont identiques (1% BSA - 7% SDS - 0.5 M NaH₂ PO₄ pH 7.0 - 1mM EDTA). La membrane était ensuite lavée deux fois 10 minutes à 65°C avec un premier tampon de lavage (0.5% BSA -

5% SDS - 40 mM NaH₂ PO₄ pH 7.0 - 1mM EDTA) puis quatre fois 10 mn à 65°C avec un second tampon lavage (1% SDS - 40 mM NaH₂ PO₄ pH 7.0 - 1mM EDTA). La membrane hybridée était autoradiographiée à -80°C sur un film KODAK X-OMAT. L'intensité des signaux radiographiques était évaluée par un analyseur d'image (Image Master DT, Pharmacia).

3.6. Synthèse des sondes ADNc de cathepsine B et L. Une sonde cathepsine L humaine était préparée par transcription inverse de 2 µg ARN total issu de tissu synovial humain, suivie d'une PCR (Polymérase Chain Reaction) à partir de primers spécifiques aux extrémités de la région s'étendant des paires de bases 604 à 999 de l'ADNc de la cathepsine L cloné précédemment (126). Le fragment résultant était sous-cloné dans le vecteur pGEX (Pharmacia, Uppsala, Suède), puis séquencé partiellement, montrant ainsi une séquence identique à celle publiée précédemment. Une sonde de la cathepsine B humaine était aussi synthétisée par transcription inverse d'ARN total de synoviale humaine, suivie d'une amplification de l'ADNc de la cathepsine B (90) par PCR à partir des primers suivants :

5'-CCTGGACATGAGCTACTTGAAG-3' sur l'exon 4

5-TCCCAGTACTGATCGGTGCGT-3' sur l'exon 11.

Le fragment amplifié était ensuite sous-cloné dans le vecteur pBlueScript II KS+ (Stratagene, La Jolla, CA). L'amplification des plasmides était faite en bactéries E.Coli NM522. Les ADNc clonés de la cathepsine B (805 pb) et cathepsine L (395 pb) étaient isolés sur gel d'agarose, et purifiés à l'aide du kit Geneclean (Bio 101, San Diego, CA).

3.7. Western Blot. Après traitement des cellules synoviales par les cytokines (voir condition ci-dessus), les protéines extracellulaires (1 ml de milieu de culture) et intracellulaires (50 µg de protéines du lysats cellulaires) étaient séparées sur un gel de gradient d'acrylamide (5-30%) en conditions dénaturantes (127). Les protéines étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode décrite par Vaessen et al (128). La membrane était ensuite traitée avec un anticorps de lapin dirigé contre la cathepsine B ou cathepsine L humaine (Calbiochem) dilué au 1/200^e. La membrane était ensuite incubée avec un anticorps anti Ig de lapin (ICN

Biomedicals) marqué à la peroxidase. La révélation s'effectuait en présence de chloro-1-naphtol (Sigma).

3.8. Immunofluorescence. Les cellules synoviales étaient cultivés sur des lamelles en verre (Nunc), puis traités par les cytokines. Les cellules étaient ensuite fixées à l'éthanol 80% pendant 10 minutes. Après trois lavage en PBS et un traitement à la glycine 0.1 M pendant 3 minutes, les cellules étaient incubées pendant une heure avec l'anticorps primaire dilué au 1/100^e en PBS (anticorps polyclonal de lapin anti-cathepsine B ou L (Calbiochem), ou anticorps monoclonal de souris anti-fibroblaste humain (clone 5B5, DAKO)). Après lavage en PBS, les cellules étaient incubées pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire (anti Ig de souris ou de lapin conjugué à la FITC (DAKO)). Les cellules étaient ensuite lavées, montées sur lame avec une solution DABKO, et observées avec un microscope Leitz.

3.9. Microscopie électronique. Les cellules synoviales de type fibroblastique étaient cultivées dans des flacons de culture de 150 cm² presque à confluence (environ 3.10⁶ cellules), et privées de sérum pendant 24 heures. Les cellules étaient ensuite traitées par les diverses cytokines pré-citées. Après 24 heures, les cellules étaient récupérées et centrifugées 10 minutes à 500 g. Les culots cellulaires de chaque stimulation étaient fixées une heure dans du glutaraldéhyde 1%, puis mis en tampon cacodylate 0.2 M ph 7.4. Le culot étaient déshydraté dans des bains d'alcool successif selon la procédure PLT (Progressive Low Temperature), puis inclus à froid dans une résine de type lowycriol. Après polymérisation de la résine aux UV, des coupes ultrafines de 70 nm d'épaisseur étaient effectuées et déposées sur des grilles au nickel.colloidioné Un immunomarquage anti-cathepsine B et L à l'or colloïdal était ensuite pratiqué selon les règles. En bref, les coupes étaient pré-traitées 10 mn avec du sérum de chèvre dilué au 1/100^e dans du tampon TNO. (Tris-NaCl-Ovavlbumine), incubées pendant 1 nuit à 4^{°c} avec un anticorps polyclonal de lapin anti-cathepsine B ou L humaine (Calbiochem) dilué au 1/250^e dans du tampon TNO. Après lavage, une incubation avec un anticorps marqué à l'or colloïdal (latencifié au lactate d'argent) anti-IgG de lapin (TEBU Biocell) dilué au 1/50^e était effectuée pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules étaient ensuite post-fixée en glutaraldéhyde 1% pendant 10

minutes. Suit une amplification à la lactate hydroquinone pendant 15 minutes à l'obscurité. Finalement, une contre-coloration à l'acétate d'uranyle à 6% et au citrate de plomb était pratiquée. Les immunomarquages anti-cathepsine B et L étaient ensuite analysés au microscope électronique (Zeiss EM 10 CR).

3.10. RT-PCR de la région 5' de l'ARNm de la cathepsine B. L'ARN total était préparé par lyse des cellules au RNazol. L'intégrité du RNA était vérifiée sur gel d'agarose en visualisant les bandes 18 S et 28 S. La RT était faite à 42°C à partir de 2 µg d'ARN en utilisant la transcriptase reverse du MMLV et des primers polydT(Life Technologies). La PCR était faite sur un Perkin Elmer's GeneAmp system 9600 thermal cyler. Les primers utilisés pour amplifier la région 5' de l'ADNc de la cathepsine B étaient:

5'-GGGATCCAACCGCTCCGCTGCGCGC- 3' dans l'exon 1 (sens)

5'-GGGAATTCGGTGTGGATGCAGATCCG- 3' dans l'exon 6 (anti-sens).

L'amplification se faisait sur 30 cycles (30 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C, et 2 minutes à 72°C) dans un volume de 100 µl. Les produits PCR étaient ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, transférés sur une membrane de nylon, et hybridés à la sonde ADNc de 805 pb radiomarquée de la cathepsine B. L'intensité de chaque bande d'amplification était ensuite analysée sur Phosphor Imager 445 SI.

4. RESULTATS

4.1. Régulation par les cytokines de la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique.

Pout tester l'effet du TNF- α , du PDGF, du bFGF, et de l'IFN- γ sur la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales fibroblastique, le temps nécessaire à chacune des cytokines pour induire un niveau maximum de cathepsines dans le milieu de culture était d'abord déterminé (cinétique de temps). Sur cette base, l'effet stimulant de chacune des cytokines sur la sécrétion était maximisé par détermination d'une concentration optimale (cinétique de concentration). Les données présentées ci-après sont représentatives de celles obtenues sur deux autres lignées cellulaires.

4.1.1. Effet du TNF- α sur la sécrétion de cathepsine B.

Notre équipe avait démontré la sécrétion d'une activité cystéine protéase latente chez les cellules synoviales de type fibroblastique traitées avec le TNF- α (78). L'activité maximale sécrétée était alors détectée après 24 heures de traitement pour des concentrations de TNF- α allant de 100 à 500 units/ml. La nature de cette activité cystéine protéase sécrétée dans le milieu de culture était donc examinée par ELISA. L'addition de TNF- α recombinant au milieu de culture a induit la sécrétion de cathepsine B. L'effet stimulant du TNF- α sur la sécrétion de cathepsine B était apparu maximal à la concentration 2 ng/ml (figure 8). Le TNF- α a provoqué une augmentation de la sécrétion de cathepsine B de l'ordre d'un facteur 5. Il n'a pas induit en revanche une sécrétion de la cathepsine L. Dans le même temps, l'activité sécrétée de type cathepsine B était évaluée après activation à la pepsine. Les données obtenues à partir des activités de type cathepsine B étaient en accord avec celles obtenues à partir des ELISA, comme l'a démontré l'allure identique des courbes de dosage de la protéine cathepsine B et de l'activité cathepsine B (figure 8). Cette étude a confirmé que l'activité cystéine protéase sécrétée après traitement par le TNF- α représentait essentiellement la cathepsine B.

4.1.2. Effet du PDGF sur la sécrétion de cathepsine B.

Pour caractériser de manière plus complète la régulation de la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique, leur réponse au PDGF, un facteur de croissance connu pour réguler leur phénotype transformé et invasif dans la PR, était testée. Le traitement de ces cellules par le PDGF a induit une augmentation de la sécrétion de la cathepsin B. Un accroissement maximum d'un facteur 2,3 de la sécrétion de cathepsine B était constaté après 8 heures de traitement par le PDGF (figure 9A, PDGF / cathepsine B et contrôle / cathepsin B). Le niveau de cathepsine B sécrétée était apparu maximum après 8 heures de stimulation, avant de revenir à son niveau contrôle à 24 heures. L'effet stimulant du PDGF sur la sécrétion de cathepsine B à 8 heures de traitement était optimisé pour une concentration de 25 ng/ml, avec une augmentation d'un facteur 3,1. Cet effet n'était pas retrouvé à 24 heures (figure 9B). En revanche, la sécrétion de la cathepsine L n'a pas semblé être régulée par le PDGF, comme l'ont démontré les niveaux tout à fait similaires de cathepsine L sécrétés chez les cellules traitées et non traitées (figure 2A, PDGF / cathepsine L et contrôle / cathepsine L).

4.1.3. Effet du bFGF sur la sécrétion des cathepsines B et L.

Puisque nous avons trouvé que le PDGF régulaient la sécrétion de cystéine protéase chez les cellules synoviales de type fibroblastique, il était intéressant de tester un autre facteur de croissance connu pour ses capacités à réguler le phénotype des cellules synoviales. Nous avons démontré que chez ces cellules le bFGF stimulait fortement la sécrétion de la cathepsine L, et d'une manière relativement marquée celle de la cathepsine B. Après 24 heures de traitement des cellules synoviales par le bFGF (20 ng/ml), le niveau de cathepsine L sécrétée dans le milieu était augmenté 2,2 fois. La sécrétion de la cathepsine B n'était alors pas apparue être régulée par le bFGF (figure 10A). L'effet stimulant du bFGF sur la sécrétion de cathepsine L était optimisé pour une concentration de 10 ng/ml avec un accroissement de près d'un facteur 8. Un effet du bFGF sur la sécrétion de cathepsine B était finalement détecté après optimisation à 10 ng/ml et plus du doublement de la sécrétion de la cathepsine B (figure 10B). Les activités cathepsine L sécrétées étaient aussi évaluées dans le milieu de culture. Les activités cathepsine L étaient mesurées avec activation préalable à la pepsine. Les données obtenues à partir des activités cathepsine L étaient en

accord avec celles obtenues en ELISA pour la protéine, comme le démontre la similarité des deux courbes (figure 10B).

4.1.4. Effet de l'IFN- γ sur la sécrétion des cathepsines B et L.

Nous avons également étudié l'effet de l'IFN- γ sur la sécrétion des cystéine protéases. Le traitement par l'IFN- γ des cellules synoviales de type fibroblastique induit une augmentation de la sécrétion des deux cathepsines B et L. L'effet de l'IFN- γ sur la sécrétion des cathepsines est apparu plus marqué pour la cathepsine B que pour la cathepsine L. Le niveau des cathepsines B et L dans le milieu de culture était presque doublé à 24 heures de traitement par l'IFN- γ (figure 11A, IFN- γ / cathepsine B et contrôle / cathepsine B - IFN- γ / cathepsine L et contrôle / cathepsine L). L'effet stimulant de l'IFN- γ sur la sécrétion des cathepsines était optimisé à la concentration de 25 ng/ml avec une augmentation maximale d'un facteur 4,7 pour la cathepsine B, et 10 ng/ml avec une augmentation maximale d'un facteur 2,2 pour la cathepsine L (figure 11B).

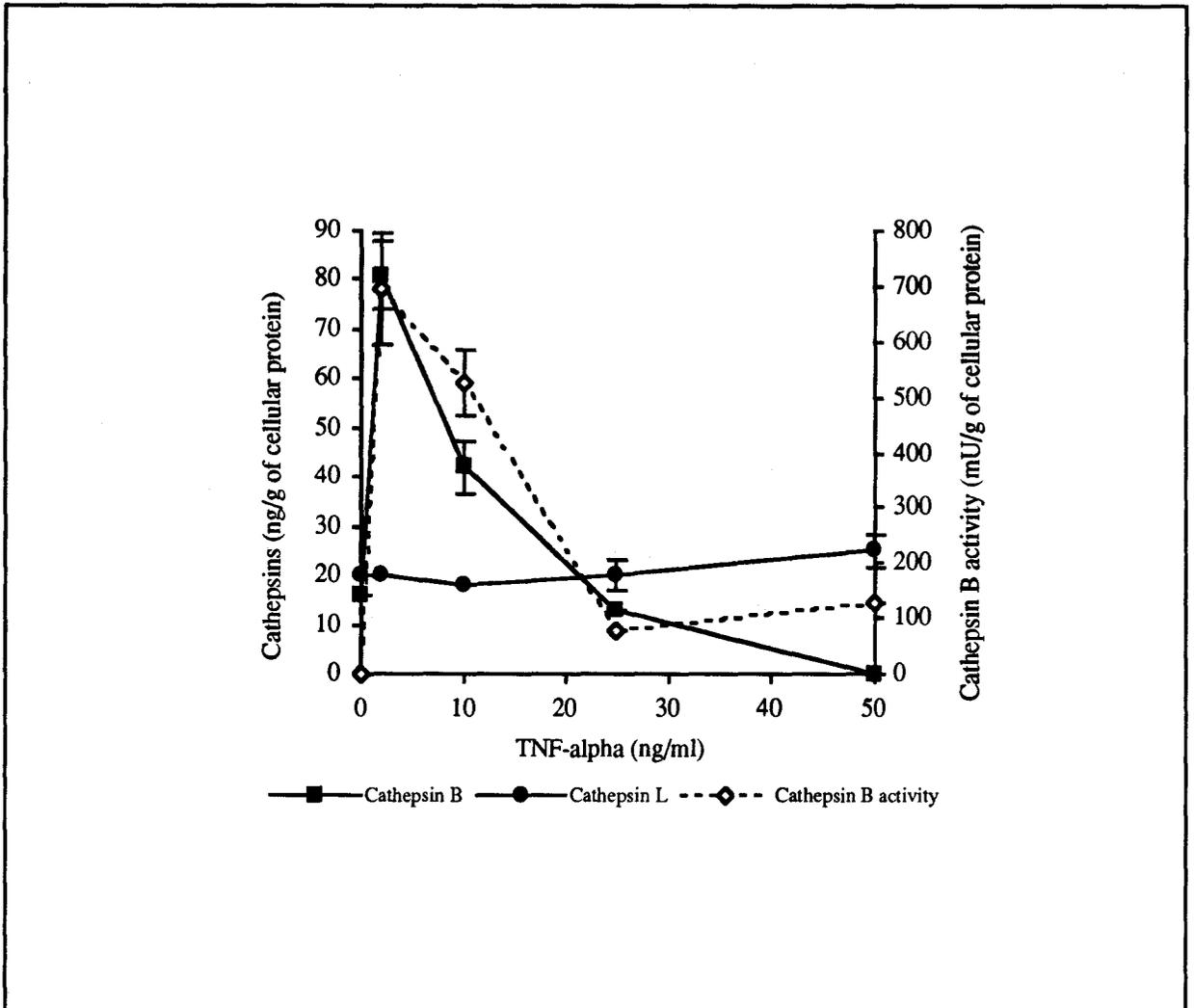


Figure 8. INFLUENCE DU TNF- α SUR LA SÉCRÉTION DE LA CATHEPSINE B CHEZ LES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE. Les cellules synoviales étaient cultivées presque à confluence dans des plaques 6 puits, privées de sérum pendant 24 heures, puis traitées par le TNF-alpha à différentes concentrations. Après 24 heures, le milieu de culture était collecté, et analysé en ce qui concerne la cathepsine B et L en ELISA, et pour l'activité de type cathepsine B en utilisant le substrat fluorigène Z-Arg-Arg-AMC. Chaque point est la moyenne de deux mesures, la barre d'erreur représentant l'erreur standard à la moyenne. Les barres d'erreur ne sont pas montrées quand l'erreur standard est inférieure à 5 ng/g or 30 mU/g.

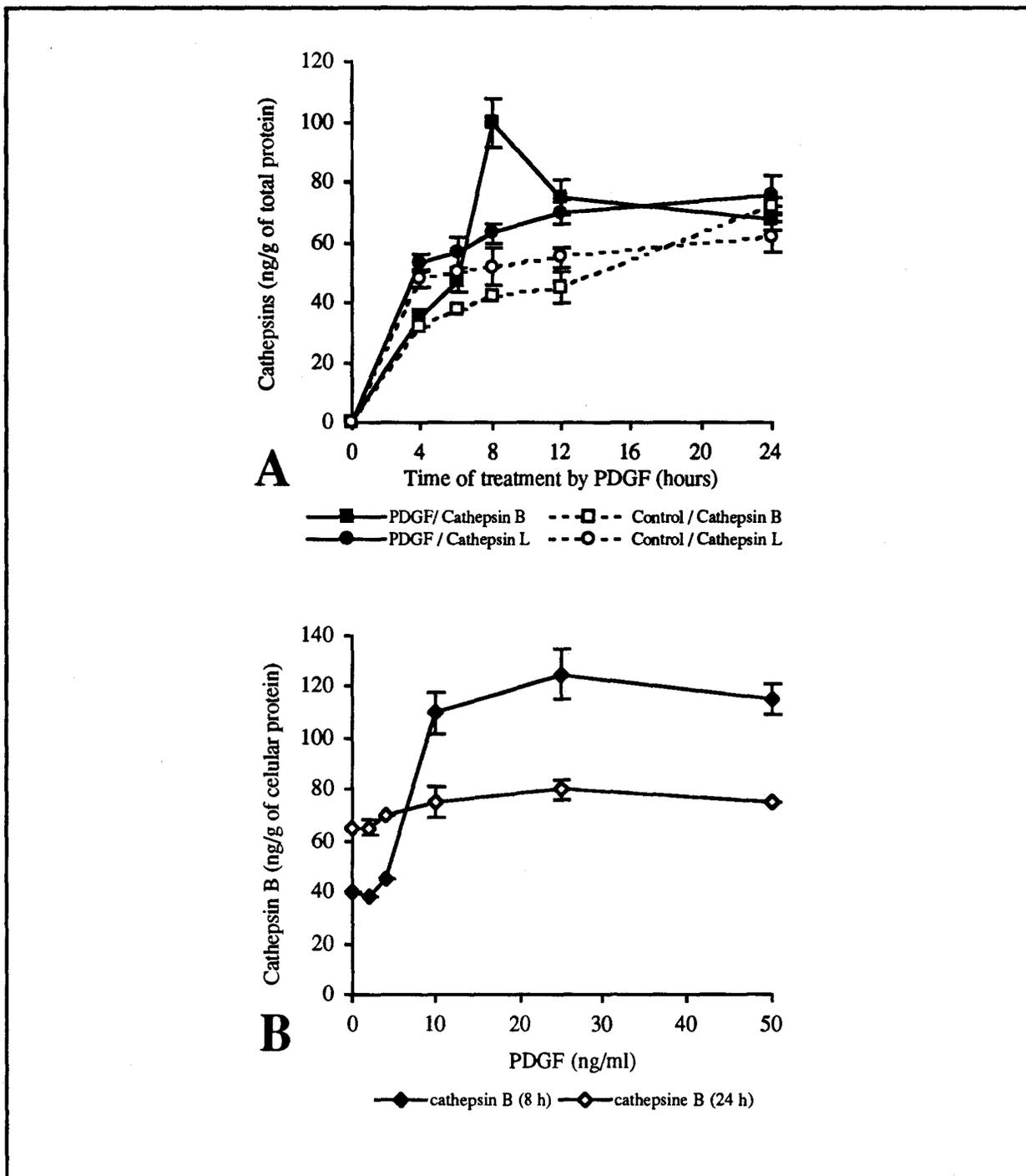


Figure 9. INFLUENCE DU PDGF SUR LA SÉCRÉTION DE LA CATHEPSINE B CHEZ LES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE. Les cellules synoviales étaient cultivées presque à confluence dans des plaques 6 puits, puis privées de sérum pendant 24 heures. Les cinétiques de temps (A) et de concentrations (B) pour le PDGF étaient ensuite effectuées. (A) Les cellules étaient traitées par le PDGF (10 ng/ml) ou laissées non traitées (Contrôle). Le milieu de culture était ensuite collecté à 4, 6, 8, 12 et 24 heures de traitement par le PDGF, et analysé en ce qui concerne les cathepsines B et L en ELISA (B) Les cellules étaient traitées par le PDGF à différentes concentrations. Le milieu de culture était collecté à 8 et 24 heures de traitement, et analysé en ce qui concerne les cathepsines B et L en ELISA. Chaque point est la moyenne de deux mesures, la barre d'erreur représentant l'erreur standard à la moyenne. Les barres d'erreur ne sont pas montrées quand l'erreur standard est inférieure à 5 ng/g.

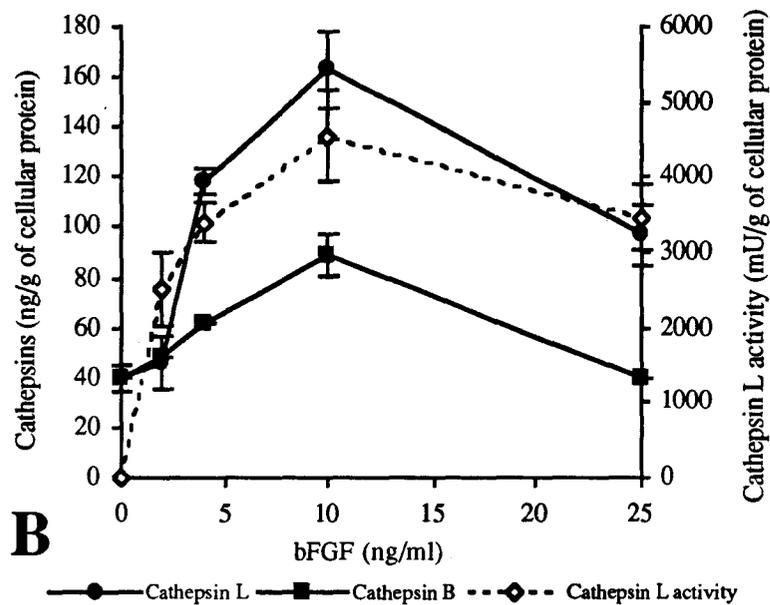
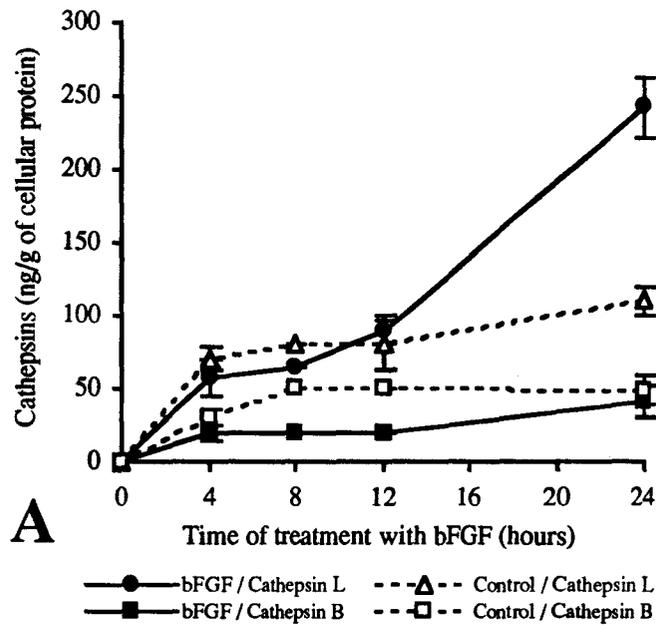


Figure 10. INFLUENCE DU bFGF SUR LA SÉCRÉTION DES CATHEPSINES B ET L CHEZ LES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE. Les cinétiques de temps (A) et de concentrations (B) sont effectuées comme décrit dans la figure 9. La cinétique de temps était effectuée à une concentration de 20 ng/ml. La cinétique de concentration l'était à 24 heures de traitement. L'activité cathepsine L était évaluée grâce à l'utilisation de l'inhibiteur sélectif Z-Phe-Arg-AMC. Chaque point est la moyenne de deux mesures, la barre d'erreur représentant l'erreur standard à la moyenne. Les barres d'erreur ne sont pas montrées quand l'erreur standard est inférieure à 5 ng/g.

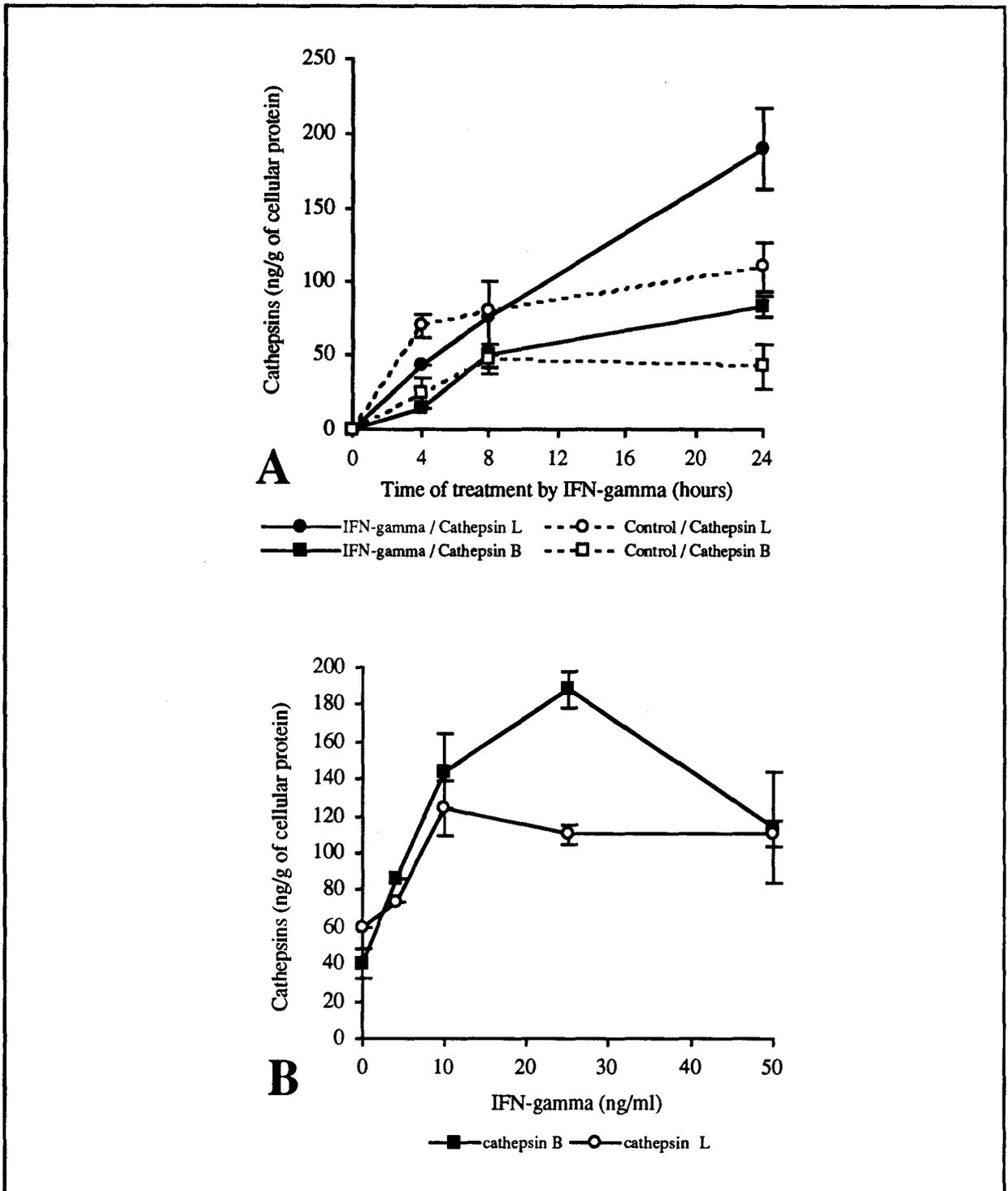


Figure 11. INFLUENCE DE L'IFN- γ SUR LA SÉCRÉTION DES CATHEPSINE B ET L CHEZ LES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE. Les cinétiques de temps (A) et de concentrations (B) sont effectuées comme décrit dans la figure 9. La cinétique de temps était effectuée à une concentration de 10 ng/ml. La cinétique de concentration l'était à 24 heures de traitement. Chaque point est la moyenne de deux mesures, la barre d'erreur représentant l'erreur standard à la moyenne. Les barres d'erreur ne sont pas montrées quand l'erreur standard est inférieure à 5 ng/g.

4.2. Régulation par les cytokines de la synthèse des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique.

Afin de savoir si la sécrétion stimulée par les cytokines des cathepsines B et L avait au moins en partie une origine dans une synthèse accrue de la protéine, la régulation de la synthèse des cathepsines B et L était analysée en immunocytochimie à l'aide d'anticorps polyclonaux sur coupe semi-fines faites sur des cellules synoviales de type fibroblastique traitées par le TNF- α (4 et 24 heures), PDGF (4 et 24 heures), bFGF (24 heures) et IFN- γ (24 heures). Une analyse statistique était entreprise à partir du dénombrement au microscope de cellules positives sur des champs cellulaires constants (planche 1-photo A). Les résultats sont présentés dans le **tableau 6**. Chez les cellules non traitées, 3,5% et 2,8% apparaissaient positives pour la cathepsine B, respectivement à 4 heures et 24 heures. Une augmentation significative du nombre de cellules positives pour la cathepsine B était notée après traitement par le TNF- α (9,7% à 4 heures et 9,7 % à 24 heures), par le bFGF (6,5% à 24 heures), par l'IFN- γ (6,4 % à 24 heures). En ce qui concerne le PDGF, une augmentation significative du nombre de cellules positives pour la cathepsine B était notée à 24 heures (7,2%), mais pas à 4 heures (4,2%). Pour la cathepsine L, 2,6 % des cellules laissées sans traitement étaient positives. Une augmentation significative du nombre de cellules positives pour la cathepsine L était notée après traitement par le bFGF (8,6 %) et l'IFN- γ (7,0%).

Tableau 6. Etude de la régulation par les cytokines de la synthèse des cathepsines B et L chez la cellule synoviale de type fibroblastique par immunomarquage sur coupes semi-fines.

CATHEPSINE B		Nombre de cellules positives*										Moyenne	% **	Probabilité***
4 heures	Contrôle	11	11	11	14	13	14	12	15	12	10	12	3,5	
	TNF-alpha	38	42	28	40	35	39	22	29	37	30	34	9,7	0,0000000
	PDGF	23	14	10	13	17	8	16	16	13	16	15	4,2	0,1178635
24 heures	Contrôle	8	10	10	7	9	10	11	13	9	11	10	2,8	0,0034546
	TNF-alpha	32	32	28	41	30	28	26	17	22	26	28	8,1	0,0000001
	PDGF	32	28	15	35	24	14	19	28	31	27	25	7,2	0,0000031
	bFGF	31	20	24	28	30	20	15	22	19	18	23	6,5	0,0000010
	IFN-gamma	25	24	20	23	25	19	14	17	26	31	22	6,4	0,0000005
CATHEPSINE L		Nombre de cellules positives*										Moyenne	% **	Probabilité***
24 heures	Contrôle	7	11	9	10	6	11	8	6	7	16	9	2,6	
	bFGF	41	28	24	20	26	35	35	29	25	38	30	8,6	0,0000001
	IFN-gamma	27	18	20	22	26	23	23	17	34	34	24	7,0	0,0000010

* nombre de cellules positives dans un champ de 350 cellules - ** pourcentage de cellules positives

*** probabilité associée au test de student: la différence avec le contrôle est considérée significative si $p < 0,05$

4.3. Distribution intracellulaire des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique.

Pour connaître la distribution intracellulaire des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique fortement positives, décrites précédemment, un immunomarquage en fluorescence pour la cathepsine B et L était entrepris à partir d'anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine. Chez les cellules considérées fortement positives pour la cathepsine B et/ou L, le marquage était localisé dans la totalité de la cellule, non seulement dans la région périnucléaire, mais aussi dans les régions plus périphériques, et ce quelque soit le type de stimulation (planche 1-photographie C et D). Ces cellules fortement positives correspondent probablement à celles activées par les cytokines ou constitutivement activées. La localisation des cathepsines B et L chez ces cellules était probablement en relation directe avec le processus de sécrétion. En revanche, les autres cellules synoviales, probablement non activées par les cytokines, présentaient un marquage faible pour les cathepsine B et L, généralement périnucléaire (planche 1-photographie B). Ces cellules avaient été considérées négatives dans le cadre de l'analyse statistique faites auparavant (planche 1-photographie A).

4.4. Localisation ultrastructurale des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique.

Chez les cellules synoviales de type fibroblastique, les cathepsines B et L semblant être acheminées vers la membrane en vue d'une sécrétion après activation par les cytokines, il était intéressant de localiser les structures cellulaires permettant ce transport et d'éventuellement détecter des anomalies du trafic intracellulaire en rapport avec l'action d'une cytokine spécifique. Après traitement des cellules synoviales en culture par le TNF- α , le PDGF, le bFGF, l'IFN- γ pendant 24 heures, un immunomarquage contre les cathepsines B ou L était exécuté sur des coupes ultra-fines des culots cellulaires. L'observation des cellules synoviales activées à fort marquage (référence aux cellules positives du paragraphe précédent traitant de la distribution intracellulaire)

au microscope électronique ne révélait pas de différence entre les différentes cytokines quant à la localisation ultrastructurale des cathepsines B et L chez ces cellules. Les cathepsines B et L se localisaient de la même manière dans des structures vésiculaires réparties du noyau jusqu'à la membrane plasmique (respectivement planche 2-photographie A et planche 3-photographie B). Ces vésicules étant claires ne représentaient probablement pas des vésicules d'endocytose classiques, mais plutôt des vésicules de type lysosome primaire ou de sécrétion. Contrairement aux cellules non activées, les cellules activées formaient généralement des pseudopodes cytoplasmiques associés à une expression des cathepsines B et/ou L dans des structures vésiculaires (planche 3-photographie C).

4.5. Régulation par les cytokines de l'expression des ARNm de cathepsine B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique.

L'influence de cytokines comme le TNF- α , l'IL-1, le PDGF, le bFGF, l'IFN- γ sur l'expression des ARNm des cathepsines B et L chez les cellules synoviales était également testée par Northern blot. Contrairement au TNF- α , IL-1 et IFN- γ qui n'apparaissaient pas influencer significativement sur la transcription des ARNm ni de la cathepsine B, ni de la cathepsine L, le bFGF était capable d'augmenter d'une manière très marquée l'expression des ARNm, aussi bien de la cathepsine B que de la cathepsine L. Dans l'exemple montré, l'expression des ARNm de la cathepsine B, constitutivement assez élevée (figure 12 A: contrôle), était augmentée d'un facteur 2,9 après traitement des cellules par le bFGF (figure 12 A et B: contrôle comparé au bFGF). La stimulation de la transcription de la cathepsine B se produisait de la même manière sur les deux types de transcrits de la cathepsine B de 2,3 et 4,0 kb: le rapport 2,3 kb:4,0 kb était d'environ 2:1 avant comme après traitement par le bFGF. De manière similaire aux transcrits de la cathepsine B, le transcrit de la cathepsine L apparaissait constitutivement élevé (figure 12 A: contrôle), et voyait son expression augmenter d'un facteur 2,6 après traitement par le bFGF (figure 12 A et C: contrôle comparé au bFGF). Des résultats similaires étaient obtenus sur cinq autres lignées cellulaires. L'absence d'effet de la part de cytokines telles que le TNF- α ou l'IL-1 sur la

transcription des cathepsines B et L se trouvait confirmée par la suite ne pas être un artéfact de stimulation dû à un manque d'activité de ces cytokines: l'IL-1 et le TNF- α stimulait de façon très marquée l'expression de la collagénase chez les cellules synoviales (figure 12 A), effet classique chez ces cellules (76, 80). Le bFGF stimulait également l'expression de l'ARNm de la collagénase, comme précédemment reporté chez les cellules synoviales (129).

Pour tenter de comprendre l'effet dépendant du temps du PDGF sur la sécrétion de la cathepsine B chez les cellules synoviales de type fibroblastique, l'expression des transcrits de la cathepsine B était également étudiée à différents temps de traitement par le PDGF. L'analyse par northern blot révélait que la transcription des ARNm de la cathepsine B n'était pas régulée par le PDGF: le niveau des ARNm de la cathepsine B à 3, 6, 8 et 24 heures de traitement par le PDGF ne variait pas significativement par rapport à leur contrôle respectif, et ce pour les deux types de transcrits de 2,3 et 4,0 kb (figure 13: contrôle comparé à PDGF à 3, 6, 8 et 24 heures). Des résultats similaires étaient obtenus sur trois autres lignées cellulaires.

4.6. Analyse par Western blot des cathepsines B et L synthétisées et sécrétées par les cellules synoviales de type fibroblastique.

Afin de mieux comprendre les mécanismes activées par les cytokines lors de la sécrétion des cathepsines B et L par les cellules synoviales, et éventuellement pouvoir corrélérer l'action d'une cytokine à la sécrétion d'une forme particulière des cathepsines, les formes sécrétées et intracellulaires de ces deux enzymes étaient caractérisées par Western blot avant et après traitement des cellules synoviales de type fibroblastique par le TNF- α , PDGF, bFGF ou IFN- γ . Comme le montre la **figure 14 B**, la forme sécrétée de la cathepsine B ne semblent pas varier en fonction du type de cytokine utilisée: on détectait invariablement dans le surnageant une forme de la cathepsine B de poids moléculaire d'environ 43 kDa, que ce soit pour la sécrétion stimulée par le PDGF (à 8 heures de traitement) ou le TNF- α , bFGF ou IFN- γ (à 24 heures de traitement), que la sécrétion constitutive (contrôle). Cette forme de 43 kDa correspond probablement à la procathepsine B. Les formes intracellulaires de la cathepsine B ne semblaient pas non plus varier en fonction du type de

stimulation (**figure 14 A**): on détectait dans les lysats cellulaires une forme de la cathepsine B d'environ 31 kDa et une autre de 27 kDa, et ce aussi bien après traitement par le PDGF (à 8 heures) ou par le TNF- α , bFGF ou IFN- γ (à 24 heures), que constitutivement (contrôle à 8 et 24 heures). Ces formes de 31 kDa et 27 kDa correspondent probablement aux formes respectivement matures simples et doubles chaînes de la cathepsine B. Comme pour la cathepsine B, la cathepsine L ne voyait pas apparaître de nouvelles forme sécrétées dans le surnageant après stimulation par les cytokines (**figure 15 B**): une forme d'environ 40 kDa était invariablement détectée aussi bien après 24 heures de stimulation par le bFGF ou l'IFN- γ que constitutivement (contrôle 24 heures). Cette forme de 40 kDa correspond probablement à la procathepsine L. Le traitement des cellules synoviales par les cytokines ne paraissait pas non plus pouvoir influencer sur la synthèse d'une forme particulière de la cathepsine L (**figure 15 A**): on retrouvait invariablement dans les lysats cellulaires 3 formes de 22 kDa (forme la plus nombreuse), 30 kDa et 40 kDa, aussi bien après 24 heures de traitement par le bFGF ou l'IFN- γ que constitutivement (contrôle 24 heures, bande à 30 et 40 kDa visible seulement sur le blot lui-même). Ces formes de 22 kDa, 30 kDa et 40 kDa correspondent probablement respectivement aux formes matures simples et doubles chaînes de la cathepsine L, et à la procathepsine L.

4.7. Régulation par les cytokines de l'expression des ARNm délétés de l'exon 2 ou des deux exons 2 et 3 de la cathepsine B chez les cellules synoviales de type fibroblastique.

L'épissage alternatif dans la région 5' du pré-messager de la cathepsine B donne naissance à de multiples transcrits, et notamment des ARNm délétés de l'exon 2 ou des deux exons 2 et 3 (130). L'expression de ces deux messagers de la cathepsine B étaient étudiée sur des cellules synoviales traitées par le TNF- α , le PDGF, le bFGF ou l'IFN- γ par transcription inverse suivie de l'amplification par PCR des parties 5' terminales des ADNc. de la cathepsine B. Notre étude démontrait ici une induction sélective du transcript de la cathepsine B délété des exons 2 et 3 par le TNF- α et le PDGF. L'expression du transcript délété du seul exon 2 ne se trouvait en revanche

régulée par aucune des cytokines testées. Dans l'exemple montré, la part prise par l'ARNm délété des deux exons 2 et 3 dans l'expression transcriptionnelle globale de la cathepsine B apparaissait accrue après traitement d'une culture de cellules synoviales par le TNF- α ou le PDGF (figure 16 A et B: PDGF et TNF- α par rapport au contrôle). Les données obtenues à partir de cette culture sont représentatives de celles obtenues dans cinq autres cultures. Les données moyennes obtenues à partir de ces six cultures montraient que chez les cellules non traitées l'expression de l'ARNm délétés des exons 2 et 3 ne représentait que 9,7% \pm 1,2% de l'expression globale des ARNm de la cathepsine B, alors que la proportion de cet ARNm passait à 14,9% \pm 1,7% après traitement par le PDGF et à 17,3 % \pm 2,4% après traitement par le TNF- α (figure 16 C). L'analyse statistique confirmait une augmentation significative de la proportion d'ARNm délétés des exons 2 et 3 seulement après stimulation par le TNF- α (p=0,025) et le PDGF (p = 0,011) (tableau 7, 306/total). L'ARNm de la cathepsine B délété du seul exon 2, bien qu'étant l'ARNm prépondérant pour la cathepsine B (autour de 65%), ne voyait pas son expression sélectivement accrue sous l'action des cytokines testés (tableau 7, 461/total).

Tableau 7. Induction sélective de l'expression du transcrite de la cathepsine B délété des deux exons 2 et 3 par le TNF- α et le PDGF chez la cellule synoviale de type fibroblastique

306/total*	Culture 1	Culture 2	Culture 3	Culture 4	Culture 5	Culture 6	Moyenne	Ecart Type	SEM	Probabilité
Contrôle	0,08	0,13	0,14	0,09	0,09	0,06	0,097	0,029	0,012	
PDGF	0,13	0,15	0,24	0,12	0,12	0,14	0,149	0,042	0,017	0,011
TNF-alpha	0,12	0,20	0,26	0,15	0,09	0,22	0,173	0,060	0,024	0,025
FGF	0,11	0,05	0,20	0,18	0,09	0,09	0,119	0,053	0,022	0,398
IFN-gamma	0,12	0,08	0,23	0,12	0,08	0,12	0,125	0,050	0,021	0,232
461/total*	Culture 1	Culture 2	Culture 3	Culture 4	Culture 5	Culture 6	Moyenne	Ecart Type	SEM	Probabilité
Contrôle	0,47	0,69	0,46	0,74	0,51	0,84	0,618	0,146	0,060	
PDGF	0,77	0,59	0,45	0,75	0,68	0,70	0,656	0,109	0,045	0,606
TNF	0,59	0,70	0,46	0,72	0,59	0,62	0,613	0,085	0,035	0,921
FGF	0,62	0,82	0,48	0,75	0,70	0,75	0,687	0,110	0,045	0,175
IFN	0,56	0,81	0,50	0,69	0,70	0,65	0,652	0,100	0,041	0,574

* total = addition des bandes de 306,461 et 549 paires de bases

** probabilité associée au test de student: la différence avec le contrôle est considérée significative si p<0,05

LEGENDE PLANCHE 1

PHOTOGRAPHIE A. Analyse de la synthèse des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique sur coupes semi-fines. Après avoir été cultivées presque à confluence, les cellules synoviales étaient traitées par le TNF-alpha, le PDGF, le bFGF, l'IFN-gamma ou laissées sans traitement (contrôle) pendant 4 ou 24 heures. Après les avoir décollées, les cellules étaient centrifugées. Les culots cellulaires étaient alors fixés dans le glutaraldéhyde 1%. Les culots étaient ensuite inclus dans une résine type lowycriol, et des coupes fines étaient effectuées. Un immunomarquage contre les cathepsines B ou L était alors exécuté à l'aide d'anticorps polyclonaux. Les cellules étaient ensuite observées au microscope optique. Seules les cellules à marquage bien visible sont considérées positives. La cellule contrôle présentée ici (flèche entière) exprime constitutivement la cathepsine B (coloration spécifique marron). Les cellules à faible marquage périnucléaire étaient considérées ici comme négatives (pointe de flèche). Barre=20 µm.

PHOTOGRAPHIES B, C ET D. Distribution intracellulaire des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique. Après traitement des cellules synoviales par le TNF-alpha, le PDGF, le bFGF, l'IFN-gamma pendant 24 heures, les cellules étaient fixées à l'éthanol 80 %. Un immunomarquage à la fluorescéine était alors entrepris contre les cathepsines B et L. Les cellules étaient ensuite observées au microscope en fluorescence à 260 nm. La **photo B** présente le cas général de la cellule synoviale à marquage anti-cathepsine B ou L faible et localisé en zone périnucléaire: ces cellules n'ont probablement pas été activées par les cytokines. Les **photos C et D** présentent le cas général de la cellule synoviale à fort marquage respectivement anti-cathepsine B et anti-cathepsine L, situé dans les deux cas dans des zones périnucléaires (flèche fine) et périphériques (flèche épaisse): ces cellules ont été probablement activées par les cytokines, ou étaient constitutivement activées. N=noyau. Barre=10 µm.

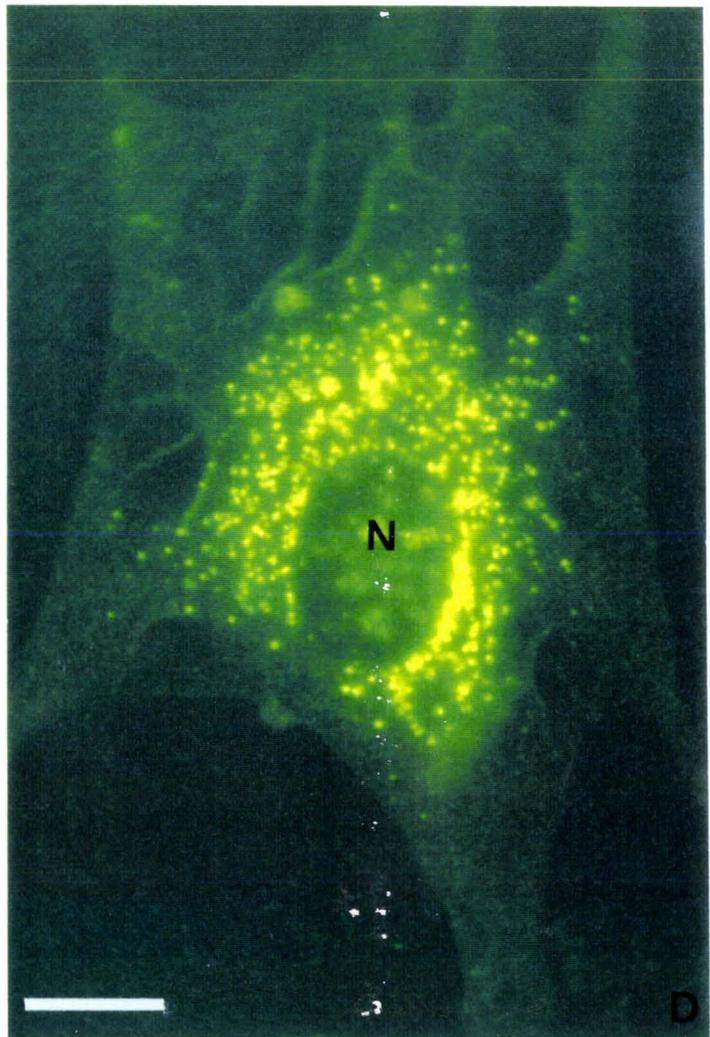
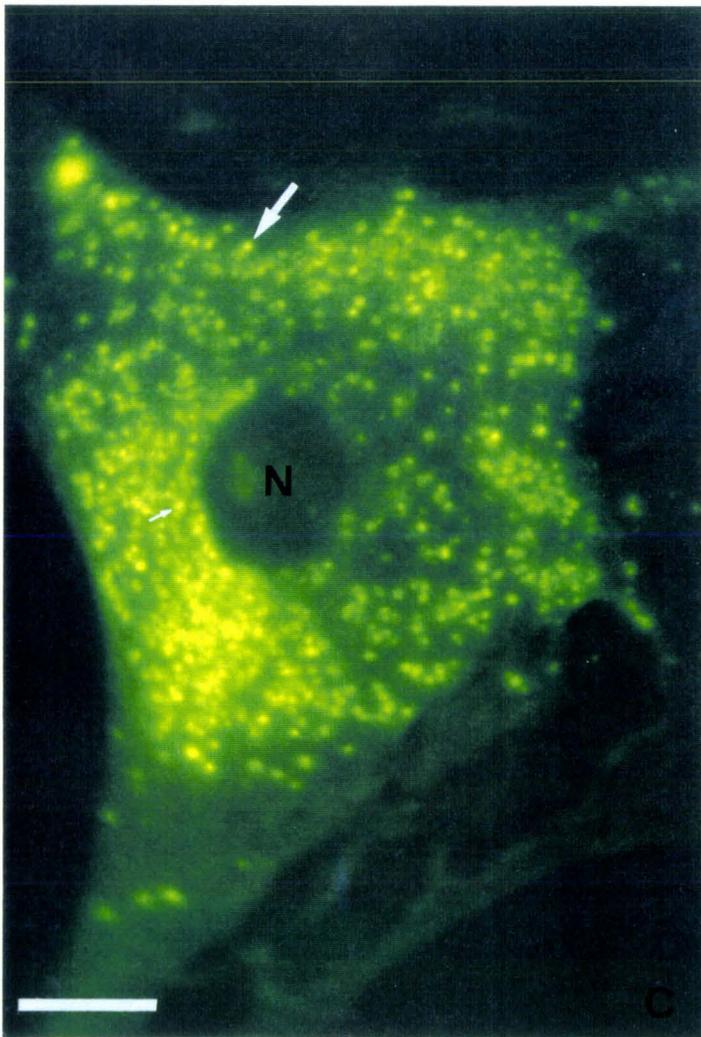
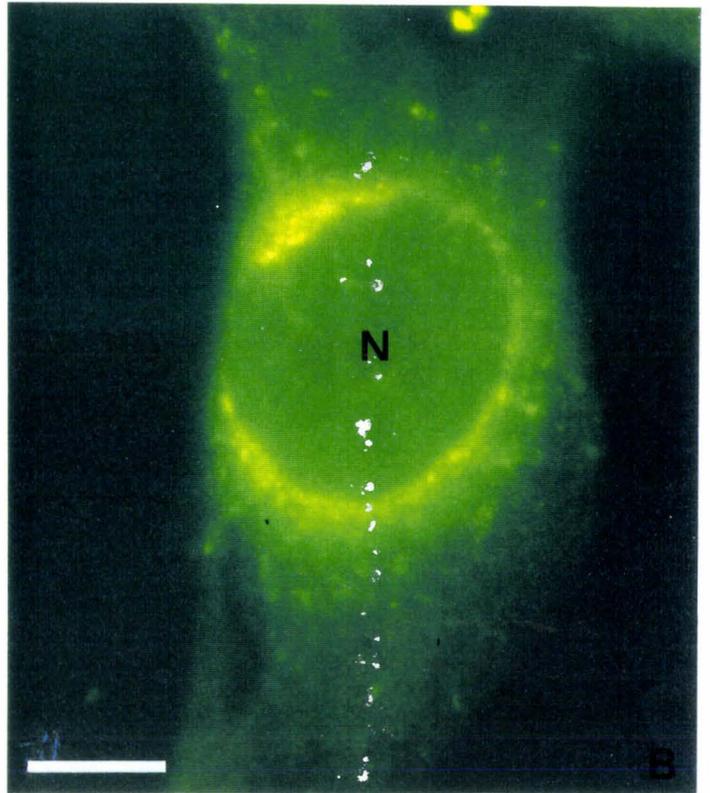
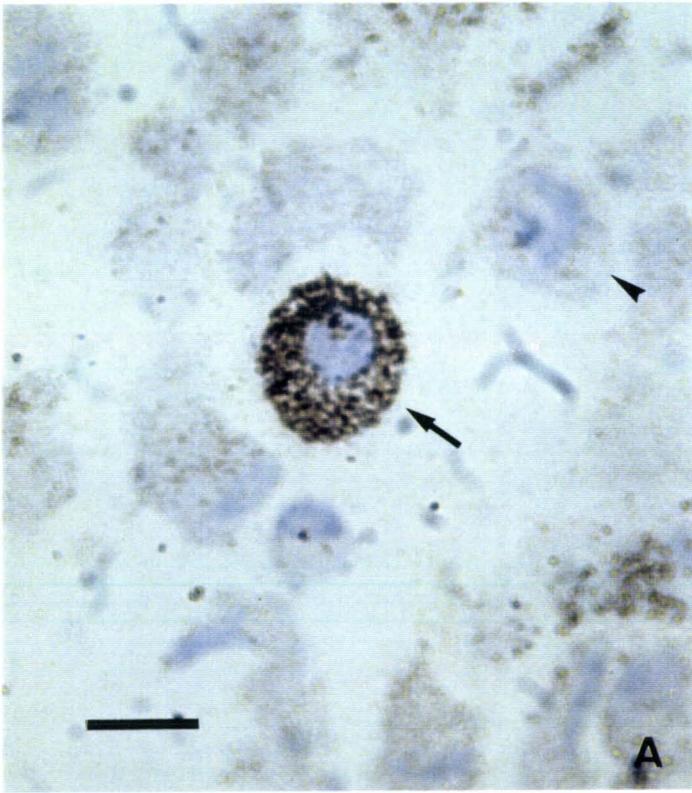


PLANCHE 1

LEGENDE PLANCHE 2

Localisation ultrastructurale des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique. Les cellules synoviales en culture étaient traitées pendant 24 heures par le TNF- α (4 ng/ml), l'IFN- γ (25 ng/ml), le PDGF (20 ng/ml) et le bFGF (10 ng/ml). Les culots cellulaires étaient fixés dans le glutaraldéhyde 1%. A partir de coupes de 70 nm d'épaisseur, un immunomarquage à l'or colloïdal anti-cathepsine B ou L était effectué. L'analyse se faisait ensuite au microscope électronique.

PHOTOGRAPHIE A. Localisation intra-vésiculaire de la cathepsine L chez une cellule synoviale de type fibroblastique traitée par l'IFN- γ . Les grains d'argent (points noirs) représentant la cathepsine L se localisaient dans des vésicules claires (V) allant du noyau (N) jusqu'aux pseudopodes cytoplasmiques périphériques (P). Barre=5 μ m.

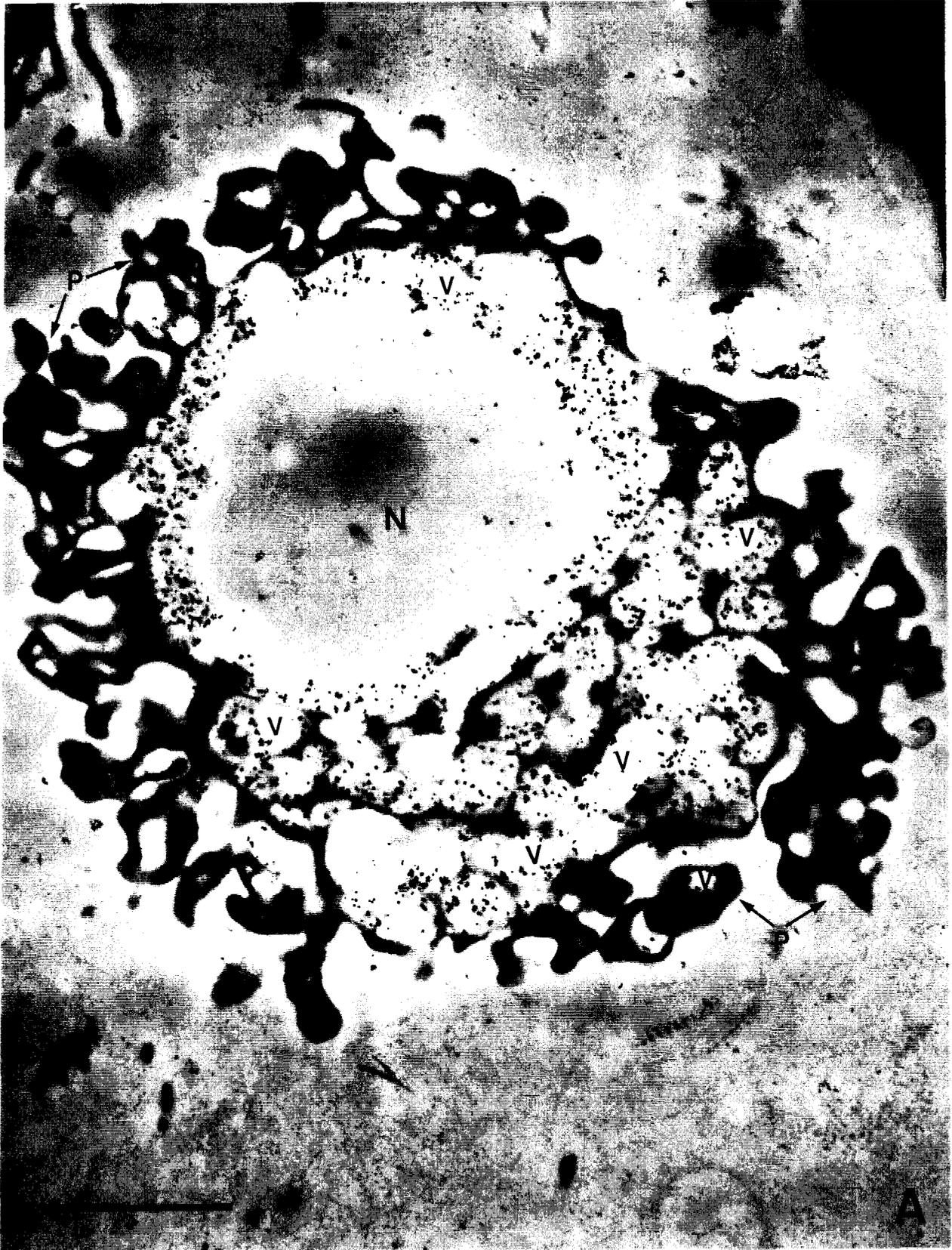


PLANCHE 2

LEGENDE PLANCHE 3

Localisation ultrastructurale des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique. Les cellules synoviales en culture étaient traitées pendant 24 heures par le TNF- α (4 ng/ml), l'IFN- γ (25 ng/ml), le PDGF (20 ng/ml) et le bFGF (10 ng/ml). Les culots cellulaires étaient fixés dans le glutaraldéhyde 1%. A partir de coupes de 70 nm d'épaisseur, un immunomarquage à l'or colloïdal anti-cathepsine B ou L était effectué. L'analyse se faisait ensuite au microscope électronique.

PHOTOGRAPHIE B. Localisation intra-vésiculaire de la cathepsine B chez une cellule synoviale de type fibroblastique traitée par le TNF- α . Les grains d'argent (points noirs) représentant la cathepsine B se localisaient dans des vésicules claires (V) allant du noyau (N) jusqu'aux pseudopodes cytoplasmiques périphériques (P). La présence de mitochondries (M) dans le cytosol témoignait non seulement de la qualité de la fixation cellulaire, mais surtout de la bonne santé de cette cellule. Barre=5 μ m.

PHOTOGRAPHIE C. Cellules synoviales de type fibroblastique activée (A) et non activée (B) après traitement par le bFGF. Contrairement à la cellule non activée, la cellule activée formait des pseudopodes cytoplasmiques (P) en relation avec une forte expression de la cathepsine L dans des structures vésiculaires (pointe de flèche). Barre=5 μ m.

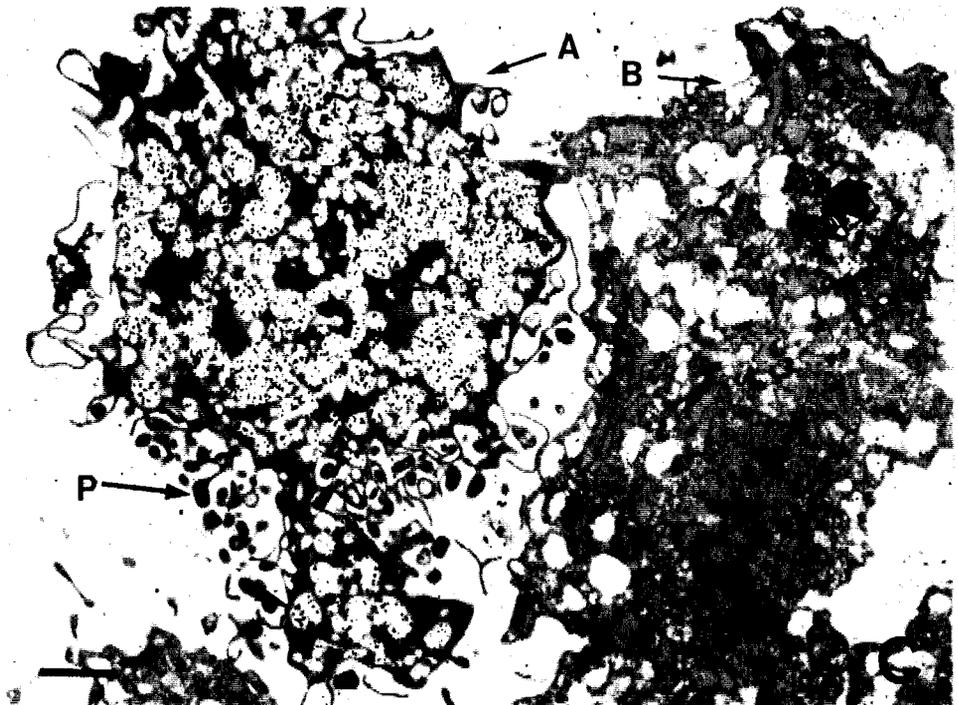
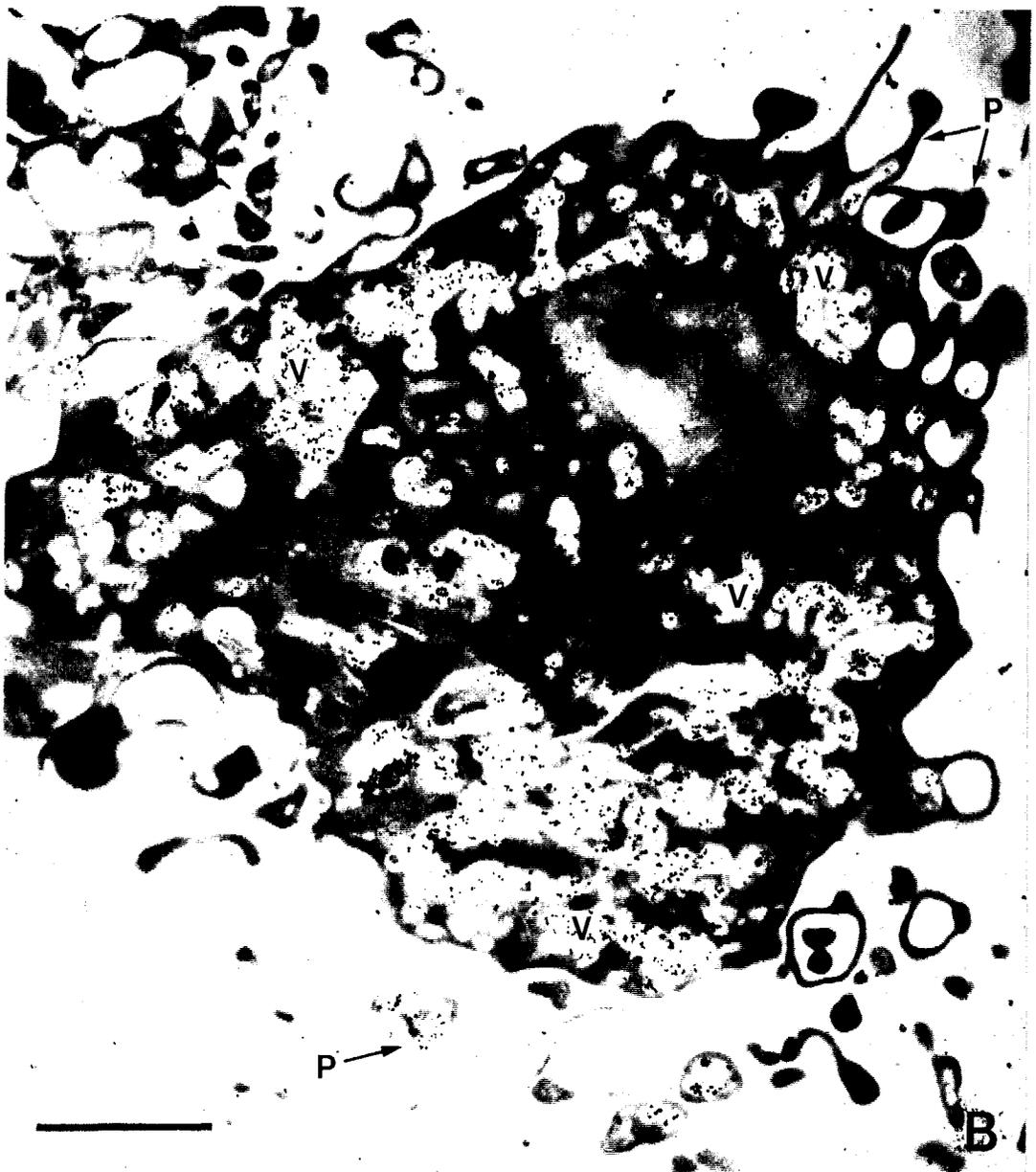
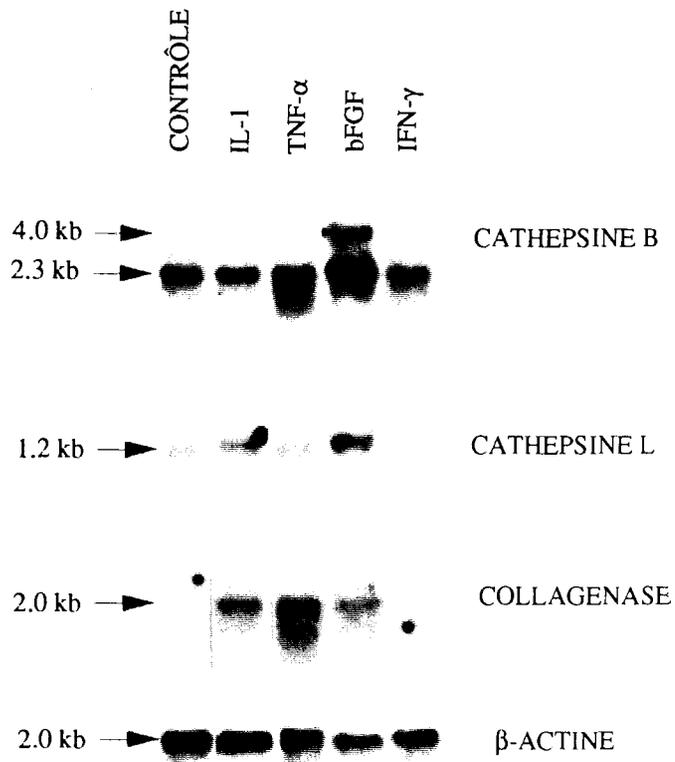
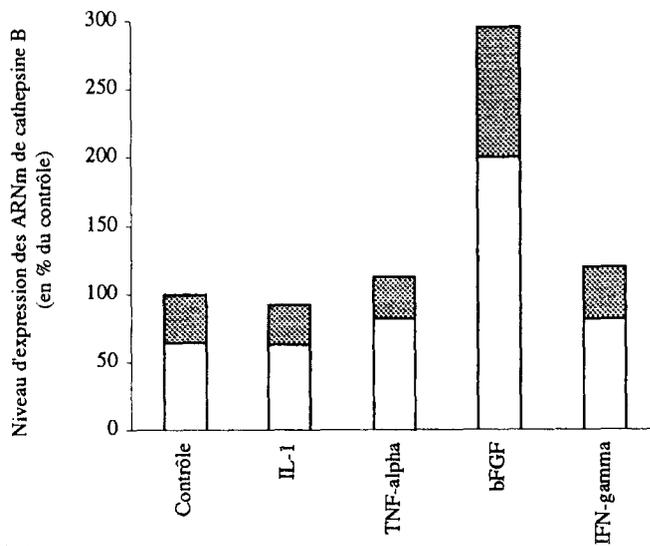


PLANCHE 3

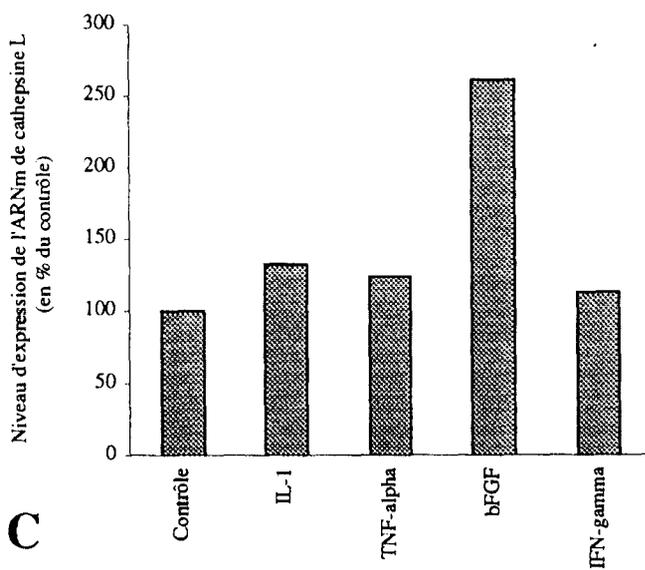
FIGURE 12. Régulation par les cytokines de l'expression des ARNm des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique. Les cellules synoviales étaient privées de sérum pendant 24 heures, puis traitées par le TNF- α (4 ng/ml) , l'IL-1 (50 U/ml), le bFGF (10 ng/ml), l'IFN- γ (25 ng/ml) ou laissées sans traitement (contrôle) pendant 24 heures. L'ARN était alors préparé à partir de ces cellules, séparé par électrophorèse en gel d'agarose, puis transféré sur une membrane de nylon. L'ARN était ensuite hybridé à une sonde d'ADNc radiomarquée de la cathepsine B, cathepsine L, collagénase ou β -actine, puis exposé à un film autoradiographique (A) L'intensité de chacune des bandes était quantifiée sur un analyseur d'image (Pharmacia). En parallèle avec la figure A, les figures B et C présentent le niveau d'expression des transcrits respectivement de la cathepsine B et L en pourcentage du contrôle, après correction des résultats en fonction de l'expression de la β -actine.



A



B



C

Figure 12

FIGURE 13. Régulation par le PDGF de l'expression des ARNm de la cathepsine B chez les cellules synoviales de type fibroblastique. Les cellules étaient privées de sérum pendant 24 heures, puis traitées par le PDGF (20 ng/ml) ou laissées non traitées (contrôle). Après 3, 6, 8 ou 24 heures, l'ARN était extrait de ces cellules, préparé, séparé, transféré, hybridé à une sonde radiomarquée de la cathepsine B ou de la β -actine, puis exposé à un film autoradiographique (A). En parallèle avec la figure A, les figures B et C présentent le niveau d'expression des transcrits de la cathepsine B respectivement de 4,0 kb et 2,3 kb en pourcentage du contrôle, après correction des résultats en fonction de l'expression de la β -actine.

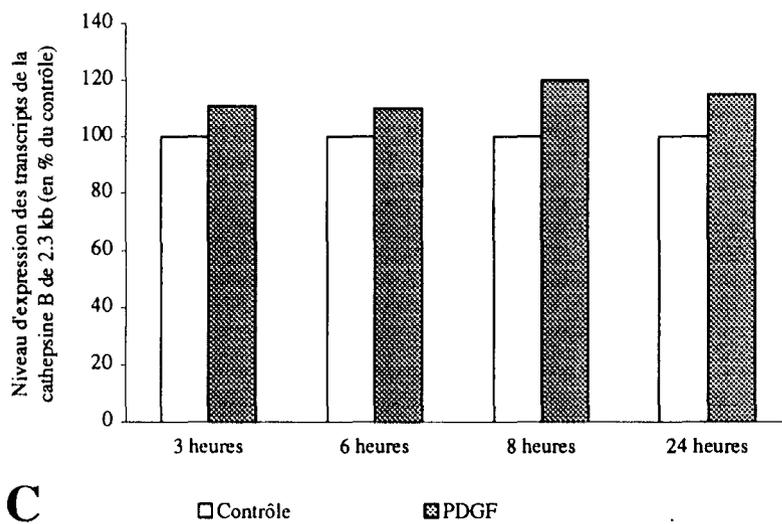
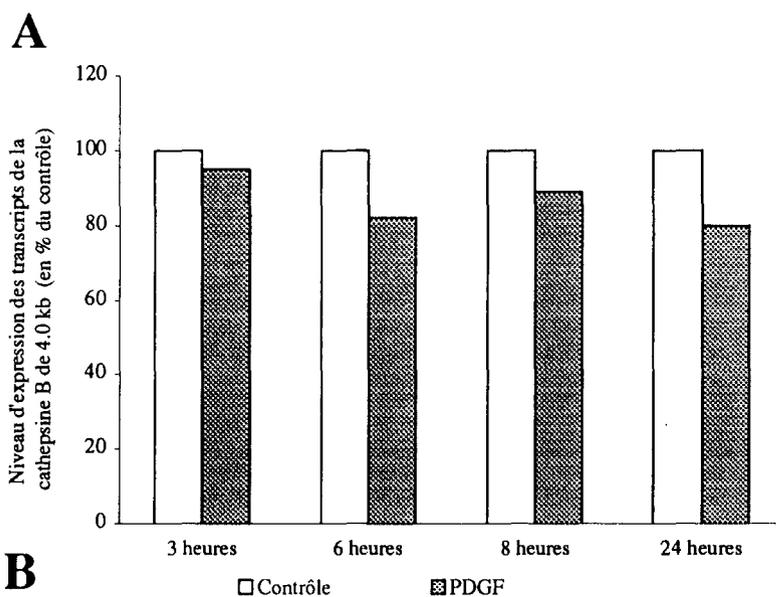
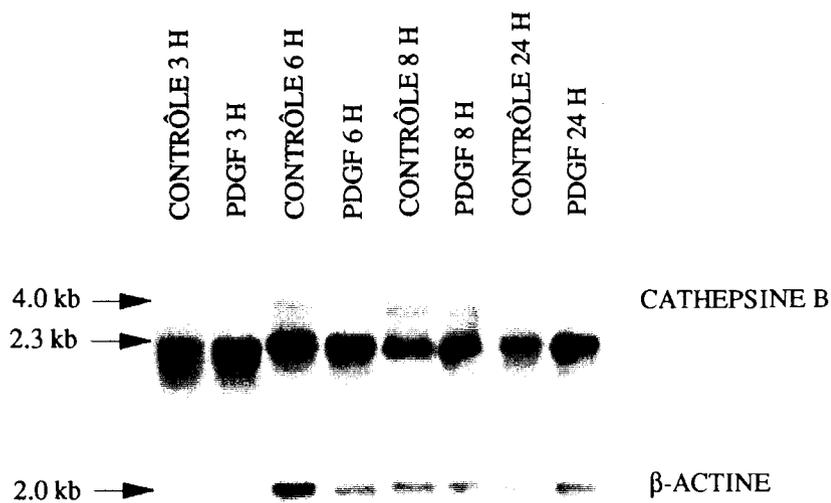


Figure 13

FIGURE 14. Caractérisation par western blot des formes synthétisées et sécrétées de la cathepsine B chez les cellules synoviales de type fibroblastique. Les cellules synoviales étaient privées de sérum pendant 24 heures, puis traités par le TNF- α , PDGF, IL-1, bFGF ou IFN- γ , ou laissées sans traitement. A 8 heures ou 24 heures, le surnageant et les cellules étaient récupérées. Les protéines extracellulaires (1 ml de milieu de culture) et intracellulaires (50 μ g de protéines du lysat cellulaire) étaient séparées sur gel d'acrylamide, transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les différentes formes de cathepsine B intracellulaires (**A**) et extracellulaires (**B**) étaient détectées avec un anticorps polyclonal dirigé contre les formes matures et immatures de la cathepsine B

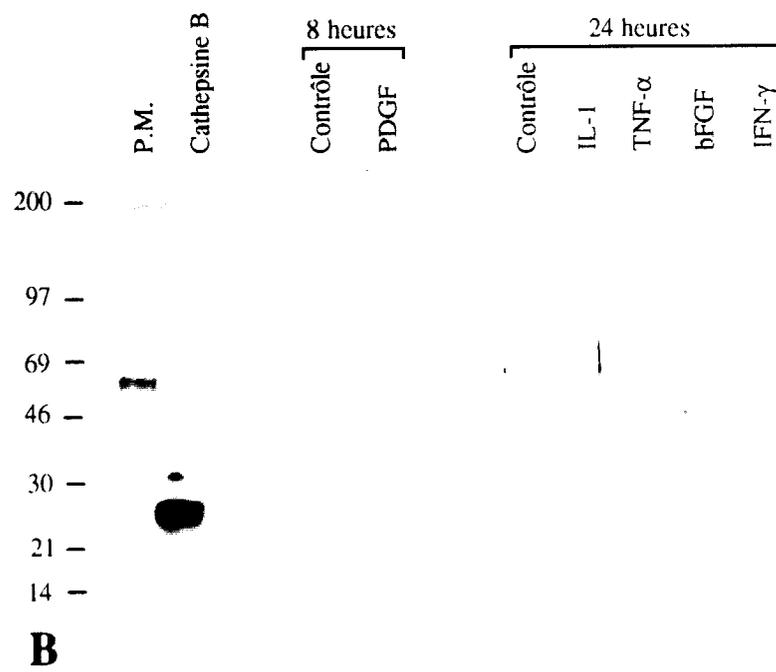
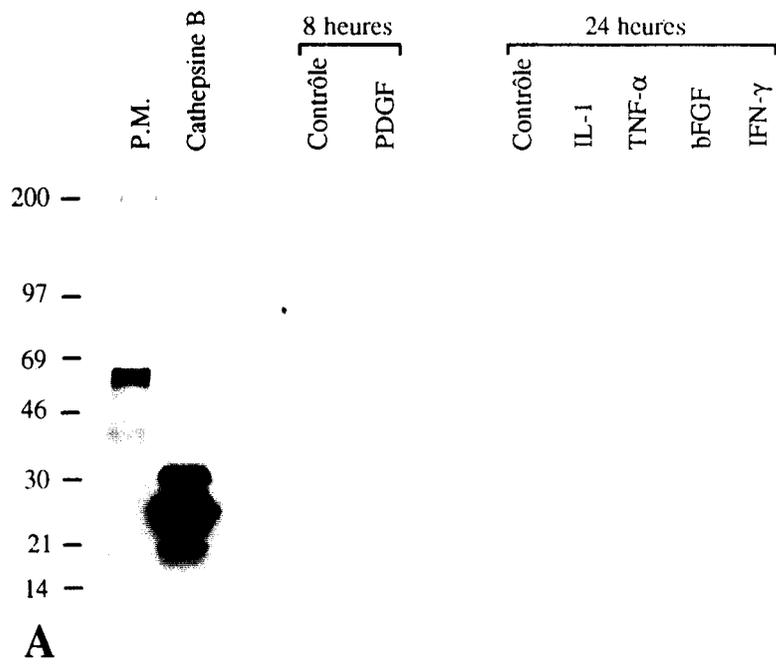


FIGURE 14

FIGURE 15. Caractérisation par western blot des formes synthétisées et sécrétées de la cathepsine L chez les cellules synoviales de type fibroblastique. Les cellules synoviales étaient privées de sérum pendant 24 heures, puis traités par le TNF- α , PDGF, IL-1, bFGF ou IFN- γ , ou laissées sans traitement. A 8 heures ou 24 heures, le surnageant des cultures et les cellules étaient récupérées. Les protéines extracellulaires (1 ml de milieu de culture) et intracellulaires (50 μ g de protéines du lysat cellulaire) étaient séparées sur gel d'acrylamide, transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les différentes formes de cathepsine L intracellulaires (A) et extracellulaires (B) étaient détectées avec un anticorps polyclonal dirigé contre les formes matures et immatures de la cathepsine L .

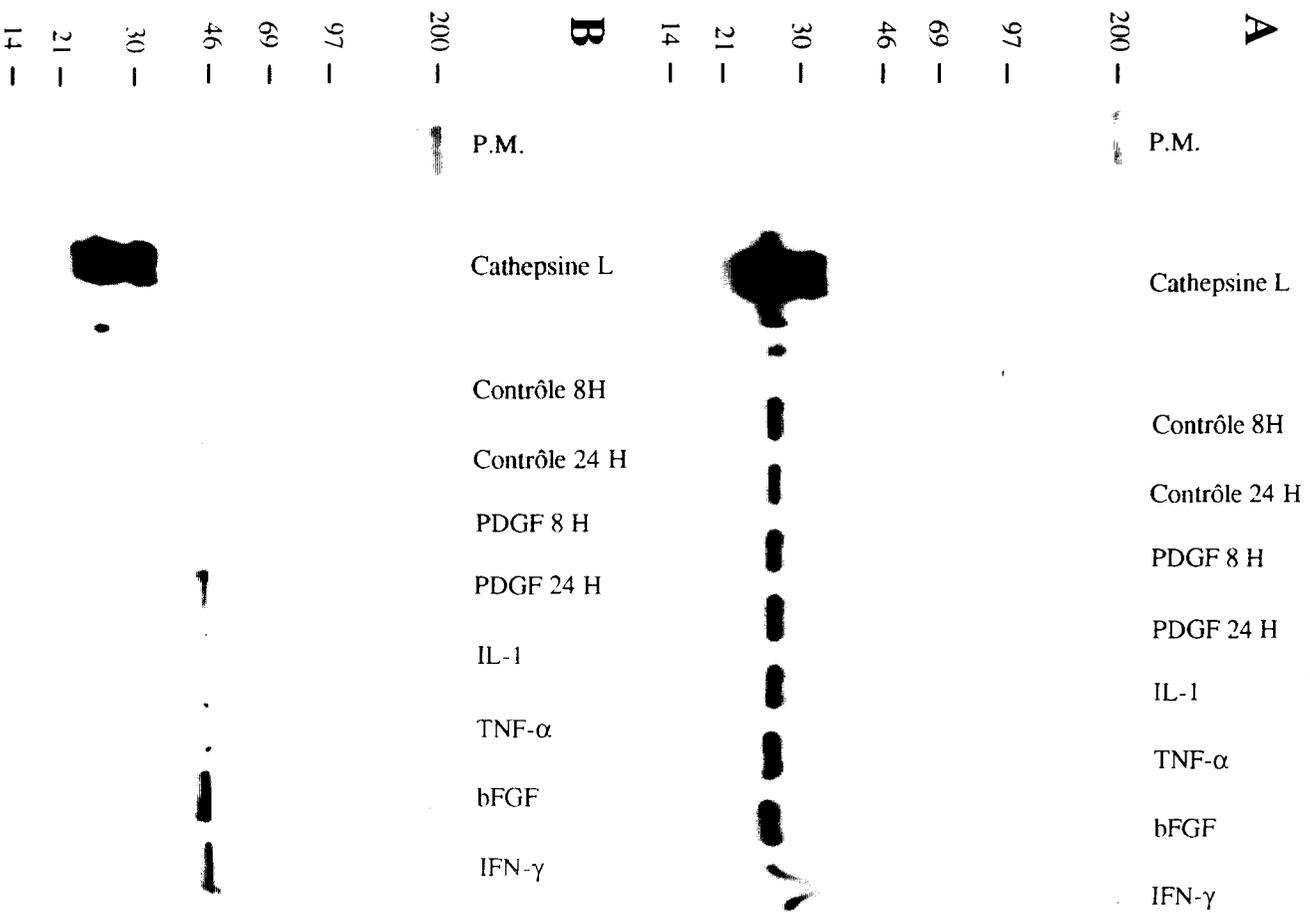
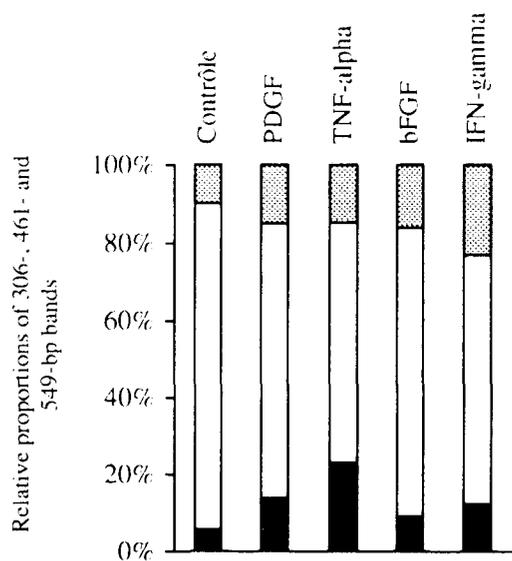


FIGURE 15

FIGURE 16. Régulation par les cytokines de l'expression des variants 5' des ARNm de la cathepsine B chez la cellule synoviale. Une transcription inverse de l'ARN suivie d'une amplification par PCR de la région 5' de l'ADNc de la cathepsine B étaient entreprises à partir de cellules synoviales de type fibroblastique traitées par le TNF- α , le PDGF, le bFGF ou l'IFN- γ , ou laissées sans traitement. Les produits PCR étaient séparés sur gel d'agarose, transférés sur membrane, et hybridés à une sonde ADNc radiomarquée de la cathepsine B. L'autoradiographe de la figure A montre des bandes de 549, 461 et 306 paires de bases qui correspondent respectivement à l'ARNm complet de la cathepsine B, l'ARNm délété de l'exon 2 et l'ARNm délété des deux exons 2 et 3. Pour mesurer l'expression de ces différents transcrits dans chacune des stimulations, l'intensité de chaque bande était analysée au phosphor imager. En parallèle avec la figure A, la figure B montre les proportions des bandes de 549, 461 et 306 pb. La figure C présente les proportions moyennes de chacune de ces bandes, obtenues à partir de la compilation des résultats de 6 cultures cellulaires distinctes.

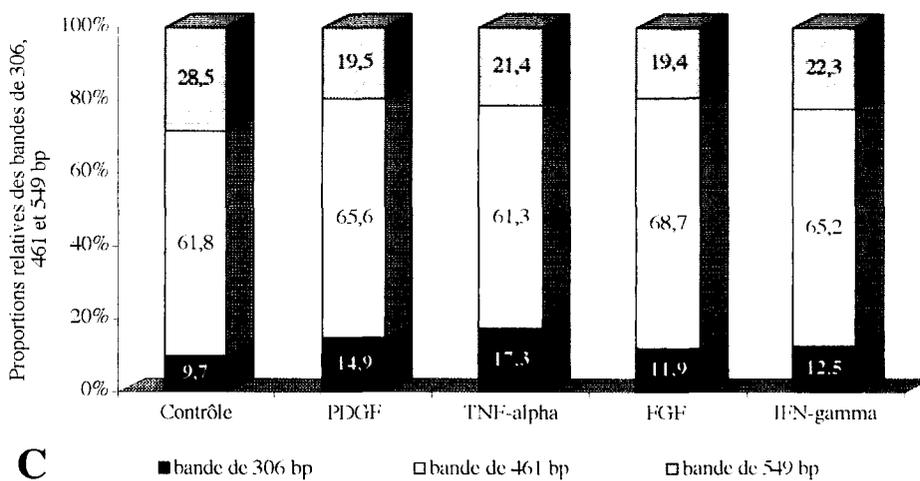


A



B

■ 306 band □ 461 band ▨ 549 band



C

■ bande de 306 bp □ bande de 461 bp ▨ bande de 549 bp

Figure 16

5. DISCUSSION

Dans la PR, l'érosion typique des structures cartilagineuses de l'articulation qui se produit essentiellement dans les zones contigües à un front de cellules synoviales proliférantes d'apparence transformée suggère que les cellules synoviales libèrent des enzymes capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Bien que les protéases neutres sont considérées comme les principales enzymes responsables de la destruction de l'articulation rhumatoïde (52), les processus de dégradation dans la PR pourrait aussi impliquer les cathepsines. En effet, les cathepsines B et L, que l'on peut localiser dans les cellules synoviales attachées au cartilage et à l'os au site de destruction de l'articulation rhumatoïde.(46, 47), pourraient compléter l'action destructrice de la collagénase sur le collagène de la matrice extracellulaire puisqu'elles peuvent dégrader les protéoglycanes du cartilage (61). Puisque les cellules synoviales de type fibroblastique représentent probablement l'agent final responsable de la destruction de l'articulation dans la PR, on étudiait chez ces cellules la régulation potentielle de l'expression et de la sécrétion des cathepsines B et L par les principales cytokines connues dans la PR pour être présentes dans l'environnement synovial et pour réguler des aspects importants du phénotype invasif et destructeur des cellules synoviales de type fibroblastique. Notre équipe avait par avant démontré la capacité du TNF- α à stimuler la sécrétion d'une activité cystéine protéase chez ces cellules (78). Dans cette étude, la nature exacte de cette activité était définie. L'effet du PDGF, bFGF et IFN- γ sur l'expression et la sécrétion des cathepsines B et L était également testé chez les cellules synoviales de type fibroblastique.

Le traitement des cellules synoviales de type fibroblastique par le TNF- α et le PDGF induisait une augmentation du niveau intracellulaire et de la sécrétion de la cathepsine B. De plus, un traitement prolongé par le PDGF provoquait le retour de la quantité de cathepsine B sécrétée à son niveau de base. Le TNF- α et le PDGF n'avaient pas d'effet sur la sécrétion de la cathepsine L. En revanche, le bFGF et l'IFN- γ induisaient tous les deux l'augmentation du niveau

intracellulaire et de la sécrétion aussi bien de la cathepsine B que de la cathepsine L. Dans un cas général, que ce soit pour le TNF- α , le bFGF, l'IFN- γ , et éventuellement le PDGF, l'augmentation de la sécrétion de la cathepsine B ou de la cathepsine L après traitement apparaissait d'être au moins en partie à une synthèse fortement accrue dans un nombre restreint de cellules synoviales. L'hétérogénéité des cellules synoviales de type fibroblastique dans une primo-culture pourrait expliquer que seule une proportion restreinte de cellules répondaient aux cytokines.

TUMOR NECROSIS FACTOR - ALPHA

La sécrétion sélective de la cathepsine B, et non de la cathepsine L, par les cellules synoviales traitées par le TNF- α confirmait que l'activité cystéine protéase sécrétée après stimulation par le TNF- α , décrite dans une étude précédente, représentait essentiellement la cathepsine B. Un tel résultat est en parfait accord avec l'analyse en chromatographie liquide de cette activité cystéine latente (78). Le TNF- α est connu pour ses capacités à induire la production de la collagénase et de la prostaglandine E₂ (80), ainsi que la prolifération cellulaire (79) chez les cellules synoviales. Dans cette étude, on montre que le TNF- α peut aussi induire chez ces cellules la sécrétion de la cathepsine B. Toutes ces données suggèrent que le TNF- α pourrait jouer un rôle majeur dans la dégradation du cartilage articulaire médiée par les cellules synoviales de type fibroblastique dans la PR.

Le TNF- α stimulait également la synthèse de la cathepsine B chez les cellules synoviales. L'effet stimulant du TNF- α sur cette synthèse était apparu très précoce puisque la proportion de cellules positives pour la cathepsine B était presque triplée après seulement 4 heures de traitement par le TNF- α . La stimulation de la sécrétion de la cathepsine B par le TNF- α était donc probablement d'être, au moins en partie, à une synthèse accrue de cette protéine. Ceci était confirmé par la distribution non seulement périnucléaire, mais aussi périphérique de la cathepsine B après traitement des cellules par le TNF α . Au niveau ultrastructural, la cathepsine B nouvellement synthétisée se localisaient dans des structures vésiculaires claires. La corrélation que l'on pouvait faire entre ces nombreuses vésicules périphériques remplies de cathepsine B et la présence de

pseudopodes cytoplasmiques dans les cellules activées par la TNF- α dénotaient probablement de la sécrétion en cours d'une partie de la cathepsine B nouvellement synthétisée. Ces vésicules étant claires, elles ne représentaient probablement pas des vésicules d'endocytose, mais plutôt des vésicules de type lysosome primaire ou de sécrétion. Le fait que l'on retrouve exclusivement la forme immature de 43 kDa dans le surnageant suggère que la cathepsine B sécrétée était véhiculée depuis le trans Golgi vers la membrane dans les vésicules de sécrétion constitutive, et ne résultait donc pas de la délocalisation vers la membrane de vésicules type lysosome, comme déjà décrit chez des cellules épithéliales transformées avec l'oncogène H-ras (131). Le processus de sécrétion de la cathepsine B chez les cellules synoviales traitées par le TNF- α pourrait donc se concevoir de la façon suivante: 1. Stimulation de la synthèse de la cathepsine B sous l'effet du TNF- α . 2. Saturation des récepteurs man-6P du trans Golgi par la cathepsine B nouvellement synthétisée 3. Déroutage de la cathepsine B de son adressage habituel vers le compartiment lysosomal pour la voie de sécrétion par défaut (dite constitutive). 4. Sécrétion de la cathepsine B.

Néanmoins, la stimulation de la synthèse de la cathepsine B par le TNF- α ne pouvait être corrélée à une expression transcriptionnelle accrue pour la cathepsine B: le niveau des transcrits de 2,3 et 4,0 kb de la cathepsine B était identique avant et après traitement des cellules synoviales par le TNF- α . Ceci suggère que la régulation de l'expression de la protéine cathepsine B par le TNF- α mettrait en jeu des mécanismes post-transcriptionnels, notamment au niveau du processing de l'ARNm. Ainsi, il a été montré que l'expression de la cathepsine B dans les tissus humains pouvait être en partie régulée au niveau de l'épissage alternatif de la région 5' du pré-ARNm de la cathepsine B (130). En effet, cet épissage alternatif produit des transcrits de la cathepsine B délétés de l'exon 2 ou des deux exons 2 et 3. Des essais in vitro ont démontré une augmentation de l'activité traductionnelle pour ces deux transcrits: l'ARNm délété de l'exon 2 et celui délété des deux exons 2 et 3 étaient respectivement 4 fois et 8 fois plus actifs que l'ARNm entier. Dans notre étude, la proportion des transcrits délétés des deux exons 2 et 3 se trouvait significativement augmentée chez les cellules synoviales après traitement par le TNF- α , contrairement aux transcrits délétés du seul exon 2. L'activation par le TNF- α de mécanismes responsables de l'épissage des exons 2 et 3 dans l'ARNm de la cathepsine B pourrait donc éventuellement expliquer l'augmentation de l'expression de la protéine cathepsine B chez les cellules synoviales traitées par

le TNF- α . Néanmoins, l'exon 3 codant pour le peptide signal et une partie de peptide d'activation, la protéine résultante de 32 kDa aurait en principe une localisation cytosolique. Le rôle joué par l'expression de ce transcrit délété des exons 2 et 3 dans la sécrétion de la cathepsine B induite par le TNF- α reste donc encore incertain.

PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR

Le PDGF a été montré augmenter sélectivement d'une manière dépendante du temps la synthèse ainsi que la sécrétion de la cathepsine L chez les cellules les souris NIH3T3. Cette sécrétion sélective de la cathepsine L a été attribuée en partie à une altération de la distribution des récepteurs man-6P en réponse au PDGF (132). Un tel effet du PDGF sur la distribution des récepteurs man-6P chez les cellules synoviales de type fibroblastique pourrait supporter un modèle où un mécanisme de sécrétion capture activé par le PDGF serait responsable de l'effet dépendant du temps du PDGF sur le niveau de cathepsin B sécrété. En effet la redistribution induite par le PDGF des récepteurs man-6P pourrait provoquer des altérations au niveau du trafic intracellulaire de la cathepsine B, ainsi que de l'endocytose de la cathepsine B déjà sécrétée. En premier lieu, des concentrations limitantes de récepteurs man-6P dans l'appareil de Golgi pourraient causer une diversion de l'adressage de la cathepsine B nouvellement synthétisée de la voie lysosomal vers la voie de sécrétion constitutive, et donc expliquer le niveau accrue de la procathepsine B sécrétée dans le milieu de culture après 8 heures de traitement. par le PDGF. Le niveau élevé de récepteurs man-6P à la surface cellulaire pourrait ensuite provoquer la recapture de la cathepsine B, et donc par la même expliquer le bas niveau de cathepsine B retrouvée dans le milieu extracellulaire après 24 heures de traitement des cellules synoviales de type fibroblastique par le PDGF. Un effet dépendant du temps du PDGF sur l'endocytose médiée par les récepteurs man-6P a d'ailleurs déjà été décrit sur les cellules NIH3T3 (132).

La sécrétion variable au cours du temps de la cathepsine L chez les fibroblastes 3T3 traités par le PDGF a été montré au moins en partie lié à une expression variable au cours du temps de son ARNm (101). Chez les cellules synoviales de type fibroblastique, l'effet dépendant du temps

du PDGF sur le niveau de cathepsine B sécrétée n'était pas lié à une expression variable au cours du temps des ARNm de la cathepsine B: le niveau d'expression des transcrits de 2,3 et 4,0 kb de la cathepsine B à 3, 6, 8 et 24 heures de traitement par le PDGF était identique à leur niveau contrôle respectif. Cette absence de corrélation entre la sécrétion et l'expression transcriptionnelle de la cathepsine B suggère qu'un mécanisme post transcriptionnelle pourrait réguler la sécrétion sélective de la cathepsine B. Ainsi comme pour le TNF- α , le PDGF était capable de réguler l'épissage alternatif de la région 5' du pré-ARNm de la cathepsine B: la proportion de transcrits délétés des exons 2 et 3 apparaissait significativement augmentée après traitement des cellules synoviales par le PDGF. Néanmoins, le rôle joué par l'expression d'un tel transcrit dans l'induction par le PDGF de la sécrétion de la cathepsine B reste incertain étant donné la probable localisation cytosolique de la protéine traduite à partir de cette ARNm. Toutes ces données suggèrent que la sécrétion sélective de la cathepsine B par le PDGF chez les cellules synoviales de type fibroblastique pourrait se faire à partir de mécanismes indépendant de la synthèse de la protéine. Ainsi, la cathepsine L chez la cellule de souris NIH 3T3 a été montrée avoir une affinité 10 fois moindre pour le récepteur man-6P que les autres enzymes lysosmales (96). En extrapolant, il n'est pas interdit de penser que dans une autre espèce, en l'occurrence l'espèce humaine, et qui plus est chez le fibroblaste synovial, ce soit la cathepsine B qui ait une faible affinité pour le récepteur man-6P. Ce fait n'est pas documenté. Néanmoins, si tel était le cas, et en association avec les capacités du PDGF à altérer la distribution des récepteurs man-6P, cela pourrait expliquer l'induction transitoire par le PDGF de la sécrétion de la cathepsine B chez la cellule synoviale. Ainsi, la concentration des récepteurs man-6P dans le Golgi devenant limitante sous l'action du PDGF, elle provoquerait la sécrétion sélective de la cathepsine B, protéines de faible affinités et synthétisées constitutivement. A long terme, la cathepsine B sécrétée serait recapturée par les récepteurs man-6P délocalisaient à la surface de la cellule. Le fait qu'une augmentation significative du nombre de cellules positives pour la cathepsine B était notée à 24 heures (7,2%), mais pas à 4 heures (4,2%) de traitement par le PDGF, était en accord avec ce type de modèle pour l'induction sélective de la sécrétion de la cathepsine B par le PDGF.

BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR

Le bFGF est essentiellement connu pour ses capacités à moduler la croissance des cellules synoviales (84). Le bFGF était démontré dans cette étude capable de moduler la sécrétion des deux cathepsines L et B chez les cellules synoviales. L'induction de la sécrétion de la cathepsine L par le bFGF est un phénomène déjà reporté chez les fibroblastes 3T3 de souris (133). La régulation de la sécrétion des cathepsines B et/ou L par des facteurs de croissance comme le bFGF ou le PDGF chez les cellules synoviales de type fibroblastique suggère que ces cathepsines jouent un rôle important dans la croissance invasive et destructrice de ces cellules observée dans la PR. La régulation de la sécrétion des deux cathepsines B et L par le bFGF se fait probablement à partir de mécanismes similaires. Ainsi l'induction de la sécrétion des cathepsines B et L par le bFGF se trouvait directement corrélée à un accroissement de l'expression de leurs ARNm respectifs: le niveau d'expression des transcrits de 2,3 et 4,0 kb de la cathepsine B et celui de 1,2 kb de la cathepsine L étaient augmenté 3 fois après traitement des cellules par le bFGF. La sécrétion induite des deux cathepsines B et L apparaissait donc dépendre au moins en partie d'une synthèse accrue. Ceci était confirmé par l'augmentation significative de la proportion des cellules positives pour la cathepsine B ou L après traitement par le bFGF. La cathepsine B comme la cathepsine L étaient localisées dans des structures vésiculaires claires se répartissant depuis le noyau jusqu'aux pseudopodes cytoplasmiques périphériques, significatifs probablement de la sécrétion en cours de ces cathepsines nouvellement synthétisées. Le fait que l'on retrouve seulement leur forme propeptidique immature, respectivement de 43 kDa et 40 kDa, dans le surnageant suggère que la sécrétion d'une partie des cathepsines B et L nouvellement synthétisées après traitement par le bFGF s'effectue de la même façon depuis le trans Golgi vers la membrane dans les vésicules de sécrétion constitutive, et ne résultait donc pas de la délocalisation vers la membrane de vésicules type lysosome.

INTERFERON - GAMMA

Une étude a récemment démontré une induction sélective de la cathepsine B (augmentation d'un facteur 5) et de la L (augmentation d'un facteur 3) chez des macrophages par l'IFN- γ (134). Un effet sélectif similaire de l'IFN- γ sur la sécrétion de la cathepsine B (augmentation d'un facteur 5) et de la cathepsine L (augmentation d'un facteur 2) était démontré ici chez des cellules synoviales de type fibroblastique. Ces données mettent en avant le rôle potentiel de l'IFN- γ dans la destruction du cartilage de l'articulation dans la PR. Ceci est en accord avec une étude précédente qui a démontré que la dégradation des protéoglycanes du cartilage de l'articulation rhumatoïde par les neutrophiles pouvait être accrue par l'IFN- γ (135). En plus de son rôle dans la dégradation du cartilage articulaire, les cathepsines B et L ont été montrées impliquées dans le processing des molécules du CMH de classe II (88). Cette dernière donnée mise en relation avec les capacités de l'IFN- γ à stimuler l'expression des molécules du CMH de classe II (85) et des cathepsines B et L (démonstré ici) chez les cellules synoviales, suggère un rôle majeur de l'IFN- γ dans la pathogénie rhumatoïde en général. Ceci est en contraste avec l'utilisation de l'IFN- γ comme agent thérapeutique dans la PR. (136). L'effet thérapeutique de l'IFN- γ est sans doute lié à l'effet antagoniste que peut avoir l'IFN- γ avec certaines autres cytokines sur l'expression du phénotype destructeur des cellules synoviales dans la PR: l'IFN- γ inhibe la croissance cellulaire ainsi que la sécrétion de la collagénase stimulée par l'IL-1 (137) et le TNF- α (79) chez les cellules synoviales.

Les mécanismes de sécrétion activés par l'IFN- γ étaient probablement similaires pour les deux cathepsines B et L. Leur sécrétion apparaissait dépendre au moins en partie d'une synthèse accrue, dans la mesure où la proportion des cellules positives pour la cathepsine B ou L était significativement augmentée après traitement par l'IFN- γ . Le fait que les cathepsines B et L étaient toutes les deux localisées dans des vésicules claires souvent associées à des pseudopodes cytoplasmiques et que les formes sécrétées étaient dans les deux cas le propeptide, suggèrent qu'une partie des cathepsines B et L nouvellement synthétisées après traitement par l'IFN- γ étaient toutes les deux véhiculées depuis le trans Golgi vers la membrane dans les vésicules de sécrétion constitutive, et ne résultait donc pas de la délocalisation vers la membrane de vésicules type lysosome.

La régulation de la synthèse des cathepsines B et L par l'IFN- γ ne se faisait pas au niveau transcriptionnel puisque l'expression des ARNm de ces deux cathepsines ne se voyait pas augmentée après traitement des cellules synoviales par l'IFN- γ . Ceci suggère que la régulation par l'IFN- γ de l'expression des protéines cathepsine B et L met en jeu des mécanismes post-transcriptionnelles, peut être au niveau du processing de l'ARNm dans le cas de la cathepsine B. Mais tel ne semblait pas être le cas, puisque la proportion des transcrits de la cathepsine B délétés soit de l'exon 2 soit des deux exons 2 et 3 n'était pas significativement augmenté par l'IFN- γ . La régulation de la synthèse des cathepsines B et L par l'IFN- γ pourrait donc éventuellement se passer directement au niveau du processus de traduction.

Bien que les cathepsines B et L soient des enzymes similaires, elles ont été montrées agir sur les fibres de collagène au travers de mécanismes bien distincts. La cathepsine L est plus effective que la cathepsine B sur une base moléculaire. De plus, elles apparaissent avoir des sites de clivage bien différents (60). Etant donné la spécificité d'action des deux cathepsines sur le collagène de la matrice extracellulaire, l'effet sélectif des cytokines sur la sécrétion des cathepsines B et L reporté dans cette étude suggère que la dégradation du cartilage de l'articulation rhumatoïde par la cellule synoviale de type fibroblastique se fait suivant des mécanismes hautement régulés.

PUBLICATIONS

R. Lemaire, G. Huet, F. Zerimech, G. Grard, C. Fontaine, B. Duquesnoy and R.M.Flipo. Selective regulation of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *British Journal of Rheumatology*, *accepté pour publication, décembre 1996*

R. Lemaire, G. Huet, F. Zerimech, G. Grard, C. Fontaine, B. Duquesnoy and R.M.Flipo. Régulation sélective par les cytokines de la sécrétion des cathepsines B et L par les cellules synoviales. *Rev Rhum Mal Ostéoartic*, 1995, 62, 731

British Journal of Rheumatology

EDITOR: H. A. BIRD MD, FRCP (University of Leeds)
Editorial Office, Chapel Allerton Hospital, Chapeltown Road, Leeds LS7 4SA, UK
Assistant Editors: D. L. Scott MD, FRCP, King's College Hospital, London, UK
M. Walport PhD, FRCP, Hammersmith Hospital, London, UK
Editorial Assistant: W. Johnson Tel: 0113 292 4727 Fax: 0113 292 4726

27 November 1996

Dr R Lemaire
Department de Rhumatologie
Laboratoire de culture cellulaire
Faculte de Medicine 3eme EST
1, Place de Verdun
59045 Lille Cedex
France

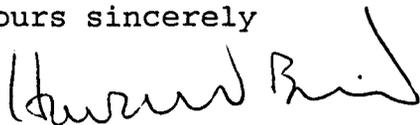
Dear Dr Lemaire

**Re: Selective induction of the secretion of cathepsins B
and L by cytokines
Lemaire et al (BJR Ref 960354)**

Thank you for submitting your paper. It has now been seen by two assessors. Both recommended publication though one has made some minor points that would need to be incorporated into a revision.

In addition, I would be grateful if you can consider reducing the length, particularly of the discussion. If you agree to do so, I look forward to receiving your revision shortly, preferably accompanied by a letter, listing the changes made.

Yours sincerely



Howard Bird

Deuxième partie

ETUDE DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE LA RÉGION 5' DU PRÉ-mRNA DE LA CATHEPSINE B DANS LE TISSU SYNOVIAL

1. INTRODUCTION

Dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), la destruction de l'articulation est liée à la présence de cellules synoviales d'apparence transformée: l'érosion des structures cartilagineuses de l'articulation se localise essentiellement dans les zones contigües à un front de cellules synoviales proliférantes (33). La cathepsine B apparait jouer un rôle important dans la croissance invasive de type tumoral des cellules synoviales rhumatoïdes. En effet, cette enzyme lysosomiale, capable de dégrader le collagène de type II, IX, XI et les protéoglycanes (60), a été détectée à un haut niveau dans le liquide synovial rhumatoïde (123, 138-140), et immunolocalisée dans les cellules synoviales accrochée au cartilage et à l'os aux sites de destruction de l'articulation (46, 47).

Le niveau élevé d'expression de la cathepsine B en marge du pannus de type tumoral trouvé dans le tissu synovial enflammé des individus polyarthritiques doit être mise en relation avec l'expression fréquemment accrue de la cathepsine B dans certaines tumeurs humaines (141). Comme dans les tumeurs humaines le niveau des transcrits de la cathepsine B est augmenté dans le même temps (115, 142), il est considéré en général que la régulation de l'expression de la cathepsine B se fait d'abord au niveau de la transcription. Néanmoins, l'hétérogénéité des régions 5' et 3' non traduites des ARNm de la cathepsine B humaine (143-145), suggère fortement que l'expression de la cathepsine B pourrait aussi être régulé par des mécanismes post-transcriptionnels, notamment au niveau du processing de l'ARNm. Gong et Frankfater ont démontré que les multiples messages de la cathepsine B proviennent de l'épissage alternatif d'un seul gène (143). Dans la région 3' non traduites de l'ARNm de la cathepsine B, il ont montré que l'épissage à partir d'un site donneur localisé dans l'intron 11 et l'utilisation d'un signal de polyadénylation alternatif dans l'exon 12 produit un message de 4,0 kb, en plus de celui de 2,3 kb décrit précédemment (90). Dans la région 5', ils ont reporté des transcrits dont les exons 2 ou les deux exons 2 et 3 avaient été épissés. Alors que le ratio des transcrits de 2,3 kb sur ceux de 4,0 kb était similaire dans les tissus tumoraux ou normaux, une différence significative dans le ratio des variants 5' du transcrit de la cathepsine B était notée: les ARNm de la cathepsine B

délétés de l'exon 2 étaient prédominants dans les tissus humains tumoraux, et ceux délétés des deux exons 2 et 3 étaient détectés exclusivement dans des carcinomes du colon et du sein ou des mélanomes humains (143). D'une importance particulière, ces ARNm de la cathepsine B à région 5' variables, spécifiques des tumeurs, montraient des taux accrues de traduction dans des essais in vitro: les ARN sans les exons 2 et 3 étaient deux fois plus actifs que ceux sans le seul exon 2, et huit fois plus actifs que ceux à région 5' complète. Ces données mettent en évidence le rôle de l'épissage alternatif de l'ARNm de la cathepsine B dans la forte expression de la cathepsine B dans les tumeurs humaines. Le but de cette étude était d'évaluer la contribution de l'épissage alternatif du pré-ARNm de la cathepsine B dans le niveau élevé de la cathepsine B observé dans le tissu synovial rhumatoïde au niveau de la marge invasive du pannus de type tumoral. L'expression des différents ARNm de la cathepsine B, en particulier les variants 5', était examinée dans le tissu synovial rhumatoïde comparé au tissu synovial arthrosique ou normal.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Tissus synoviaux. Les tissus synoviaux de 23 individus atteints de PR, et 12 d'arthrose étaient obtenus au moment de procédures chirurgicales (arthroplastie totale de l'articulation dans la plupart des cas). Tous les individus atteints de PR répondaient aux critères de l'American College of Rheumatology (4). Comme contrôle, en plus de l'arthrose, 3 tissus synoviaux avaient été obtenus lors de chirurgies post-traumatiques (ligamentoplastie du genou)

2.2. Sonde ADNc de la cathepsine B. Un fragment de la cathepsine B humaine était obtenu par transcription inverse d'ARN de tissu synovial humain, suivi par une PCR utilisant des primers aux extrémités d'une région s'étendant des paires de base 147 (exon 4) à 1011 (exon 11) de l'ADNc de la cathepsine B précédemment clonée (90). Ce fragment était sous-cloné dans le vecteur pBlueScript II KS+ (Stratagene, La Jolla, CA). L'insert cloné de la cathepsine B était isolé par digestion avec les enzymes KpnI et EcoRI pour donner un fragment de 805 paires de bases. Ce fragment était isolé par électrophorèse en gel d'agarose et purifié par le kit GeneClean (Bio 101, San Diego, CA). Pour être utilisé comme sonde, le fragment ADNc de cathepsine B était marqué au ^{32}P - αdCTP (random primed labelling kit, Amersham, Les Ulis, France).

2.3. RT-PCR de la région 5' non traduite de la cathepsine B. Les tissus synoviaux étaient mis dans de l'azote liquide au moment de la procédure chirurgicale. L'ARN total était préparé par lyse des cellules au RNazol. L'intégrité du RNA était vérifiée sur gel d'agarose en visualisant les bandes 18 S et 28 S. La RT était faite à 42°C à partir de 2 μg d'ARN en utilisant la transcriptase reverse du MMLV et des primers polydT(Life Technologies). La PCR était faite sur un Perkin Elmer's GeneAmp system 9600 thermal cycler. Les primers utilisés pour amplifier la région 5' de l'ADNc de la cathepsine B étaient:

5'-GGGATCCAACCGCTCCGCTGCGCGC-3' dans l'exon 2 (sense)

5'-GGGAATTCGGTGTGGATGCAGATCCG-3' dans l'exon 6 (anti-sense)

Les oligonucléotides étaient synthétisés par Eurogenetec. L'amplification était pratiquée sur 30 cycles (30 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C, et 2 minutes à 72°C) dans un volume de 100 µl. Les produits PCR étaient ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, transférés sur une membrane de nylon, et hybridés à la sonde ADNc de 805 pb radiomarquée de la cathepsine B. La membrane était ensuite appliquée à un écran photosensible pendant 72 heures. L'intensité de chaque bande d'amplification était ensuite analysée sur un Phosphor Imager 445 SI.

2.4. Northern blot. L'ARN total était séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1%/1.1M formaldéhyde en tampon MOPS (5 µg par puit), transféré sur membrane de nylon, et hybridé à la sonde ADNc de 805 pb selon le protocole de Church (125). Les niveaux d'expression des différents transcrits de la cathepsine B étaient déterminés sur analyseur d'image (Image master DT, Pharmacia).

3. RESULTATS

3.1. Identification des variants 5' de l'ARNm de la cathepsine B dans le tissu synovial humain.

Pour évaluer l'épissage alternatif de l'ARN de la cathepsine B, l'expression des variants 5' du transcrit de la cathepsine B était examinée dans le tissu synovial d'individus atteints de PR, d'arthrose ou normaux. La région 5' de l'ARNm de la cathepsine B était donc rétrotranscrite par PCR à l'aide de primers situés aux exons 1 et 6. Après électrophorèse, l'hybridation du blot avec la sonde de la cathepsine B révélait des fragments de 549, 461 et 306 paires de bases qui correspondent respectivement à l'ARNm contenant la totalité de la région 5', l'ARNm délété de l'exon 2, et l'ARNm délété des deux exons 2 et 3 (143). La figure 17 A montre des exemples représentatifs de l'amplification de la région 5' des ARNm de la cathepsine B issus de tissus synoviaux rhumatoïdes, arthrosiques et post-traumatiques (considérés comme normal) obtenus de diverses articulations. Les deux ARNm de la cathepsine B contenant la région complète et délétés de l'exon 2 étaient exprimés dans tous les tissus synoviaux rhumatoïdes, arthrosiques, ou normaux. En revanche, l'ARNm délété des exons 2 et 3 montraient une expression variable, et étaient détectés dans 20 cas sur 23 de PR, 10 cas sur 12 d'arthrose, et 1 cas sur 3 de traumatisme.

3.2. Quantification des variants 5' de l'ARNm de la cathepsine B dans le tissu synovial humain.

Les tissus synoviaux exprimaient apparemment plus d'ARNm de la cathepsine B délété des exons 2 et 3. que les tissus synoviaux arthrosiques ou normaux (figure 17 A). Pour connaître l'impact réel de l'épissage alternatif de la cathepsine B sur le niveau élevé de l'ARNm délété des exons 2 et 3, l'influence potentielle d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle dans le tissu rhumatoïde devait être pris en compte. Après avoir mesuré l'intensité de chacune des bandes

d'amplification de 549, 461 et 306 pb à partir d'un phosphor imager, les proportions des variants 5' du transcrit de la cathepsine B étaient établies. En relation avec la figure 17 A, la figure 17 B montre les proportions de ces divers ARNm de la cathepsine B. A partir des exemples montrés, il apparaissait que la proportion des ARNm sans les exons 2 et 3 était plus importante dans les tissus synoviaux de PR que dans les tissus arthrosiques ou normaux. Les proportions moyennes des variants 5' du transcrit de la cathepsine B étaient établies à partir de la totalité des tissus synoviaux analysées (figure 17 C). Les ARNm sans les exons 2 et 3 représentaient $17,7\% \pm 2,2\%$ de la totalité des ARNm de la cathepsine B dans les tissus synoviaux rhumatoïdes, $9,0\% \pm 2,1\%$ dans les tissus arthrosiques, et $0,2\% \pm 0,1\%$ dans les tissus normaux. En revanche, la proportion des ARNm de la cathepsine B délétés du seul exon 2, qui étaient les messagers prépondérants de la cathepsine B dans les tissus synoviaux, apparaissait plutôt similaire dans les tissus rhumatoïdes, arthrosiques et normaux (respectivement $64,9\% \pm 3,0\%$, $71,3\% \pm 3,5\%$ et $80,5\% \pm 7,1\%$).

Pour établir de façon certaine un déplacement significatif de l'expression des ARNm de la cathepsine B à régions 5' complètes vers les ARNm délétés des exons 2 et 3 dans le tissu synovial rhumatoïde, une étude statistique avec le test U de Mann-Whitney était entreprise à partir des proportions des ARNm de la cathepsine B délétés des exons 2 et 3, et de l'exon 2. Comme démontré par l'analyse des proportions de la bande de 306 pb dans les différents tissus, une augmentation significative de la proportion des ARNm délétés des exons 2 et 3 était observée dans le tissu synovial rhumatoïde par rapport au tissu arthrosique ($p=0,029$) ou normal ($p=0,021$) (tableau 7 bis, ratio 306/total). La spécificité potentielle de l'ARNm de la cathepsine B délété du seul exon 2 dans la PR était aussi examinée. Comme démontré par l'analyse des proportions des bandes de 461 pb dans les différents tissus, l'ARNm de la cathepsine B délété de l'exon 2, contrairement à celui délété des deux exons 2 et 3, n'apparaissait pas être spécifique de la PR: la différence entre le tissu synovial rhumatoïde et le tissu synovial arthrosique ($p=0,135$) ou normal ($p=0,059$) n'était pas significative (tableau 7 bis, 461/total).

Tableau 7 bis. Accroissement significatif de la proportion de l'ARNm de la cathepsine B délété des exons 2 et 3 exprimé dans le tissu synovial rhumatoïde par rapport au tissu synovial arthrosique ou normal.

	Probabilité associée au test U de Mann-Whitney	
	306/total* ratio	461/total* ratio
PR et arthrose	0.029	0.135
PR et normal	0.021	0.059

* total = addition des bandes de 306, 461 et 549 pb

3.3. Analyse de la région 3' non traduite de l'ARNm de cathepsine B

Pour examiner dans sa totalité l'épissage alternatif de la cathepsine B dans le tissu synovial, les variations dans la région 3' non traduite de l'ARNm de la cathepsine B étaient aussi étudiées. Les transcrits de la cathepsine B de 4,0 kb et 2,3 kb, qui diffèrent dans leur région 3' non traduite, étaient détectés dans tous les tissus testés (figure 18 A). L'analyse densitométrique des signaux radiographiques révélait que le ratio des ARNm de 2,3 kb sur ceux de 4,0 kb était environ de 2:1 dans les tissus synoviaux rhumatoïdes, arthrosiques et normaux (figure 18 B). La normalisation des données au travers de la β -actine indiquait que le niveau global des ARNm de la cathepsine B était similaire dans les tissus synoviaux rhumatoïdes, arthrosiques et normaux.

FIGURE 17. Régulation par les cytokines de l'expression des variants 5' des ARNm de la cathepsine B dans les tissus synoviaux. Une transcription inverse de l'ARN suivie d'une amplification par PCR de la région 5' de l'ADNc de la cathepsine B étaient entreprises à partir de tissus synoviaux rhumatoïdes (RA), arthrosiques (OA) ou normaux (NO). Les produits PCR étaient séparés sur gel d'agarose, transférés sur membrane, et hybridés à une sonde ADNc radiomarquée de la cathepsine B. L'autoradiographe de la figure A montre des bandes de 549, 461 et 306 paires de bases qui correspondent respectivement à l'ARNm complet de la cathepsine B, l'ARNm délété de l'exon 2 et l'ARNm délété des deux exons 2 et 3. Pour mesurer l'expression de ces différents transcripts dans les tissus synoviaux, l'intensité de chaque bande était scannée au phosphor imager. En parallèle avec la figure A, la figure B montre les proportions des bandes de 549, 461 et 306 pb. La figure C présente les proportions moyennes de chacune de ces bandes, obtenues à partir de de la totalité des tissus synoviaux (23 tissus rhumatoïdes, 12 arthrosiques et 3 normaux).

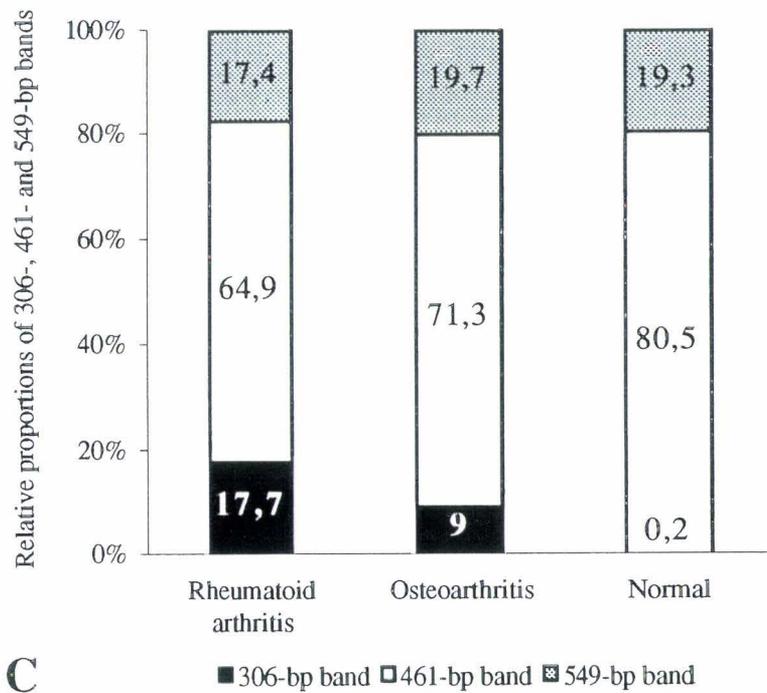
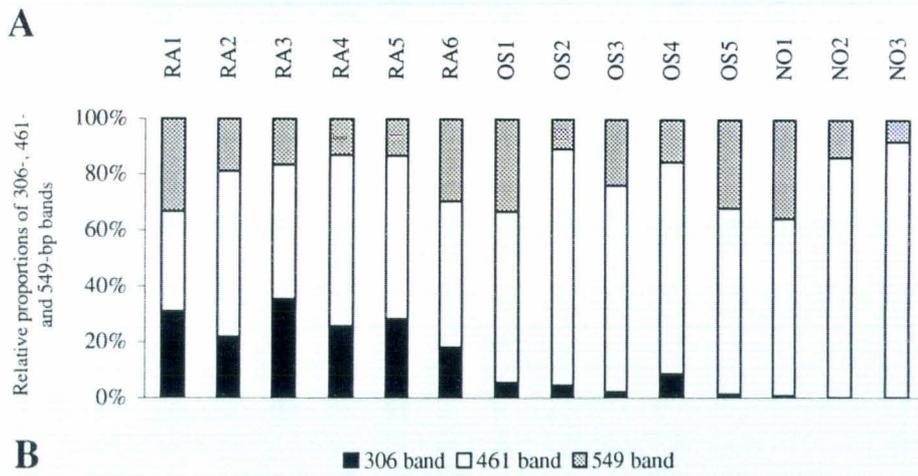
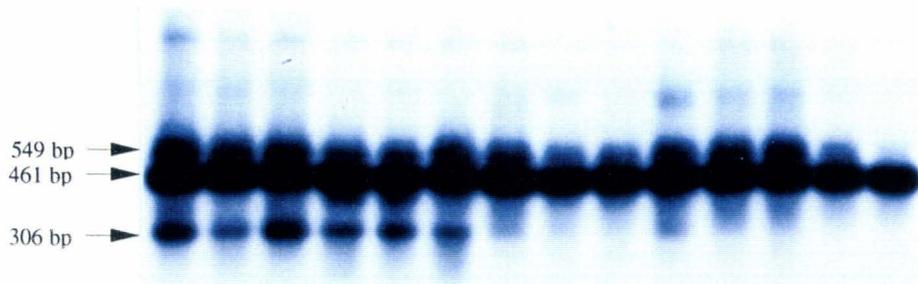


FIGURE 17

FIGURE 18. Expression globale des ARNm de la cathepsine B dans les tissus synoviaux. Un northern blot était pratiqué à partir d'ARN de tissus synoviaux rhumatoïdes (RA), arthrosiques (OA), ou normaux (NO). L'ARN était hybridé à une sonde ADNc radiomarquée au ^{32}P de la cathepsine B et de la β -actine. La figure A montre l'autoradiographe. L'intensité de chacune des bandes était quantifiée sur un analyseur d'image (Pharmacia). En parallèle avec la figure A, la figure B présente le niveau d'expression des transcrits de 4,0 et 2,3 kb de la cathepsine B après correction des résultats en fonction de l'expression de la β -actine.

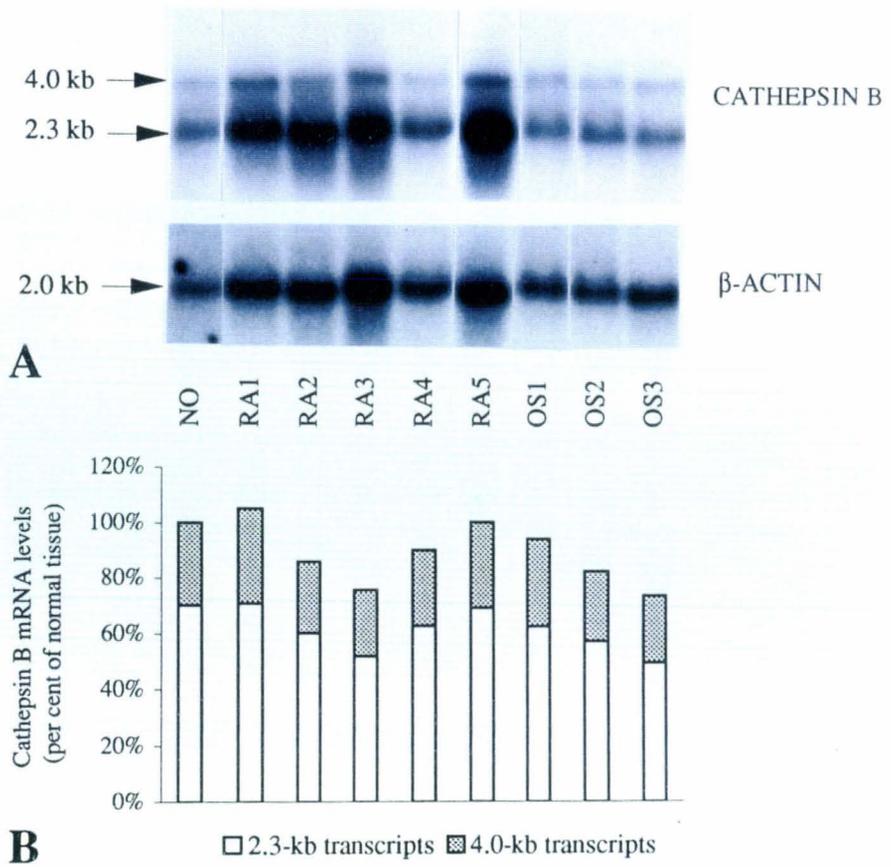


FIGURE 18

4. DISCUSSION

La croissance invasive des cellules synoviales aux sites de destruction articulaire dans la PR est très certainement liée à leur capacité à proliférer et à sécréter des enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéases collagénase et stromelysine, ou les cystéine protéases cathepsine B et L (33, 78, 116-119). L'expression d'un tel phénotype chez la cellule synoviale suggère qu'un processus analogue à la transformation cellulaire néoplasique se produise chez ces cellules dans la PR. Pour examiner dans sa globalité la relation entre le tissu synovial rhumatoïde et un tissu tumoral, l'épissage alternatif de l'ARNm de la cathepsine B, notamment dans sa région 5', était étudié. L'épissage alternatif dans la région 5' de l'ARNm de la cathepsine B produit des ARNm délétés des exons 2 ou des exons 2 et 3, qui sont exprimés presque exclusivement dans les tissus tumoraux. Ces ARNm spécifiques des tumeurs possèdent des taux de traduction excessivement élevés, et par conséquent pourraient être au moins en partie responsable de la forte expression de la cathepsine B dans les tumeurs humaines. A l'instar des tissus tumoraux, le niveau élevé de la cathepsine B détectée dans le tissu synovial rhumatoïde, dans la marge invasive du pannus de type tumoral, pourraient en partie trouver son origine dans l'épissage alternatif de son pré-ARNm. Nous avons donc cherché une éventuelle expression spécifique des variants 5' de l'ARNm de la cathepsine B dans le tissu synovial rhumatoïde, par rapport au tissu synovial arthrosique ou normal. Bien que l'ARNm délété de l'exon 2 était le transcrite prépondérant de la cathepsine B dans tous les tissus synoviaux testés, aucune différence significative dans l'expression de ce message n'était démontrée entre le tissu rhumatoïde, arthrosique ou normal. Au contraire, l'ARNm de la cathepsine B délété des exons 2 et 3 était significativement augmenté dans le tissu synovial rhumatoïde en comparaison de l'arthrose ($p=0,029$) ou normal ($p=0,021$). Cette sélectivité au niveau de l'augmentation des variants 5' de l'ARNm de la cathepsine B démontrait ainsi le rôle de l'épissage alternatif au niveau de la régulation de l'expression de la cathepsine B.

Puisqu'il a été démontré spécifiquement dans une tumeur humaine du cerveau que la transcription de la cathepsine B pouvait être initiée non seulement à partir de l'exon 1, mais aussi à

partir de l'exon 2 et 3 (145). On pourrait arguer que les variants 5' de l'ARNm de la cathepsine B exprimés dans le tissu synovial ne dérivent pas seulement de l'épissage alternatif du pré-ARNm, mais aussi de la présence de ces sites supplémentaires d'initiation de transcription. Cependant, puisque le but de cette étude était l'analyse de l'épissage alternatif de la région 5' de l'ARNm de la cathepsine B, la détection potentielle des transcrits de la cathepsine B issus de régions promotrices en amont des exons 3 et 4 était prévenue par la l'utilisation d'un primer au niveau de l'exon 1 lors de la PCR (voir matériels et méthodes).

Dans une autre étude, deux exons supplémentaires avaient été détectés dans la région 5' non traduite des transcrits de la cathepsine B, entre les exons 2 et 3. De tels transcrits sont exprimés dans des glioblastomes et tumeurs de prostate (145). Cependant, ces transcrits apparaissaient toujours comme des variants transcriptionnels mineurs. De plus, ils n'ont pas été détectés dans les tissus du colon. Dans notre étude, de tels transcrits n'avait été détectés dans aucun des tissus testés. Les cellules synoviales expriment des variants transcriptionnels de la cathepsine B sans les exons 2 ou 2 et 3, mais probablement pas les transcrits de la cathepsine B avec un exon supplémentaire entre les exons 2 et 3.

Le fait que dans tous les tissus analysés le transcrit prépondérant de la cathepsine B était celui délété de son exon 2 est dans la droite ligne d'études précédentes faites sur d'autres types tissulaires normaux ou tumoraux, comme les tissus du colon, de la prostate ou du cerveau (145). Parce que l'exon 2 de 88 pb n'implique pas la séquence codant pour la cathepsine B, l'excision de l'exon 2 lors du processing du pré-ARNm apparait jouer un rôle important dans l'expression de la protéine cathepsine B dans la plupart des tissus humains. En plus, les transcrits sans exon 2 ont été démontrés deux fois plus actifs que ceux contenant l'exon 2 (143). Néanmoins puisque des proportions similaires d'ARNm délétés de l'exon 2 étaient détectés dans les tissus rhumatoïdes, arthrosiques et normaux, l'épissage responsable de la production de ces ARNm ne semble pas devoir subir de régulation particulière dans le tissu synovial, suggérant que le niveau élevé de la protéine de la cathepsine B dans le tissu synovial rhumatoïde aux sites de destruction de l'os et du cartilage ne dérive pas de l'excision de l'exon 2 lors du processing de l'ARNm de la cathepsine B.

L'expression de l'ARNm de la cathepsine B délétés des exons 2 et 3 était aussi examinée dans cette étude. Contrairement à l'exon 2, l'exon 3 implique des séquences codant pour la cathepsine B. L'exon 3 de 151 pb code le peptide signal requis pour l'entrée dans le réticulum endoplasmique, et 7 résidus du peptide d'activation. Comme démontré dans des essais in vitro, la traduction d'un tel transcrite sans exon 2 ni 3 aboutit à la synthèse d'une protéine de 32 kDa à laquelle il manque le peptide signal et plus de la moitié du peptide d'activation (143). A partir de ces données, le rôle d'un tel ARNm sans exons 2 et 3 dans l'expression de la protéine cathepsine B apparaît assez incertain. Cependant, d'autres données suggèrent que cette protéine pourrait quand bien même avoir un rôle intracellulaire. Il a été reporté que cette protéine synthétisée in vitro pouvait se reconformer de manière telle qu'elle serait active sans excision du peptide d'activation. De plus, le traitement à la pepsine de cette protéine de 32 kDa provoquerait une augmentation de l'activité enzymatique de l'ordre d'un facteur 3 (130). Puisque le peptide signal est absent d'une telle protéine, son expression éventuelle semble être corrélée à une localisation cytosolique ou nucléaire. Cette enzyme protéolytique pourrait être impliquée indirectement dans le processus destructeur par modulation de l'activité de certaines protéines régulatrices intracellulaires importantes.

Des variations dans la région 5' non traduite de certains ARNm ont été montrées affecter le niveau d'expression de la protéine synthétisée au travers de modifications de la stabilité (146) ou de l'activité traductionnelle (147) de l'ARNm. L'excision des deux exons 2 et 3 lors du processing du pré-ARNm de la cathepsine B induit une augmentation d'un facteur 8 de l'activité traductionnelle de l'ARNm (143). La proportion de cet ARNm hautement traduit de la cathepsine B était montrée dans cette étude être significativement accrue dans le tissu synovial rhumatoïde. Ceci suggère que l'épissage alternatif de la région 5' du pré-ARNm de la cathepsine B pourrait réguler l'expression de la protéine dans le tissu synovial, et donc serait responsable de l'expression accrue de la cathepsine B chez les cellules synoviales dans la PR.

Des variations dans la région 3' non traduite de certains ARNm ont aussi été démontrées affecter la stabilité (148) ou la traduction (149) de l'ARNm. Pour déterminer la contribution potentielle de l'épissage alternatif de la région 3' du pré-ARNm de la cathepsine B, l'expression des transcrits de 2,3 et 4,0 kb de la cathepsine B, qui diffèrent dans leur région 3', était aussi

analysée. Le ratio des ARNm de 2,3 kb sur ceux de 4,0 kb était similaire dans les tissus synoviaux rhumatoïdes, arthrosiques et normaux. L'épissage alternatif de la région 3' du pré-ARNm de la cathepsine B n'apparaît donc pas être impliqué dans le niveau élevé de la protéine cathepsine B observé dans le tissu synovial d'individus atteints de PR.

L'analyse par northern blot indiquait un niveau des transcrits de la cathepsine B similaire dans les tissus synoviaux rhumatoïdes, arthrosiques et normaux. Une étude précédente a rapporté une transcription accrue de la cathepsine B dans les cellules synoviales issues de PR (47). Mais dans notre étude, la transcription de la cathepsine B était évaluée directement dans le tissu synovial, et non pas dans des cellules synoviales de type fibroblastique en culture. De plus, contrairement à l'autre groupe qui avait utilisé en tant que contrôle des fibroblastes gingivaux et des cellules épithéliales de tumeurs de colon, nous avons utilisé du tissu synovial non inflammé comme contrôle. Nos données suggèrent que l'expression de la cathepsine B dans le tissu synovial rhumatoïde n'est pas l'objet d'une régulation transcriptionnelle. Ceci renforce le rôle potentiel des mécanismes post-transcriptionnels, comme l'épissage alternatif de la région 5' du pré-mRNA de la cathepsine B, dans la régulation de l'expression de la cathepsine B dans le tissu synovial.

Comme l'ARNm de la cathepsine B délété des exons 2 et 3 a été montré avant tout être exprimé dans les tissus tumoraux, la prévalence démontrée d'un tel ARNm dans le tissu synovial rhumatoïde renforce la vue que les cellules synoviales expriment un phénotype de type tumoral. Le phénotype transformé des cellules synoviales dans la PR est probablement régulé par les cytokines inflammatoires présentes au niveau de la synoviale rhumatoïde. Ainsi le PDGF induit *in vitro* la croissance avec et sans ancrages des cellules synoviales (82, 150). Le bFGF peut aussi moduler la croissance de ces cellules (84). La production de la collagénase est induite par l'IL-1 et le TNF- α (76, 80) L'IFN- γ inhibe la croissance cellulaire et la sécrétion de la collagénase induites par l'IL-1 (137) et le TNF- α (79). Nous venons de démontrer la stimulation de l'expression et/ou la sécrétion de la cathepsine B par le TNF- α , l'IL-1, le PDGF, le bFGF, et l'IFN- γ , ainsi que l'expression et sécrétion de la cathepsine L par le bFGF, et l'IFN- γ (151). On pouvait donc spéculer sur la régulation par les cytokines de l'épissage alternatif de la région 5' de l'ARNm de la cathepsine B qui donne naissance aux transcrits anormaux. Ceci était confirmé par la

démonstration d'une induction sélective par le PDGF et le TNF- α de l'expression du transcrite de la cathepsine B délété des exons 2 et 3 chez les cellules synoviales en culture. Plus frappant encore était la similarité des proportions de cet ARNm, d'une part chez la cellule synoviale traitée par le PDGF ou le TNF- α (14,9% et 17,3% des ARNm totaux de la cathepsine B) et le tissu synovial rhumatoïde (17,7%), et d'autre part chez la cellule synoviale contrôle non traitée (9,7%) et le tissu synovial arthrosique (9,0%). Ceci confirme le rôle prépondérant des cytokines dans l'expression du phénotype transformé des cellules synoviales dans la PR.

PUBLICATIONS

R. Lemaire, G. Huet, H. Migaud, E. Dacquembronne, C. Fontaine, R. Lafyatis, R.M. Flipo. Specific regulation of alternative splicing of the 5' untranslated region of cathepsin B pre-mRNA in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum, Accepté sous révision, août 1996.*

R. Lemaire, G. Huet, H. Migaud, E. Dacquembronne, C. Fontaine, R. Lafyatis, R.M. Flipo. Specific regulation of alternative splicing of the 5' untranslated region of cathepsin B pre-mRNA in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum, 1996 39, S198 (60ème congrès Annuel de l'American College of Rheumatology, Orlando, 18-22 octobre 1996)*

R. Lemaire, G. Huet, H. Migaud, E. Dacquembronne, C. Fontaine, R. Lafyatis, R.M. Flipo. Régulation spécifique de l'épissage alternatif du pré-mRNA de la cathepsine B dans le tissu synovial rhumatoïde. *9ème Congrès Français de Rhumatologie, Paris.*

Troisième partie

ETUDE DES SIGNAUX INTRACELLULAIRES ASSOCIES A L'EXPRESSION DU PHENOTYPE TRANSFORME DES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

1. GENERALITES SUR L'ACTIVATION ONCOGENIQUE DANS LA PR

1.1. Contribution des oncogènes à la pathogénie de la PR.

Comme les oncoprotéines jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la régulation de la croissance cellulaire, l'apparition de ce front invasif de cellules synoviales transformées suggère une régulation anormale de l'expression de certains oncogènes dans la PR. Une expression anormale de ces oncogènes provoquerait une dérégulation des fonctions cellulaires normales, avec une croissance accentuée et l'induction d'enzymes protéolytiques (34).

Les proto-oncogènes codent des protéines impliquées dans bon nombre de fonctions cellulaires incluant prolifération et différenciation (152, 153). Ces oncoprotéines sont potentiellement impliquées à chacune des étapes de la cascade de signaux intracellulaires, allant du stimulus extracellulaire jusqu'à l'expression du gène dans le noyau (154). Ce sont ainsi les facteurs de croissance, les récepteurs de facteurs de croissance, les protéines liant le GTP, les protéines kinases et les facteurs nucléaires de transcription (152). Selon la localisation intracellulaire du produit de leur contrepartie normale ("proto-oncogène"), les oncogènes peuvent être classés comme suit: ceux agissant au niveau de la membrane plasmique (src, fms, ras), du cytoplasme (mos, raf), ou dans le noyau (myc, myb, fos, jun, Rb, p53).

Afin de déterminer la contribution oncogénique à la pathogénie de la PR, il est apparu important d'étudier au niveau de la synoviale rhumatoïde l'expression d'oncogènes connus pour participer aux mécanismes régulant l'expression de certains caractères liés à la transformation: induction d'enzymes protéolytiques comme les cystéine protéases ou les métalloprotéases, et prolifération cellulaire.

1.2. Induction oncogénique des cystéine protéases dans la PR: rôle de ras dans l'expression des cathepsines B et L.

Différents travaux ont démontré une interconnexion entre l'expression de l'oncogène ras et l'expression des cystéine protéases cathepsines L et B. Ainsi la transfection du seul oncogène ras dans les fibroblastes NIH3T3 de souris mène à la transformation cellulaire avec induction de

cathepsine L (91). De même des formes activées des cathepsines B et L sont sécrétées par des fibroblastes de souris transformés par le virus de Kirsten exprimant l'oncogène ras (155). C'est à ce titre que l'on a cherché et trouvé une telle association dans la synoviale rhumatoïde. Des analyses immunohistochimiques pratiquées au niveau du tissu synovial rhumatoïde ont démontré que l'expression accrue des cathepsines L et B au niveau des synoviocytes attachés au cartilage et à l'os est directement associée à une expression significative de l'oncoprotéine ras (46, 47).

1.3. Induction oncogénique des métalloprotéases dans la PR: rôle de c-fos et ras dans l'expression de la collagénase.

Les expériences de transformation cellulaire ont démontré que le gène de la collagénase peut être régulé transcriptionnellement par un certain nombre d'oncogènes codant des formes normales ou mutées de facteurs de croissance ou de protéines impliquées dans la transduction du signal. En particulier, il a été démontré que l'oncoprotéine nucléaire c-fos, appartenant à la famille des "immediately early genes", est essentiel à l'activation transcriptionnelle du gène de la collagénase dans des fibroblastes murins transformés (156). Les observations histologiques de la synoviale rhumatoïde humaine ont décrit une intense coloration nucléaire spécifique à la protéine c-fos dans les cellules synoviales produisant la collagénase au site de destruction (46). D'autres études ont montré que l'expression du messager de la collagénase intersticielle est directement associée à l'expression du messager de c-fos dans des fibroblastes issus d'explants synoviaux, ainsi qu'une corrélation positive entre l'immunoréactivité de la protéine c-fos et celle de la collagénase dans les articulations rhumatoïdes (48). De plus, on a montré récemment que la souris transgénique c-fos développait une arthrite destructive sans infiltration de lymphocytes (44). Toutes ces données suggèrent une véritable implication de l'oncogène c-fos dans la pathogénie de la PR par induction de l'expression des métalloprotéases chez les synoviocytes présents au site de destruction.

On peut situer c-Hras au même niveau que c-fos dans la pathogénie de la PR puisque c-Hras, exprimé significativement dans les cellules synoviales rhumatoïdes attachées au cartilage en cours d'érosion (46), est un des éléments régulateurs de l'expression de c-fos (157). Ainsi peut-

on constater chez des fibroblastes murins synoviaux normaux transfectés avec c-Hras une forte expression de la transine, l'homologue de la métalloprotéase humaine stromelysine (158).

Néanmoins, la forte activité globale de métalloprotéases au niveau de l'interface pannus-cartilage peut ne pas s'expliquer que par la seule induction oncogénique de l'expression de la proenzyme. En effet, il apparaît nécessaire de tenir compte également de l'expression d'inhibiteurs spécifiques de ces métalloprotéases. La famille sans cesse croissante des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) comprend actuellement trois protéines appelées TIMP-1 (159), TIMP-2 (160) et TIMP-3 (161). La balance entre les TIMPs et les métalloprotéases est un élément crucial de la restriction de caractéristiques néoplasiques chez les cellules normales (162). Un déséquilibre en faveur d'une activité accrue des métalloprotéases favorise la croissance néoplasique (163). On a pu constater qu'un tel déséquilibre existe réellement au niveau de la synoviale dans les cas de PR hautement inflammatoire, l'expression de TIMP y apparaissant moins intense que celle de la collagénase et de la stromelysine (59). Des mécanismes oncogéniques pourraient fort bien également être à l'origine de ce déséquilibre dans la PR. En effet, la présence de l'élément TRE au niveau du promoteur des gènes codant les TIMPs et les métalloprotéases suggère que les oncoprotéines type fos ou jun, qui compose le complexe AP-1 responsable de l'activation du TRE, jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des métalloprotéases et des TIMPs (164).

1.4. Oncogènes modulant la croissance cellulaire dans la PR: rôle de c-fos, c-ras et Rb dans le contrôle de la prolifération.

Les oncogènes c-fos et c-ras, qui sont significativement exprimés dans les cellules synoviales du pannus rhumatoïde, peuvent également contribuer à la pathogénie de la PR en modulant la prolifération des synoviocytes du pannus. En effet, c-fos et c-ras sont connus d'une façon générale pour participer activement à la régulation du cycle cellulaire. Ainsi la prolifération de cellules 3T3 peut être inhibée par la présence de messagers antisenses de c-fos (165). De même, le processus de prolifération cellulaire normale est souvent associé à un fort accroissement

des messagers de ras, comme dans le cas de cellules hépatiques en cours de régénération (166, 167).

L'importance de l'anti-oncogène Rb (Rétinoblastome) dans la croissance cellulaire transformée des synoviocytes dans la PR est quant à lui suggérée par l'expression anormale de ce gène dans un cas de sarcome synovial (168). De récentes études ont laissé entendre que les facultés de la protéine Rb à réguler négativement le cycle cellulaire prennent leur origine dans la capacité de Rb à se lier au facteur de transcription E2F pour ainsi moduler l'activité de ce dernier (169). Certaines protéines virales comme l'antigène grand T de SV40 (AgT de SV40) sont capables de contrôler l'activité de la protéine Rb dans les fibroblastes humains (170). Ces données suggèrent un rôle majeur de la protéine Rb dans la régulation de la croissance des synoviocytes. La dérégulation de l'expression de cette oncoprotéine Rb dans les synoviocytes pourrait ainsi expliquer la prolifération de ces cellules au niveau du pannus rhumatoïde.

1.5. Facteurs d'activation des oncogènes dans la PR.

Si les oncogènes paraissent jouer un rôle important dans la pathogénie de la PR, reste à déterminer les facteurs responsables de l'activation de ces oncogènes au niveau de la synoviale rhumatoïde. L'hypothèse dominante place les cytokines comme activateurs majeurs des oncogènes dans la PR. Une hypothèse plus marginale fait intervenir les rétrovirus dans l'activation oncogénique.

1.5.1. Rétrovirus et activation oncogénique.

Bien qu'un modèle rétroviral d'activation oncogénique apparaisse très séduisant, puisque pouvant expliquer les deux processus dominants dans la PR, hyperplasie synoviale et réponse immunitaire dépendante des lymphocytes, les preuves d'une réelle implication d'un virus dans la pathogénie rhumatoïde restent assez minces et marginales, et sont pour la plupart plutôt des spéculations. Des études *in vitro* sur des cellules issues d'explants synoviaux d'articulations rhumatoïdes ont indiqué que les fibroblastes synoviaux rhumatoïdes ont le potentiel de transcrire

spontanément c-fos et egr-1, contrairement à ceux issus de tissus non inflammatoires (171). Egr-1, comme c-fos, est associé à l'initiation du cycle cellulaire et peut agir dans la régulation de la transcription comme en atteste la présence dans sa structure de trois doigts de zinc liant l'ADN. Certains faits suggèrent que l'expression constitutive de egr-1 dans la PR est directement liée à la présence d'un rétrovirus. En effet certains travaux récents ont décrit au niveau de certaines cultures de cellules synoviales rhumatoïdes la présence de transcrits RNA codant un doigt de zinc appelé "Z225" (172). Ce doigt de zinc Z225 avait auparavant été montré être exprimé spontanément dans des lignées cellulaires transformées par le virus HTLV I et II (173). L'analyse nucléotidique de Z225 l'établit comme homologue de egr-1. D'autres données supportent également un modèle rétroviral d'activation oncogénique dans la PR: la dérégulation de l'expression de c-fos par la protéine Tax-1 du HTLV-1 (174) et la présence possible de particules *de type* rétroviral dans le liquide synovial (175, 176) de patients rhumatoïdes. Néanmoins, si infection virale il y a dans la PR, elle apparaît souvent plus une conséquence qu'une cause de la PR. Le cas du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans la PR est à ce titre très significatif. En effet, alors que la fréquence de lymphocytes B infectés par EBV apparaît anormalement élevée dans le sang des malades atteints de PR (7), chez les malades à PR précoce, le titre d'anticorps dirigés contre un antigène nucléaire associé à EBV ou un antigène de la capsid virale n'est pas élevé (8).

1.5.2. Cytokines et activation oncogénique.

Les cytokines, incluant facteurs de croissance et interleukines, sont probablement l'élément clé de l'expression du phénotype transformé et destructeur des synoviocytes du pannus puisqu'ils ont la capacité de moduler l'expression des oncogènes intéressant directement la PR.

Ainsi est-il intéressant de noter que la plupart des cytokines, si ce n'est toutes, sont capables d'activer l'oncoprotéine ras, protéine mitogénique par excellence (177). Ceci est à mettre en relation avec les facultés du PDGF à induire la prolifération des synoviocytes *in vitro* sous des conditions dépendantes (178) ou indépendantes d'ancrages (82) De même, la protéine ras, inducteur des cathepsines B et L, est un intermédiaire majeur dans la transduction du signal issu de la stimulation par l'IL-1 ou du TNF α vers le gène de la cathepsine B (78).

Chez les cellules synoviales rhumatoïdes, il a été montré que l'IL-1, comme le TPA, stimule l'expression du gène de la collagénase (179) et de la stromelysine (180), au travers de l'activation de la protéine PKC, par stimulation de l'élément TRE (TPA Responsive Element) du promoteur de la collagénase et de la stromelysine. Les mêmes mécanismes sont à l'origine de la stimulation de la collagénase par le TNF α (181). L'inhibition de c-fos, une des protéines avec c-jun du complexe protéique AP-1 activant le TRE, inhibe l'induction par l'IL-1 du promoteur de la collagénase (179). Ceci dénote le rôle prépondérant de c-fos dans la transduction du message intracellulaire depuis la stimulation de l'IL-1 jusqu'au gène de la collagénase. Bien que l'expression de c-fos soit un élément indispensable à l'expression de la collagénase, son expression est en partie dissociée de celle de la collagénase. En effet, il a été montré que, à l'instar de l'IL-1, le PDGF, le FGF, le TGF β et l'AMPc stimulent l'expression de c-fos, mais au contraire de l'IL-1, ne stimulent pas l'expression de la collagénase (données non publiées).

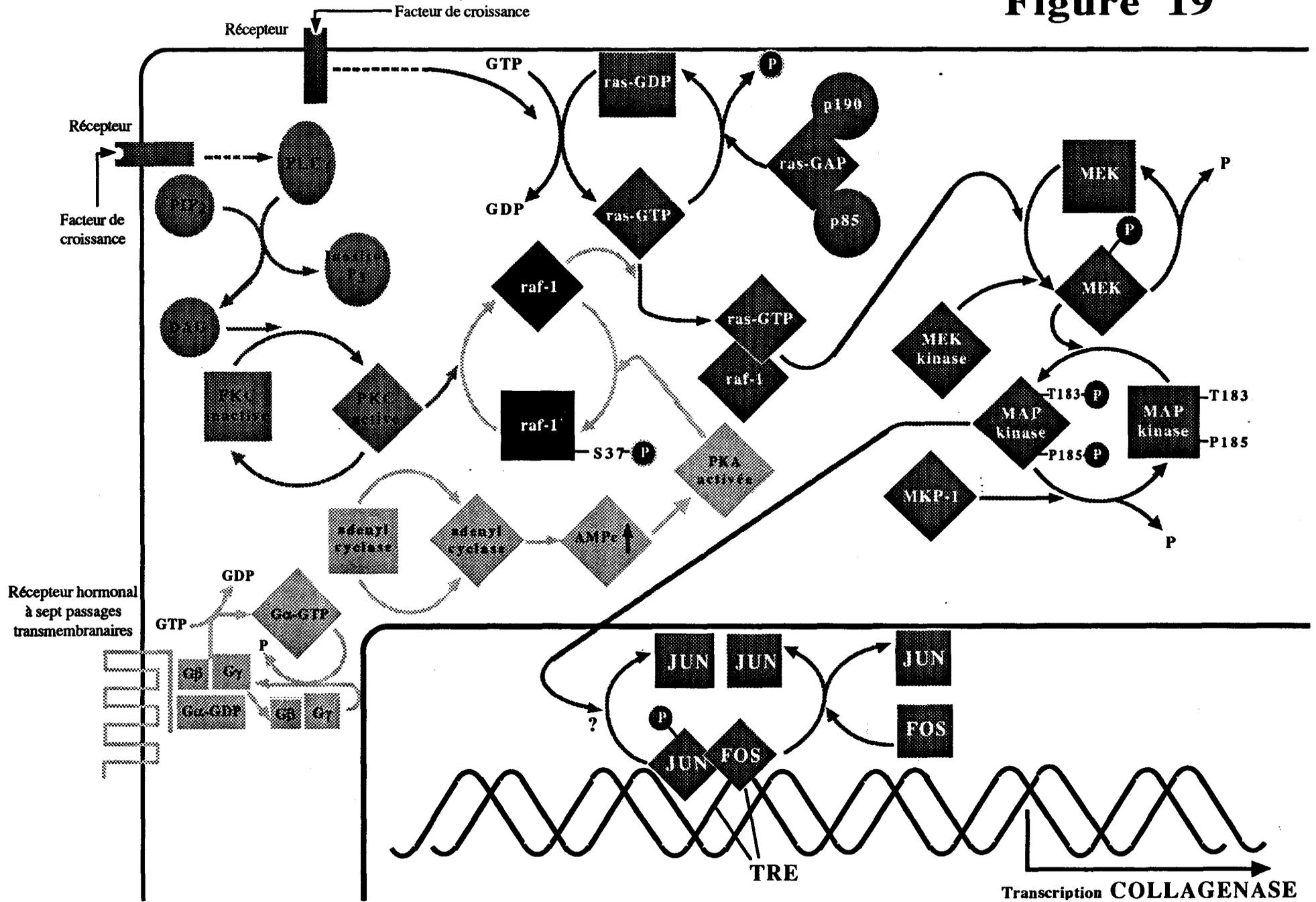
En revanche, cette augmentation de l'expression de c-fos après stimulation par le PDGF ou le FGF confirme chez les synoviocytes le rôle important joué généralement dans beaucoup de types cellulaires par c-fos au niveau de la transduction des signaux mitogéniques.

Un autre facteur important de la régulation des oncogènes dans la PR est l'acide rétinoïque. En effet, l'acide rétinoïque inhibe l'expression de c-fos induite par l'IL-1, le PDGF ou le FGF (données non publiées). Ceci est à mettre en relation avec la capacité de l'acide rétinoïque à inhiber l'expression de la collagénase et la croissance sans ancrage des synoviocytes (82 et données non publiées). L'inhibition de c-fos par l'acide rétinoïque est donc dans ce cas directement corrélée à l'inhibition de deux caractéristiques du phénotype transformé exprimé par les cellules synoviales du pannus rhumatoïde.

L'expression ubiquitaire de l'oncogène c-fos après stimulation par toute une série de cytokines, chacune ayant un effet différent sur le phénotype cellulaire, laisse à penser que des voies intracellulaires autres que celles passant par c-fos sont nécessaires à la spécificité du signal donné par une cytokine (182). Ainsi dans les synoviocytes, comme nous venons de le voir, si l'IL-1 et le PDGF stimulent l'expression de c-fos, seul l'IL-1 induit l'expression de la collagénase. Néanmoins, si l'expression de la collagénase apparaît en partie dissociée de celle de c-fos, cette dernière n'en demeure pas moins indispensable. C'est à ce titre qu'il semble

intéressant de synthétiser les connaissances actuelles sur la régulation intracellulaire de c-fos pour être à même de schématiser les différentes voies de transduction du signal interagissant dans la régulation de l'expression de cet élément clé de la pathogénie rhumatoïde qu'est la collagénase. Comme le décrit le modèle de la **figure 19**, la sérine/thréonine kinase raf-1 (183, 184) est un élément régulateur majeur puisque placée à la croisée de trois voies importantes de la signalisation intracellulaire générale: les voies ras, PKC et PKA dépendantes.

Figure 19



Le modèle cytokine-dépendant d'activation des proto-oncogènes cellulaires au niveau des cellules synoviales de type fibroblastique du pannus rhumatoïde, présenté **figure 20**, décrit les mécanismes extracellulaires et intracellulaires qui, dans l'état actuel de nos connaissances, semblent les plus à mêmes à réguler le phénotype transformé et destructeur de ces cellules dans la PR.

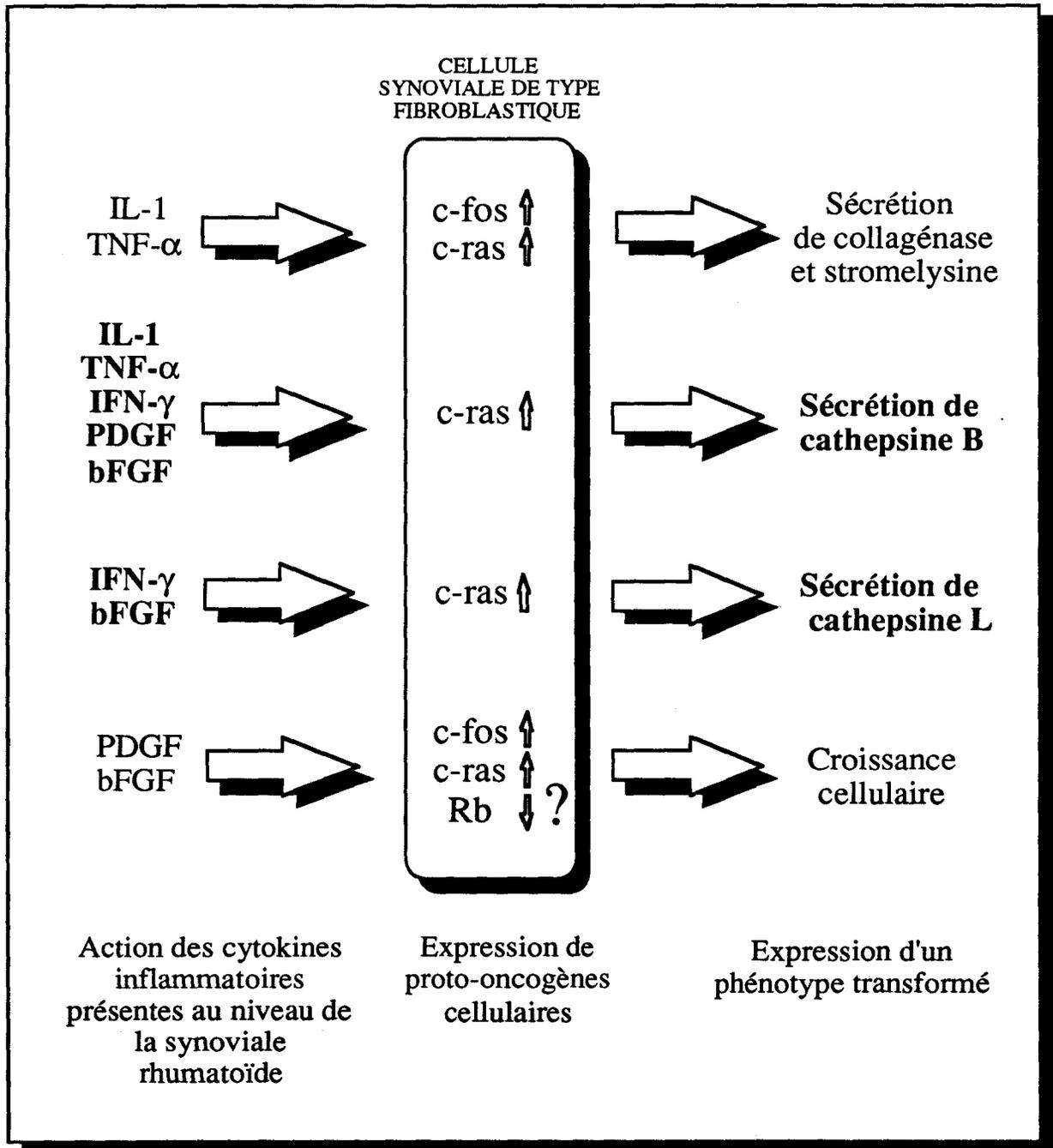


FIGURE 20. Modèle d'activation des proto-oncogènes cellulaires au niveau des cellules synoviales de type fibroblastique du pannus rhumatoïde à partir de l'action des cytokines inflammatoires présentes dans la synoviale.

2. INTRODUCTION

Dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), l'inflammation du tissu synovial induit un changement dans le phénotype des cellules synoviales de type fibroblastique qui de cellules relativement statiques du tissu connectif deviennent des cellules largement impliquées dans plusieurs aspects de la pathophysiologie rhumatoïde (185). Ces changements phénotypiques participent à la pathophysiologie synoviale à deux niveaux. D'une part, la cellule synoviale de type fibroblastique est généralement considérée comme *le* médiateur final d'aspects importants de la destruction articulaire dans cette maladie. Elles sécrètent des enzymes protéolytiques jouant un rôle important dans la dégradation du cartilage telles la collagénase, la stromelysine, ou les cathepsines B et L (116-119). Elles interviennent également dans la résorption de l'os juxtaarticulaire de par l'expression d'un phénotype transformé et invasif. D'autre part, la cellule synoviale de type fibroblastique est probablement impliquée dans la constitution et l'entretien du milieu favorable à la migration et la maturation des cellules immunitaires dans le tissu synovial par la sécrétion de diverses cytokines tels que le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, et le TGF-bêta (transforming growth factor) (45, 86, 186-191). La sécrétion de ces cytokines, et probablement d'autres, est très certainement un important facteur d'infiltration et de régulation de ces cellules mononucléaires dans le tissu synovial rhumatoïde.

Le phénotype transformé destructeur des cellules synoviales de type fibroblastique dans la PR est probablement régulé par les cytokines inflammatoires présentes à l'interface pannus-cartilage. Comme décrit largement précédemment dans ce mémoire, les cytokines, incluant interleukines et facteurs de croissance, ont montré dans différentes études stimuler *in vitro* plusieurs caractéristiques du phénotype pathologique de type transformé des cellules synoviales exprimé dans le tissu synovial rhumatoïde *in vivo*.

Pour essayer de mieux comprendre les signaux intracellulaires associés à l'expression du phénotype transformé induit par les cytokines chez les cellules synoviales de type fibroblastique, la méthode employée ici est de court-circuiter les voies intracellulaires normales aboutissant à la stimulation des proto-oncogènes responsables de l'expression de ce phénotype. Pour ce faire, les

cellules synoviales sont transfectées par des gènes déjà connus pour leurs qualités transformantes chez d'autres cellules: les oncogènes. Les changements phénotypiques associés à l'expression de ces oncogènes sont alors étudiés. La transformation complète d'une cellule normale en une cellule tumorale nécessitant dans un certain nombre de cas la présence d'au moins deux oncogènes, cette étude est faite à partir de deux oncogènes connus pour leur capacité à se compléter parfaitement dans la transformation cellulaire: l'antigène grand T de SV40 et l'oncogène T24 H-ras, forme activée du proto-oncogène cellulaire H-ras par mutation (153, 192). L'antigène viral grand T est une phosphoprotéine multifonctionnelle localisée dans le noyau (193), alors que ras est une protéine eucaryote associée à la membrane plasmique, et dont le rôle au niveau de la transduction du signal à travers la membrane cellulaire apparaît essentiel (167). L'effet de chacun de ces oncogènes dépend du type cellulaire étudié, cependant, *en général*, l'antigène grand T de SV40 provoque l'immortalisation de cellules primaires de rongeurs et une espérance de vie accrue chez des cellules humaines primaires (170, 194, 195), alors que l'oncogène ras provoque la formation de foyers cellulaires ou une croissance sous des conditions indépendantes d'ancrage chez des lignées cellulaires bien établies ou des cellules immortalisées, mais ne rallonge pas l'espérance de vie de cellules primaires (196-199). Ces deux effets sont probablement importants dans la transformation stable d'une cellule normale en une cellule tumorale, et comme il est suggéré ci-dessus, on peut penser que chez les patients atteints de PR, ces événements sont peut être reproduits ponctuellement chez les cellules synoviales sous l'influence de cytokines comme le PDGF et/ou l'IL-1. De plus, l'induction stable de ce phénotype transformé chez les cellules synoviales pourrait permettre de corrélérer la croissance invasive de ces cellules avec leurs caractéristiques destructrices chez les patients rhumatoïdes. Expressément, on peut faire croître des cellules transfectées de manière stable dans des animaux immunodéficients pour tester l'effet d'oncogènes spécifiques, non seulement sur le potentiel de croissance de ces cellules, mais aussi sur leur capacité à reproduire *in vivo* les effets habituels des cellules synoviales chez les personnes atteintes de PR, c'est à dire la destruction de l'os et du cartilage de l'articulation.

Cette étude montrait que la transfection de cellules synoviales de type fibroblastique par l'antigène grand T de SV40 conduisait à une transformation morphologique, une prolifération cellulaire spontanée accrue, une croissance indépendante d'ancrage et de facteur de croissance, et à

la formation de tumeur transitoire dans des souris immunodéficientes. En revanche, la transfection de l'oncogène T24 H-ras ne menait pas à la transformation de ces cellules; de même la transfection de T24 H-ras dans des cellules déjà transformées par l'antigène grand T de SV40 n'avait aucun effet apparent sur le phénotype initial de ces cellules. La régulation de l'expression du gène de la collagénase et des cathepsines B et L n'était pas modifiée par l'antigène grand T de SV40, seul ou associé à l'oncogène T24 H-ras. En revanche, la transfection de cellules synoviales par l'antigène grand T de SV40, seul ou associé à l'oncogène T24 H-ras, induisait une sécrétion des cathepsines B et L, notamment de leurs formes matures, largement accrue et indépendante des cytokines.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Obtention et culture des cellules synoviales humaines. Le tissu synovial était obtenu lors d'une intervention chirurgicale pour arthroplastie totale chez des sujets atteints de PR ou d'arthrose. Les cellules synoviales de type fibroblastique étaient ensuite isolées comme décrit précédemment (82). Brièvement, le tissu synovial était haché très finement, puis dissocié enzymatiquement pendant 4 heures à 37°C dans du Milieu de Dulbecco Modifié par Iscove (IMDM) (GIBCO/BRL, Cergy Pontoise, FRANCE) sous l'action de la collagénase (type III, Worthington, freehold, NJ) à raison de 4 mg/ml. Après digestion, les cellules libérées et les fragments de tissu digérés étaient recueillis par une centrifugation à 500 g pendant 10 minutes, puis resuspendus dans du milieu complet (IMDM + 10% de sérum de veau foetal (FBS), 50 U/ml de pénicilline, et 50 µg/ml de streptomycine. Les cellules étaient cultivées dans un incubateur saturé en humidité à 37°C dans 5% de CO₂, et passées à une dilution de 1 pour 3 jusqu'à la première utilisation, en général au passage numéro 3 ou 4.

3.2. Plasmides. Trois plasmides étaient utilisés dans le cadre des essais de transfection (**Figure 21**): le plasmide pHO6T1 (200) (aimablement fourni par D.A. Spandidos) qui contient, d'une part la forme génomique de l'oncogène *T24 H-ras* (forme activée par mutation du proto-oncogène cellulaire humain H-ras) dont la transcription est contrôlée en partie par certaines séquences activatrices de MoMSV LTR (Moloney Murine Sarcoma Virus Long Terminal Repeat) et de SV40 (Simian Virus 40), et d'autre part le gène bactérien *neo'* codant l'enzyme APH (aminoglycoside phosphotransférase) qui confère la résistance aux antibiotiques telles que la néomycine ou la généticine, sous le contrôle transcriptionnel des régions promotrices et activatrices de MoMSV LTR et du signal de polyadénylation dérivé du gène HSV-1 tk (herpes simplex virus thymidine kinase) ; le plasmide pRSV-TAG (aimablement fourni par J. Brady), qui contient le gène codant l'*antigène grand T de SV40* sous le contrôle transcriptionnel des régions promotrices et activatrices de RSV-LTR (Rous Sarcoma Virus); le plasmide pSV2-néo, qui

contient le gène *néo^r* sous le contrôle transcriptionnel du promoteur tardif de SV40 (région se situant au niveau de l'origine de réplication du génome de SV40) et du signal de polyadénylation dérivé de la région précoce de SV40.

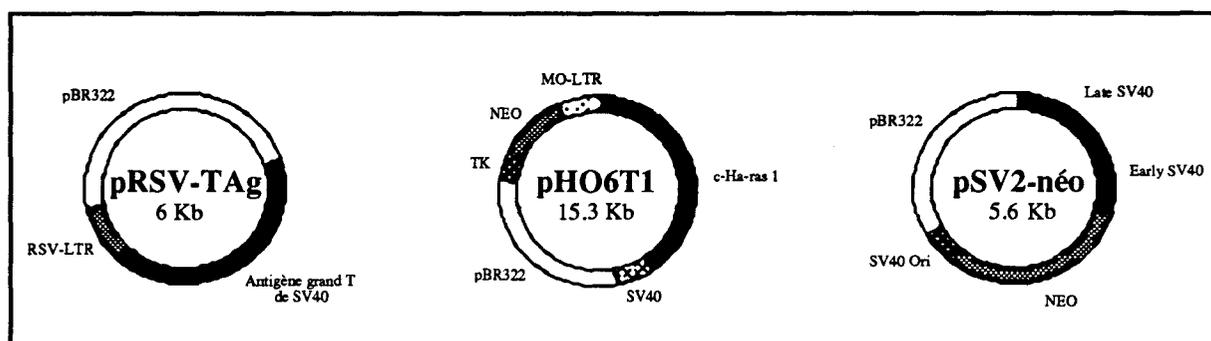


Figure 21

3.3. Transfection. Environ 3 semaines après leur mise en culture, les cellules synoviales de type fibroblastique étaient passées dans des flacons de culture de 25 cm² à une densité de 2.10⁵ cellules par flacon, et transfectées 48 heures plus tard en utilisant une technique de lipofection. Pour la lipofection, 30 µl du liquide de transfection (DOTAP/Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) étaient dilués à 100 µl avec de l'HBS (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4), puis mélangés avec la solution d'ADN à transférer diluée, elle aussi, à 100 µl avec de l'HBS. La solution d'ADN consistait soit en 5 µg du plasmide pRSV-TAg cotransfecté avec 1 µg du plasmide pSV2-néo, soit en 5 µg du seul plasmide pHO6T1, soit encore en 5 µg du plasmide pRSV-TAg cotransfecté avec 1 µg du plasmide pHO6T1. Après mélange des solutions de DOTAP et d'ADN, la mixture était laissée 10 minutes à température ambiante, puis transférée au milieu de culture cellulaire, lequel avait été changé préalablement pour du milieu OPTIMEM (GIBCO/BRL, Cergy Pontoise, FRANCE) non additionné de sérum. Les cellules étaient laissées dans ce milieu de transfection de 4 à 6 heures, puis remises en présence du milieu de culture initial (IMDM + 20% de FBS) pour 72 heures supplémentaires. Les cellules transfectées de manière stable étaient alors sélectionnées sur la base de la présence du marqueur dominant néo^r par l'utilisation de l'antibiotique G418 (Généticine). La concentration de G418 nécessaire pour tuer les cellules non transfectées était déterminée pour chaque culture primaire, mais se situe en général entre 200 et

400 µg/ml. La sélection se faisait en général sur 7 à 10 jours, suivie d'une expansion des cellules survivantes.

3.4. Test de prolifération cellulaire. Les cellules synoviales étaient distribuées dans des plaques de culture 96 puits à raison de 10^4 cellules/puit dans 200 µl de milieu complet/puit. Le jour suivant, les cellules étaient lavées deux fois avec du PBS (phosphate buffer saline), puis mises en culture dans de l'IMDM non additionné de sérum. Après 48 heures, 1 µCi de ^3H thymidine était ajouté à chaque puit, avec ou sans addition d'une cytokine. Après 48 heures supplémentaires, les cellules étaient lavées avec du PBS, et 50 µl de trypsine-EDTA (GIBCO/BRL, Cergy Pontoise, France) étaient ajoutés dans chaque puit. Suite à la vérification du bon décollement des cellules au microscope, celles-ci étaient recueillies sur un filtre à l'aide d'un "cell harvester". L'incorporation de ^3H thymidine était ensuite mesurée au compteur à scintillation liquide.

3.5. Cytokines. L'IL-1-alpha recombinante était fournie par Hoffman-La-Roche (Nutley NJ), le PDGF-BB homodimère humain recombinant par Genzyme (Cambridge, MA), le TGF-bêta était aimablement fourni par le Dr. M. Sporn, et le bFGF (basic fibroblast growth factor) aimablement fourni par le Dr. Boilly.

3.6. Test de croissance cellulaire sans ancrage. Une solution à 2% d'agarose (point de fusion bas/SERVA) était préparée dans de l'eau distillée, et autoclavée. Du milieu de culture IMDM 2X/20% FBS était également préparé. Après un préchauffage à 40°C, ces deux solutions étaient mélangées à volume égal, et 1 ml utilisé pour couvrir le fond de chaque puit d'une plaque de culture 6 puits. Ce même mélange agarose-milieu de culture était utilisé pour cultiver les cellules. La solution cellulaire était préparée après trypsination à une concentration approximative de 10^6 cellules/ml. Le passage de cette suspension cellulaire à travers une aiguille de jauge 25 dissociait les éventuels agrégats de cellules. 15 µl de cette suspension cellulaire étaient alors ajoutés à 3 ml du mélange agarose-milieu de culture pour être ensuite coulés dans un des puits

précouvris. Après une incubation de 30 minutes à 4°C pour permettre à l'agarose de polymériser rapidement, les cellules étaient cultivées dans un incubateur à 5% de CO₂ et 37°C.

3.7. Test de tumorigénicité. Le test était effectué sur des souris SCID/Nu dont la grande qualité est une tolérance aux greffes tumorales du fait d'une déficience au niveau lymphocytaire. Les souris SCID/Nu descendaient directement de souris C.B-17-SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) élevées à l'Institut Pasteur de Lille en conditions stériles. Ces souris étaient croisées avec des souris Nu/Nu pour établir des souris homozygotes pour les deux phénotypes SCID et Nude (SCID/Nu). Environ 4 semaines après la transfection, les lignées cellulaires à tester étaient trypsinées et lavées 2 fois avec du milieu IMDM sans sérum. Les souris SCID/Nu, âgées de 6 à 8 semaines, étaient alors chacune injectées en sous cutané avec 5.10^6 cellules dans 0.2 ml de milieu sans sérum (IMDM), et examinées 2 fois par semaine quant à la formation d'une tumeur.

3.8. Analyse immunohistochimique. Le tissu à analyser était immédiatement fixé dans du paraformaldéhyde 4% en tampon cacodylate, pour être par la suite enrobé dans de la paraffine. Des sections du tissu de 4 µm d'épaisseur étaient alors incubées avec un anticorps non dilué de souris dirigé contre la partie C-terminale de l'antigène grand T de SV40 (surnageant issu de la culture du clone hybridome # 412 (201) obtenu dans l'ATCC (American Tissue Culture Collection) #TIB117, Pab 101) pendant 18 heures à 4°C. Ceci était suivi d'une incubation avec un anticorps de lapin anti-souris biotinylé (Dako laboratory) dilué au 1/200e pendant 30 minutes à température ambiante, puis d'une incubation avec le complexe streptavidine-biotine couplé à la peroxydase pendant 30 minutes à température ambiante. La révélation s'effectuait en présence de diaminobenzidine. Une contre-coloration à l'hématoxyline était pratiquée dans le même temps.

4. RESULTATS

4.1. Transfection des cellules synoviales de type fibroblastique.

Les cellules synoviales de type fibroblastique de malades atteints de PR ou d'arthrose étaient transfectées soit avec le plasmide pRSV-TAg codant l'antigène grand T de SV40, soit avec le plasmide pH06T1 codant la protéine oncogénique T24 H-ras, ou encore avec les deux. Après la transfection, les cellules synoviales étaient sélectionnées avec la G418, un antibiotique qui tue les cellules ne contenant pas une copie du gène néo^r. Ce gène était présent sur le plasmide pH06T1, et se trouvait co-transfecté dans les cellules transfectées avec le seul antigène grand T par l'intermédiaire du plasmide pSV2-néo. Généralement, chaque culture de cellules synoviales transfectées (que l'on désignera par la suite pour des raisons pratiques sous le terme de *lignée cellulaire*, même si l'expression peut paraître un peu abusive dans le cas présent) croissait à partir d'une ou deux cellules résistantes, rarement plus. Après sélection par la G418, la transfection effective des cellules synoviales avec l'antigène grand T, seul ou combiné à l'oncogène T24 H-ras, était testée par Northern Blot suivi d'une hybridation. La présence de l'antigène grand T était vérifiée en utilisant comme sonde l'insert plasmidique radiomarqué, et dans tous les cas de cellules résistantes transfectées avec grand T, seul ou en association avec T-24 H-ras, la transfection stable de l'ADN codant l'antigène grand T de SV40 s'était révélée effective (figure 22). Généralement, l'hybridation de la sonde antigène grand T était constatée au niveau d'une bande d'intensité variable correspondant à un ARNm d'environ 2.7 Kb (la lignée cellulaire R4 T ne révélait clairement une bande qu'après une exposition plus longue). Exceptionnellement, un transcrite supplémentaire de poids moléculaire plus élevé pouvait être distingué chez certaines lignées (*par exemple R2 T*). La présence de la protéine grand T dans toutes ces lignées transfectées était aussi confirmée par immunocytochimie (données non présentées).

La transfection effective de l'oncogène T24 H-ras dans les cellules où celui-ci a été cotransfecté avec l'antigène grand T s'avèrait plus difficile à vérifier du fait, d'une part de la présence naturelle dans le génome d'une copie non mutée de ce gène (le proto-oncogène cellulaire H-ras), et d'autre part du caractère génomique de l'insert T24-H-ras du plasmide pHO6T1, ceci occasionnant une trainée (smear) plutôt qu'une bande discrète quand cet insert était hybridé au blot d'ARN. Cependant, la présence du plasmide pHO6T1 codant la protéine T24 H-ras était démontrée par la résistance à la G418 des cellules transfectées avec cette combinaison de plasmides (le plasmide pRSV-TAg ne possède pas le gène neo^r qui confère cette résistance, contrairement au plasmide pHO6T1). De plus, la transfection effective des gènes transfectés neo^r était confirmée par Northern Blot (**figure 22**). Dans un cas, une lignée cellulaire transfectée avec grand T s'était trouvée spontanément partiellement résistante à la G418, en dépit de l'absence du plasmide pSV2-neo cotransfecté (**figure 22, lignée cellulaire R4T**). Après retransfection avec le plasmide pHO6T1, puis resélection à une concentration de G418 beaucoup plus élevée, cette lignée montrait un très haut niveau de transcrite du gène neo^r (**figure 22, lignée cellulaire R4 T+R**), montrant qu'elle était effectivement transfectée avec le plasmide pHO6T1.

Les cellules transfectées avec le seul oncogène T24 H-ras ne croissaient pas à une densité suffisante pour permettre de vérifier par Northern Blot la bonne réalisation de la transfection de T24 H-ras dans ces cellules, mais une analyse par PCR pouvait en attester (données présentées dans la publication faite à partir de ce travail).

4.2. Caractérisation des cellules synoviales transfectées.

Plusieurs types de cellules synoviales, adhérentes et non lymphoïdes, ont été caractérisés *in vivo* et *in vitro* : au moment de la dissociation du tissu et de la culture cellulaire primaire, ces cellules synoviales sont soit de type macrophagique soit de type dentritique, les deux exprimant des molécules du CMH II, soit encore de type fibroblastique avec expression de hauts niveaux de vimentine (202, 203). Les cellules synoviales transfectées étaient donc caractérisées par immunocytochimie au niveau de ces deux marqueurs phénotypiques, révélant chez ces cellules une expression nulle de molécules du CMH II, contrairement à l'expression de vimentine qui

apparaissait très intense, indiquant que les cellules synoviales transfectées sont dans tous les cas de type fibroblastique. Le caractère fibroblastique des cellules synoviales était également démontré par un immunomarquage positif par l'anticorps 5B5 anti-fibroblaste sur les cellules synoviales avant comme après transfection (**planche 4**) Ces résultats étaient en accord avec certaines études précédentes montrant qu'au moment où ces cellules étaient transfectées (généralement deux à quatre semaines après la mise en culture) plus de 99% des cellules synoviales en culture étaient de type fibroblastique. Dans plusieurs cas, des cultures clonales transfectées étaient obtenues par le procédé de dilution limite à partir d'une culture initiale non clonale de cellules synoviales transfectées, avec des résultats similaires à ceux obtenus pour la culture non clonale (données non présentées).

Les cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T de SV40, seul ou en association avec l'oncogène T24 H-ras, acquérissaient des caractères typiques de cellules transformées puisque, initialement de forme allongée, avec un rapport nucléocytoplasmique faible, et se disposant en culture en un réseau monocouche plutôt lâche, ces cellules après transfection montraient, en association avec un potentiel de division accru, une forme arrondie ou ovoïde, voyaient leur taille se réduire et leur rapport nucléocytoplasmique s'accroître, et en culture se disposaient en amas denses avec zones de recouvrement. Les cellules transfectées avec le seul oncogène T24 H-ras ressemblaient à des cellules SF ayant subi de nombreux passages, voire sénéscentes, de par un potentiel de croissance excessivement réduit, mais aussi un aspect plat et d'imposantes dimensions (**planche 5**).

Ce mode de réponse à l'antigène grand T de SV40 ou à l'oncogène T24 H-ras de la part de cellules synoviales était valable aussi bien au niveau de la PR que de l'arthrose.

4.3. Réponse des cellules synoviales transfectées aux facteurs de croissance.

De nombreux facteurs de croissance apparaissaient être importants dans la régulation de la croissance des cellules synoviale de type fibroblastique. Des études précédentes avaient montré que le PDGF et le FGF stimulaient fortement la prolifération des cellules synoviales, de manière

identique au sérum (150). Dans le but d'étudier les effets de l'antigène grand T de SV40 sur la prolifération des cellules synoviales de type fibroblastique, les cellules transfectées avec grand T et non transfectées, étaient traitées par différents facteurs de croissance connus pour réguler le phénotype des cellules synoviales. Les cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T avaient un niveau basal de prolifération très élevé, même après deux jours sans sérum ; dans l'exemple montré, la prolifération spontanée, mesurée par incorporation de ^3H thymidine, était 50 fois plus forte que chez une cellule synoviale non transfectée (**figure 23 A et 23 B, contrôle**). Ces résultats pouvaient varier d'une lignée à l'autre, cependant la prolifération spontanée restait toujours au moins 20 fois plus élevée chez une cellule synoviale transfectée avec l'antigène grand T que chez cette même cellule non transfectée.

Le traitement de cellules synoviales non transfectées avec le sérum ou différents facteurs de croissance confirmait parfaitement le mode de régulation de la prolifération précédemment reporté chez ces cellules (150) (**figure 23 A**). En revanche, ce même traitement pratiqué sur les cellules transfectées avec l'antigène grand T de SV40 faisait apparaître que la présence de l'antigène grand T réduisait considérablement l'impact des cytokines sur la prolifération (**figure 23 B**). En particulier, bien que l'action du PDGF sur des cellules synoviales non transfectées multipliait par 11.1 leur niveau initial de prolifération, après la transfection, ces cellules ne voyaient plus leur niveau initial de prolifération que multiplié par 1.3. Des effets similaires étaient constatés avec le FGF, et à un degré moindre avec le TGF- β . En revanche, la réponse au sérum était généralement similaire chez les cellules transfectées et non transfectées. Des résultats similaires étaient constatés chez deux autres lignées cellulaires transfectées avec l'antigène grand T de SV40 et trois autres non transfectées, toutes d'origine rhumatoïde. Un mode similaire de réponse était aussi vu chez des cellules synoviales de type fibroblastique obtenues chez des patients atteints d'arthrose, transfectées ou non avec l'antigène grand T.

Les cellules cotransfectées avec l'antigène grand T de SV40 et l'oncogène T24 H-ras étaient identiques quant à leur mode de régulation de la prolifération aux cellules synoviales transfectées avec le seul antigène grand T (trois lignées rhumatoïdes)

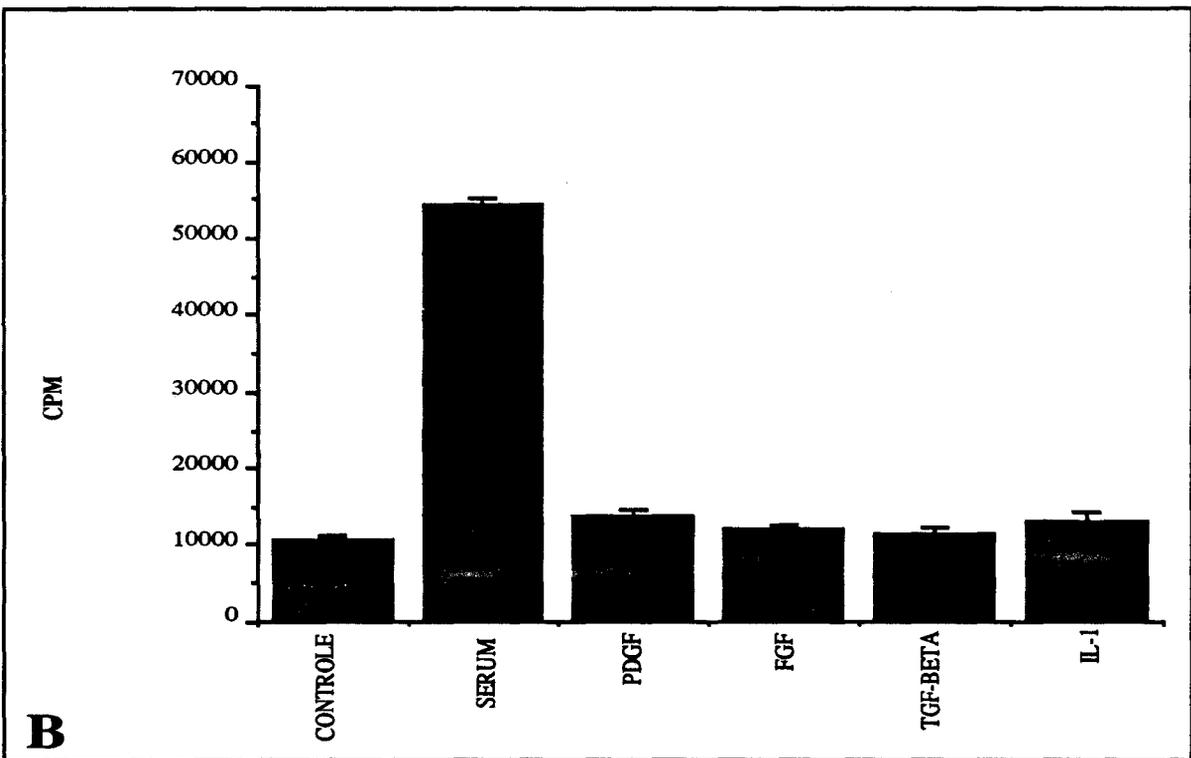
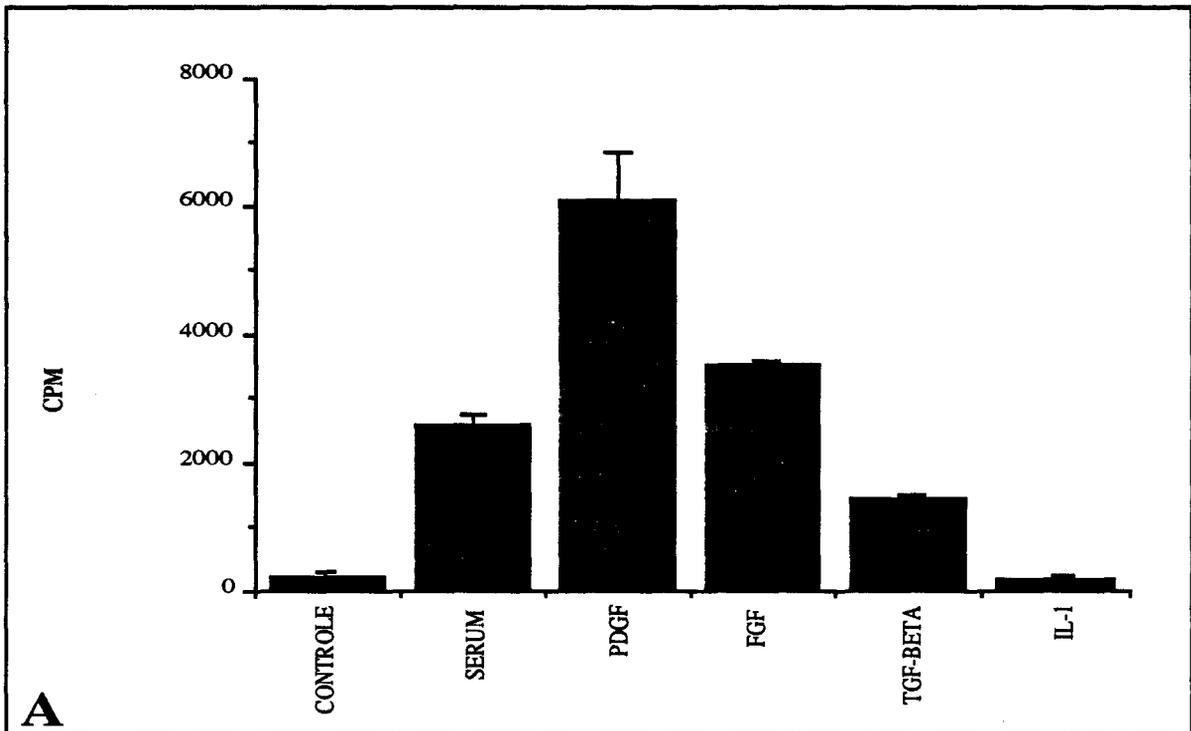


FIGURE 23. RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION CHEZ LES CELLULES SYNOVIALES AVANT ET APRÈS TRANSFECTION AVEC L'ANTIGÈNE GRAND T DE SV40. Les cellules synoviales non transfectées (A) et transfectées (B) avec l'antigène grand T de SV40 étaient cultivées sans sérum pendant 48 heures, puis traitées avec du sérum de veau foetal (10%), PDGF (20 ng/ml), bFGF (2ng/ml), TGF-beta1 (2 ng/ml), IL-1 (100 U/ml), ou laissées sans traitement (CONTROL). La thymidine tritiée était ajoutée dans le même temps. Après 48 heures, les cellules étaient recueillies sur un filtre et la quantité de thymidine tritiée incorporée était mesurée (CPM). Les valeurs et les barres montrées représentaient respectivement les moyennes effectuées sur 3 puits et les écart-types.

4.4. analyse des capacités de croissance sans ancrage des cellules synoviales transfectées.

Dans l'optique de déterminer si les cellules synoviales transfectées avaient des caractéristiques de transformation in vitro, ces cellules étaient cultivées dans de l'IMDM à 1% d'agarose. Les cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T de SV40, seul ou en combinaison avec l'oncogène T24 H-ras, formaient dans tous les cas de larges colonies dans l'agarose, conditions dans lesquelles les cellules non transfectées ne poussaient que très peu (10% FBS, **figure 24, tableau 8**). Les colonies formées étaient beaucoup plus larges (jusqu'à 1 mm de diamètre) que celles décrites précédemment chez des cellules synoviale non transfectées en présence de sérum humain et de PDGF exogène (82).

La plupart des cellules transfectées avec grand T formaient des colonies, au contraire des cellules non transfectées chez lesquelles généralement seules 5 à 10% d'entre elles formaient des colonies (82). Il n'existait pas de différence notable au niveau des capacités de croissance sans ancrage entre les cellules synoviales transfectées avec le seul antigène grand T et celles transfectées avec l'antigène grand T associé à l'oncogène T24 H-ras.

TABLEAU 8. Croissance de type transformé chez des lignées de cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T de SV40, seul ou accompagné de l'oncogène T24 H-ras, de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou d'arthrose.

ADN transfecté	Croissance cellulaire sans ancrage* Formation de tumeur transitoire**		
	Polyarthrite rhumatoïde	Arthrose	Polyarthrite rhumatoïde
Antigène grand T de SV40	3/3 (3/3)	-	4/5 (2/3)
Antigène grand T de SV40 + T24 H-ras	6/6 (4/4)	3/3 (1/1)	6/8 (2/3)

* seules les lignées dont les cellules forment dans l'agarose des colonies de plus de 60 micromètres de diamètre sont considérées positives - nombre d'essais positifs/nombre total d'essais (nombre de lignées cellulaires positives/nombre de lignées testées)

** seules les tumeurs de plus de 3 millimètres de diamètre étaient considérées positives - nombre de tumeurs positives/nombre total d'injections (nombre de lignées cellulaires positives/nombre de lignées testées)

4.5. Expression des ARNm de la collagénase et des cathepsines B et L chez les cellules synoviales transfectées.

Pour définir de manière plus complète l'effet de l'antigène grand T de SV40 sur le phénotype des cellules synoviales, l'expression de la métalloprotéases collagénase et des cystéine protéases cathepsines B et L, était étudiée chez les cellules synoviales de type fibroblastique après transfection. La transformation des cellules synoviales par l'antigène grand T de SV40 ne modifiait pas le mode de régulation de l'expression du transcrite de la collagénase précédemment reportée chez ces cellules (76, 80): l'IL-1 et le TNF- α stimulait fortement l'expression de l'ARNm de 2.0 kb de la collagénase chez les cellules synoviales transfectés avec l'antigène T (figure 25 A). L'apport de ras chez les cellules synoviales transfectées par l'antigène grand T ne modifiait en rien l'effet stimulant de l'IL-1 et du TNF- α sur la collagénase (figure 26 A).

Bien que le niveau d'expression constitutionnelle des cathepsines B et L chez les cellules synoviales soit variable d'un patient à l'autre, ce niveau apparaissait assez élevé et aucun changement associé à la présence de l'antigène grand T de SV40 ou de l'oncogène T24 H-ras n'était détecté (figure 12, 25, 26, et données non présentées).

L'effet stimulant du bFGF sur l'expression de la collagénase chez la cellule synoviale de type fibroblastique, démontré précédemment dans cette étude (figure 12 A), se retrouvait également chez les cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T, seul ou associé à l'oncogène ras (figure 25 et 26 A).

L'effet stimulant du bFGF sur l'expression des transcrits de 2,3 et 4,0 kb de la cathepsine B et celui de 1,2 kb de la cathepsine L chez la cellule synoviale de type fibroblastique avait été décrit précédemment dans cette étude (figure 12). Après transfection avec l'antigène grand T, seul ou associé à l'oncogène ras, le bFGF stimulait toujours l'expression transcriptionnelle de la cathepsine B (figure 25 et 26, A et B) et de la cathepsine L (figure 25 et 26, A et C).

Le TNF- α , l'IL-1, le PDGF et l'IFN- γ restait sans effet sur l'expression des transcrits des cathepsines B et L (figure 12 et 13). Chez la cellule synoviale transfectée avec l'antigène grand T, seul ou associée à ras, cet absence d'effet sur l'expression de la cathepsine B (figure 25 et 26, A et B) et de la cathepsine L (figure 25 et 26, A et C) était conservée.

Des résultats similaires étaient obtenus sur quatre autres lignées cellulaires (2 lignées transfectées avec le seul antigène grand T, et 2 avec l'association antigène grand T-oncogène ras).

4.6. Régulation par les cytokines de la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales transfectées.

La régulation par les cytokines de la sécrétion des cathepsines B et L était également testée sur les cellules synoviales après transfection. La transfection de l'antigène grand T dans les cellules synoviales induisait une sécrétion constitutive considérablement accrue pour les cathepsines B et L, et non régulée par les cytokines définies auparavant comme étant des agents inducteurs des cathepsines chez les cellules synoviales avant transfection. Dans l'exemple montré figure 26 bis, l'apport de grand T dans les cellules synoviales modifiait considérablement le mode de régulation par les cytokines de la sécrétion des cathepsines B et L. En effet, alors qu'avant transfection la sécrétion de cathepsine B était stimulée par le TNF- α , PDGF, bFGF et IFN- γ , et celle de cathepsine L par l'IFN- γ et le bFGF, ce type de régulation ne se retrouvait plus après transfection puisque le niveau de sécrétion après traitement des cellules synoviales par les différentes cytokines était similaire au niveau contrôle. Ce phénomène devait probablement être mis en relation avec le niveau de sécrétion constitutive extrêmement élevé après transfection. En effet, si l'on se référait au contrôle avant et après transfection, l'on constatait à 24 heures une élévation de la sécrétion spontanée des cathepsines B et L d'environ un facteur 20 après transfection par grand T. On ne constatait pas de différences notables entre les cellules synoviales transfectées par l'antigène grand T seul ou associé à l'oncogène ras.

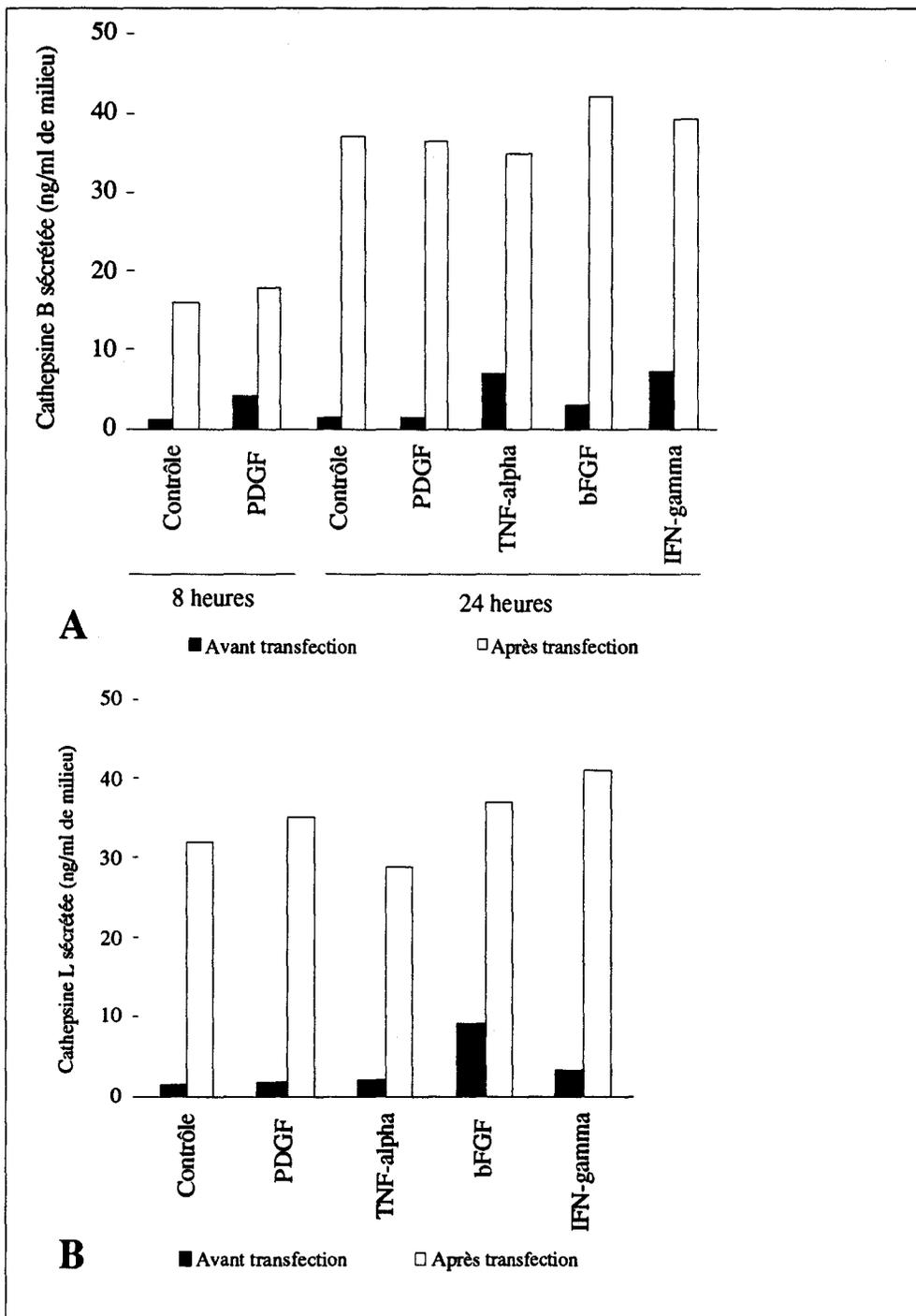


FIGURE 26 BIS. Induction de la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique par transfection de l'antigène grand T de SV40. Après avoir été privées de sérum pendant 24 heures, les cellules synoviales, avant et après transfection, étaient traitées par le TNF- α , le PDGF, le bFGF ou l'IFN- γ . Le niveau de la cathepsine B (A) et de la cathepsine L (B) sécrétées dans le milieu à 8 ou 24 heures de traitement était analysé par ELISA.

4.7. Analyse par Western blot des cathepsines B et L synthétisées et sécrétées par les cellules synoviales de type fibroblastique.

Pour mieux caractériser le phénotype des cellules synoviales transfectées, les formes sécrétées et intracellulaires des cathepsines B et L étaient caractérisées par Western blot, avant et après traitement par le TNF- α , PDGF, bFGF ou IFN- γ . Comme le montre la figure 27 B, et contrairement aux cellules synoviales avant transfection (figure 14 B), plusieurs formes sont sécrétées chez les cellules transfectées: on retrouve dans le milieu des formes de la cathepsine B de 43 kDa (forme la plus représentée), 31 kDa et 27 kDa, qui correspondent probablement respectivement à la procathepsine B, la forme mature simple chaîne et mature double chaîne de la cathepsine B. Ces trois formes n'étaient pas sécrétées sous l'action des cytokines puisque qu'elles étaient retrouvées de la même façon dans les sécrétions constitutives (contrôle). Le traitement des cellules transfectées par les cytokines ne paraissait pas non plus pouvoir stimuler la synthèse d'une forme particulière de la cathepsine B (figure 27 A): on retrouvait invariablement dans les lysats cellulaires les 3 formes de 27 kDa (forme la plus nombreuse), 31 kDa et 43 kDa. Ces trois formes de cathepsine B étaient déjà retrouvées dans les cellules synoviales avant la transfection (figure 14 A). Comme pour la cathepsine B, la cathepsine L étaient constitutivement sécrétées par les cellules transfectées sous trois formes de 40 kDa (la plus représentée), 30 kDa et 22 kDa, correspondant sans doute aux formes respectivement immatures, matures simples chaînes et matures doubles chaînes (figure 28 B). Ceci contraste avec l'unique forme de 40 kDa sécrétée par les cellules synoviales avant transfection (figure 15 B). Ces trois formes de la cathepsine L sont aussi celles majoritairement détectées dans les cellules avant et après transfection (figure 15 A et figure 28 A). Cependant, la proportion des formes les moins matures (40 kDa et 20 kDa) apparaissaient accrue après transfection. Les cytokines n'avaient aucune influence sur la synthèse de ces formes intracellulaires.

Aucune modification n'était notée après apport de l'oncogène ras dans les cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T.

4.8. Distribution intracellulaire et localisation ultrastructurale des cathepsines B et L chez les cellules synoviales transfectées.

La plupart des cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T avaient constitutivement une distribution intracellulaire très périphérique de la cathepsine B et de la cathepsine L. La photographie A de la planche 6 présente un exemple typique de cellules transfectées où les cathepsines, en l'occurrence ici la cathepsine B, ont une distribution ubiquitaire. Ces cathepsines B et L étaient constitutivement localisées dans des vésicules claires réparties depuis le noyau jusqu'à la membrane, en association généralement avec des pseudopodes cytoplasmiques témoignant de l'état d'activation des cellules synoviales transfectées. La photographie B de la planche 6 décrit ce phénomène pour le cas de la cathepsine B. Les mêmes caractéristiques étaient également vues pour la cathepsine L.

L'apport de l'oncogène ras dans les cellules synoviales déjà transfectées avec l'antigène grand T ne changeait pas cette localisation constitutivement périphérique des cathepsines B et L.

4.9. Capacité des cellules synoviales transfectées à former des tumeurs chez des souris immunodéficientes.

Puisque les cellules synoviales transfectées croissaient indépendamment d'ancrage, il était intéressant de tester la croissance de ces cellules dans des animaux immunodéficients. Différentes lignées cellulaires transfectées étaient donc injectées en sous cutanée à des souris SCID/Nu, et la formation d'une éventuelle tumeur était contrôlée régulièrement. L'injection des cellules transfectées avec l'antigène grand T associé à l'oncogène T24 H-ras ou avec l'antigène grand T seul donnait lieu généralement au développement rapide, mais transitoire d'une tumeur (tableau 8). Pour mieux comprendre la nature transitoire de ces tumeurs, l'une d'entre elles était étudiée par immunohistochimie cinq jours après l'injection (approximativement le temps mis par la tumeur pour atteindre sa taille maximum) en utilisant un anticorps dirigé contre l'antigène grand T de

SV40 pour identifier les cellules synoviales injectées. Grand T ayant une localisation nucléaire, la coloration spécifique se situait essentiellement au niveau du noyau (planche 7)

L'histologie de cette tumeur transitoire montrait une lésion caractérisée par une nécrose centrale, une infiltration au niveau de cette région centrale nécrosée de polynucléaires identifiés comme étant des neutrophiles (une contre coloration au May-Gründwald-Giemsa confirmait que ces polynucléaires n'étaient pas des éosinophiles), et un manque général de vascularisation de la tumeur. Ces résultats amenaient les remarques suivantes: (1) les cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T de SV40 étaient capables de croître au moins transitoirement dans une souris immunodéficente; (2) la mort des cellules était peut être due à une vascularisation insuffisante; (3) la migration des neutrophiles était stimulée, soit par la présence de médiateurs sécrétés par les cellules synoviales, soit par la mort de ces même cellules; (4) comme l'on pouvait s'y attendre chez la souris SCID/Nu, il n'y avait pas de réponse lymphocytaire significative contre la tumeur.

LEGENDE PLANCHE 4

Marquage anti-fibroblastique chez les cellules synoviales en culture avant et après transfection. Après fixation des cellules synoviales à l'éthanol 80 %, un immunomarquage à la fluorescéine (FITC) était entrepris avec l'anticorps anti fibroblaste humain 5B5 (anti prolyl 4-hydroxylase, enzyme catalysant la formation du collagène). Les cellules étaient ensuite observées au microscope en fluorescence à 260 nm.

PHOTOGRAPHIE A. Les cellules synoviales avant transfection étaient toutes positives pour le marquage anti-fibroblaste humain. Barre=20 μm .

PHOTOGRAPHIE B. Les cellules synoviales après transfection étaient toutes positives pour le marquage anti-fibroblaste humain. Barre=20 μm .

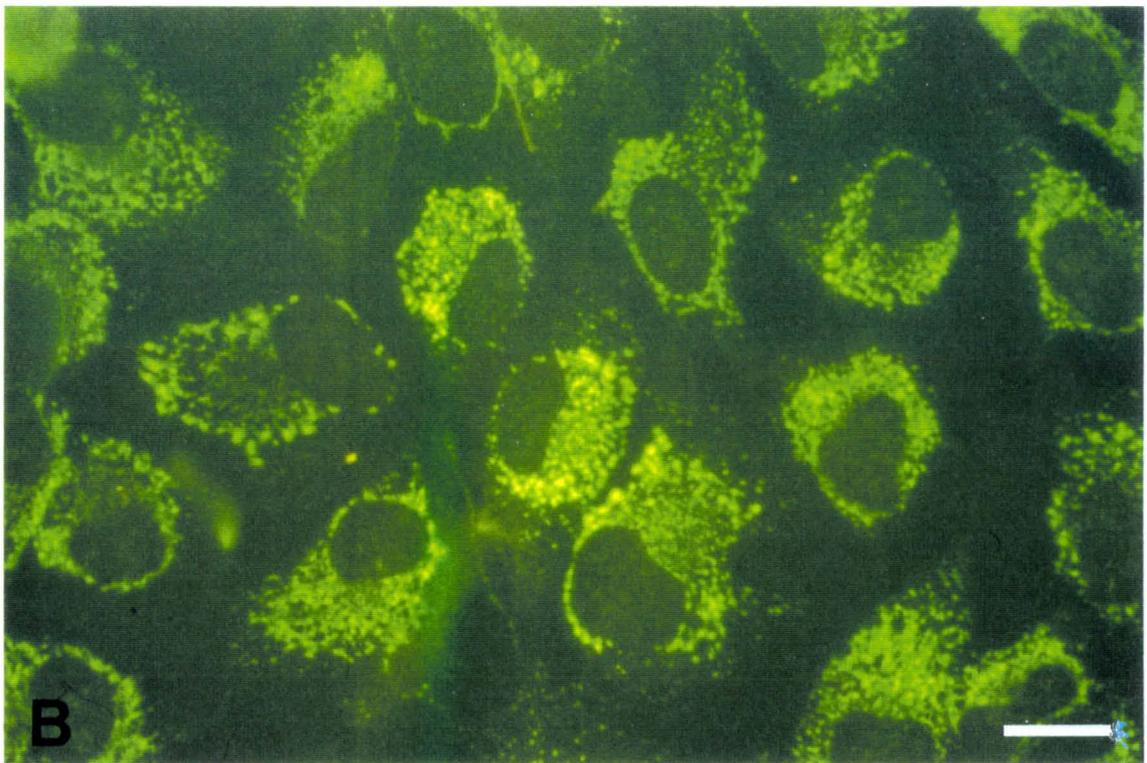
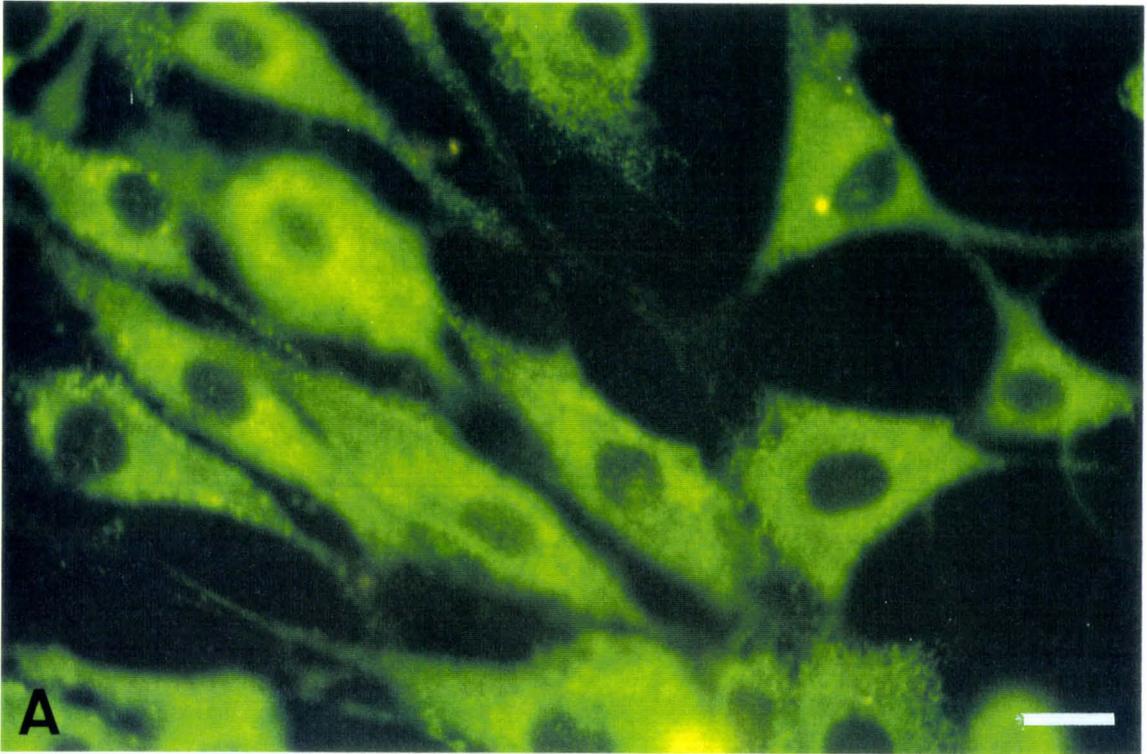


PLANCHE 4

LEGENDE PLANCHE 5

Morphologie des cellules synoviales avant et après transfection avec l'antigène grand T de SV40. Après fixation 5 minutes dans l'acétone, les cellules synoviales étaient colorées à l'hématéine-éosine-safran.

PHOTOGRAPHIE A. Les cellules synoviales avant transfection sont disposées en un réseau lâche, sans zone de superposition. Elles ont une forme allongée et un rapport nucléocytoplasmique faible. Il n'existe pas de noyaux monstrueux, ni de mitose apparente. Barre=20 μm .

PHOTOGRAPHIE B. Les cellules synoviales après transfection avec l'antigène grand T de SV40 montrent des caractères typiques de cellules transformées. Ces cellules sont disposées en amas denses avec des plages de superposition (double flèche). Elles sont arrondies ou ovoïdes, ont un rapport nucléocytoplasmique élevé et des noyaux comportant plusieurs nucléoles. L'index mitotique est élevé (pointe de flèche), mais il n'existe pas de mitoses anormales. Barre=20 μm .

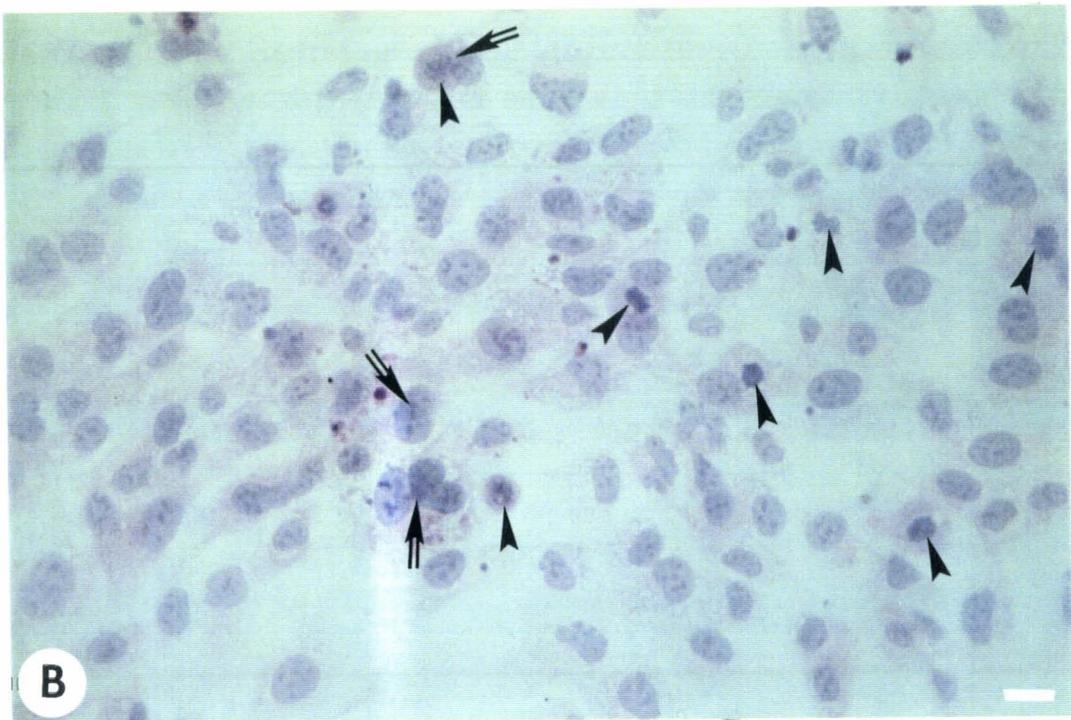
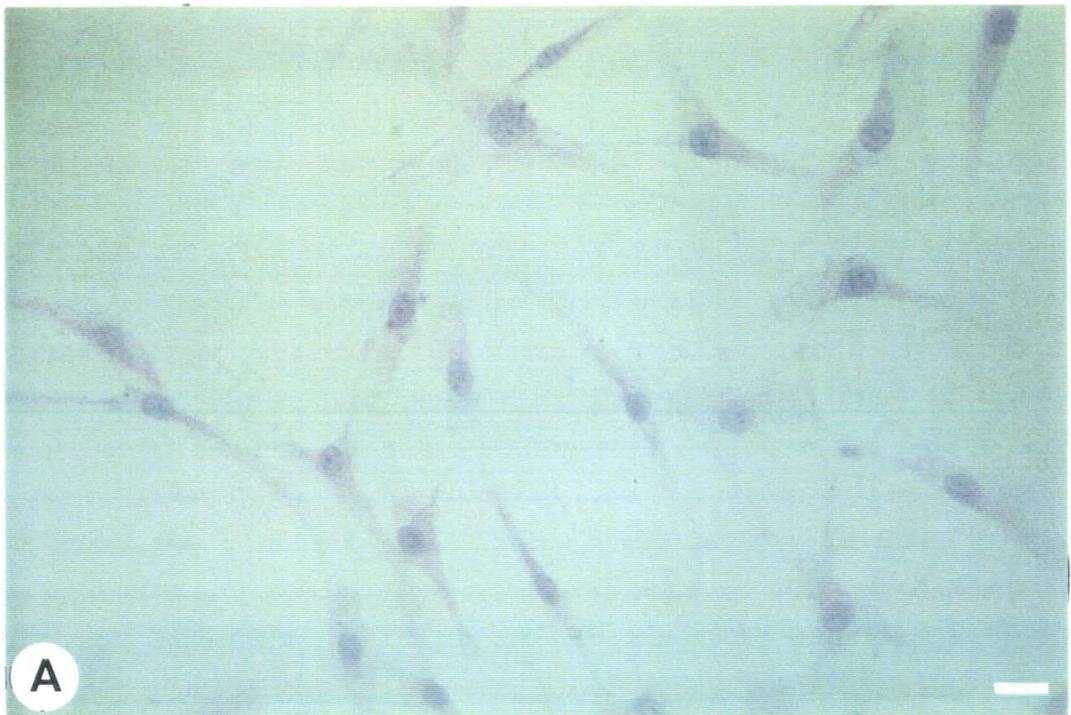


PLANCHE 5

LEGENDE PLANCHE 6

PHOTOGRAPHIE A. Distribution intracellulaire des cathepsines B chez la cellule synoviale de type fibroblastique après transfection par l'antigène grand T. Après 24 heures de culture sans sérum, les cellules synoviales transfectées par Ag T étaient fixées à l'éthanol 80 %. Un immunomarquage à la fluorescéine était alors entrepris contre les cathepsines B et L. Les cellules étaient ensuite observées au microscope en fluorescence à 260 nm. La cellule de la photographie A présente un marquage pour la cathepsine B localisée dans la totalité de la cellule, et notamment au niveau de la membrane (flèche). C'était le cas pour la plus grande partie des cellules transfectées. Cette délocalisation de la cathepsine B vers la membrane se faisait constitutivement chez les cellules synoviales après transfection, contrairement à ces mêmes cellules avant transfection qui ne voyaient dans la majorité des cas une délocalisation de la cathepsine B que sous l'effet du TNF- α , du PDGF, du bFGF ou de l'IFN- γ . N=noyau. Barre=10 μ m.

PHOTOGRAPHIE B. Localisation ultrastructurale des cathepsines B chez les cellules synoviales de type fibroblastique après transfection par l'antigène grand T. Les cellules synoviales transfectées étaient cultivées sans sérum pendant 24 heures. Le culot cellulaire était fixé dans le glutaraldéhyde 1%. A partir de coupes de 70 nm d'épaisseur, un immunomarquage à l'or colloïdal anti-cathepsine B ou L était effectué. L'analyse se faisait ensuite au microscope. Les grains d'argent (points noirs) représentant la cathepsine B se localisaient dans des vésicules claires (V) allant du noyau (N) jusqu'aux pseudopodes cytoplasmiques périphériques (P). La présence de mitochondries (M) dans le cytosol témoignait de la bonne santé de cette cellule. Barre=5 μ m.

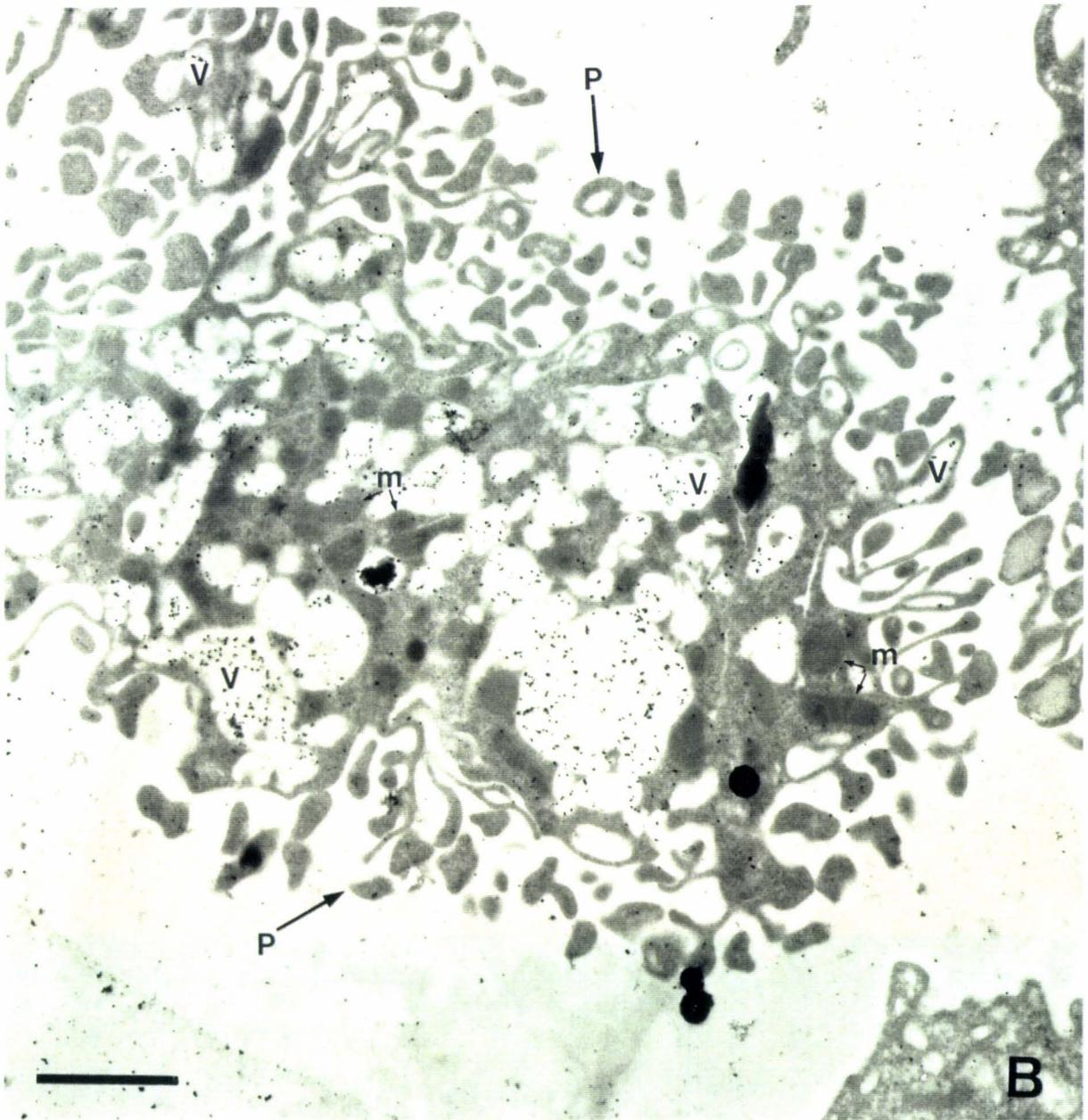
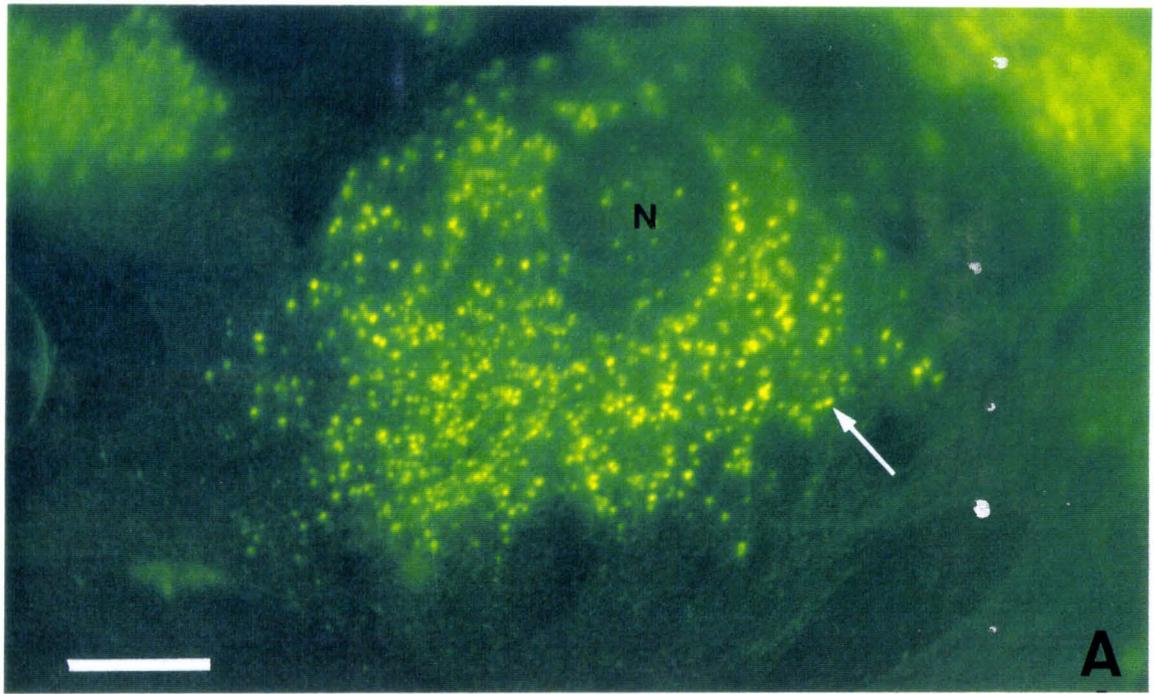


PLANCHE 6

LEGENDE PLANCHE 7.

Formation d'une tumeur transitoire chez une souris immunodéficiente par des cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T de SV40. Une souris SCID/Nu est injectée en sous cutanée avec 5 millions de cellules stablement transfectées avec grand T. Après 5 jours l'animal est sacrifié. La tumeur et le tissu connectif avoisinant sont analysés par immunohistochimie en utilisant un anticorps dirigé contre grand T. La coloration spécifique apparaît en marron, la contre-coloration en bleu.

PHOTOGRAPHIE A. Région à la limite de la tumeur (T = tumeur, pointe de flèche = limite de la tumeur). Les cellules synoviales transfectées ont un noyau large, dense et irrégulier. Une légère vascularisation peut être distinguée. barre=40 μ m

PHOTOGRAPHIE B. Région de nécrose dans le centre de la tumeur, avec mort apparente des cellules synoviales dont les noyaux sont pycnotiques (petite flèche) ou absents (pointe de flèche), et une infiltration massive de neutrophiles (grande flèche). barre=40 μ m

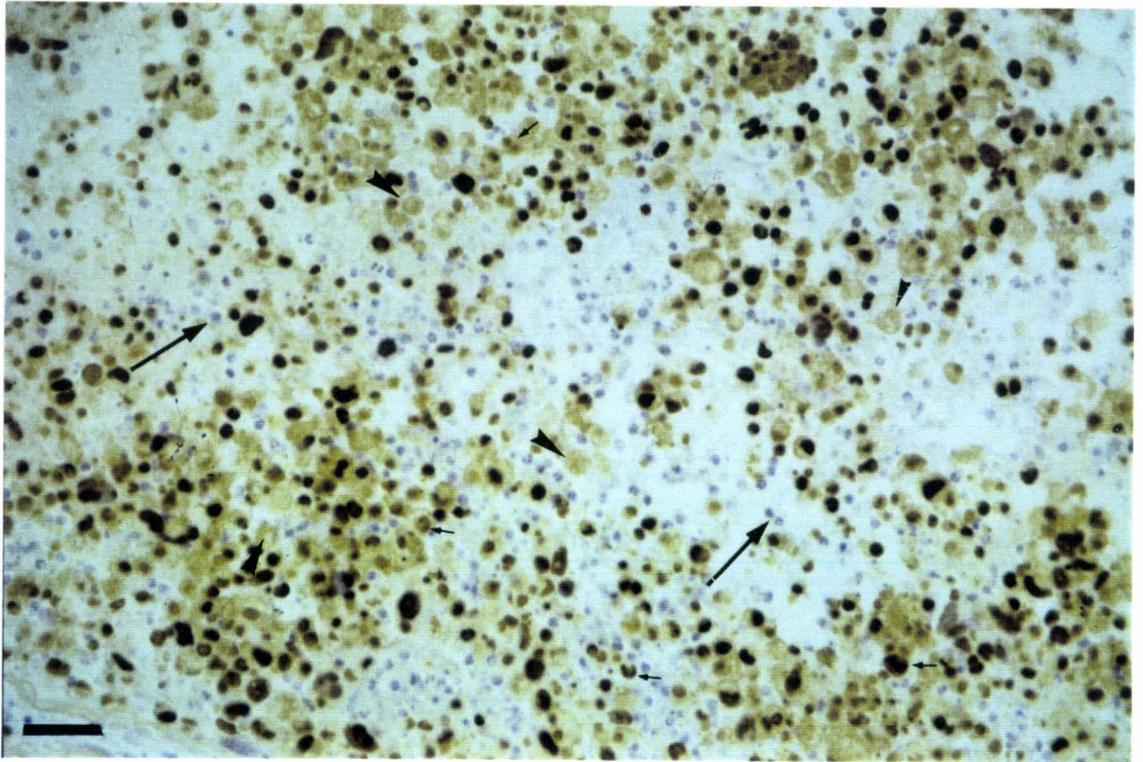
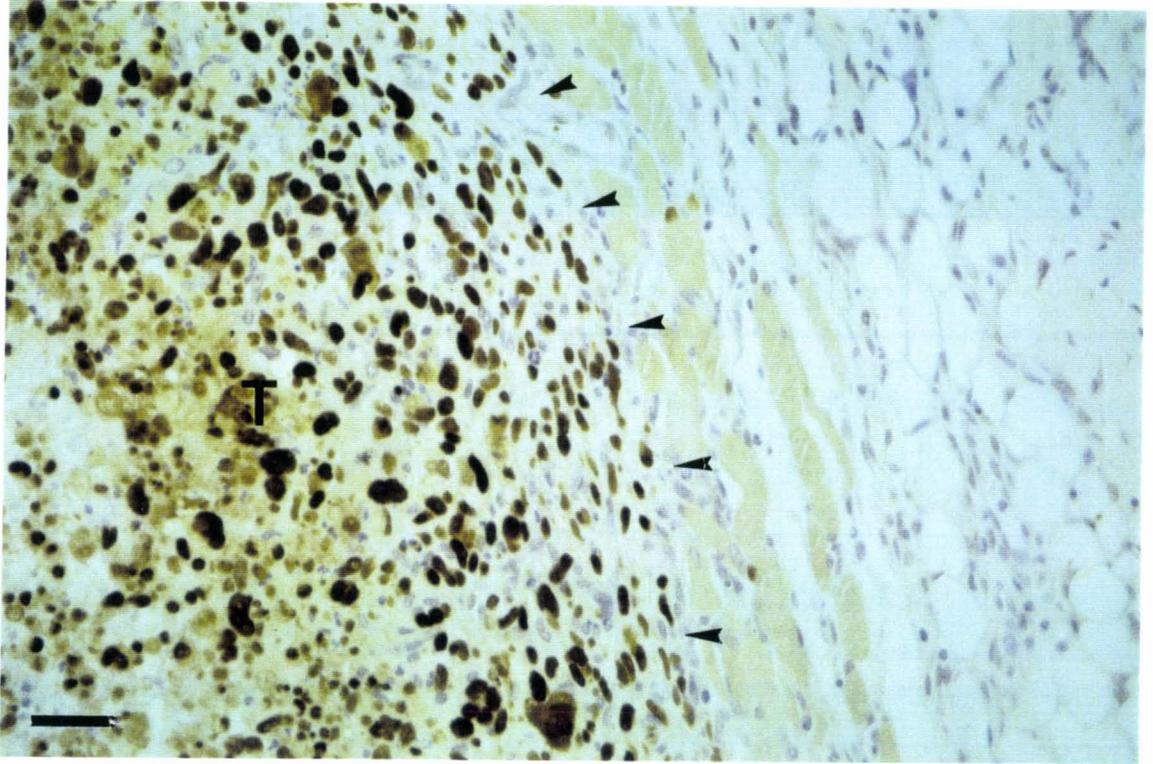


PLANCHE 7

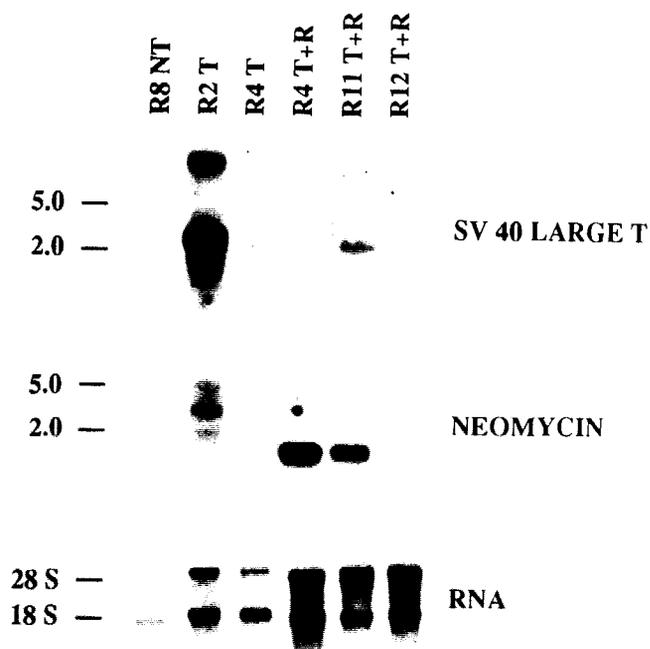


FIGURE 22. TRANSFECTION STABLE DES CELLULES SYNOVIALES DE TYPE FIBROBLASTIQUE. Les cellules synoviales étaient cotransfectées avec pRSV-TAg, un plasmide d'expression contenant l'antigène grand T de SV40, et pSV2-néo, un plasmide contenant le gène néo^r (R2 T, R4 T); soit cotransfectées avec pRSV-TAg et pSV2-néo, suivi d'une transfection avec pHO6T1, un plasmide d'expression contenant l'oncogène T24 H-ras et le gène néo^r (R4 T+R); soit cotransfectées avec pRSV-TAg et pHO6T1 (R11 T+R, R12 T+R); ou non transfectées (R8 NT). Les cellules transfectées étaient ensuite sélectionnées avec la G418, l'ARN était préparé, séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, transféré sur une membrane de nylon, et hybridé à une sonde ADNc radiomarquée du gène de la résistance à la néomycine ou de l'antigène grand T de SV40.

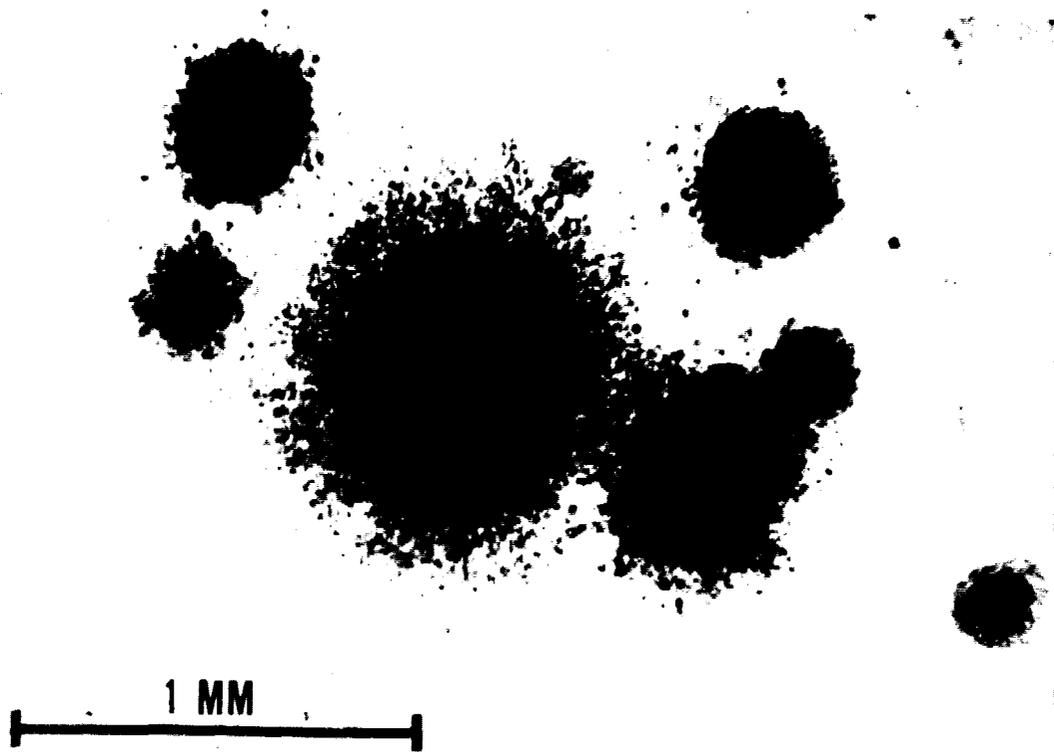


FIGURE 24. CROISSANCE CELLULAIRE SANS ANCRAGE CHEZ LES CELLULES SYNOVIALES TRANSFECTÉES AVEC L'ANTIGÈNE GRAND T DE SV40. Les cellules synoviales transfectées avec grand T étaient cultivées dans de l'IMDM à 1% d'agarose pendant 4 semaines. La lignée cellulaire photographiée ici était typique des lignées positives pour la croissance en agarose décrites dans la table 8.

FIGURE 25. Régulation par les cytokines de l'expression des ARNm des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique transfectées avec l'antigène grand T. Les cellules synoviales après transfection étaient privées de sérum pendant 24 heures, puis traitées par le TNF- α (4 ng/ml), le PDGF (20 ng/ml), l'IL-1 (50 U/ml), le bFGF (10 ng/ml), l'IFN- γ (25 ng/ml) ou laissées sans traitement (contrôle) pendant 24 heures. L'ARN était alors préparé à partir de ces cellules, séparé par électrophorèse en gel d'agarose, puis transféré sur une membrane de nylon. L'ARN était ensuite hybridé à une sonde d'ADNc radiomarquée de la cathepsine B, cathepsine L, collagénase ou β -actine, puis exposé à un film autoradiographique (A) L'intensité de chacune des bandes était quantifiée sur un analyseur d'image (Pharmacia). En parallèle avec la figure A, les figures B et C présentent le niveau d'expression des transcrits respectivement de la cathepsine B et L en pourcentage du contrôle, après correction des résultats en fonction de l'expression de la β -actine.

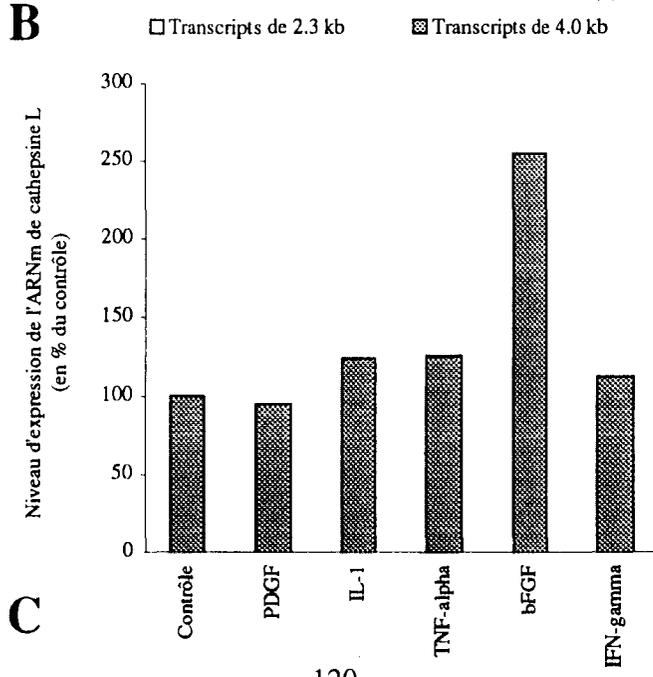
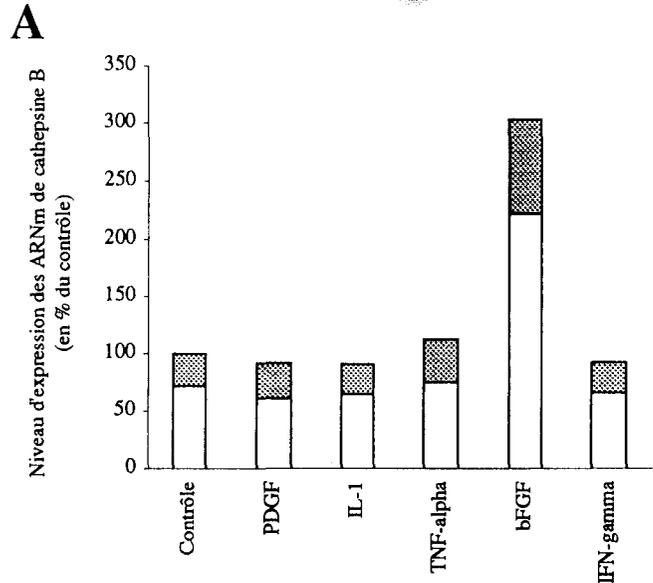
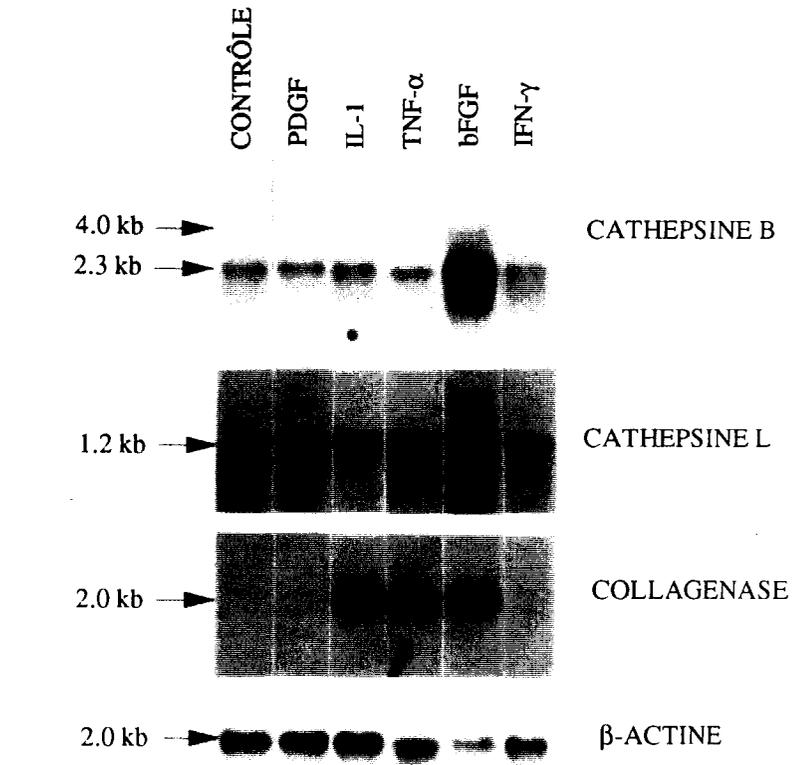
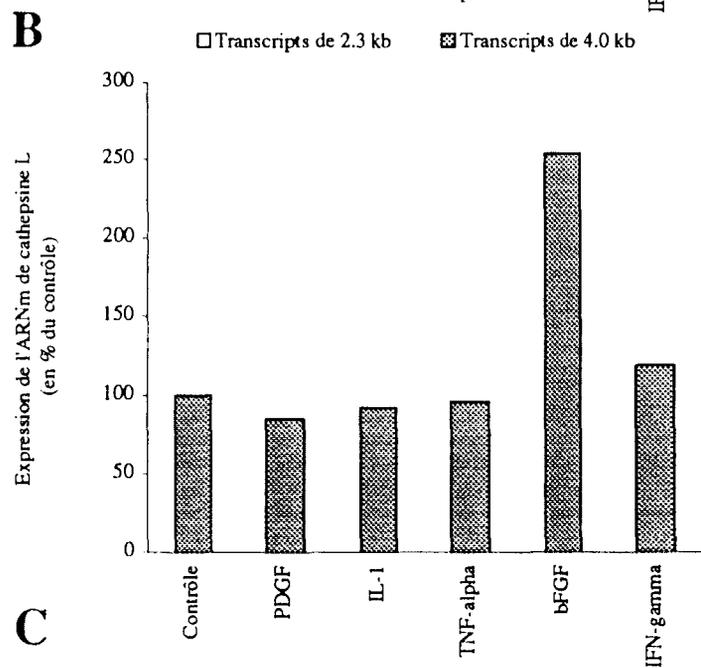
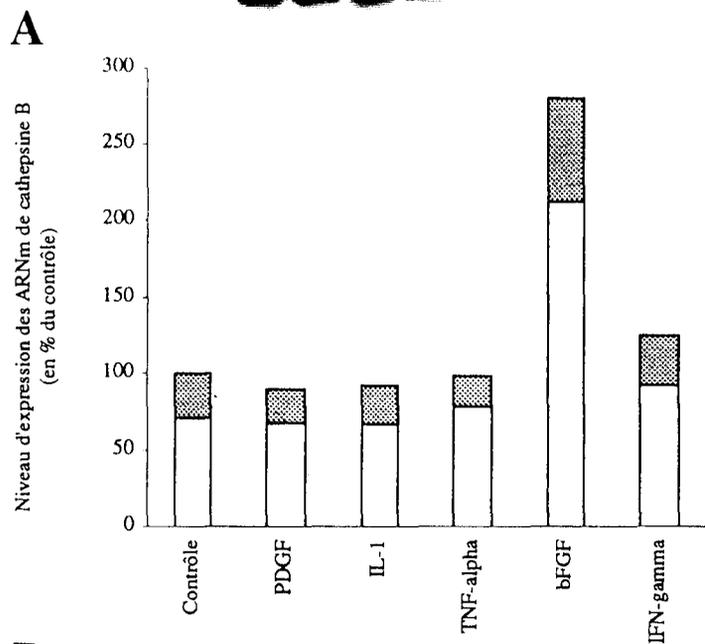
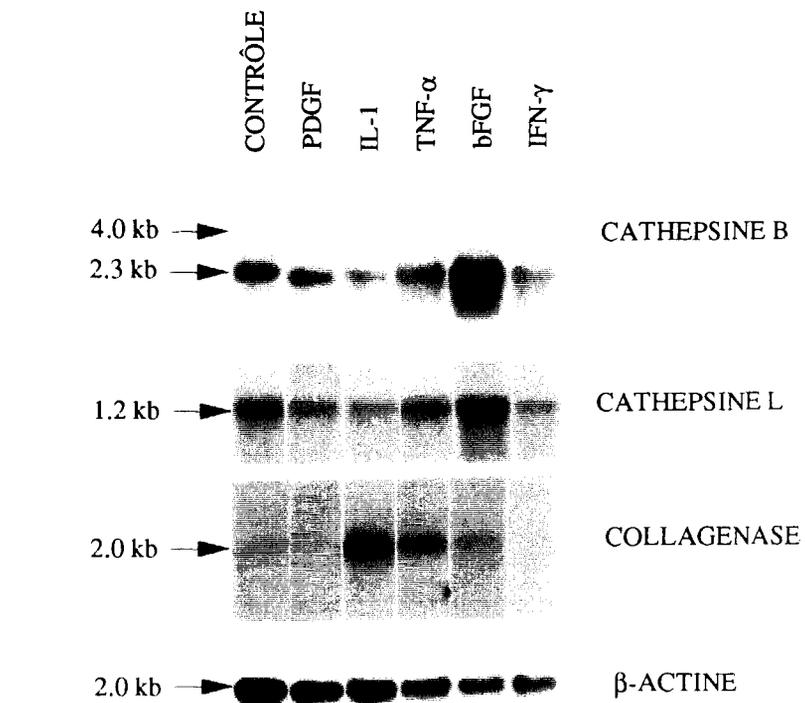


FIGURE 25

FIGURE 26. Régulation par les cytokines de l'expression des ARNm des cathepsines B et L chez les cellules synoviales de type fibroblastique transfectées avec l'antigène grand T et T24 H-ras. Les cellules synoviales après transfection étaient traitées et l'ARNm préparé comme indiqué à la figure 24. L'ARN était hybridé à une sonde d'ADNc radiomarquée de la cathepsine B, cathepsine L, collagénase ou β -actine, puis exposé à un film autoradiographique (A) L'intensité de chacune des bandes était quantifiée sur un analyseur d'image (Pharmacia). En parallèle avec la figure A, les figures B et C présentent le niveau d'expression des transcrits respectivement de la cathepsine B et L en pourcentage du contrôle, après correction des résultats en fonction de l'expression de la β -actine.



C

FIGURE 26

FIGURE 27. Caractérisation par western blot des formes synthétisées et sécrétées de la cathepsine B chez les cellules synoviales de type fibroblastique transfectées par l'antigène grand T. Les cellules synoviales après transfection étaient privées de sérum pendant 24 heures, puis traitées par le TNF- α , PDGF, IL-1, bFGF ou IFN- γ , ou laissées sans traitement. A 24 heures, le surnageant et les cellules étaient récupérées. Les protéines extracellulaires (1 ml de milieu de culture) et intracellulaires (50 μ g de protéines du lysat cellulaire) étaient séparées sur gel d'acrylamide, transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les différentes formes de cathepsine B intracellulaires (A) et extracellulaires (B) étaient détectées avec un anticorps polyclonal dirigé contre les formes matures et immatures de la cathepsine B

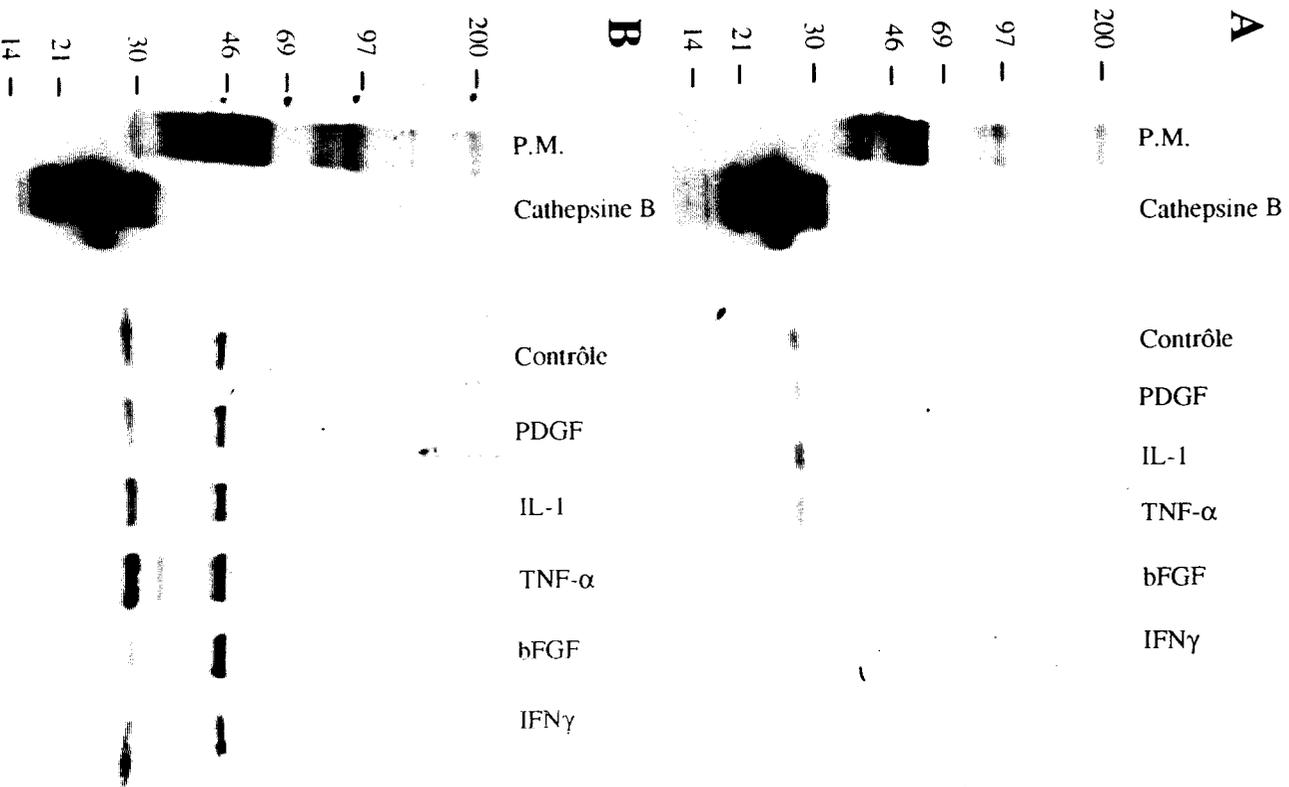


FIGURE 27

FIGURE 28. Caractérisation par western blot des formes synthétisées et sécrétées de la cathepsine L chez les cellules synoviales de type fibroblastique transfectées par l'antigène grand T. Les cellules synoviales après transfection étaient privées de sérum pendant 24 heures, puis traités par le TNF- α , PDGF, IL-1, bFGF ou IFN- γ , ou laissées sans traitement. A 24 heures, le surnageant et les cellules étaient récupérées. Les protéines extracellulaires (1 ml de milieu de culture) et intracellulaires (50 μ g de protéines du lysat cellulaire) étaient séparées sur gel d'acrylamide, transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les différentes formes de cathepsine L intracellulaires (A) et extracellulaires (B) étaient détectées avec un anticorps polyclonal dirigé contre les formes matures et immatures de la cathepsine L .

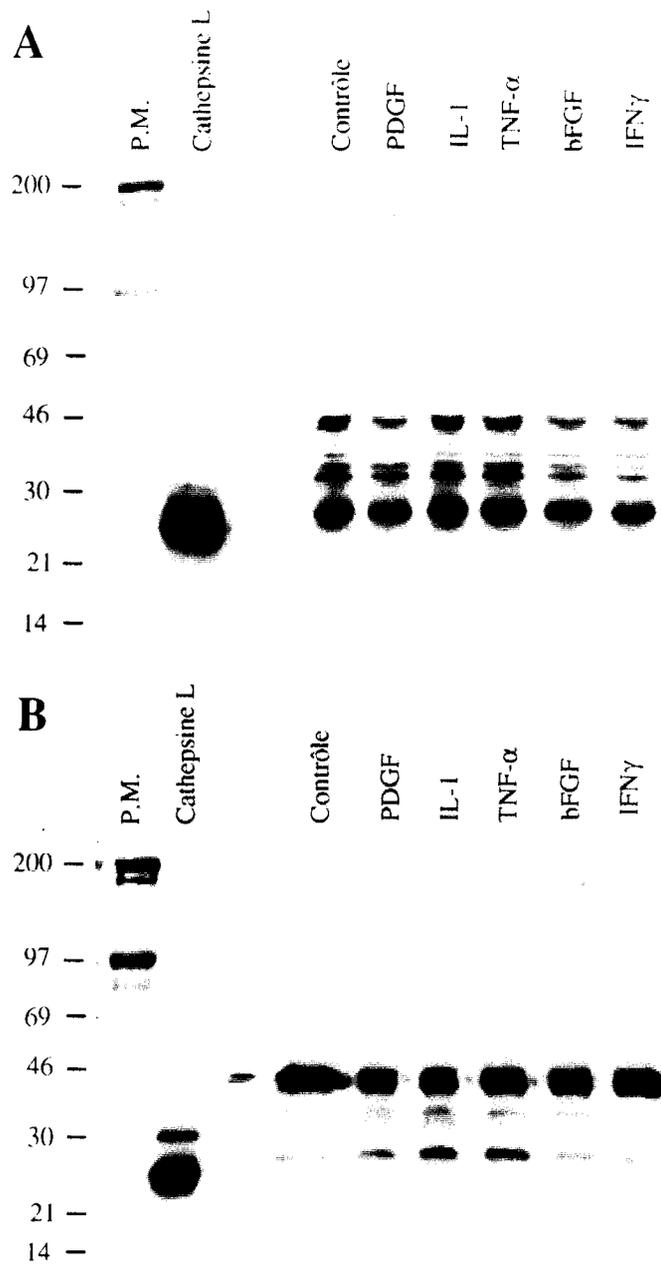


FIGURE 28

5. DISCUSSION

Le pannus de type tumoral qui se forme dans le tissu synovial inflammatoire de malades atteints de PR suggère qu'un processus analogue à la transformation cellulaire néoplasique se produit chez les cellules synoviales de type fibroblastique dans cette maladie. Comme l'ont déjà laissé entendre de précédents travaux, l'expression du phénotype néoplasique chez certaines cellules cancéreuses peut être liée à la présence de mutations au niveau de proto-oncogènes (et/ou anti-oncogènes) souvent complémentaires dans leurs fonctions transformantes (153). De même, l'expression de la collagénase, induite par l'IL-1 (ou le TNF-alpha), et la croissance sans ancrage, induite par le PDGF, deux changements phénotypiques associés à la néoplasie, ont des effets complémentaires sur le phénotype des cellules synoviales (204), suggérant que ces cytokines peuvent stimuler les cellules synoviales à reproduire dans la PR un phénotype similaire à celui de cellules cancéreuses; mais dans ce cas plutôt régulé extérieurement que dû à des mutations génétiques. Pour déterminer la relation existant entre ces signaux externes et la régulation interne de l'expression du phénotype transformé des cellules synoviales, les cellules synoviales de type fibroblastique de cultures primaires étaient transfectées avec des oncogènes complémentaires. Les lignées cellulaires résultantes étaient alors testées quant à l'expression et sécrétion de la collagénase et cathepsines B et L, ainsi que leur capacité à croître in vitro avec et sans ancrage, ou in vivo dans des souris immunodéficientes.

La transfection stable de cellules synoviales primaires humaines avec l'antigène grand T de SV40 produit des lignées cellulaires capables de croître indépendamment de facteurs de croissance et d'ancrage. Ces cellules expriment et sécrètent spontanément les cathepsines B et L, et forment des tumeurs transitoires dans des souris immunodéficientes. L'antigène grand T de SV40 est connu pour ses capacités à immortaliser des fibroblastes primaires ou d'autres cellules, mais aussi, en association avec un oncogène complémentaire comme ras, pour ses capacités à convertir des cellules "normales" en cellules tumorales (205-207). Ces fonctions immortalisantes et

transformantes de l'antigène grand T de SV40 ont été montrées corrélées à deux régions différentes de cette protéine: un site liant la protéine du rétinoblastome (Rb), l'autre la protéine p53. L'inactivation de ces protéines, dites suppressives de tumeur, par liaison à l'antigène grand T apparaît critique à l'acquisition des propriétés immortalisantes et transformantes de grand T (170, 206, 207). Il est donc concevable que le phénotype de type transformé, acquis par les cellules synoviales après transfection avec l'antigène grand T, soit lié à l'inactivation de l'une et/ou l'autre de ces protéines. Un groupe a reporté récemment la microinjection de cellules synoviales avec l'ADN génomique de SV40 (208). Bien qu'une véritable caractérisation de ces cellules microinjectées n'ait pas été faite, il est probable que l'effet de l'ADN viral entier est en grande partie dû à la présence de l'antigène grand T; par conséquent, il est vraisemblable que ces cellules aient des caractéristiques similaires à celles décrites ici chez les mêmes cellules synoviales transfectées avec l'antigène grand T.

L'effet de l'antigène grand T sur les cellules synoviales met en évidence le caractère bien distinct des voies intracellulaires utilisées par l'IL-1 vis à vis du PDGF dans la régulation des cellules synoviales. Comme décrit dans cette étude et par d'autres, le traitement par le PDGF conduit à une croissance cellulaire dépendante et indépendante d'ancrage, alors que le traitement par l'IL-1 mène à une augmentation marquée dans l'expression de la collagénase (25, 82, 150, 204). Ces deux voies sont très probablement distinctes puisque le PDGF ne stimule pas l'expression de la collagénase, et que l'IL-1 ne stimule pas la croissance avec et sans ancrage. L'antigène grand T semble affecter la voie de signaux intracellulaires utilisée par le PDGF, puisque les cellules synoviales transfectées avec grand T deviennent insensibles à ce facteur, alors qu'elles répondent toujours au sérum. D'autre part, la stimulation de l'expression de la collagénase par l'IL-1 n'est pas modifiée par la présence de l'antigène grand T. On sait déjà que la stimulation par AP-1 du TRE (TPA Responsive Element) du promoteur de la collagénase est un intermédiaire important dans l'activation de cette voie (179), l'activité AP-1 étant déterminée par la formation de dimères entre les produits des oncogènes *fos* et *jun*.

A partir de cette étude, il n'est pas possible de définir précisément la voie par laquelle grand T active cet état d'insensibilité au PDGF des cellules synoviales transfectées; cependant l'élévation concomitante du niveau de prolifération spontanée chez les cellules synoviales transfectées, et la

capacité de ces cellules à croître sans ancrage, un phénotype normalement acquis après stimulation par le PDGF, suggère que grand T active des voies intracellulaires similaires à celles activées après stimulation du PDGF. Le fait que l'expression de l'antigène grand T chez ces cellules soit également associée à l'apparition d'une insensibilité à d'autres facteurs de croissance laisse à penser que grand T agit en un point où convergent les différentes voies de signalisation activées par ces facteurs de croissance; éventuellement au niveau des protéine Rb et/ou p53. Le mécanisme d'action précis de p53 et de Rb au niveau de la régulation du cycle cellulaire est encore mal connu, cependant ces deux protéines paraissent agir durant la phase G1 pour empêcher le passage en phase S. Des études ont montrées que la protéine Rb intervenait dans la régulation du cycle cellulaire en se liant au facteur de transcription cellulaire E2F, contrôlant ainsi l'activité transcriptionnelle que E2F peut exercer au niveau de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (169). D'autres études ont montrées que p53, en étant lié par le produit de l'oncogène mdm-2 (murine double minute 2), voyait son activité inhibée (209). D'une manière générale, l'on peut penser que l'antigène viral grand T en se liant aux protéines "suppressives de tumeur" Rb ou p53, empêche leurs activités régulatrices de s'exercer normalement, menant ainsi à l'activation des mêmes voies de signaux utilisées normalement par le PDGF pour promouvoir prolifération et transformation. Le rôle potentiel du gène Rb dans la croissance transformée des cellules synoviales transfectées est de plus suggéré par l'expression anormale de ce gène dans un cas de sarcome synovial (168).

Une autre explication de l'effet de l'antigène grand T sur le phénotype des cellules synoviales est que cette protéine virale stimule chez ces cellules la sécrétion de PDGF, autorisant ainsi une stimulation autocrine. La sécrétion accrue d'une molécule de type PDGF après transformation par différents agents, incluant grand T de SV40, a déjà été reportée (210). Ces deux explications ne s'excluent pas mutuellement.

Il semble nécessaire d'ajouter que d'autres groupes ont rapporté la stimulation de la prolifération cellulaire par l'IL-1, et celle de l'expression de la collagénase par le PDGF, chez des fibroblastes du derme (211, 212). L'existence de telles données fait valoir l'influence du type cellulaire et des conditions de culture sur la nature des résultats. Dans nos essais, la prolifération et l'expression de la collagénase étaient évaluées en absence de sérum et après des temps de culture relativement courts (24 à 48 heures). En effet, on peut penser que des temps de culture plus

conséquents et/ou la présence de sérum compliquent l'interprétation des signaux intracellulaires activés par les cytokines, ceci à cause d'une éventuelle stimulation par des médiateurs secondaires. En fait, on sait déjà que ce type de réactions secondaires existent chez les cellules synoviales par l'intermédiaire de la pGE₂ sécrétée après stimulation de l'IL-1 (204). Manifestement, si ces stimulations secondaires ont une importance physiologique certaine, elles ne facilitent pas l'interprétation des événements intracellulaires.

Les cellules synoviales transfectées avec un gène codant une forme activée de la protéine ras apparaissent très grandes et plates, sans aucun signe de formation in vitro de foyers cellulaires caractéristiques de la transformation par ras dans d'autres types cellulaires. Le gène ras utilisé dans cette étude a été isolé à partir d'une lignée cellulaire (T24) dérivée d'un carcinome humain de la vessie sur la base de sa capacité à transformer morphologiquement des cellules NIH 3T3 (213), une lignée murine immortalisée. Le plasmide employé dans cette étude pour transfecter les cellules synoviales primaires humaines surexprime cette forme activée de ras (T24 H-ras), et a déjà montré dans un cas induire la transformation maligne complète de cellules primaires de rongeurs (200). Chez les cellules humaines, plusieurs groupes utilisant ce plasmide ou d'autres contenant un oncogène ras, ont rapporté des résultats allant de la transformation complète d'une lignée épithéliale des bronches, à aucun effet apparent sur des fibroblastes de l'épiderme du prépuce humain (195, 198, 214). Dans le cas des cellules synoviales humaines, l'absence de réponse à l'oncogène T24 H-ras de la part de cellules primaires pourrait s'expliquer par l'apparition du phénomène de sénescence avant que le phénotype associé normalement à ras puisse s'exprimer.

L'effet potentiel d'une forme activée de ras sur les cellules synoviales est donc testé par co-transfection de T24 H-ras avec l'antigène grand T de SV40. Les cellules synoviales transfectées avec cette combinaison se comportent dans tous les cas de façon identique aux cellules transfectées avec le seul antigène grand T. D'une importance particulière, la transfection de l'oncogène T24 H-ras n'affecte pas la croissance sans ancrage ou le niveau d'expression et de sécrétion des cathepsine B et L chez la cellule synoviale, deux changements phénotypiques associés à la transformation par ras chez d'autres types cellulaires (91, 104, 113, 114, 155). Ces données suggèrent qu'une activité accrue de ras ne peut modifier le phénotype des cellules. Peut être que l'activité ras est naturellement élevée chez les cellules synoviales. Ceci pourrait expliquer la

transformation partielle des cellules synoviales par la seule action de l'antigène grand T de SV40 sans apport d'un oncogène complémentaire, ainsi que le haut niveau constitutif d'expression et de sécrétion des cathepsine B et L chez ces cellules.

Les mécanismes intracellulaires activées lors de la sécrétion des cathepsines B et L par l'antigène grand T semblent différer en partie de ceux activés par les cytokines. Les cytokines comme le TNF- α , le bFGF ou l'IFN- γ induisaient une distribution plus périphérique des cathepsines avec sécrétion de formes précurseurs des cathepsines B et/ou L. L'antigène grand T induisait une distribution plus périphérique avec sécrétion non seulement des formes précurseurs, mais aussi des formes matures des cathepsine B et L, issues du compartiment lysosomal. Les cytokines, selon toutes vraisemblances, agiraient donc seulement sur l'induction de leur synthèse, alors que l'antigène grand T provoquerait la sécrétion des cathepsines également au travers de la délocalisation des lysosomes vers la membrane. La plupart des cathepsines nouvellement synthétisées étant habituellement dirigées vers le compartiment lysosomal (92, 96), la voie de sécrétion par défaut, responsable en grande partie de la sécrétion induite par les cytokines comme le laisse penser notre étude, ne prendrait qu'une part mineure au niveau global des cathepsines sécrétées. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet apparent des cytokines sur la sécrétion des cathepsines B et L chez les cellules synoviales transfectées par grand T. L'association de l'antigène grand T à une sécrétion de formes matures de cathepsine B ou L n'a jamais été reportée. Néanmoins, l'augmentation de la sécrétion de formes matures de la cathepsine B se trouve souvent corrélée à sa distribution au niveau de la membrane plasmique chez des cellules épithéliales et fibroblastiques transformées par l'oncogène ras.(111, 112, 131). Un tel effet transformant de l'antigène grand T serait donc plutôt un effet indirect, permettant par exemple à ras de s'exprimer pleinement comme déjà discuté dans le paragraphe précédent, qu'un effet direct sur les mécanismes affectant le cytosquelette tel que l'acidification du cytoplasme (215).

La capacité des cellules synoviales transfectées avec soit grand T, ou grand T et T24 H-ras, à former des tumeurs transitoires chez des souris SCID/Nu laisse à penser que l'antigène grand T active la ou les même(s) voie(s) intracellulaire(s) que celle(s) activée(s) au niveau du pannus de type tumoral des patients atteints de PR. Le caractère transitoire de cette tumeur peut refléter un manque relatif de vascularisation, soit parce que des facteurs angiogéniques ne sont pas sécrétés

en quantité suffisante par les cellules synoviales, soit du fait du développement trop rapide de la tumeur, ne donnant pas le temps nécessaire à une vascularisation adéquate de s'établir. D'un autre côté, l'activation d'une voie intracellulaire complémentaire peut également être nécessaire aux cellules synoviales pour conserver à long terme cette capacité de croissance de type tumoral. L'infiltration dense de cette tumeur par les neutrophiles est identique à la réaction décrite après l'injection d'une population hétérogène de cellules issues de la digestion fraîche de tissu synovial (216). Nos résultats suggèrent que les cellules synoviales de cette population cellulaire hétérogène sont en grande partie responsables de cette infiltration. Peut être que ces cellules sécrètent d'importants facteurs chimiotactiques telle l'IL-8. Malheureusement, la nature transitoire de cette tumeur n'a pas permis de déterminer si ces cellules synoviales, en relation avec leur croissance invasive, sont capables de reproduire un phénomène caractéristique de la PR: la destruction de l'os et du cartilage articulaire.

Ce modèle d'étude associé à l'expression de l'antigène grand T de SV40 chez les cellules synoviales a ainsi permis d'évaluer les voies de signaux intracellulaires potentiellement activées pour que ces cellules puissent acquérir une des caractéristiques de croissance cellulaire transformée constatée *in vivo* chez ces cellules dans le contexte de la PR, et reproduite *in vitro* sous l'action stimulante du PDGF: la croissance cellulaire sans ancrage. Néanmoins, l'antigène grand T ne permet aux cellules synoviales de croître dans des souris SCID que transitoirement. Ceci tendrait à prouver que l'activation d'une voie intracellulaire complémentaire est nécessaire. Cette voie pourrait éventuellement être celle associée à l'expression d'enzymes protéolytiques, si l'on se réfère à l'importance prise par la croissance cellulaire sans ancrage et la production d'enzymes protéolytiques dans l'expression d'un phénotype néoplasique. Dans cette optique, il serait donc intéressant de co-transfecter l'antigène grand T de SV40 avec le gène codant l'IL-1-alpha ou le TNF-alpha, cytokines dont le rôle apparaît primordial au niveau de la synthèse et la sécrétion d'enzymes protéolytiques telles que la collagénase ou la stromelysine. Dans le même ordre d'idée, si le manque de vascularisation est effectivement le facteur limitant pour le développement stable de la tumeur dans une souris immunodéficiente, la co-transfection de l'antigène grand T de SV40 avec le gène codant le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) associé à un peptide signal (217) pourrait résoudre ce problème. En effet, de par ses qualités angiogéniques, le bFGF devrait

amener la vascularisation qui manquait tant à la tumeur issue de la croissance de cellules synoviales transfectées avec le seul antigène grand T, et ainsi lui retirer son caractère transitoire.

Une exploitation plus complète de ce modèle d'étude est ainsi susceptible de nous fournir de plus amples informations quant aux signaux intracellulaires activés chez les cellules synoviales dans le cadre des lésions articulaires constatées dans la PR.

PUBLICATIONS

R. Lemaire, R.M. Flipo, D. Monté, T. Dupressoir, B. Duquesnoy, J.Y. Cesbron, A. Janin, A. Capron, R. Lafyatis. Synovial fibroblast-like cells transfection with the SV40 large T antigen induces a transformed phenotype and permits transient tumor formation in immunodeficient mice. *J Rheumatology*, 1994, 21, 1409-19

R. Lemaire, R.M. Flipo, D. Monté, T. Dupressoir, B. Duquesnoy, J.Y. Cesbron, A. Janin, A. Capron, R. Lafyatis. Synovial fibroblast-like cells transfection with the SV40 large T antigen induces a transformed phenotype and permits transient tumor formation in immunodeficient mice. *Arthritis Rheum*, 1993, 36, S-128 (57ème congrès Annuel de l'American College of Rheumatology, San Antonio, 7, 11 novembre 1993)

R. Lemaire, R. Lafyatis, R.M. Flipo, D. Monté, T. Dupressoir, B. Duquesnoy, A. Janin, A. Capron. Transfection de cellules synoviales par l'antigène grand T de SV40 et obtention d'une prolifération tumorale transitoire chez la souris immunodéficente. *Rev Rhum Mal Ostéoartic*, 1993, 60, 672

BIBLIOGRAPHIE

1. Short CL: The antiquity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 17:193, 1974
2. Soranus of Ephesus: On acute disease and on chronic disease (translated into latin by Caelius Aurelianus [5th century]. University of Chicago Press 923-929, 1950
3. Mitchell DM, Fries JF: An analysis of the American Rheumatism association criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 25:481, 1982
4. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA Jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324, 1988
5. Gregersen PK, Shen M, Song QL, et al.: Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2642, 1986
6. Ahmed SA, Penhale WJ, Talal N: Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. *Am J Pathol* 121:431, 1985
7. Tosato G, Steinberg AD, Yarchoan R, Heilman CA, Pike SE, De Seau V, Blaese RM: Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 73:1789, 1984
8. Silverman SL, Schumacher HR: Antibodies to Epstein-Barr viral antigens in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 24:1465, 1981
9. Yaq QY, Rickinson AB, Gaston JSH, Epstein MA: Disturbance of Epstein-Barr virus-host balance in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Immunol* 64:302, 1986
10. Depper JM, Zvaifler NJ: Epstein-Barr virus. Its relationship to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 24:755, 1981
11. Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA: The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA-DR4, HLA-DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27:367, 1988

12. Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, et al.: Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4, DRbeta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5104, 1989
13. Cohen BJ, Buckley MM, Clewley JP, Jones VE, Puttick AH, Jacoby RK: Human parvovirus infection in early rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 45:832, 1986
14. Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, et al.: Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-1. *Science* 253:1026, 1991
15. Tsoulfa G, Rook GA, Van-Embden JD, et al.: Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 48:118, 1989
16. Gaston JSH, Life PF, Bailey LC, Bacon PA: In vitro responses to a 65-kilodalton mycobacterial protein by synovial T cells from inflammatory arthritis patients. *J Immunol* 143:2494, 1989
17. Born W, Hall L, Dallas A, et al.: Recognition of a peptide antigen by heat-shock-reactive $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Science* 249:67, 1990
18. Terato K, Hasty KA, Cremer MA, Stuart JM, Townes AS, Kang AH: Collagen-induced arthritis in mice: localization of an arthritogenic determinant to a fragment of the type II collagen molecule. *J Exp Med* 162:637, 1985
19. Klareskog L, Johnell O, Hulth A, Holmdahl R, Rubin K: Reactivity of monoclonal anti-type II collagen antibodies with cartilage and synovial tissue in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 29:1, 1986
20. Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M, Fujii K, Sagara M, Kobayashi S, Goto M, Nishioka K, Miyasaka N, Nagai Y: Specificities of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 29:174, 1990
21. Rowley M, Tait B, Mackay IR, Cunningham T, Phillips B: Significance of antibodies to denatured collagen and their association with HLA-DR4. *Arthritis Rheum* 29:174, 1986
22. Howell DS, Malcolm JM, Pike H: The FII agglutinating factors in the serum of patients with non rheumatic diseases. *Am J Med* 29:662, 1960

23. Koopman WJ, Schrohenloher RE, Carson DA: Dissociation of expression of two rheumatoid factor cross-reactive kL chain idiotypes in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 144:3468, 1990
24. Welch MJ, Fong S, Vaughan J, Carson D: Increased frequency of rheumatoid factor precursor B lymphocytes after immunization of normal adults with tetanus toxoid. *Clin Exp Immunol* 51:299, 1983
25. Butcher EC: Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036, 1991
26. von Adrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC: Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and leukocyte β 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7538-7542, 1991
27. Smith CW, Kishimoto TK, Abbass O, et al.: Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 87:609-618, 1991
28. Abbot SE, Kaul A, Stevens CR, Blake DR: Isolation and culture of synovial microvascular endothelial cells. Characterization and assessment of adhesion molecule expression. *Arthritis Rheum* 35:401-405, 1992
29. Kavanaugh AF, Lightfoot E, Lipsky PE, Oppenheimer-Marks N: Role of CD11/CD18 in adhesion and transendothelial migration of T cells. *J Immunol* 146:4149-4156, 1991
30. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg T, Lipsky PE: Differential utilization of ICAM-1 and VECAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 147:2913-2921, 1991
31. Pitzalis C, Kingsley G, Haskard D, Panayi G: The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. *Eur J Immunol* 18:1397-1404, 1988
32. Lipsky PE, Davis LS, Cush JJ, Oppenheimer-Marks N: The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 11:123-162, 1989
33. Fassbender: Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rel Res* 3:141-155, 1983

34. Gay S, Gay RE: Cellular basis and oncogene expression of rheumatoid joint destruction. *Rheumatol Int* 9:105-113, 1989
35. Buus S, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM: The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 235:1353-1358, 1987
36. Kappler JW, Roehen M, Marrack P: T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49:273-280, 1987
37. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM: Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Ann Rev Immunol* 9:745-772, 1991
38. Harris ED Jr: Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Eng J Med* 322:1277-1289, 1990
39. Firestein GS, Zvaifler NJ: How important are T cell in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 33:768-773, 1990
40. Moreland LW, Stewart T, Gay RE, Huang GQ, McGee N, Gay S: Immunohistologic demonstration of type II collagen in synovial fluid phagocytes of osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 32:1458-1464, 1989
41. O'Sullivan FX, Fassbender HG, Gay S, Koopman WJ: Etiopathogenesis of the rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice: I. The histomorphologic basis of joint destruction. *Arthritis Rheum* 28:529-536, 1985
42. Tanaka A, O'Sullivan FX, Koopman WJ, Gay S: Etiopathogenesis of the rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice: II. Ultrastructural basis of joint destruction. *J Rheumatol* 15:10-16, 1988
43. Koopman WJ, Gay S: The MRL-lpr/lpr mouse. A model for the study of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 75 (Suppl):284-289, 1988
44. Shiozawa S, Tokuhisa T: Contribution of synovial mesenchymal cells to the pathogenesis of Rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 21:267-273, 1992

45. Firestein GS, Xu WD, Townsend K, et al: Cytokines in chronic inflammatory arthritis I. Failure to detect T cell lymphokines (IL-1 and IL-3) and the presence of M-CSF and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 168:1573-1586, 1988
46. Trabant A, Aicher W, Gay RE, Sukhatme VP, Nilson-Hamilton M, Hamilton RT, McGhee JR, Fassbender HG, Gay S: Expression of the collagenolytic and ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/l mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 10:349-361, 1990
47. Trabant A, Gay RE, Fassbender HG, Gay S: Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34:1444-1451, 1991
48. Trabant A, Gay RE, Birkedal-Hansen H, Gay S: Expression of collagenase and potential transcriptional factors in MRL/l mouse arthropathy. *Semin Arthritis Rheum* 21:246-251, 1992
49. Aznavoorian S, Murphy AN: Molecular aspects of tumor cell invasion. *Cancer* 71:1368-1383, 1993
50. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ: Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 96:1631-1638, 1995
51. Trabant A, Gay RE, Gay S: Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 100:861-875, 1992
52. Krane SM, Conca W, Stephenson ML, Amento EP, Goldring MB: Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann. NY. Acad. Sci* 580:340-354, 1990
53. Woolley DE, Crossley MJ, Evanson JM: Collagenase at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 20:1231-1239, 1977
54. Unemori EN, Ferrara N, Kim J, Bauer EA, Amento P: Vascular endothelial growth factor induces collagenase expression in human endothelial cells. *Arthritis Rheum* 34:S116, 1991
55. Gravallesse EM, Darling JH, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH: In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 34:1076-1084, 1991

56. Case JP, Lafyatis R, Remmers EF, Kumkumian GK, Wilder RL: Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium: a transformation-associated metalloproteinase secreted by phenotypically invasive synoviocytes. *Am J Pathol* 135:1055, 1989
57. Okada Y, Takeuchi N, Tomita K, Nakanishi I, Nagase H: Immunolocalization of metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 48:645-653, 1989
58. Matrisian LM, Bowden GT, Krieg P, Furstenberger G, Briand JP, Leroy P, Breathnach R: The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9413, 1986
59. McCachren SS: Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis Rheum* 34:1085-1093, 1991
60. Maciewicz RA, Wotton SF, Etherington DJ, Duance VC: Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Lett* 269:189-193, 1990
61. Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ: Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than cathepsin B. *Biochem J* 266:569-573, 1990
62. Mort JS, Recklies AD, Poole AR: Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis Rheum* 27:509-515, 1984
63. Van Noorden CJF, Smith RE, Rasnick D: Cysteine proteinase activity in arthritic rat knee joints and the effects of a selective systemic inhibitor, Z-Phe-AlaCH₂. *J Rheumatol* 15:1525-1535, 1988
64. Etherington DJ, Taylor MAJ, Henderson B: Elevation of cathepsin L levels in the synovial lining of rabbits with antigen-induced arthritis. *Br J Exp Path* 69:281-289, 1988
65. Kempson GE, Tuke MA, Dingle JT, Barrett AJ, Horsfield PH: The effect of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage. *Biochem Biophys Acta* 428:741-760, 1976
66. Harris ED Jr, Parker HG, Radin EL, Krane SL: Effects of proteolytic enzymes on structural and mechanical properties of cartilage. *Arthritis Rheum* 15:497-503, 1972

67. Miossec P, Dinarello CA, Ziff M: Interleukin-1 lymphocytic chemotactic activity in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum* 29:461-470, 1986
68. Wood DD, Ihrle EJ, Dinarello A, Cohen PL: Isolation of interleukin-1 like factor from human joint effusions. *Arthritis Rheum* 26:975-983, 1983
69. Firestein GS, Tsai V, NJ Zvaifler: Cellular immunity in the joint of patients with rheumatoid arthritis and other forms of chronic synovitis. *Rheum Dis Clin N Am* 13:191-213, 1987
70. Firestein GS, Zvaifler NJ: Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue Interferon suggest that γ -Interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 30:864-871, 1987
71. Sanders KM, Carmack J, Littman BH: Gold sodium thiomalate: effects on macrophage responses to interferon-gamma and production of C2. *Arthritis Rheum* 29:D19 (Abstr.), 1986
72. Hamerman D, Taylor S, Kirschenbaum I, Klagsbrun M, Raines EW, Ross R, Thomas KA: Growth Factors with heparin binding affinity in human synovial fluid. *Proc Soc Exp Biol Med* 186:384-389, 1987
73. Lafyatis R, Thomson N, Remmers E, Flanders K, Roberts, Sporn M, Wilder R: Demonstration of local production of PDGF and TGF-beta by synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:S62 (abstract), 1988
74. Chu CQ, Field M, Allard S, Abney E, Feldmann M, Maini RN: Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. *Br J Rheum* 31:653-661, 1992
75. Qu Z, Huang XN, Ahmadi P, Andresevic J, Planck SR, Hart CE, Rosenbaum JT: Expression of fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Lab Invest* 73:339-346, 1995
76. Dayer JM, Rochemonteix B, Burrus B, Demczuck S, Dinarello CA: Human recombinant interleukin-1 stimulates collagenase and prostaglandin production by human synovial cells. *J Clin Invest* 77:645-648, 1986

77. Frisch SM, Ruley HE: Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J Biol Chem* 262:16300-16304, 1987
78. Huet G, Flipo RM, Colin M, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghe M, Lafyatis R, Duquesnoy B, Degand P: Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by Tumor Necrosis Factor α and interleukin-1. *Arthritis Rheum* 36:772-780, 1993
79. Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS: Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Clin Invest* 86:1790-1798, 1990
80. Dayer JM, Beutler B, Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162:2163-2168, 1985
81. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslari E, Kioussis D, Kollias G: Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10:4025-4031, 1991
82. Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL: Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints: stimulation by exogenous Platelet-Derived Growth Factor and inhibition by Transforming Growth Factor-Beta and retinoids. *J Clin Invest* 83:1267-1276, 1989
83. Remmers EF, Sano H, Lafyatis R, et al.: Production of platelet-derived growth factor B chain mRNA and immunoreactive PDGF-like polypeptide by rheumatoid synovium: co-expression with heparin binding growth factor-1. *J Rheumatol* 18:7-13, 1991
84. Goddard DH, Grossman SL, Williams WV, Weiner DB, Gross JL, Eidsvoog K, Dasch JR: Regulation of synovial cell growth. *Arthritis Rheum* 35:1296-1303, 1992
85. Amento EP, Bahn AK, McCullagh KG, Krane SM: Influences of gamma interferon on synovial fibroblast-like cells. *J Clin Invest* 76:837-848, 1985
86. Lafyatis R, Thompson NL, Remmers EF, et al.: Transforming-growth factor-beta production by synovial tissue from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on

secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol* 143:1142-1148, 1989

87. Bohley P, Seglen PO: Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48:151, 1992

88. Takahashi H, Cease KB, Berzofsky JA: Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *J Immunol* 142:2221-2229, 1989

89. Reyes VE, Lu S, Humphreys RE: Cathepsin B cleavage of I_i from class II MCH α and β -chains. *J Immunol* 146:3877, 1991

90. Chan SJ, Segundo BS, McCormick MB, Steiner DF: Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7721-7725, 1986

91. Joseph L, Lapid S, Sukhamtme VP: The major ras induced protein in NIH3T3 cells is cathepsin L. *Nucl Acid Res* 15:3186, 1987

92. Hanewinkel H, Glössl J, Kresse H: Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell. *J Biol Chem* 262:12351-12355, 1987

93. Achkar C, Gong Q, Frankfater A, Bajkowski AS: Differences in targeting and secretion of cathepsin B BALB/3T3 fibroblasts and Moloney murine sarcoma virus transformed BALB/3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 265:13650-13654, 1990

94. Mach L, Stüwe K, Hagen A, Ballaun C, Glössl J: Proteolytic processing and glycolysation of cathepsin B - The role of the primary structure of the latent precursor and of carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem J* 282:577-582, 1992

95. Gal S, Willingham MC, Gottesman M: Processing and lysosomal localization of a glycoprotein whose secretion is transformation stimulated. *J Cell Biol* 100:535-544, 1985

96. Dong J, Prenc EM, Sahagian GG: Mechanism for selective secretion of a lysosomal protease by transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 264:7377-7383, 1989

97. Moin K, Rozhin J, McKernan TB, Sanders VJ, Fong D, Honn KV, Sloane BF: Enhanced levels of cathepsin B mRNA in murine tumors. *FEBS Lett* 244:61-64, 1989

98. Doherty PJ, Hua L, Liau G, Gal S, Graham E, Sobel M, Gottesman MM: Malignant transformation and tumor promoter treatment increase levels of a transcript for a secreted glycoprotein. *Mol Cell Biol* 5:466-473, 1985
99. Gottesman MM, and Sobel ME: Tumor promoters and Kirsten sarcoma virus increase synthesis of a secreted glycoprotein by regulating levels of translatable mRNA. *Cell* 19:449-455, 1980
100. Chian CP, Nilsen-Hamilton M: Opposite and selective effects of epidermal growth factor and human platelet transforming growth factor-b on the secretion of secreted proteins by murine 3T3 cells and human fibroblasts. *J Biol Chem* 261:10478-10481, 1986
101. Frick KK, Doherty PJ, Gottesman MM, Scher CD: Regulation of the transcript for a lysosomal protein: evidence for a gene program modified by Platelet-Derived Growth Factor. *Mol Cell Biol* 5:2582-2589, 1985
102. Scher CD, Dick RL, Whipple AP, Locatell KL: Identification of a Balb/c-3T3 cell protein modulated by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol* 3:70-81, 1983
103. Gottesman MM: Transformation-dependent secretion of a low molecular weight protein by murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:2767-2771, 1978
104. Kane SE, Gottesman MM: The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 1:127-136, 1990
105. Maciewicz RA, Wardale RJ, Etherington DJ, Paraskeva C: Immunodetection of cathepsins B and L in and secreted from human pre-malignant and malignant colorectal tumour cell lines. *Int J Cancer* 43:478-486, 1989
106. Poole AR, Tilman KJ, Recklies AD, Stocker TAM: Differences in the secretion of the cysteine proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature* 273:545-547, 1980
107. Recklies AD, Tiltman KJ, Stoker TAM, Pool AR: Secretion of proteinases from malignant and non malignant human breast tissue. *Cancer Res* 40:550-556, 1980
108. Recklies AD, Pool AR, Mort JS: A cysteine proteinase secreted from human breast tumors is immunologically related to cathepsin. *Biochem J* 207:1982

109. Mort JS, Leduc M, Recklies A: A latent thiol proteinase from ascitic fluid of patients with neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 662:173-180, 1981
110. Qian F, Bajkowski AS, Steiner DF, Chan SJ, Frankfater A: Expression of five cathepsins in melanomas of varying metastatic potential and normal tissues. *Cancer Res* 49:4870-4875, 1989
111. Sloane BF: Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer Biol* 1:137-152, 1990
112. Sloane BF, Moin K, Krepela E, Rhozin J: Cathepsin B and its endogenous inhibitor: role in tumor malignancy. *Cancer Metas Rev* 9:333-352, 1990
113. Chambers AF, Collela R, Denhardt D, Wilson SM: Increased expression of cathepsin-L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Mol Carcinogen* 5:238-245, 1992
114. Zhang JY, Schultz RM: Fibroblasts transformed by different ras oncogenes show dissimilar patterns protease gene expression and regulation. *Cancer Res* 52:6682-6689, 1992
115. Murnane MJ, Sheahan K, Ozdemirli M, Shuja S: Stage-specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 51:1137-1142, 1991
116. Dayer JM, Krane SM, Russel GG, Robinson DR: Production of collagenase and prostaglandins by isolated synovial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:945-949, 1976
117. Chin JR, Murphy G, Werb Z: Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 260:12367-12376, 1985
118. He C, Wihlelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI: Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2632-2636, 1989
119. Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM: The role of stromelysine in the cartilage destruction that accompagnies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 33:388-396, 1990

120. Etherington DJ, Maciewicz RA, Taylor MAJ, Wardale RJ, Silver IA, Murrills RA, Pugh D: The role of collagen-degrading cysteine proteinases in connective tissue metabolism. Cysteine proteinases and their inhibitors. Ed V. Turk. Berlin: Walter de Gruyter 269-282, 1986
121. Lemaire R, Flipo RM, Monté D, Dupressoir T, Duquesnoy B, Cesbron JY, Janin A, Capron A, Lafyatis R: Synovial fibroblast-like cell transfection with the SV40 large T antigen induces a transformed phenotype and permits transient tumor formation. *J Rheumatol* 21:1409-1419, 1994
122. Peterson GL: Modified procedure for protein assay. *Anal Biochem* 83:346-356, 1977
123. Zerimech F, Huet G, Balduyck M, Degand P: Cysteine proteinase activity in synovial fluids measured with a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 39:1751-1753, 1993
124. Lah T, Kokalj-Kunovar M, Strukelj B, Pungercar J, Barlic-Maganja D, Drolnic-Kosorok M, Kastelic L, Babnick J, Golouh R, Turk V: Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Clin Chem* 39:1751-1753, 1993
125. Church GM, Gilbert W: Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1991-1995, 1984
126. Joseph LJ, Chang LC, Stamenkovich D, Sukhatme: Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. *J Clin Invest* 81:1988
127. Lammeli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
128. Vaessen RTMJ, Kreike J, Groot GSP: Protein transfer to nitrocellulose filters. *FEBS Lett* 124:193-196, 1981
129. Bigg H, Cawston TE: All-trans-retinoic acid inactivates synergistically with basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor to stimulate the production of tissue inhibitor of metalloproteinases from fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 319:74-83, 1995
130. Gong Q, Frankfater A: Alternative splicing of cathepsin B in human tumors produces a novel isoform which can be refolded into an active enzyme in vitro. *FASEB J* 7:A1208, 1993

131. Sloane BF, Moin K, Sameni M, Tait LR, Rozhin J, Ziegler G: Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. *J Cell Sci* 107:373-384, 1994
132. Prencz EM, Dong J, Sahagian GG: Modulation of the transport of a lysosomal enzyme by PDGF. *J Cell Biol* 110:319-326, 1990
133. Hamilton MN, Hamilton RT, Allen WR, Massoglia SL: Stimulation of the release of two glycoproteins from mouse 3T3 cells by growth factors and by agents that increase intralysosomal pH. *Biochem Biophys Res Commun* 101:411-417, 1981
134. Lah TT, Hawley M, Rock KL, Goldberg AL: Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsin B and L in macrophages. *FEBS Lett* 363:85-89, 1995
135. Kowanko IC, Ferrante A: Interferon-gamma increases human neutrophil-mediated cartilage proteoglycan degradation. *Clin Exp Rheum* 10:123-129, 1992
136. Machold KP, Neumann K, Smolen JS: Recombinant human interferon-gamma in the treatment of rheumatoid arthritis: double blind placebo controlled study. *Ann Rheum Dis* 51:1039-1043, 1992
137. Nakajima H, Hiyama Y, Tsukada W, Warabi H, Uchida S, Hirose S: Effects of Interferon gamma on cultured synovial cells from patients with rheumatoid arthritis: inhibition of cell growth, prostaglandin E₂, and collagenase release. *Ann Rheum Dis* 49:512-516, 1990
138. Huet G, Flipo RM, Richet C, Thiebaut C, Demeyer D, Balduyck M, Duquesnoy B, Degand P: Measurement of elastase and cysteine proteinases in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, sero-negative spondylarthropathies, and osteoarthritis. *Clin Chem* 38:1694-1697, 1992
139. Gabriejelcic D, Annan-Prah A, Rodic B, Rozman B, Cotic V, Turk V: Determination of cathepsin B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint diseases. *J Chem Clin Biochem* 28:149-153, 1990
140. Maciewicz RA, Etherington DJ: Enzyme immunoassay for cathepsins B and L in synovial fluids from patients with arthritis. *Biochem Soc Trans* 16:812-813, 1988
141. Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR: Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 145:301-309, 1994

142. Sinha AA, Gleason DF, DeLeon OF, Wilson MJ, Sloane BF: Localization of biotinylated cathepsin B oligonucleotide probe in human prostate including invasive cells and invasive edges by in situ hybridization. *Anat Rec* 235:233-240, 1993
143. Gong Q, Chan SJ, Bajkowski AS, Steiner DF, Frankfater A: Characterization of the cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. *DNA Cell Biol* 12:299-309, 1993
144. Tam SW, Cote-Paulino LR, Peak DA, Sheahan K, Murnane MJ: Human cathepsin B cDNAs: sequence variations in the 3'-untranslated region gene. *Gene* 139:171-176, 1994
145. Berquin IM, Lequn C, Fong D, Sloane BF: Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. *Gene* 159:143-149, 1995
146. Brawerman G: Determinants of messenger RNA stability. *Cell* 48:5-6, 1987
147. Kozak M: Structural features in eukariotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 266:19867-19870, 1991
148. Hepler JE, Van Wyk J, Lund P: Different half-lives of insulin-like growth factor I mRNAs that differ in length of 3' untranslated sequence. *Endocrinology* 127:1550-1552, 1990
149. Kruys V, Wathelet M, Poupart P, Contreras R, Fiers W, Content J, Huez G: The 3' untranslated region of the human interferon β mRNA has an inhibitory effect on translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6030-6034, 1987
150. Remmers EF, Lafyatis R, Case JP, Roberts AB, Sporn MB, Wilder RL: Cytokine and growth regulation of synoviocytes from patient with rheumatoid arthritis and rats with streptococcal cell wall arthritis. *Growth factors* 2:179-188, 1990
151. Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, Flipo RM: Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *British J Rheum*, accepté pour publication, décembre 1996
152. Bishop JM: Molecular themes in oncogenes. *Cell* 64:235-248, 1991
153. Hunter T: Cooperation between oncogenes. *Cell* 64:249-270, 1991

154. Varmus H: In: Weinberg RA: Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor Press, New-York:3-44, 1989
155. Mason RW, Wilcox D, Wilkstrom P, Shaw EN: The identification of active forms of cysteine proteinases in Kirsten-virus-transformed mouse fibroblasts by use of a specific radiolabelled inhibitor. *Biochem J* 257:125-129, 1989
156. Schönthal A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ, Ponta H: Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54:325-344, 1988
157. Stacey DW, Watson T, Kung HF, Curran T: Microinjection of transforming ras protein induces c-fos expression. *Mol Cell Biol* 7:523-527, 1987
158. Matrisian LM, Hogan BLM: Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts. *EMBO J* 4:1435-1440, 1985
159. Edwards DR, Waterhouse P, Holman ML: A growth factor-responsive gene (16C8) in normal mouse fibroblasts homologous to a human collagenase inhibitor with erythroid-potentiating activity: evidence for constitutive and inducible transcripts. *Nucleic Acids Res* 14:8863-8878, 1986
160. Stetler-Stevenson WG, Krutsh HC, Liotta LA: Tissue inhibitor of metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proc Natl Acad USA* 264:17374-17378, 1989
161. Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, et al.: A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP3; A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 267:17321-17326, 1992
162. Khokha R, Waterhouse P, Yagel S, et al.: Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* 243:947-950, 1989
163. Liotta LA, Steeg PS, Stetler Stevenson WG: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64:327-336, 1990
164. Campbell CE, Flenniken AM, Skup D, Williams BRG: Identification of a serum- and phorbol ester-responsive element in the murine tissue inhibitor of metalloproteinase gene. *J Biol Chem* 266:7199-7209, 1991

165. Holt JT, Gopal TV, Moulton AD, Nienhuis AW: Inducible expression of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4794-4798, 1986
166. Goyette M, Petropoulos CJ, Shank PR, Fausto N: Expression of a cellular oncogene during liver regeneration. *Science* 219:510-512, 1983
167. Barbacid M: ras genes. *Ann Rev Biochem* 56:779-827, 1987
168. Mendoza AE, Shew J, Lee EY, Brookstein R, Lee W: A case of synovial sarcoma with abnormal expression of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Hum Pathol* 19:487-489, 1988
169. Nevins JR: E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258:424-429, 1992
170. Resnick-Silverman L, Pang Z, Li G, Jha KK, Ozer HL: Retinoblastoma protein and simian virus 40-dependent immortalization of normal human diploid fibroblasts. *J Virol* 65:2845-2852, 1991
171. Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S: Spontaneous expression of c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int* 12:53-59, 1992
172. Aicher WK, Gay RE, Stransky G, Trabandt A, Bridges SL Jr, Schroeder HW, Koopman WJ, Siebenlist U, Gay S: Detection of Z-225 message in a c-DNA library and synovial lining cells of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum* 34:S44, 1991
173. Wright JJ, Gunter KC, Mitsuya H, Irving SG, Kelly K, Siebenlist U: Expression of a zinc finger gene in HTLV-1- and HTLV-II-transformed cells. *Science* 248:588-591, 1990
174. Fujii M, Sassone-Corsi P, Verma IM: C-fos promoter trends-activation by the tax 1 protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8526-8530, 1988
175. Stransky G, Moreland LW, Gay RE, Gay S: Virus-like particles (VLP) in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum* 33 (S):143, 1990

176. Stransky G, Aicher WK, Moreland LW, Gay RE, Gay S: Virus-like particles in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Brit J Rheumatol* 32:1044-1048, 1993
177. Bollag G, McCormick: Regulators and effectors of ras protein. *Annu Rev Cell Biol* 7:601, 1991
178. Remmers EF, Thompson R, Lafyatis R, Flanders K, Yocum D, Roberts A, Sporn MB, Wilder RL: Regulation of rheumatoid synoviocyte proliferation by PDGF, TGF-beta, EGF, IL-1 and TNF-alpha. *J Clin Invest* 83:1267, 1988
179. Lafyatis R, Kim SJ, Angel P, Roberts AB, Sporn MB,, Karin M, Wilder RL: Interleukin-1 stimulates and all trans-Retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1 binding site. *Mol Endo* 4:973-980, 1990
180. Case JP, Lafyatis R, Kumkumian GK, Remmers EF, Wilder RL: IL-1 regulation of transin/stromelysin transcription in rheumatoid synovial fibroblasts appears to involve two antagonistic transduction pathways, an inhibitory, prostaglandin-dependent pathway mediated by cAMP, and a stimulatory, protein kinase c-dependent pathway. *J Immunol* 145:3755-3761, 1990
181. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M: Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis growth factor-alpha. *Nature* 337:661-663, 1989
182. Verma IM, Sassone-Corsi: Proto-oncogene fos: complex but versatile regulation. *Cell* 51:513-514, 1987
183. Jamal S, Ziff E: Transactivation of c-fos and β -actin genes by raf as a step in early response to transmembrane signals. *Nature* 344:463-466, 1990
184. Cook JC, Mc Cormick: Inhibition of cAMP of ras-dependent activation of raf. *Science* 262:1069-1072, 1993
185. Harris ED: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, eds. *Textbook of rheumatology*. Philadelphia: WB Saunders 886-915, 1985
186. Firestein GS, Alvaro-Garcia JM, Maki R: Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 144:3347-3353, 1990

187. Xu WD, Firestein GS, Taetle R, Kaushansky K, Zvaifler NJ: Cytokines in chronic inflammatory arthritis II. GM-CSF in rheumatoid synovial effusions. *J Clin Invest* 83:876-882, 1989
188. Bucala R, Richtilin C, Winchester R, Cerami A.: Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J Exp Med* 173:569-574, 1991
189. Mourad W, Mehindate K, Schall TM, McColl SR: Engagement of major Histocompatibility complex class II molecules by superantigen induces inflammatory cytokine gene expression in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Exp Med* 175:613-706, 1992
190. Goto M, Sasano M, Yamanaka H, Miyasaka N, Kamatani, Inoue K, Nishioka K, Miyamoto T: Spontaneous production of an interleukine-1-factor by cloned rheumatoid synovial cells in long-term culture. *J Clin Invest* 80:786-796, 1987
191. Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldman M: Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis : prolonged production of IL-1 α . *Clin Exp Immunol* 73:449-455, 1988
192. Land H, Parada LF, Weinberg RA: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304:596-602, 1983
193. Zhu J, Abate M, Rice PW, Cole CN: The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *J Virol* 65:6872-6880, 1991
194. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW: Reversible cellular senescence : implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9:3088-3092, 1989
195. Sager R, Tanaka K, Lau CC, Ebina Y, Anisowicz A: Resistance of human cells to tumorigenesis induced by cloned transforming genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:7601-7605, 1983
196. Hurlin PJ, Maher VM, McCormick JJ: Malignant transformation of human fibroblasts caused by expression of a transfected T24 HRAS oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:187-191, 1989

197. Wilson DM, Yang D, Dillberger JE, Dietrich S, Maher VM: Malignant transformation of human fibroblasts by a transfected N-ras oncogene. *Cancer Res* 50:5587-5593, 1990
198. Kinsella AR, Fiszler-Maliszewska L, Mitchell ELD, Guo Y, Fox M, Scott D: Introduction of the activated N-ras oncogene into human fibroblasts by retroviral vector induces morphological transformation and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 11:1803-1809, 1990
199. Tubo RA, Rheinwald JG: Normal human mesothelial cells and fibroblasts transfected with the EJras oncogene become EGF-independent, but are not malignantly transformed. *Oncogene Res* 1:407-421, 1987
200. Spandidos DA, Wilkie NM: Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310:469-475, 1984
201. Deppert W, Gurney EG, Harrison RO: Monoclonal antibodies against simian virus 40 tumor antigens : analysis of antigenic binding sites, using adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid viruses. *J Virol* 37:478-482, 1981
202. Burmester GR, Dimitriu-Bona A, Waters SJ, Winchester RJ: Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages and fibroblasts. *Scand J Immunol* 17:69-82, 1983
203. Yocum DE, Lafyatis R, Remmers EF, Schumacher HR, Wilder RL: Hyperplastic synoviocytes from rats with streptococcal cell wall-induced arthritis exhibit a transformed phenotype that is thymic-dependent and retinoid inhibitable. *Am J Pathol* 132:38-48, 1988
204. Kumkumian GK, Lafyatis R, Remmers EF, Case JP, Kim SJ, Wilder RL: Platelet-Growth Factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 143:833-837, 1989
205. Hirakawa T, Ruley HE: Rescue of cells from ras oncogene-induced growth arrest by a second, complementing oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1519-1523, 1988
206. Rhim JS, Jay G, Arnstein P, Price FM, Stanford KK, Aaronson SA: Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by AD-12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses. *Science* 227:1250-1252, 1985
207. Wynford-Thomas D, Bond JA, Wyllie FS, et al: Conditional immortalization of human thyroid epithelial cells : a tool for analysis of oncogene action. *Mol Cell Biol* 10:5365-5377, 1990

208. Goto M, Okamoto M, Sasano M, et al: Functional characterization of SV 40-transformed adherent synovial cells from rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 86:387-392, 1991
209. Momand M, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ: The mdm-2-oncogene products form a complex with the p53 proteins inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245, 1992
210. Bowen-Pope DF, Vogel A, Ross R: Production of platelet derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2396-2400, 1984
211. Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF: Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4132-4136, 1985
212. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 128:2177-2182, 1982
213. Goldfarb M, Shimizu K, Perucho M, Wigler M: Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from the T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 296:404-409, 1982
214. Yoakum GH, Lechner JF, Gabrielson EW, et al: Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. *Science* 227:1174-1179, 1985
215. Heuser J: Changes in lysosomes shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J Cell Biol* 108:855-864, 1989
216. Brinckerhoff CE, Harris ED: Survival of rheumatoid synovium implanted into nude mice. *Am J Pathol* 103:411-418, 1981
217. Rogelj S, Weinberg RA, Fanning P, Klagsburn M: Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells. *Nature* 331:173-175, 1988

ANNEXE

Synovial Fibroblast-Like Cell Transfection with the SV40 Large T Antigen Induces a Transformed Phenotype and Permits Transient Tumor Formation in Immunodeficient Mice

RAPHAËL LEMAIRE, RENÉ-MARC FLIPO, DIDIER MONTÉ, THIERRY DUPRESSOIR, BERNARD DUQUESNOY, JEAN-YVES CESBRON, ANNE JANIN, ANDRÉ CAPRON, and ROBERT LAFYATIS

ABSTRACT. Objective. To understand the intracellular signals leading to transformed-like growth of synovial fibroblast-like cells from patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods. Cell lines stably transfected with one or both of 2 complementary oncogenes, the SV40 large T antigen and the ras oncogene, were studied for phenotypic changes.

Results. Synovial fibroblast-like cells stably transfected with the SV40 large T antigen, but not the ras oncogene, showed high levels of growth factor independent proliferation, grew under anchorage independent conditions, expressed cathepsin L mRNA, and formed transient tumors in immunodeficient mice. Synovial fibroblast-like cells stably transfected with both oncogenes appeared phenotypically similar to synovial fibroblast-like cells transfected with the large T antigen alone.

Conclusion. The SV40 large T antigen confers a phenotype on synovial fibroblast-like cells similar to that stimulated by growth factors, suggesting that it stimulates the same intracellular signalling pathway leading to cytokine induced, transformed synovial fibroblast-like cell growth. When injected into immunodeficient mice these transfected cells formed tumors characterized by rapid, transient growth, central necrosis, and neutrophil infiltration. (*J Rheumatol* 1994;21:1409-19)

Key Indexing Terms:

RHEUMATOID ARTHRITIS
SV40 LARGE T ANTIGEN

SYNOVIUM
CYTOKINES
PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR

In rheumatoid arthritis (RA) inflammation of the synovial tissue leads to a change in the phenotype of synovial fibroblast-like cells from relatively static connective tissue cells into cells critically involved in several aspects of rheumatoid pathophysiology¹. These phenotypic changes result in 2 general types of effects on synovial pathophysiology. First, synovial fibroblast-like cells are generally regarded as the final mediator of important aspects of joint destruction in this disease. They secrete collagenase, stromelysin, and other proteolytic enzymes that are important in degradation of cartilage²⁻⁶. They may also mediate juxtaarticular

bone reabsorption associated with the expression of an invasive or transformed phenotype⁷. Second, synovial fibroblast-like cells are likely involved in the development of the milieu responsible for migration and maturation of immune cells in the synovial tissue by secretion of various cytokines including macrophage colony stimulating factor (CSF), granulocyte macrophage CSF, interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-8, and transforming growth factor- β (TGF- β)⁷⁻¹⁴. The secretion of these and possibly other cytokines by synovial fibroblast-like cells is likely an important factor in the infiltration and regulation of mononuclear cells in rheumatoid synovial tissue.

Cytokines, including both interleukins and growth factors, have been shown in several studies to stimulate *in vitro* several features of the pathologic synovial fibroblasts-like cell phenotype expressed in rheumatoid tissue *in vivo*. IL-1 has received the greatest attention because it stimulates collagenase and stromelysin gene expression and secretion, as well as prostaglandin E₂ (PGE₂) secretion^{15,16}. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) has similar *in vitro* effects¹⁷ and has recently been shown to cause arthritis when overexpressed in transgenic mice¹⁸. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates both anchorage dependent and independent growth of synovial cells¹⁹. This latter pattern of growth is strongly associated with transformed cell growth, and some evidence suggests that PDGF or a closely related factor is at least partly responsible for the tumor-like growth of rheumatoid synovial tissue²⁰. TGF- β has the opposite effect on synovial cell

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM U167, CNRS U624 and Unité d'Oncologie Moléculaire, CNRS URA 1160, Institut Pasteur de Lille; and Service de Rhumatologie and Service d'Anatomo-pathologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, Lille, France.

Supported by the Association de Recherche sur la Polyarthrite rhumatoïde (ARP) and the Commission mixte de recherche hospitalo-universitaire (CHRU, Lille).

R. Lemaire, MSc (biol), Graduate Student; R-M. Flipo, MD, Staff Physician, CHU Lille; D. Monté, PhD; T. Dupressoir, PhD, Researcher; B. Duquesnoy, MD, Professor of Rheumatology; J-Y. Cesbron, MD, University Lecturer, Staff Physician; A. Janin, MD, Associate Professor of Pathology; A. Capron, MD, Professor of Immunology; R. Lafyatis, MD, Visiting Professor, Institut Pasteur, currently, Division of Rheumatology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA.

Address reprint requests to Dr. R. Lafyatis, Division of Rheumatology, University of North Carolina, CB 7280, 932 Faculty Laboratory Office Building, Chapel Hill, NC 27599-7280.

Submitted July 8, 1993 revision accepted January 24, 1994.

phenotype in that it both inhibits collagenase gene expression stimulated by IL-1 and partially inhibits anchorage independent synovial cell growth^{7,19}. Finally interferon- γ has been shown to stimulate MHC class II expression on synovial cells²¹, and stimulation of the MHC class II molecule leads to cytokine expression¹².

We have begun to study the intracellular events associated with these cytokine induced changes of SF cell phenotype. Our method to try to understand these events was to transfect genes previously shown to induce transformed growth in other cells (i.e., oncogenes) into synovial cells and to study the phenotypic changes associated with the expression of these oncogenes. Cellular transformation generally requires the presence of at least 2 oncogenes, and therefore we have studied 2 oncogenes that have been shown to complement each other in cellular transformation, a "nuclear" oncogene, the SV40 large T antigen, and a "cytoplasmic" oncogene, the ras oncogene^{22,23}. The effect of each of these oncogenes is dependent on the cell type studied; however, in general large T causes immortalization and occasionally transformation of primary rodent cells and an extended life span of primary human cells²⁴⁻²⁶, whereas ras generally causes cell lines or immortalized cells to form foci or grow under anchorage independent conditions, but does not generally immortalize or change the life span of primary cells²⁷⁻³⁰. Both of these effects are likely important in the stable oncogenic transformation of a normal cell into a tumor cell, and as we have suggested above, might be mimicked in synovial fibroblast-like cells under the influence of cytokines such as PDGF and IL-1 in patients with RA. Further, the stable induction of this transformed phenotype in synovial cells might permit a correlation of the invasive growth of synovial fibroblast-like cells with the destructive features of these cells in patients with RA. Specifically, stably transfected cells can be grown in immunodeficient animals to assess the effect of specific oncogenes on both the growth potential of these cells and also the *in vivo* potential of the cells to destroy bone and cartilage as occurs in patients with RA.

We show that transfection of synovial fibroblast-like cells with the SV40 large T antigen leads to growth factor independent proliferation, anchorage independent cell growth, and transient tumor formation in immunodeficient mice. Transfection with the ras oncogene did not transform synovial fibroblast-like cells, and transfection of ras into large T transformed cells had no apparent effect on synovial fibroblast-like cell phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Recombinant IL-1 α was obtained from Hoffmann-LaRoche (Nutley, NJ). PDGF was purchased from Genzyme (Cambridge, MA). TGF- β was kindly provided by Dr. M. Sporn, and basic fibroblast growth factor (FGF) was kindly provided by Dr. Boilly.

Cell culture. Synovial tissues from patients with RA or osteoarthritis (OA) were obtained at the time of elective joint surgery. Specimens were ob-

tained from patients receiving a range of different therapies for RA; although not studied systematically, there were no qualitative differences between cell lines established from various patients in any of the variables studied. Synovial fibroblast-like cells were cultured as described¹⁹. Briefly, tissue was minced finely and then placed in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) and 4 mg/ml collagenase (type III, Worthington, Freehold, NJ) for 4-6 h. Released cells and digested tissue fragments were pelleted and resuspended in complete medium (IMDM and 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 50 units/ml, and streptomycin 50 mg/ml). Cells were grown in a humidified incubator at 37°C in 5% CO₂ and passaged 1:3 until use in experiments, generally at passage 4-5.

Plasmids and DNA transfection. Three plasmids were used for the transfection experiments: the plasmid pHO6T1³¹, containing the T24 H-ras oncogene and a neomycin resistance gene (neo) under the regulation of the SV40 and MoMSV promoters (kindly supplied by D.A. Spandidos); the plasmid pRSVTA_g, containing the SV40 large T antigen under the regulation of the Rous sarcoma virus LTR (kindly provided by J. Brady); and the plasmid pSV2neo, containing the neo gene under regulation of the SV40 promoter.

Cells to be transfected were passaged into 25 cm² culture flasks at a density of 2×10^5 cells/flask and transfected 48 h later using a lipofection technique. For lipofection, 30 μ l DOTAP (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) was diluted to 100 μ l with Hank's balanced salt solution (HBS) (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4) and mixed with a solution of the DNA to be transfected diluted to 100 μ l with HBS. Transfected DNA consisted of either 5 μ g pRSVTA_g cotransfected with 1 μ g pSV2neo, 5 μ g pHO6T1, or 5 μ g pRSVTA_g cotransfected with 1 μ g pHO6T1. After mixing the 2 solutions of DOTAP and DNA, the mixture was left at room temperature for 10 min, and then transferred to the cultured cell medium, which was changed to OPTIMEM (GIBCO/BRL, Cergy Pontoise, France) (without serum) during the room temperature incubation of the transfection mixture. The cells were exposed to the transfection mixture for 4-6 h, the medium changed to complete media containing 20% serum for 48-72 h, and then stably transfected cells containing the neo gene selected using G418. The concentration of G418 needed to kill all nontransfected cells was determined for each culture of primary cells, but in general was between 200-400 μ g/ml. Selection was carried out over 7-10 days, followed by expansion of the surviving cells.

PCR for detection of ras transfected cells. To prepare crude DNA, adherent cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), lysed in lysis buffer (40 mM NaCl, 10 mM Tris - pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml gelatin, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20 and 24 μ g/ml proteinase K), incubated at 56°C for 1 h, and heated to 95°C for 10 min. Polymerase chain reaction (PCR) was performed according to the standard Perkin-Elmer-Cetus protocol using 2 primers in the pHO6T1 plasmid: the 5' primer sequence (P1) 5' AGCAGATGTGGTCAGCTTCTCCAC3' is to a region in the 3' end of the T24 H-ras plasmid, and the 3' primer sequence (P2) 5' TGCTGACTAATTGAGATGCATGCT3' is to a region in the 5' end of the SV40 promoter, vector plasmid sequence.

Assay of cell proliferation. Cells were distributed in 96-well culture dishes at a density of 10^4 cells in 200 μ l complete media/well and permitted to adhere overnight. The next day cells were washed 2 times with PBS and then cultured in medium lacking serum. After 48 h 1 μ Ci ³H-thymidine was added to each well with or without the addition of a cytokine. After an additional 48 h the wells were washed in PBS, treated with trypsin-EDTA for 15 min, and the cells lysed on filters using a cell harvester. ³H-thymidine incorporation was measured using a scintillation counter.

Anchorage independent cell growth assay. Solutions of 2% low melting point agarose in water and a 2X concentration of IMDM/20% FBS were prepared. Equal volumes of these 2 solutions were preheated to 40°C, mixed, and 1 ml used to coat the bottom of each well of a 6-well tissue culture dish. This same agarose/media mixture was used to culture the cells. Cell suspensions were prepared from trypsinized cells at a concentration of about 10^6 cells/ml. A single cell suspension was assured by passing cell suspen-

sions through a 25 gauge needle. Of each cell suspension 15 μ l was then added to 3 ml of the agarose/media mixture, mixed, layered onto the precoated well, incubated at 4°C for 30 min and then cultured in a humidified incubator at 37°C in 5% CO₂.

RNA preparation and analysis. Total RNA was prepared by disruption of cells in RNazol as described by the manufacturer (Bioprobe Systems, Montreuil, France). Of each RNA 5 μ g was separated by electrophoresis through a 1M formaldehyde/1% agarose gel and blotted onto a nylon membrane (Hybond-N, Amersham, Les Ulis, France). Filters were baked 2 h at 80°C. Insert cDNA were isolated from plasmids containing human collagenase³², SV 40 large T antigen (pRSVTag), or neo (pHO6T1) genes using restriction enzymes. A fragment of the human cathepsin L gene was obtained by reverse transcription of poly dT primed human synovial tissue RNA followed by PCR using primers at both ends of a region spanning base pairs 604 to 999 of the previously cloned cathepsin L cDNA³³. The resulting fragment was subcloned into the pGEX vector (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and partially sequenced, showing sequence identity to the published sequence. Plasmid inserts, or in the case of cathepsin L, PCR products using the plasmid containing the cloned fragment as a template, were isolated by agarose gel electrophoresis and purification using the GeneClean kit (Bio 101, San Diego, CA). For use as probes, each cDNA was labelled with ³²P by random primed labelling (kit from Boehringer-Mannheim). Pre-hybridization, hybridization, and washing of the filters were done according to the protocol of Church³⁴.

Injection of SCID/Nu mice. CB-17-SCID mice between 6-8 weeks of age, bred and maintained under pathogen free conditions at the Institut Pasteur de Lille, were used. The Pasteur SCID colony was derived from breeding pairs kindly provided by N. Lieberman (Stanford University). These mice were bred with Nu/Nu mice to establish mice homozygous for both the SCID and Nu phenotypes (SCID/Nu). Mice were injected subcutaneously with 5 \times 10⁶ cells in 0.2 ml IMDM and examined 2 times/week for tumor formation.

Immunohistochemistry. Tissues for immunohistochemistry were immediately fixed in 4% paraformaldehyde in cacodylate buffer and further processed for paraffin embedding. Sections of 4 μ m thickness were incubated with undiluted mouse antibody directed against the large T antigen (supernatant from hybridoma clone #412³⁵ obtained from American Tissue Culture Collection #TTB117, PAb 101) for 18 h at 4°C. This was followed by incubation with a biotinylated rabbit antimouse antibody (Dako Laboratory) at a dilution of 1/200 for 30 min at room temperature and then incubation with streptavidin-biotin complex (Dako Laboratory) for 30 min, at room temperature. Development was carried out using diaminobenzidine.

RESULTS

Transfection of synovial fibroblast-like cells. Synovial fibroblast-like cells from patients with RA, OA, or traumatic joint injury were transfected with plasmids containing the SV40 large T antigen (pRSVTag), T24 H-ras gene (pHO6T1), both, or neither. After transfection cells were selected using G418, an antibiotic that kills cells not containing a copy of the neo gene; this gene is contained on the plasmid pHO6T1 and was cotransfected in cells transfected with pRSVTag alone using the plasmid pSV2neo. Generally cell colonies could be seen to result from the outgrowth of one to several resistant cells. Cells transfected with either the SV40 large T antigen alone or the large T antigen in combination with the ras oncogene produced antibiotic resistant cells that grew rapidly and had a shape similar to early passage synovial fibroblast-like cells, but appeared somewhat smaller and more round. In contrast, cells transfected with only the activated ras gene gave colonies of cells rarely. These cells grew

very slowly as large flattened cells, similar to senescent or very late passage synovial fibroblast-like cells, except that the cells appeared even larger and flatter than senescent synovial fibroblast-like cells.

G418 selected cells transfected with either the large T, or both large T and ras were tested for the presence of the transfected plasmids by RNA blotting and hybridization. Evidence for the presence of the transfected SV40 large T antigen was obtained using a labelled probe to the SV40 large T plasmid insert and showed that in all cases the resistant cells transfected with either the large T, or both large T and ras were stably transfected with SV40 large T DNA (Figure 1). Generally hybridization was seen of variable intensity to an mRNA at ~ 3 kb (hybridization to cell line R4 T was seen clearly only on longer exposure), and in some cell lines another mRNA transcript was seen at a higher molecular weight (for example, cell line R2 T). The presence of the large T protein was also identified in some cell lines by immunocytochemistry (data not shown).

Presence of the plasmid containing the ras gene was implied by the neomycin resistance of cells transfected with this plasmid combination (the plasmid pRSVTag does not contain a neo resistance gene). The presence of the transfected neo genes was identified by RNA hybridization (Figure

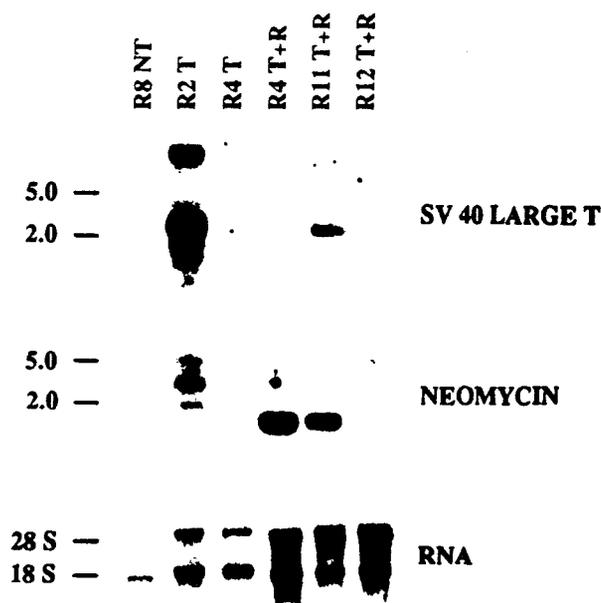


Fig. 1. Stable transfection of synovial fibroblast-like cells. Synovial fibroblast-like cells were either cotransfected with pRSVTag, an expression plasmid containing the SV40 large T antigen, and pSV2neo, an expression plasmid containing the neo gene (R2 T and R4 T); cotransfected with pRSVTag and pSV2neo, followed by transfection with pHO6T1, an expression plasmid containing the ras and neo genes (R4 T+R); cotransfected with pRSVTag and pHO6T1 (R11 T+R, R12 T+R); or left untransfected (R8 NT). Transfected cells were selected with G418, RNA prepared from selected cells and separated by agarose gel electrophoresis, blotted and hybridized to either the SV40 large T or the neomycin resistance gene cDNA. At bottom is a photograph of the separated RNA before blotting.

1). In addition, in one case we found a large T transfected cell line that was spontaneously partially resistant to G418 despite lacking the cotransfected pSV2neo plasmid (Figure 1, cell line R4T). After this cell line was retransfected with the pHO6T1 plasmid and reselected (at a higher concentration of G418), it expressed high levels of the neo gene (Figure 1, R4 T+R), showing that it had been successfully cotransfected with the pHO6T1 plasmid. Further evidence of stable transfection of the pHO6T1 plasmid was obtained by PCR amplification using DNA from the transfected cells and primers within the pHO6T1 plasmid. pHO6T1 transfected cells, but not cells transfected with pRSVTA_g or nontransfected cells, resulted in the amplification of a pHO6T1 specific fragment (Figure 2). Cells transfected with ras alone did not grow to a sufficient density to permit an analysis by Northern blot, but were also positive for the transfected ras plasmid by PCR analysis (data not shown).

Phenotypic characterization of transfected cells. Several types of nonlymphoid, adherent synovial cells have been characterized *in vivo* and *in vitro* at the time of tissue dissociation and primary cell culture: synovial dendritic cells and synovial macrophage-like cells, both of which express MHC class II, and synovial fibroblast-like cells, which express high levels of vimentin^{36,37}. Transfected synovial cells were therefore characterized by immunocytochemistry against these 2 phenotypic markers, which showed that the transfected cells expressed undetectable levels of MHC class II products, but stained intensely with vimentin, indicating that

the transfected cells were in all cases fibroblast-like cells. These results are consistent with data showing that at the time these cells were transfected (generally 2 to 4 weeks after initial culture) greater than 99% of cells in culture are fibroblast-like. In one experiment individual cell lines were cloned from the initially uncloned transfected cell cultures with similar results to those found for the uncloned lines (data not shown).

Response of transfected synovial fibroblast-like cells to growth factors. Several growth factors appear to be important in regulating the growth of synovial fibroblast-like cells. It has been shown that PDGF and FGF strongly stimulate the proliferation of synovial fibroblast-like cells, as does serum³⁸. To study the effect of the presence of the SV40 large T antigen on synovial fibroblast-like cell proliferation, both untransfected and SV40 large T transfected cells were tested for their response to a variety of growth factors known to have potent effects on the regulation of synovial fibroblast-like cell phenotype. SV40 large T antigen transfected cells had high baseline proliferation even after 2 days without serum (Figure 3); in the example shown, spontaneous proliferation as measured by ³H-thymidine incorporation was 50-fold higher than in untransfected cells. Other lines gave varying results; however, unstimulated proliferation was always > 20-fold higher in SV40 large T antigen transfected cells than in untransfected cells. Treatment of the untransfected synovial fibroblast-like cells with serum or a variety of growth factors gave a pattern of stimulation similar to that reported³⁸ (Figure 3A); however, stimulation of SV40 large T transfected synovial fibroblast-like cells showed that the presence of the large T antigen strongly blunted the normal effect of these cytokines (Figure 3B). In particular, although PDGF induced a 11.1-fold increase in untransfected cell proliferation, after transfection the cells increased proliferation by only 1.3-fold. Similar effects were seen with FGF, and to a lesser extent, TGF- β . In contrast, responses to serum generally were similar in both transfected and untransfected cells. The data shown are representative of data taken from three SV40 transfected and 4 untransfected synovial fibroblast-like cell cultures from patients with RA. A similar pattern of responses was also seen in synovial fibroblast-like transfected and untransfected cells taken from patients with OA. Cells transfected with both the SV40 large T antigen and ras gave a similar pattern of proliferation to cells transfected with the SV40 large T antigen alone (cells from 3 patients with RA tested, data not shown).

Analysis of transfected synovial fibroblast-like cells for anchorage independent growth. To determine whether transfected synovial fibroblast-like cells had characteristics of transformation *in vitro*, they were cultured in soft agarose. Cells transfected with either the SV40 large T antigen or the SV40 large T antigen together with the T24 H-ras gene formed large colonies in soft agarose under conditions in which untransfected synovial fibroblast-like cells did not

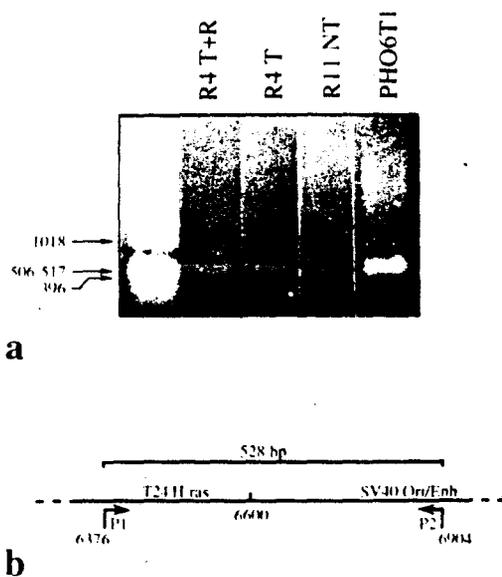


Fig. 2. PCR analysis of cells stably transfected with pHO6T1. (a) DNA from synovial fibroblast-like cells transfected with pRSVTA_g and pHO6T1 (R4 T+R), with pRSVTA_g (R4 T) or left untransfected (R11 NT), was used as a template for PCR, using primers synthesized to amplify a 528 base pair region in the pHO6T1 plasmid as diagrammed in (b). Molecular weight markers are shown in the first lane and a control amplification of the purified plasmid is shown in the lane marked PHO6T1.

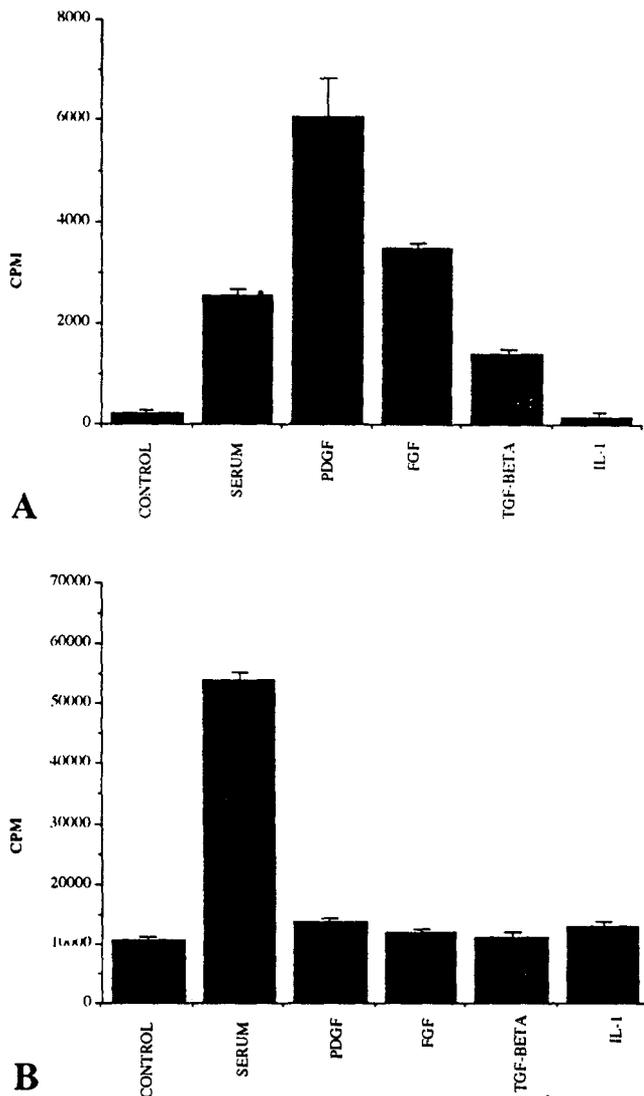


Fig. 3. Proliferation of transfected and untransfected synovial fibroblast-like cells. Untransfected (A) or SV40 large T transfected synovial fibroblast-like cells (B) were cultured without serum for 48 h and then treated with FBS 10% (serum), PDGF (20 ng/ml), FGF (2 ng/ml), TGF- β 1 (2 ng/ml), IL-1 100 U/ml, or left without treatment. 3 H-thymidine was added at the time of cytokine or serum treatment, and after 48 h, cells were lysed on filters, and incorporated 3 H counted. Values shown represent the mean of triplicate wells; error bars show the standard deviation between wells.

Table 1. Anchorage independent growth and transient tumor formation of SV 40 large T and SV 40 large T/T24 H-ras transfected synovial fibroblast-like cell lines derived from patients with RA or with traumatic injury (control)

DNA Transfected	Anchorage Independent Cell Growth*		Transient Tumor Formation**	
	RA	Traumatic Injury (Control)	RA	Traumatic Injury (Control)
SV40 large T	3/3 (3/3)	1/1 (1/1)	4/5 (2/3)	2/2 (1/1)
SV 40 large T + EJ ras	6/6 (4/4)	3/3 (1/1)	6/8 (2/3)	0/3 (0/1)

* Only cell lines with colonies $\geq 60 \mu\text{m}$ in diameter were considered positive — no. positive/no. assays (no. cell lines positive/no. cell lines tested).

** Only tumors of 5 mm diameter were considered as positive — no. tumors/no. injections (no. cell lines positive/no. cell lines tested).

grow (10% FBS, Figure 4, Table 1). The colonies that formed were much larger (to 1 mm in diameter) than colonies we have described using untransfected synovial fibroblast-like cells in the presence of high serum concentrations and exogenous PDGF. Additionally, frequently virtually all large T transfected synovial fibroblast-like cells grew to form colonies, in contrast to untransfected synovial fibroblast-like cells in which generally only between 5–10% of the cells form colonies¹⁹. Synovial fibroblast-like cells transfected with the SV40 large T antigen, or the SV40 large T and T24 H-ras grew equally well in agarose. Transfections of SV40 large T, or large T and ras into synovial fibroblast-like cells derived from patients with traumatic joint injuries also resulted in cell lines that formed colonies in agarose (Table 1).

Expression of collagenase and cathepsin L mRNA by transfected synovial fibroblast-like cells. To further understand the effect of expression of SV40 large T on synovial fibroblast-like cell phenotype, we studied the expression of collagenase and cathepsin L by transfected and untransfected synovial fibroblast-like cells. Expression of the collagenase gene has been shown to be regulated by IL-1 in synovial fibroblast-like cells¹⁵, whereas cathepsin L expression has been shown to be augmented in NIH 3T3 cells express-

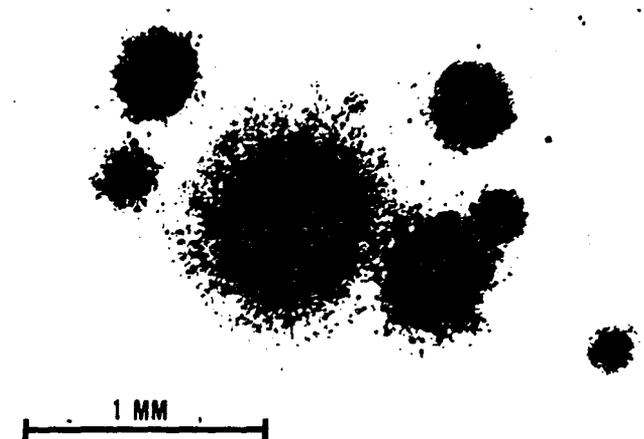


Fig. 4. Anchorage independent cell growth of transfected synovial fibroblast-like cells. SV40 large T stably transfected synovial fibroblast-like cells were cultured in 1% agarose for 4 weeks. Results shown are typical of cell lines positive for soft agarose growth as shown in Table 1.

ing a transfected ras oncogene³³. We found that in untransfected synovial fibroblast-like cells, IL-1 increased collagenase mRNA expression, as reported, and that transformation of the cells with the SV40 large T antigen did not change this response: transformed synovial fibroblast-like cells also showed large increases in collagenase expression after treatment with IL-1 (Figure 5A). The potential regulation of cathepsin L expression in synovial fibroblast-like cells has not been reported. Cathepsin L expression was constitutively quite high in untransfected synovial fibroblast-like and was not regulated by treatment with IL-1, PDGF, or serum (Figure 5B, R16 NT cells, similar results were obtained with 2 other nontransfected cell lines). In large T or large T and ras transfected cells, we occasionally saw a slight stimulatory effect of IL-1 on cathepsin L levels (Figure 5A, compare cell line R11 T+R control versus IL-1 treated), however, generally as in untransfected cells, cathepsin L mRNA expression appeared largely unregulated by cytokine treatment (Figure 5A, cell lines R4 T and R12 T+R). Further, although the level of spontaneous cathepsin L expression was variable between synovial fibroblast-like cells cultured from different patients, we were not able to detect any change in expression associated with transfection with either the SV40 large T or ras oncogenes (Figures 5A and 5B, data not shown).

Transient tumor formation by transfected synovial fibroblast-like cells in SCID/Nu mice. Since large T transfected syn-

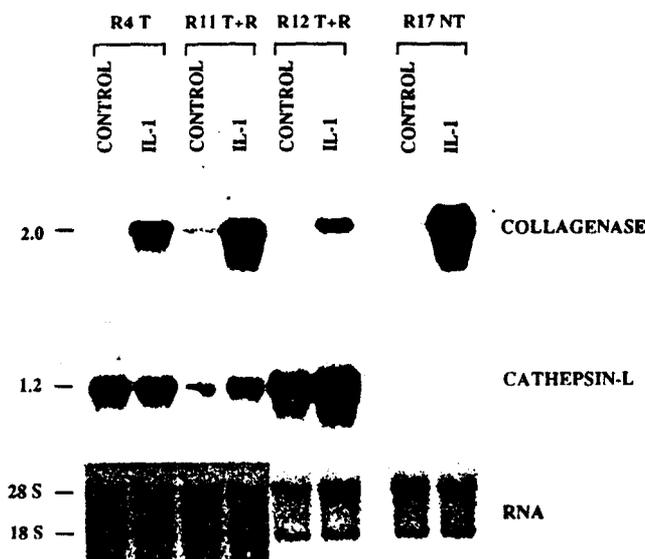


Fig. 5A. Collagenase and cathepsin L expression by transfected synovial fibroblast-like cells. Untransfected synovial fibroblast-like cells (R17 NT) or synovial fibroblast-like cells stably transfected with the SV40 large T antigen [R4 T or the SV40 large T antigen and the ras oncogene (R11 T+R, R12 T+R)] were serum starved for 24 h and then either left untreated (control) or treated with IL-1 100 U/ml for 24 h. Following treatment, RNA was prepared, separated by agarose gel electrophoresis, blotted onto nylon, and hybridized to either ³²P labelled collagenase or cathepsin L cDNA. At bottom is a photograph of the separated RNA before blotting.

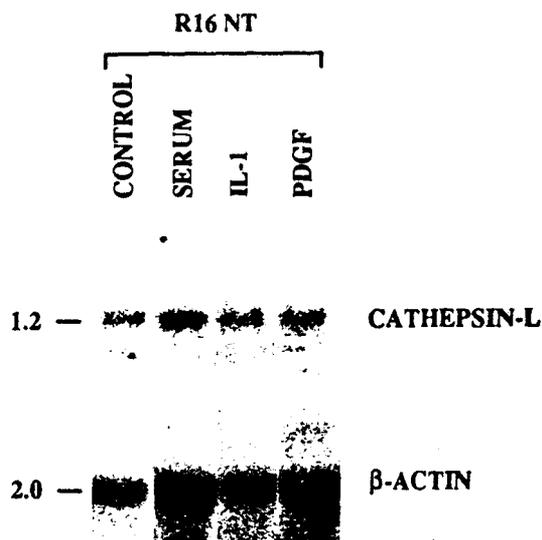


Fig. 5B. Cathepsin L expression by untransfected synovial fibroblast-like cells. Synovial fibroblast-like cells were serum starved for 24 h and then either left untreated (control) or treated with 10% FBS (serum), PDGF (20 ng/ml), or IL-1 (100 U/ml) for 24 h. Following treatment, RNA were prepared, separated by agarose gel electrophoresis, blotted onto nylon, and hybridized to either ³²P labelled cathepsin L or beta-actin cDNA.

ovial fibroblast-like cells grow under anchorage independent conditions, it was of interest to see if these cells could also grow in immunodeficient animals. Various transfected cell lines were therefore injected subcutaneously in SCID/Nu mice and monitored for tumor development. Injection of these cells generally resulted in rapid, but transient tumor formation (Table 1). Tumors developed very rapidly over 4–7 days, attained maximum sizes between 0.5 and 1.5 cm, and then regressed over the following week. Similar transient tumors were produced using large T transfected synovial fibroblast-like cells from one of 2 control patients. In both patients with RA and controls, synovial fibroblast-like cells transfected with large T and ras or with the large T antigen alone resulted in similar, transient tumor formation (Table 1). To understand better the nature of these transient tumors, one tumor was studied immunohistologically 5 days after injection (about the time of maximal tumor size) using an antibody against the large T antigen to identify injected cells. The large T antigen has a nuclear localization sequence, so staining against this antigen is primarily nuclear (Figure 6). The histology of the transient synovial cell tumor produced in the SCID/Nu mouse after subcutaneous injection of these cells showed a lesion characterized by central necrosis, neutrophil infiltration primarily in the region of central necrosis, and a general lack of vascularization of the tumor. These results suggested that (1) synovial cells transfected with the SV40 large T antigen are capable of growing at least transiently in the SCID/Nu mouse, (2) the death of the cells is possibly due to a lack of adequate vasculariza-

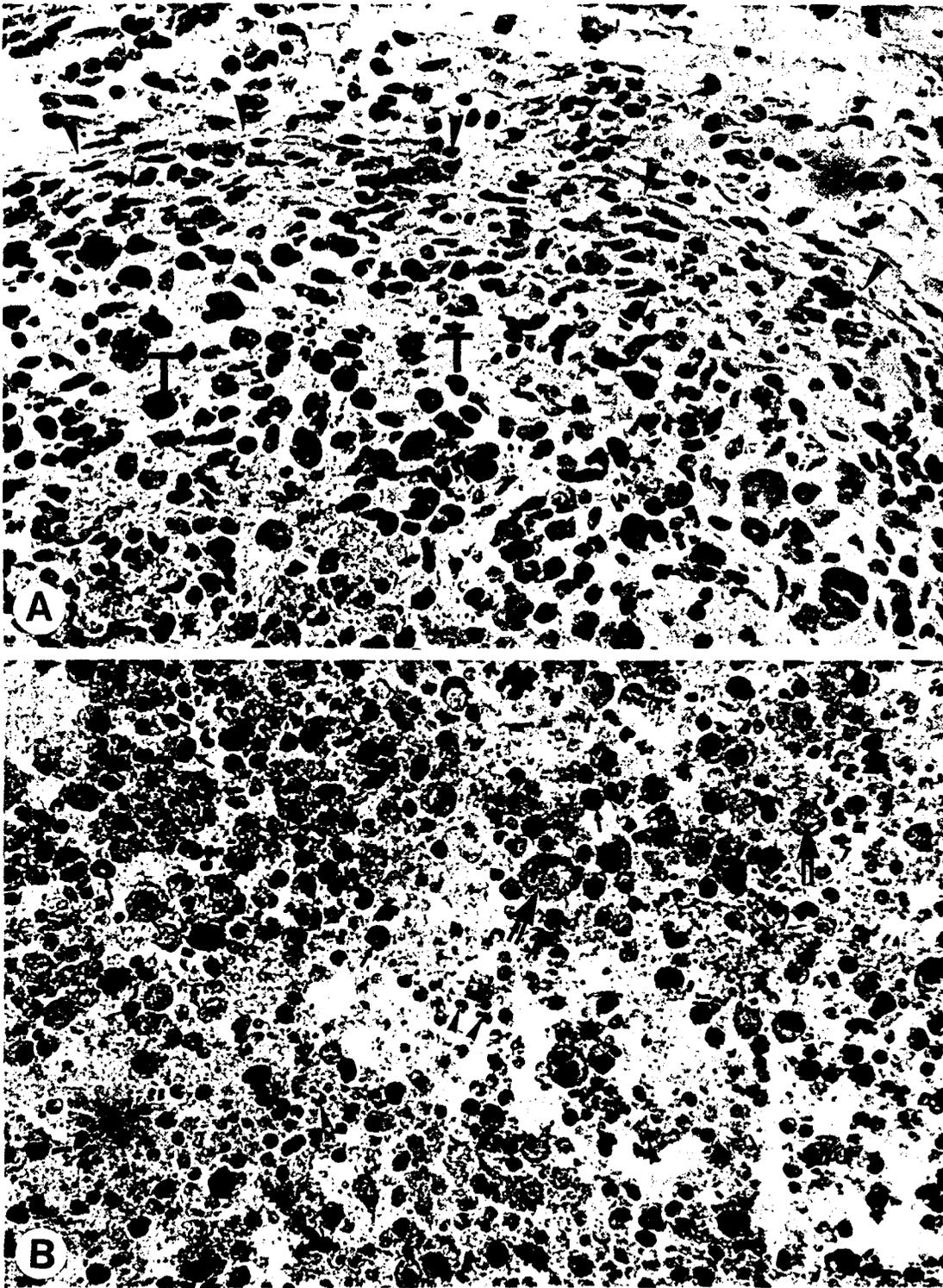


Fig. 6. Transient tumor formation by synovial fibroblast-like cells in an immunodeficient mouse. A SCID/Nu mouse was injected subdermally with 5×10^6 cells stably transfected with the SV40 large T antigen. After 5 days the animal was sacrificed, and the tumor and surrounding connective tissue analyzed by immunohistochemistry using an antibody directed against the SV40 large T antigen. Specific staining appears as brown; counterstaining is blue. Panel A shows a region at the edge of the tumor (T: tumor, arrowheads = limit of the tumor). Transfected synovial fibroblast-like cells have large, dense, and irregularly shaped nuclei; little evidence of vascularization is seen. Panel B shows a region of central necrosis of the tumor with apparent death of the synovial fibroblast-like cells with pyknotic nuclei (arrows) or no nuclei (double stranded arrows) and a dense neutrophil infiltration (arrowheads). Magnification $\times 400$.

tion, a lack of complete transformation, or the presence of an effective host response (neutrophil migration/activation), (3) neutrophil migration is likely stimulated either by mediator secretion from the synovial fibroblast-like cells or by cell death, and (4) there is not a significant lymphocyte mediated response by the SCID/Nu mouse against the tumor, as expected.

DISCUSSION

The tumor-like pannus formed in the inflamed synovial tissues of patients with RA has suggested that a process in some ways analogous to a neoplastic cellular transformation occurs in synovial fibroblast-like cells in RA. In cancer cells, it appears that mutations in complementary oncogenes (or tumor suppressor genes) activate different sets of genes important in the expression of the neoplastic cell phenotype²³. Similarly, collagenase expression induced by IL-1 (or TNF- α) and anchorage independent cell growth induced by PDGF, 2 phenotypic changes associated with neoplasia, have complementary effects on the phenotype of synovial fibroblast-like cells³⁹, suggesting that these cytokines might act on synovial cells in RA to reproduce a phenotype similar to cancer cells, but regulated externally rather than due to genetic mutation(s). To investigate the relationship between these external signals and the internal regulation of expression of the transformed synovial fibroblast-like cell phenotype, complementary oncogenes were transfected stably into synovial fibroblast-like cells and the resulting cell lines tested for anchorage dependent and independent cell growth, collagenase and cathepsin L expression, and growth in immunodeficient mice.

Stable transfection with the SV40 large T antigen resulted in synovial fibroblast-like cell lines that grew partially independently of growth factors, grew under anchorage independent conditions, spontaneously expressed cathepsin L, and formed transient tumors in immunodeficient mice. The SV40 large T antigen is known to be able to immortalize primary fibroblast and other cells, and also in some cases to cause transformation, although transformation frequently requires a complementary oncogene such as *ras*⁴⁰⁻⁴². These immortalizing and transforming functions of the SV40 large T antigen have been recently shown to be related to 2 separate binding regions in this protein, one site binds to the retinoblastoma (Rb) protein and the other binds to the p53 protein. Inactivation by binding to each of the protein products of these 2 tumor suppressor genes (or anti-oncogenes) has been shown to be critical in the immortalizing and transforming properties of the large T antigen^{25,43,44}. Similarly, it is likely that the inactivation of one or both of these proteins is responsible for the growth factor independent growth and transformed phenotype expressed by SV40 transfected synovial fibroblast-like cells. Another group has recently reported microinjection of synovial fibroblast-like cells with a replication deficient SV40 genomic DNA⁴⁵.

Although an extensive characterization of the resulting synovial fibroblast-like cells was not reported, it is likely that the effect of the whole viral DNA was due in large part to the presence of the SV40 large T antigen; therefore, it seems likely that these cells would have similar characteristics to the large T antigen transfected synovial fibroblast-like cells described here.

The effect of transfection of synovial fibroblast-like cells with the large T antigen highlights the separate intracellular pathways utilized by IL-1 versus PDGF in regulating synovial fibroblast-like cells. As we and others have shown, PDGF treatment of synovial fibroblast-like cells leads to anchorage dependent and independent cell growth, whereas IL-1 treatment leads to marked increases in collagenase expression^{19,38,39,46}. These 2 pathways are clearly distinct signalling pathways in synovial fibroblast-like cells, since under the conditions used PDGF does not stimulate collagenase expression and IL-1 does not stimulate anchorage dependent or independent cell growth. The large T antigen appears to affect the intracellular signalling pathway utilized by PDGF, since large T transfected cells became largely unresponsive to this growth factor, while retaining sensitivity to serum. On the other hand, stimulation of collagenase expression by IL-1 was unaffected by large T. It has been shown that stimulation of this pathway is mediated at least in part by AP-1 stimulation of the TPA responsive element in this collagenase promoter⁴⁷; AP-1 activity is determined by dimer formation between the *jun* and *fos* families of oncogenes.

From the experiments here we cannot define precisely how large T produces a state of unresponsiveness to PDGF in transfected cells; however, the concomitant rise in spontaneous proliferation of transfected cells and the ability of these cells to grow under anchorage independent conditions, a phenotype previously shown to be associated with PDGF stimulation, suggests that large T activates similar intracellular pathways as PDGF. The fact that large T transfection was associated with unresponsiveness to other growth factors suggests that it is acting at a point where several different growth factor signalling pathways converge, possibly by binding to Rb and/or p53. The precise mechanisms of action of p53 and Rb in regulating cell proliferation are not known; however, both appear to act in the G1 phase to inhibit G1/S progression²³.

An alternative explanation for the effect of large T transfection on these cells is that large T antigen stimulated secretion of PDGF by the transfected cells, leading to autocrine stimulation. Increased secretion of a PDGF-like molecule after transformation with several agents including the SV40 large T antigen has been reported⁴⁸. These 2 explanations are not mutually exclusive.

We should add that other groups have reported that IL-1 can stimulate proliferation, and PDGF can stimulate collagenase expression in dermal fibroblasts^{49,50}. These reports

show that the cell type tested and the culture conditions used during proliferation assays can affect the results obtained. In our assays, proliferation and collagenase expression were evaluated in the absence of serum and after relatively short periods of culture (24–48 h). We believe that longer culture times and/or the presence of serum in these assays complicate the interpretation of cytokine mediated intracellular signalling due to the potential for secondary mediator stimulation by the added cytokine. Indeed, this type of secondary reaction is important in regulating IL-1 mediated signalling due to the potent stimulation of pGE2 by IL-1³⁹.

Synovial fibroblast-like cells transfected with an overexpressed and activated ras oncogene morphologically appeared very large and flattened, without any evidence of focus formation characteristic of ras transformation in some other cell types. The ras gene used in the studies presented here was originally isolated from a bladder tumor (T24) on the basis of causing morphological transformation of NIH 3T3 cells, an immortalized mouse cell line; this is the most frequent phenotypic change associated with ras transfection. The same plasmid we transfected into synovial fibroblast-like cells, which overexpresses an activated form of the ras gene (H-ras-1), has been shown to induce complete malignant transformation of early passage rodent cells³¹. In human cells, different groups using this and other ras oncogene containing plasmid constructs have reported results ranging from complete immortalization and transformation of primary human bronchial epithelial cells to no apparent effect on human foreskin fibroblasts^{26–29,51}. In synovial fibroblast-like cells, the absence of an effect by ras on primary cultured cells could have been due to the intervention of senescence before the ras associated phenotype could be expressed.

The potential effect of ras expression in SF cells was therefore also tested by cotransfection of ras with the large T antigen. Cells transfected with a combination of the SV40 large T antigen and the ras oncogene behaved in all assays similarly to cells transfected with large T alone. Of particular importance ras transfection did not affect anchorage independent growth or cathepsin L mRNA levels, 2 phenotypic changes that have been associated with ras transformation in other cell types³³. These data suggest that increased ras activity does not change the phenotype of synovial fibroblast-like cells. Perhaps ras activity is spontaneously high in synovial fibroblast-like cells; this might account for SV40 large T antigen transformation of synovial fibroblast-like cells without transfection of a cooperating oncogene, and might also be responsible for the high basal level of cathepsin L expression in these cells.

The ability for synovial fibroblast-like cells transfected with either large T or large T and ras to form transient tumors in SCID/Nu mice further suggests that the large T antigen activates the same pathway activated in the tumor-like pannus in patients with RA. The transient growth of this tumor may simply reflect a lack of vascularization, either because

angiogenic factors were not secreted by the synovial fibroblast-like cells or simply because the very rapid growth of the tumor did not permit time for adequate vascularization. Alternatively, activation of another complementary signalling pathway may be needed for longterm tumor-like synovial fibroblast-like cell growth. Finally, tumor regression might be due to the neutrophil infiltration of the tumor. The intense neutrophil infiltration of this tumor is similar to the reaction described upon injection of a freshly digested, mixed cellular population of synovial tissue cells⁵². Our results suggest that this infiltration is due to the synovial fibroblast-like cells in this mixed cell population. Perhaps these cells secrete important mediators of neutrophil chemoattraction, such as IL-8. Unfortunately the transient nature of this tumor has not permitted a determination as to whether these cells are capable of bone destruction as seen in patients with RA; however, continuing studies with this model should help us to answer this and other questions regarding which intracellular signalling pathways in synovial fibroblast-like cells are activated to cause the destructive lesions characteristic of RA.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Jean-Pierre Decavel for help with animal experiments and Drs. C. Auriault and F. Denhez for critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Harris ED: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, eds. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: WB Saunders, 1985:886–915.
2. Dayer JM, Krane SM, Russel GG, Robinson DR: Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent synovial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:945–9.
3. Chin JR, Murphy G, Werb Z: Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 1985;260:12367–76.
4. He C, Wilhelm SM, Pentland AP, et al: Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2632–6.
5. Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM: The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:388–96.
6. Huet G, Flipo RM, Colin C, et al: Stimulation of secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor and interleukin-1. *Arthritis Rheum* 1993;36:772–80.
7. Lafyatis R, Thompson NL, Remmers EF, et al: Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol* 1989;143:1142–8.
8. Firestein GS, Xu WD, Townsend K, et al: Cytokines in chronic inflammatory arthritis I. Failure to detect T cell lymphokines (IL-1 and IL-3) and the presence of M-CSF and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 1988;168:1573–86.
9. Firestein GS, Alvaro-Garcia JM, Maki R: Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990;144:3347–53.
10. Xu WD, Firestein GS, Taetle R, Kaushansky K, Zvaifler NJ: Cytokines in chronic inflammatory arthritis II. GM-CSF in

- rheumatoid synovial effusions. *J Clin Invest* 1989;83:876-82.
11. Bucala R, Richtilin C, Winchester R, Cerami A: Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J Exp Med* 1991;173:569-74.
 12. Mourad W, Mehindate K, Schall TM, McColl SR: Engagement of major histocompatibility complex class II molecules by superantigen induces inflammatory cytokine gene expression in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Exp Med* 1992;175:613-6.
 13. Goto M, Sasano M, Yamanaka H, et al: Spontaneous production of an interleukin 1-like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long term culture. *J Clin Invest* 1987;80:786-96.
 14. Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldman M: Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 α . *Clin Exp Immunol* 1988;73:449-55.
 15. Dayer JM, Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA: Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin production by human synovial cells. *J Clin Invest* 1986;77:645-8.
 16. Frisch SM, Ruley HE: Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987;262:16300-4.
 17. Dayer JM, Beutler B, Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985;162:2163-8.
 18. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al: Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10:4025-31.
 19. Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL: Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest* 1989;83:1267-76.
 20. Remmers EF, Sano H, Lafyatis R, et al: Production of platelet-derived growth factor B chain mRNA and immunoreactive PDGF B-like polypeptide by rheumatoid synovium: co-expression with heparin binding growth factor-1. *J Rheumatol* 1991;18:7-13.
 21. Amento EP, Bhan AK, McCullagh KG, Krane SM: Influences of gamma interferon on synovial fibroblast-like cells. *J Clin Invest* 1985;76:837-48.
 22. Land H, Parada LF, Weinberg RA: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983;304:596-602.
 23. Hunter T: Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991;64:249-70.
 24. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW: Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989;9:3088-92.
 25. Resnick-Silverman L, Pang Z, Li G, Jha KK, Ozer HL: Retinoblastoma protein and simian virus 40-dependent immortalization of human fibroblasts. *J Virol* 1991;65:2845-52.
 26. Sager R, Tanaka K, Lau CC, Ebina Y, Anisowicz A: Resistance of human cells to tumorigenesis induced by cloned transforming genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:7601-5.
 27. Hurlin PJ, Maher VM, McCormick JJ: Malignant transformation of human fibroblasts caused by expression of a transfected T24 HRAS oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:187-91.
 28. Wilson DM, Yang D, Dillberger JE, Dietrich S, Maher VM: Malignant transformation of human fibroblasts by a transfected N-ras oncogene. *Cancer Res* 1990;50:5587-93.
 29. Kinsella AR, Fiszer-Maliszewska L, Mitchell ELD, Guo Y, Fox M, Scott D: Introduction of the activated N-ras oncogene into human fibroblasts by retroviral vector induces morphological transformation and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 1990;11:1803-9.
 30. Tubo RA, Rheinwald JG: Normal human mesothelial cells and fibroblasts transfected with the EJras oncogene become EGF-independent, but are not malignantly transformed. *Oncogene Res* 1987;1:407-21.
 31. Spandidos DA, Wilkie NM: Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 1984;310:469-75.
 32. Goldberg G, Wilhelm S, Kronberger A, Bauer E, Grant G, Eisen A: Human fibroblast collagenase. *J Biol Chem* 1986;261:6600-5.
 33. Joseph LJ, Chang LC, Stamenkovich D, Sukhatme VP: Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. *J Clin Invest* 1988;81:1621-9.
 34. Church GM, Gilbert W: Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1991-5.
 35. Deppert W, Gurney EG, Harrison RO: Monoclonal antibodies against simian virus 40 tumor antigens: analysis of antigenic binding sites, using adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid viruses. *J Virol* 1981;37:478-82.
 36. Burmester GR, Dimitriu-Bona A, Waters SJ, Winchester RJ: Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages and fibroblasts. *Scand J Immunol* 1983;17:69-82.
 37. Yocum DE, Lafyatis R, Remmers EF, Schumacher HR, Wilder RL: Hyperplastic synoviocytes from rats with streptococcal cell wall-induced arthritis exhibit a transformed phenotype that is thymic-dependent and retinoid inhibitable. *Am J Pathol* 1988;132:38-48.
 38. Remmers EF, Lafyatis R, Case JP, Roberts AB, Sporn MB, Wilder RL: Cytokines and growth regulation of synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis and rats with streptococcal cell wall arthritis. *Growth Factors* 1990;2:179-88.
 39. Kumkumian GK, Lafyatis R, Remmers EF, Case JP, Kim SJ, Wilder RL: Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol* 1989;143:833-7.
 40. Hirakawa T, Ruley HE: Rescue of cells from ras oncogene-induced growth arrest by a second, complementing oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1519-23.
 41. Rhim JS, Jay G, Arnstein P, Price FM, Stanford KK, Aaronson SA: Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by AD-12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses. *Science* 1985;227:1250-2.
 42. Wynford-Thomas D, Bond JA, Wyllie FS, et al: Conditional immortalization of human thyroid epithelial cells: a tool for analysis of oncogene action. *Mol Cell Biol* 1990;10:5365-77.
 43. Lin JY, Simmons D: The ability of large T antigen to complex with p53 is necessary for the increased life span and partial transformation of human cells by simian virus 40. *J Virol* 1991;65:6447-53.
 44. Zhu J, Abate M, Rice PW, Cole CN: The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *J Virol* 1991;65:6872-80.
 45. Goto M, Okamoto M, Sasano M, et al: Functional characterization of SV 40-transformed adherent synovial cells

- from rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1991;86:387-92.
46. Butler DM, Leizer T, Hamilton JA: Stimulation of human synovial fibroblast DNA synthesis by platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *J Immunol* 1989;142:3098-103.
47. Lafyatis R, Kim SK, Angel P, et al: IL-1 stimulates and retinoic acid inhibits collagenase expression through its 5' AP-1 binding site. *Mol Endocrinol* 1990;4:973-80.
48. Bowen-Pope DF, Vogel A, Ross R: Production of platelet derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2396-400.
49. Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF: Stimulation of *in vitro* human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4132-6.
50. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982;128:2177-82.
51. Yoakum GH, Lechner JF, Gabrielson EW, et al: Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. *Science* 1985;227:1174-9.
52. Brinckerhoff CE, Harris ED: Survival of rheumatoid synovium implanted into nude mice. *Am J Pathol* 1981;103:411-8.

