

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**LA CONVERTASE DE PROPROTÉINES FURINE ET SON IMPLICATION DANS
LE DÉVELOPPEMENT DE L'ARTHRITE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE RAT**

**Par
Annie Le Bel
Département de pédiatrie, service d'immunologie**

**Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie**

5 juin 2002

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	i
Liste des illustrations	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations utilisées	vii
Résumé	
<u>1. INTRODUCTION</u>	1
1.1 La polyarthrite rhumatoïde	2
1.1.1 Induction de la pathologie	3
1.1.2 Activation des lymphocytes T	4
1.1.3 Activation des lymphocytes B	5
1.1.4 Activation des macrophages, des synoviocytes, des chondrocytes et des cellules dendritiques	6
1.1.5 Hyperprolifération de la membrane synoviale	6
1.1.6 Le pannus	8
1.1.7 Enzymes de dégradation	10
1.1.8 Molécules d'adhésion	12
1.1.9 Cytokines et facteurs de croissance	13
1.1.10 Modèle d'arthrite chez les animaux	15
1.2 La furine, un prototype des convertases de proprotéines chez les mammifères	16

1.2.1	Historique de la découverte des convertases de proprotéines	16
1.2.2	Structure générale des convertases de proprotéines	18
1.2.3	Localisation tissulaire et intracellulaire des convertases	20
1.2.4	Régulation, expression et distribution tissulaire de la furine	21
1.2.5	Maturation et localisation intracellulaire de la furine	22
1.2.6	Les substrats de la furine	24
1.2.6.1	Substrats furine connus ou putatifs ayant été étudiés dans l'étude	26
1.2.6.1.1	Le TGF-β1	26
1.2.6.1.2	Le PDGF AB	29
1.2.6.1.3	La MT1-MMP	32
1.2.6.1.4	La MMP-2	35
1.2.6.1.5	La TACE et les agrécanases	39
1.3	L'α₁-antitrypsine PDX, un inhibiteur puissant de la furine	43
1.4	La thérapie génique	44
1.5	Objectifs et pertinence de recherche	46
<u>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>		47
2.1	Culture primaire de synoviocytes de type B	47
2.2	Vecteurs adénoviraux	49
2.3	Infection des synoviocytes	52
2.4	Analyse des protéines par immunobuvardage	52

2.5	Dosage du TGF-β1 biologiquement actif et du PDGF AB	54
2.6	Expression de la GFP <i>in vitro</i>	55
2.7	Préparation de milieux conditionnés	56
2.8	Étude de l'activité gélatinolytique	56
2.9	Induction de l'arthrite au collagène chez le rat (C.I.A)	57
2.10	Évaluation de l'arthrite induite par le collagène	58
2.11	Transfert de gènes <i>in vivo</i>	58
2.12	Expression de la GFP <i>in vivo</i>	60
2.13	Analyse par RT-PCR	60
3.	<u>RÉSULTATS</u>	63
3.1	Capacité d'infection des synoviocytes de type B par les adénovirus recombinants	63
3.2	Production de l'α_1-PDX par les synoviocytes infectés	65
3.3	Effet de l'inhibition de la furine sur la production de TGF-β1 mature	67
3.4	Effet de l'inhibition de la furine sur la production de PDGF AB mature	69
3.5	Impact de l'inhibition de la furine sur l'activation/ maturation de la MMP-2	71
3.6	Régulation de la cassette transcriptionnelle de l'AdTR5PDX par la doxycycline	75

3.7	Expression du transgène α_1-PDX <i>in vivo</i> par le vecteur AdTR5PDX	78
3.8	Localisation de l'expression de la GFP <i>in vivo</i>	81
3.9	Rôle de la doxycycline dans la modulation de la GFP <i>in vivo</i>	83
3.10	Impact de l'administration des adénovirus sur l'inflammation et l'index artriculaire de rats sains	86
3.11	Impact de l'administration de l'AdTR5PDX sur l'inflammation et l'index artriculaire des rats traités au collagène de type II.	89
4.	<u>DISCUSSION</u>	93
5.	<u>CONCLUSION</u>	106
6.	<u>REMERCIEMENTS</u>	108
	RÉFÉRENCES	109

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 :** Infiltration du pannus au niveau du cartilage articulaire
- Figure 2 :** Les membres de la famille des convertases de proprotéines
- Figure 3 :** Étapes menant à l'activation de la furine
- Figure 4 :** Maturation du TGF- β 1 par la furine
- Figure 5 :** Maturation du PDGF AB
- Figure 6 :** Représentation schématique de la MT1-MMP
- Figure 7 :** Structure et modèle d'activation de la MMP-2
- Figure 8 :** Représentation de la structure de la TACE/ADAM7 et des agrécanases 1 et 2 humaines (ADAMTS-4 et ADAMTS-5/ADAMTS-11)
- Figure 9 :** Résumé de l'implication potentielle de la furine dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde
- Figure 10 :** Coupe sagittale de l'articulation du genou humain
- Figure 11 :** Analyse de la capacité d'infection des synoviocytes de type B par l'AdTR5PDX
- Figure 12 :** Analyse par immunobuvardage de la production d' α_1 -PDX des synoviocytes infectés à des MOI croissantes d'AdTR5PDX
- Figure 13 :** Effet de l' α_1 -PDX sur la production de TGF- β 1 mature
- Figure 14 :** Effet de l' α_1 -PDX sur la production de PDGF AB mature
- Figure 15 :** Analyse par zymographie de l'effet de l' α_1 -PDX sur la maturation de la MMP-2
- Figure 16 :** Effet de la doxycycline sur la régulation du système adénoviral

- Figure 17 :** Analyse par RT-PCR de l'expression du transgène α_1 -PDX chez les genoux de rats arthritiques injectés à l'AdTR5PDX
- Figure 18 :** Localisation de l'expression de la GFP par analyse microscopique
- Figure 19 :** Analyse de l'effet de la doxycycline sur la modulation de l'expression de la GFP *in vivo*
- Figure 20 :** Effet des adénovirus sur la mesure de l'inflammation et de l'index articulaire au niveau des pattes de rats contrôles
- Figure 21 :** Effet de l'AdTR5PDX sur le développement de l'arthrite évalué par l'index articulaire et l'inflammation

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 :** Proprotéines clivées par la furine

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

α_1 -PDX	α_1 -antitrypsine Portland
ADAM	A desintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	A desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin domain
AdTR5GFP	Adénovirus recombinant pour la GFP
AdTR5PDX	Adénovirus recombinant pour l' α_1 -PDX
AdTR5FUR	Adénovirus recombinant pour la furine
AdCMVtTa	Adénovirus recombinant pour le transactivateur tTa
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
CIA	Arthrite induite au collagène (Collagen-induced arthritis)
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMV	Promoteur du cytomégalovirus
DMEM	Milieu de culture DMDM (Dulbecco's modified eagle medium)
FBS	Sérum de veau foetal (Fœtal bovine serum)
GFP	Protéine à fluorescence verte (Green fluorescent protein)
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IRES	Site d'entrée interne aux ribosomes (Internal ribosomes entry site)
Kb	Kilobase
MC	Milieus conditionnés

MMP	Matrix metalloproteinase
MT-MMP	Membrane-type matrix metalloproteinase
MOI	Multipllicité d'infection
PACE4	Paired basic amino acid cleavage enzyme 4
PBS	Saline tamponnée au PBS
pb	Paire de bases
PCNA	Antigène nucléaire de prolifération cellulaire (proliferating cell nuclear antigen)
PDGF	Facteur de croissance derivé des plaquettes (platelet-derived growth factor)
PR	Polyarthrite rhumatoïde
RE	Réticulum endoplasmique
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
TACE	Tumour necrosis factor alpha converting enzyme
TNFα	Tumour necrosis factor alpha
TBS	Saline tamponnée au TRIS
TGF-β1	Facteur de croissance transformant de type β1
TRIS	Hydroxyméthyle-aminométhane
TGN	Réticulum du trans-Golgi

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**LA CONVERTASE DE PROPROTÉINES FURINE ET SON IMPLICATION DANS
LE DÉVELOPPEMENT DE L'ARTHRITE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE RAT**

Par

Annie Le Bel

Département de pédiatrie, service d'immunologie

**Mémoire présenté le 5 juin 2002, à la Faculté de Médecine, en vue de l'obtention du grade
de Maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie.**

RÉSUMÉ

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie immunitaire touchant environ 1% de la population mondiale. Elle retient de plus en plus d'attention étant donnée la population vieillissante. Elle est caractérisée par une inflammation et une hypertrophie de la membrane synoviale causant des dommages irréversibles tels que la destruction progressive du cartilage et des os. Plusieurs molécules participent à l'évolution de la pathologie dont des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissances et des métalloprotéinases. La cause de la pathologie étant toujours inconnue, il n'existe donc aucun traitement curatif à ce jour.

La furine, une convertase de proprotéines, est responsable de la maturation de plusieurs substrats impliqués dans la pathologie, dont le TGF- β 1, le PDGF AB, la MMP-3

et la MT1-MMP (active la MMP-2). Cette convertase est impliquée dans la maturation de la TACE, l'enzyme de conversion du TNF α , et pourrait être impliquée dans la maturation des agrécanases qui participent à la dégradation du cartilage. Le nombre élevé de substrats de la furine connus ou putatifs impliqués dans la polyarthrite permet de supposer que cette convertase puisse jouer un rôle majeur dans le développement de la pathologie.

Afin de vérifier cette possibilité, nous avons utilisé un adénovirus (AdTR5PDX) encodant un inhibiteur puissant de la furine, l' α_1 -antitrypsine de type Portland (α_1 -PDX). L'ADNc de l' α_1 -PDX a été inséré dans une cassette dicistronique contenant aussi l'ADNc du gène rapporteur de la protéine à fluorescence verte, et soumis au contrôle d'un promoteur régulé de façon négative par la doxycycline.

Nous avons démontré la production dépendante de la MOI de la protéine α_1 -PDX par les synoviocytes de type B en culture, infectés avec l'AdTR5PDX. Ensuite, nous avons démontré l'inhibition de la furine par l'observation d'une diminution des formes matures des substrats TGF- β 1 et PDGF AB présentes dans les surnageants des synoviocytes infectés. La furine est également impliquée dans la maturation de la MT1-MMP, activant ensuite la MMP-2. De plus, il a été vérifié par cytométrie de flux que la cassette transcriptionnelle de l'adénovirus AdTR5PDX était régulable à la doxycycline chez les synoviocytes. Cette régulation a aussi été démontrée par une augmentation de maturation des substrats TGF- β 1 et PDGF AB par les cellules infectés avec l'AdTR5PDX et traitées avec 1 μ g/ml de l'antibiotique.

Nous avons ensuite vérifié *in vivo* l'efficacité du vecteur adénoviral AdTR5PDX. La transcription du transgène α_1 -PDX a été démontrée par RT-PCR des corps adipeux infra-patellaires de genoux de rats arthritiques injectés avec le virus. La visualisation du

traceur GFP par microscopie confocale du tissu synovial frais, nous a permis de démontrer que l'expression de la furine se situe de façon spécifique au niveau de la membrane synoviale. Nous avons aussi démontré que cette expression est détectable 25 jours suivant l'injection des adénovirus, avec un pic de production protéique à 15 jours. Le système adénoviral utilisé est régulable à la doxycycline *in vivo* puisque l'administration de 1 mg/ml d'antibiotique, dans l'eau des rats arthritiques injectés avec l'AdTR5PDX, inhibe l'expression de GFP. De plus, 18 jours suivant l'arrêt de l'administration de doxycycline, une reprise de fluorescence est observée, indiquant que le système est redevenu actif. Finalement, nous avons testé l'effet de l'inhibition de la furine, par injection intra-articulaire d'AdTR5PDX, sur le développement de l'arthrite induite au collagène de type 2 chez les rats. Les résultats ont démontré une diminution de l'inflammation et de la sévérité de la maladie chez les pattes injectées avec l'AdR5PDX par rapport aux pattes injectées avec le vecteur contrôle AdCMVGFP.

Ces résultats indiquent que la furine est responsable de la maturation de plusieurs substrats impliqués dans le développement de maladies inflammatoires complexes telle que la polyarthrite rhumatoïde. Ceci nous permet de proposer la furine en tant que nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement de cette pathologie.

1. INTRODUCTION

L'être humain est doté de la capacité de penser et c'est d'ailleurs ce qui lui a permis d'évoluer. Ainsi, c'est en cherchant des réponses à ses questions, que l'homme parvient à comprendre les phénomènes qui l'entourent. Dans le domaine de la santé par exemple, les recherches ont permis de comprendre les causes et la pathogénèse de plusieurs maladies, permettant ensuite de produire des médicaments afin de les traiter ou bien de fabriquer des vaccins dans le but de prévenir les infections et les épidémies.

Bien que nous disposions de nos jours de technologies médicales et de recherches de pointe, plusieurs maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde sont encore incurables. Toutefois, les recherches effectuées jusqu'à ce jour ont permis de mettre en évidence certains aspects de la pathologie tels que l'inflammation, la prolifération cellulaire et la dégradation du cartilage et des os. Ces événements sont régis par des molécules pro-inflammatoires ainsi que par des enzymes potentiellement activées par la furine, un membre des convertases de proprotéines.

1.1 La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la maladie la plus fréquente parmi celles causant des rhumatismes. Elle affecte environ 1% de la population mondiale avec une incidence trois fois plus élevée chez les femmes (Klippel et Dieppe, 1994). Elle est caractérisée par une inflammation des articulations causant des dommages irréversibles tels que la destruction progressive du cartilage et des os des articulations (Feldmann et al., 1996a; Isomäki et Punnonen, 1997; Bresnihan, 1999). C'est une maladie systémique auto-immune qui touche en particulier les articulations des mains, des poignets, des pieds et des genoux, et ce, de façon symétrique (Maini et Feldmann, 1998). En plus des manifestations intra-articulaires, des manifestations extra-articulaires locales ou systémiques peuvent être observées. Les manifestations locales sont caractérisées par l'apparition de nodules sous-cutanés généralement aux régions susceptibles de traumatismes tel que les coudes. Les manifestations systémiques peuvent être des vasculites, de la fibrose aux poumons, des péricardites, de la pleurésie, ainsi que le syndrome de Felty (Maini et Feldmann, 1998). Les dommages causés par la PR résultent en une mobilité réduite, une invalidité progressive et parfois à la mort de la personne atteinte (Smith et Arnett, 1991; Klippel et Dieppe, 1994). La PR peut survenir à tout âge, mais en général la prévalence augmente avec l'âge (Koopman, 2001; Sangha, 2000). Ainsi, le vieillissement de la population et l'absence de traitement curatif à ce jour reflètent clairement la nécessité d'approfondir les connaissances au niveau des mécanismes pathophysiologiques qui permettront l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

1.1.1 Induction de la pathologie

Bien que la cause exacte de la PR demeure inconnue, l'implication de facteurs génétiques dans la maladie est grandement étudiée. La prédisposition génétique face à l'arthrite est fortement associée au locus HLA-DRB1 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Nepom et al., 1989; Lanchbury et al., 1991; Nepom et Erlich, 1991). Entre autre, il a été observé que 80% des patients caucasiens expriment les allèles HLA DR1 ou DR4 (Gregersen et al., 1987). De plus, les chaînes bêta encodées par les gènes DRB1 possèdent chacune une séquence d'acide aminés similaires en position $^{67}\text{Q}[\text{R/K}]\text{RAA}^{74}$ appelée épitope partagé (Gregersen et al., 1987; Nepom et al., 1989; Hiraiwa et al., 1990).

Certains agents infectieux pourraient jouer un rôle dans l'induction de la pathologie. Lors de l'induction de l'arthrite chronique par *M. tuberculosis*, la similarité des séquences des antigènes de la bactérie dans l'environnement de l'articulation et des antigènes du soi pourraient causer une réactivité croisée menant à une réponse immune localisée au niveau de l'articulation (van Eden et al., 1985). La théorie de l'épitope partagé pourrait causer ce type de réactivité croisée. D'ailleurs la séquence de l'épitope partagé QKRAA est observée chez la bactérie *E. coli* (Albani et al., 1995) ainsi que chez le virus d'Epstein-Barr (Roudier et al., 1989). La bactérie *P. mirabilis* pourrait être elle aussi un agent inducteur de l'arthrite étant donné que des niveaux élevés d'anticorps de type IgG contre cet organisme ont été observés chez les patients (Ebringer et al., 1989; Rashid et al., 1999). Les rétrovirus pourraient également être impliqués dans la pathologie puisque la protéine GAG de ces virus a été détectée dans la synovie de patients atteints de polyarthrite (Ziegler et al., 1989).

La prédominance de la PR chez les femmes dans la période de pré-ménopause comparativement aux hommes du même âge, ainsi que l'effet protecteur de la pilule contraceptive et de la grossesse, suggèrent que les hormones sexuelles jouent un rôle dans la pathologie (Lahita, 1990; Spector et al., 1990; Jorgensen et al., 1996; Kanik et Wilder 2000).

L'âge est un autre facteur qui pourrait être impliqué dans la maladie, étant donné l'augmentation de l'incidence de la PR à partir de la cinquantaine (Klippel et Dieppe, 1994).

Les auto-anticorps sont des facteurs considérés dans l'implication de la PR. La présence des facteurs rhumatoïdes de type IgM, IgA et IgG a été détectée dans le synovium des patients arthritiques (Maini et al., 1987). D'autres auto-anticorps ont aussi été observés tels que les anticorps anticollagène, antikératine, antinucléaires, etc.

Finalement, l'hypothèse la plus acceptée concernant la PR est qu'il s'agisse d'une maladie d'origine multifactorielle, qui requiert une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux initiant une maladie auto-immunitaire possédant des caractéristiques inflammatoires et destructives (Klippel et Dieppe, 1998; Koopman 2001). L'importance relative des différents facteurs pouvant mener à la maladie demeure inconnue.

1.1.2 Activation des lymphocytes T

Nous avons vu précédemment que la prédisposition génétique dans les locus HLA-DR peut avoir une contribution majeure dans l'induction de la PR. Étant donné que la fonction des CMH est de présenter le peptide aux cellules T CD4⁺, et que ces dernières infiltrent la synovie, il en va de soi de l'implication des cellules T dans la pathogénèse de

cette maladie (Panayai et al., 1992; Feldmann et al., 1996a). D'autres indices de la participation des cellules T sont leurs accumulations aux environs des capillaires synoviaux dans les stades précoces de la maladie (Kurosaka et Ziff. 1983) ainsi que l'expression de la protéine de surface CD45RO (caractéristique de cellules mémoires) par les cellules T isolées du liquide et des tissus synoviaux (Kohem et al., 1996; Weyand, 2000). Cependant, il n'est toujours pas connu à quel niveau de la maladie ces cellules sont impliquées. Toutefois, l'hypothèse la plus probante est celle de l'activation des cellules T CD4⁺ de type Th1 et Th2 par une cellule présentatrice d'antigène, une première étape dans l'initiation de l'inflammation de la synovie (Todd et al., 1988; Yocum, 1999).

1.1.3 Activation des lymphocytes B

Les lymphocytes activés T CD4⁺ de type Th2 sécrètent de l'interleukine 4 (IL-4), un activateur de la prolifération des lymphocytes B. D'ailleurs, l'IL-4 a été détecté par immunohistochimie dans les tissus synoviaux (Steiner et al., 1999). L'IL-4 a aussi pour effet de stimuler la sécrétion par les lymphocytes B de facteurs rhumatoïdes (auto-anticorps IgM et IgG reconnaissant la portion Fc des IgG) (Wernick et al., 1985) et d'autres auto-anticorps comme les anti-collagène de type II qui sont détectés chez 70% des patients en phase précoce de la maladie (Cook et al., 1994; Cook et al., 1996). Une fois sécrétés, les facteurs rhumatoïdes s'associent aux IgG et forment des complexes immuns activant le complément et attirant les leucocytes polymorphonucléaires, ce qui mène aux dommages tissulaires (Feldmann et al., 1996a).

1.1.4 Activation des macrophages, des synoviocytes, des chondrocytes et des cellules dendritiques

Quant aux lymphocytes T CD4⁺ de type Th1, leur rôle serait de promouvoir la stimulation des autres populations de cellules présentes dans l'articulation telles que les synoviocytes de type A et B, les macrophages, les cellules dendritiques et les chondrocytes, et ce, par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Une fois activées, ces dernières vont médier la destruction du cartilage et des os via le relâchement de cytokines, de prostaglandines et de protéases (Yocum, 1999). Le groupe de Steiner a démontré la présence d'interféron gamma (IFN- γ) dans les liquides synoviaux et au niveau des membranes synoviales de patients (Steiner et al., 1999). Cette démonstration couplée à la détection de TNF α (tumor necrosis factor α) des macrophages de patients présumément activés par l'IFN- γ (Philip et Epstein, 1986; Isomäki et Punnonen, 1997), appuie l'hypothèse de l'implication des T CD4⁺ Th1 dans la maladie.

En plus d'activer les cellules par la sécrétion de cytokines, les lymphocytes pourraient activer les macrophages par contact direct au niveau de l'articulation (Vey et al., 1996; McInnes et al., 1997; McInnes et al., 2000). Les macrophages jouent aussi un rôle important dans l'activation des cellules synoviales et des chondrocytes ainsi que dans l'inflammation en sécrétant des cytokines comme IL-1 β , le TNF α et l'IL-18 (Isomäki et Punnonen, 1997; Pulsatelli et al. 1999; Yamamura et al., 2001).

1.1.5 Hyperprolifération de la membrane synoviale

La membrane synoviale est composée des synoviocytes de type A ou "macrophage-like" et des synoviocytes de type B ou "fibroblast-like". Cette couche de

cellules devient hyperplasique lors de la pathologie. Normalement composée d'une à deux couches, elle augmente de 2 à 3 fois du nombre de cellules (Feldmann et al., 1996b). Ceci suggère l'acquisition d'un phénotype caractéristique aux cellules transformées. D'ailleurs, le groupe de Qu et al. a observé que les synoviocytes de type B des membranes synoviales de patients montraient des signes de prolifération active par l'observation de 3 marqueurs cellulaires soit : l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA), le c-myc et l'organisation nucléaire de ces cellules (Qu et al., 1994). De plus, la co-implantation d'une culture de fibroblastes arthritiques avec un explant de cartilage normal humain dans des souris SCID résulte en l'invasion de la matrice cartilagineuse par un tissu ressemblant au pannus retrouvé chez les patients. Ces données suggèrent que les synoviocytes arthritiques soient des cellules transformées ayant acquis des propriétés prolifératives et envahissantes (Geiler et al., 1994; Müller-Ladner et al., 1996). Une autre hypothèse soutenant le phénotype transformé des cellules est la détection de mutations somatiques au niveau du gène de suppression des tumeurs P53 le rendant non-fonctionnel. Celui-ci est surexprimé au niveau du synovium et dans les fibroblastes en culture de certains patients, mais ne jouerait pas son rôle de suppresseur de tumeur, suggérant que l'hyperprolifération des synoviocytes de type B soit due en partie à la perte de fonctionnalité de cette protéine (Firestein et al., 1996; Aupperle et al., 1998; Inazuka et al., 2000).

Certains facteurs de croissance pourraient jouer un rôle dans la transformation des cellules synoviales. Entre autres, le facteur de croissance PDGF (platelet derived growth factor) peut induire *in vitro*, la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage, lui suggérant un rôle dans la transformation des synoviocytes de type B (Lafyatis et al., 1989a). De plus, en présence d'indométhacine, l'IL-1 et le PDGF ensemble stimulent la

prolifération des fibroblastes (Kumkumian et al., 1989). Le TGF- β pourrait aussi être impliqué dans la prolongation de l'étape de prolifération et de la durée de vie des synoviocytes de type B. En effet, il a été démontré *in vitro* que le TGF- β pouvait induire une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et diminuer l'expression de la protéine Fas à la surface des cellules synoviales (Kawakami et al., 1996).

Nous avons vu précédemment qu'en plus des synoviocytes de type B, la membrane synoviale est composée des synoviocytes de type A ou "macrophage-like". Ces dernières proviennent de la moelle osseuse sous forme de monocytes qui migrent dans différents tissus où elles se différencient. En plus de leurs fonctions de phagocytose et de présentation d'antigène, ces cellules sécrètent plusieurs cytokines, des facteurs de croissance, des enzymes protéolytiques et des agents chimioattractants. Entre autre, les synoviocytes de type A sécrètent de hauts niveaux de TNF α et d'IL-1 β , deux cytokines inflammatoires majeures (Burmester et al., 1997). Ainsi, le rôle prédominant des synoviocytes de type A serait d'amplifier la cascade pathogénique en sécrétant ces cytokines (Firestein, 1996; Burmester et al., 1997). Les macrophages semblent également jouer un rôle important dans la néovascularisation de la membrane synoviale en sécrétant de l'IL-8, un inducteur important de l'angiogénèse (Koch et al., 1992).

1.1.6 Le pannus

Les réactions mentionnées ci-dessus sont importantes pour la formation du pannus (figure 1), un tissu inflammatoire envahissant qui détruit le cartilage et les os des patients arthritiques. Il est considéré comme une extension de la membrane synoviale et se forme aux points de contact entre la membrane synoviale et la matrice cartilagineuse (Allard et al.,

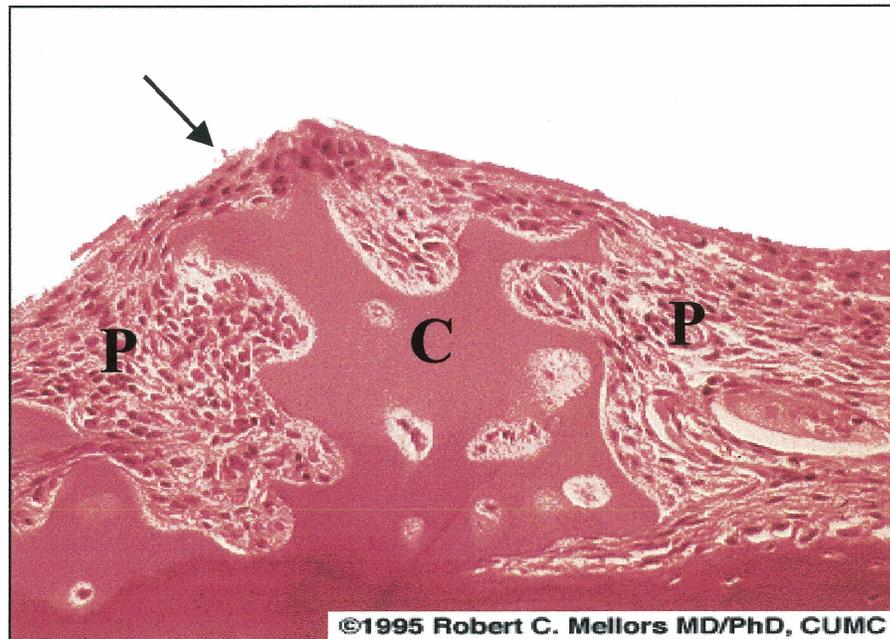


Figure 1. Infiltration du pannus au niveau du cartilage articulaire.

Coupe histologique d'une articulation de patient atteint de polyarthrite rhumatoïde colorée à l'hématoxyline-éosine. La flèche désigne la membrane synoviale hyperplasiée et enflammée qui s'étend à la surface du cartilage (C), soit le pannus (P). Ce dernier s'infiltré dans le cartilage et le dégrade au cours de sa progression vers la masse osseuse.

1990). Ce tissu est constitué majoritairement des synoviocytes de type A et de synoviocytes de type B mais aussi de pannocytes dont l'origine reste encore à être élucidé, de macrophages, de cellules T et de neutrophiles (Zvaifler et Firestein, 1994). Le pannus est fortement vascularisé et sa propriété envahissante et destructrice serait attribuable aux synoviocytes de type B possédant un phénotype transformé (Zvaifler et Firestein, 1994; Bresnihan, 1999).

1.1.7 Enzymes de dégradation

Les métalloprotéinases (MMPs) sont les médiateurs puissants de la destruction de l'articulation grâce à leur capacité à dégrader plusieurs substrats de l'articulation (Müller-Ladner et al., 1999). Ainsi, de nombreuses composantes de la matrice peuvent être attaquées simultanément, ce qui accélère la vitesse de destruction. De plus, les MMPs participent à la néovascularisation du pannus, permettant à ce dernier de s'accroître et de progresser dans son invasion (Szekanecz et al., 1998; Koch et al., 1998).

Parmi les MMPs impliquées dans l'arthrite, on retrouve la MMP-1, (Tetlow et al., 1998), la MMP-13 (Konttinen et al., 1999a), la MT2-MMP et la MMP-9 (Konttinen et al., 1999b), la MMP-3 (Yoshihara et al., 2000) et la MMP-8 (Hanemaaijer et al., 1997), et la MMP-2 et la MT1-MMP (Konttinen et al., 1998). La TIMP-2, un inhibiteur des MMPs, qui participe au complexe d'activation de la MMP-2, est également détectée au niveau des articulations atteintes (Konttinen et al., 1998).

Un autre groupe d'enzymes appartenant à la famille des MMPs, les agrécanases, sont impliquées dans la pathologie. Ces enzymes jouent un rôle majeur dans la dégradation de l'agrécan, un protéoglycan majeur du cartilage articulaire qui est responsable des

propriétés mécaniques telles que la capacité d'absorption des chocs et l'élasticité du cartilage (Van Meurs et al., 1999). L'agrécan peut être clivé par les agrécanases à 5 sites spécifiques, dont un majeur, à la séquence NITEGE³⁷³⁻³⁷⁴ARGSV (Tortorella et al., 2000a). Chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, des néoépitopes ³⁷⁴ARGSV (en N-terminale) et NITEGE³⁷³ (en C-terminale) dérivant du clivage de l'agrécan ont été observés dans le liquide synovial et au niveau de la matrice. (Sandy et al., 1992; Lohmander et al., 1993; Lark et al., 1997).

Tel que mentionné précédemment, les MMPs possèdent une grande diversité de substrats au niveau de la matrice, ce qui a un fort impact sur l'ampleur de la destruction des articulations. Par exemple, la MMP-1 dégrade spécifiquement le collagène de type I à III (Sun et al., 1999) alors que la MMP-2 peut dégrader la gélatine ainsi que plusieurs types de collagène dont le type IV et le type II, ce dernier étant la composante majeure des articulations (Konttinen et al., 1998). La MMP-13 montre une grande affinité pour le collagène de type II, mais dégrade également le type I et III (Knauper et al., 1996b) ainsi que l'agrécan (Fosang et al., 1996). La MMP-8 dégrade l'agrécan (Fosang et al., 1994), le collagène de type I et type II (Hanemaaijer et al., 1997) alors que les agrécanases, elles, clivent l'agrécan à des sites spécifiques (Tortorella et al., 1999; Tortorella et al., 2000a).

Le synoviocyte de type B serait le type cellulaire produisant la plus grande variété de métalloprotéinases, généralement suite à l'activation par le TNF α ou l'IL-1 (Bresnihan, 1999). Toutefois, les synoviocytes de type A, les chondrocytes et même les neutrophiles peuvent en sécréter. Ainsi, il existe différentes sources cellulaires de MMPs : la MMP-8 peut être retrouvée dans les granules des neutrophiles du liquide synovial (Harris et al., 1969; Konttinen et al., 1991). La MMP-2 est constitutivement produite avec la TIMP-1 par

les ostéoblastes humains (Meikle et al., 1995), et sont retrouvées dans le liquide synovial. D'ailleurs, le complexe MT1-MMP-TIMP1-MMP-2 est exprimé par les synoviocytes de type fibroblastiques et dans le pannus (Konttinen et al., 1998). De plus, la MMP-9 a été détectée dans des cultures d'ostéoblastes et la MMP-1, qui est localisée de façon prédominante aux sites d'érosions, est produite par les fibroblastes et les chondrocytes (Tetlow et al., 1998). Finalement, la MMP-13 est produite par les chondrocytes suivant une stimulation du TGF- β 1 (Moldovan et al., 1997). Ceci nous permet donc de réaliser que les métalloprotéinases sont exprimées par différents types cellulaires et tissulaires composant l'articulation, leur suggérant un rôle majeur dans la pathologie.

1.1.8 Molécules d'adhésion

L'attachement des synoviocytes de type B composant le pannus au cartilage et à l'os est une étape cruciale dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde. C'est d'ailleurs une caractéristique distinguant cette pathologie des autres formes d'arthrites présentant aussi des dommages au niveau des articulations (Müller-Ladner et al., 1996).

Les synoviocytes de type B arthritiques expriment une variété de molécules d'adhésion telles que la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1), le CD44 et les beta-1-intégrines (fibronectine et VCAM-1), permettant vraisemblablement leur adhésion à la matrice extracellulaire et la régulation du flux de cellules passant dans le liquide synovial (Kriegsmann et al., 1995; Wilkinson et al., 1993; Firestein, 1996; Bresnihan, 1999). Ces molécules d'adhésion pourraient permettre l'adhésion de cellules endothéliales à la matrice et à d'autres cellules telles que les lymphocytes et ce, via le ligand VLA-4. Les molécules d'adhésion participeraient également à l'attraction des leucocytes vers le synovium

enflammé ainsi que dans les zones d'angiogénèse observées dans la pathologie (Szekanecz et al., 1998). Un autre rôle important des molécules d'adhésions est de faciliter la migration du pannus à la surface et à l'intérieur du tissu cartilagineux et osseux (Werb et al., 1989; Werb et al., 1990) au fur et à mesure que ces derniers sont dégradés par les protéases.

1.1.9 Cytokines et facteurs de croissance

Jusqu'à maintenant, il a été possible de constater que les cytokines pro-inflammatoires et certains facteurs de croissances jouent des rôles clés dans le développement de l'arthrite, soit en activant des enzymes, en induisant la sécrétion d'autres cytokines, en induisant la prolifération et la division cellulaire. D'ailleurs, leur rôle dans la polyarthrite rhumatoïde a suscité beaucoup d'intérêts.

Ainsi, l'ajout d'anticorps anti-TNF α dans des cultures de synoviocytes provenant de patients arthritiques résulte en une baisse drastique de la productivité d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le GM-CSF, l'IL-6 et l'IL-8. Le blocage de l'IL-1 avec l'IL-1Ra induit la diminution d'IL-6 et d'IL-8 mais non de TNF α (Brennan et al., 1989; Feldmann et al., 1996a). D'autres études ont toutefois démontré la présence de cytokines anti-inflammatoires dans les articulations telles que le TGF- β (Fava et al., 1989; Wahl, 1994), l'IL-10 (Katsikis et al., 1994), l'IL-4 et l'IL-13 (Isomaki et Punnonen, 1997). Les inhibiteurs naturels de l'IL-1 et du TNF α , l'IL-1Ra et le récepteur du TNF soluble respectivement, sont aussi présent dans les articulations (Feldmann et al., 1996a, b), ce qui permet de proposer deux concepts. D'abord, le TNF α se retrouve à l'apex d'une cascade de production de cytokines pro-inflammatoires et deuxièmement, lors d'une inflammation chronique, il y aurait augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires

(Feldmann et al., 1996a), mais à un niveau moins élevé que les cytokines pro-inflammatoires.

En plus d'être situé au sommet de la cascade de cytokines, le TNF α est exprimé en grande quantité par plusieurs cellules de l'articulation arthritique telles que les synoviocytes, les lymphocytes, les cellules endothéliales et surtout les macrophages (Brennan et al., 1992), ce qui en fait la cytokine d'intérêt dans la pathologie.

D'autres études relèvent l'importance du TNF α dans la polyarthrite rhumatoïde en démontrant qu'il stimule la production de prostaglandine E (Akama et al., 1990), qu'il induit la prolifération des synoviocytes (Nakazawa et al., 2001), qu'il est impliqué dans l'augmentation d'expression des molécules d'adhésions (Tessier et al., 1993) et finalement, qu'il agit comme agent chimiotactique pour les neutrophiles et les monocytes (Isomäki et Punnonen, 1997). La surexpression de cette cytokine dans les souris cause le développement spontané d'arthrite destructive qui se rétablit par l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisant le TNF α (Keffer et al., 1991). Ces anticorps inhibent également le développement de synovite dans un modèle d'arthrite induit par le collagène chez la souris. (Williams et al., 1992). Bien que les traitements anti-TNF α diminuent l'inflammation, ils ne préviennent pas la dégradation du cartilage et des os (Joosten et al., 1999), suggérant que cette cytokine ne soit pas la seule impliquée dans la dégradation de la matrice caractéristique de la pathologie.

En plus du TNF α , d'autres cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-1 β , jouent un rôle dans la pathologie. L'IL-1 β induit, entre autres, la production de prostaglandine E et des collagénases par les synoviocytes et promouvoit la résorption osseuse *in vitro* (Dayer et

al., 1986; Gowen et al., 1983). Elle régule aussi à la hausse le GM-CSF et l'IL-6 par les synoviocytes (Alvaro-Gracia et al., 1991) qui sont aussi des molécules pro-inflammatoires.

Certaines molécules peuvent avoir des rôles pro- et anti-inflammatoire, comme l'IL-12, l'INF- γ et le TGF- β . Ainsi, le TGF- β induit l'expression de l'ARNm du collagène alors qu'il inhibe l'expression des collagénases dans les synoviocytes en culture (Lafyatis et al., 1989b) et il inhibe la prolifération des lymphocytes (Wahl et al., 1989). L'injection systémique de TGF- β prévient le développement de l'arthrite induite par le collagène chez le rat ainsi que les phases aiguës et chroniques de l'arthrite induite par des parois bactériennes (McCartney-Francis et al., 1994; Brandes et al., 1991), et ce, due à son effet immunosuppresseur. D'autre part, le TGF- β est chimiotactique pour les monocytes et lorsqu'il est injecté de façon locale dans les articulations de rats, il induit l'infiltration de cellules inflammatoire et l'hyperplasie de la membrane synoviale (Allen et al., 1990). Par ailleurs, le blocage du TGF- β par un anticorps neutralisant administré de façon locale à des rats dont l'arthrite est induite par des parois bactériennes, résulte en une diminution de l'inflammation (Wahl et al., 1993). Ces résultats présentent donc des effets différents de la neutralisation du TGF- β selon le traitement systémique ou local.

1.1.10 Modèle d'arthrite chez les animaux

Depuis les dernières années, les nombreuses recherches sur la PR ont permis de découvrir de nombreux médiateurs impliqués dans la pathologie. Toutefois les causes de la maladie sont toujours inconnues. C'est d'ailleurs pour cette raison, ainsi que par la nécessité de découvrir de nouveaux traitements plus efficaces, que les modèles d'arthrites chez les animaux ont été développés.

Bien qu'aucun modèle ne soit parfaitement identique à la PR, le modèle d'induction au collagène bovin de type II chez le rat ou la souris est un modèle expérimental reconnu puisqu'il induit des manifestations pathologiques ressemblant à celles observées chez les humains atteints de la maladie (Durie et al., 1994). Ainsi, la synovite avec infiltration de cellules polymorphonucléaires et mononucléaires, la formation du pannus, l'érosion du cartilage et des os ainsi que la fibrose sont observés (Myers et al., 1997; Williams, 1998). Chez ces rongeurs, les lymphocytes T et B jouent également un rôle majeur dans la progression de la maladie (Joe et Wilder, 1999). De plus, la susceptibilité de certaines lignées d'animaux serait liée à l'expression des haplotypes des CMH de façon similaire à l'hypothèse proposée pour la polyarthrite rhumatoïde humaine (Durie et al., 1994, Myers et al., 1997).

1.2 La furine, un prototype des convertases de proprotéines chez les mammifères

1.2.1 Historique de la découverte des convertases de proprotéines

La première étape dans la découverte des convertases de proprotéines remonte en 1967 alors que deux groupes ont émis l'hypothèse que les peptides hormonaux seraient synthétisés sous forme de précurseurs de haut poids moléculaire devant être clivés afin de relâcher leurs produits bioactifs (Chrétien et Li, 1967; Steiner et al., 1967).

Malgré plusieurs efforts, l'implication d'une endoprotéase dans la maturation de molécules précurseuses n'a été mise en évidence qu'en 1984. En effet, le groupe de Julius a démontré, à l'aide de la complémentation génétique de souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* mutantes pour le gène KEX2, que le produit de ce gène était nécessaire à la

maturation de deux molécules : la toxine mortelle (killer toxin) et le facteur alpha (Julius et al., 1984; Mizuno et al., 1988). L'analyse de la séquence en acide aminés du gène KEX2 a par la suite permis de constater que le domaine catalytique possède une similarité avec ceux de la famille des protéases bactériennes appartenant à la famille des subtilisines, suggérant que la protéine du gène KEX2 puisse avoir une activité de ce type (Mizuno et al., 1988). Finalement, la capacité de la kexine à cliver des protéines de mammifères à des sites dibasiques dont la proalbumine (Bathurst et al., 1987) et la prohormone neuroendocrine (Thomas et al., 1988), a permis de spéculer qu'il existe des enzymes analogues chez les mammifères.

Ainsi, la première convertase de proprotéines chez les mammifères, a été découverte en 1989 à l'aide de recherche à partir de bases de données de séquences homologues à la kexine (Fuller et al., 1989). Cette nouvelle enzyme, la furine, est encodée par le gène *fur* découvert 3 ans auparavant et nommé selon sa proximité au protooncogène *c-fes/fsp* (*c-fes/fsp upstream region*) (Roebroek et al., 1986a, b). Étant donné que la furine et la kexine sont hautement similaires au niveau de leur domaine catalytique de type subtilisine, des études de PCR utilisant des amorces dégénérées complémentaires aux séquences conservées dans les domaines catalytiques des subtilisines ont permis la découverte d'autres convertases homologues, soit la PC1 ou PC3 (Seidah et al., 1990; Seidah et al., 1991; Smeekens et al., 1991; Nakayama et al., 1991), la PC2 (Smeekens et Steiner, 1990; Seidah et al., 1990), suivie de la PACE4 (Kiefer et al., 1991), la PC4 (Nakayama et al., 1992; Seidah et al., 1992), la PC5/PC6 (Nakagawa et al., 1993; Lusson et al., 1993) et finalement la LPC/PC7/PC8/SPC7 (Meerabux et al., 1996; Bruzzaniti et al., 1996; Seidah et al., 1996; Constam et al., 1996). Puisque la furine a été la première

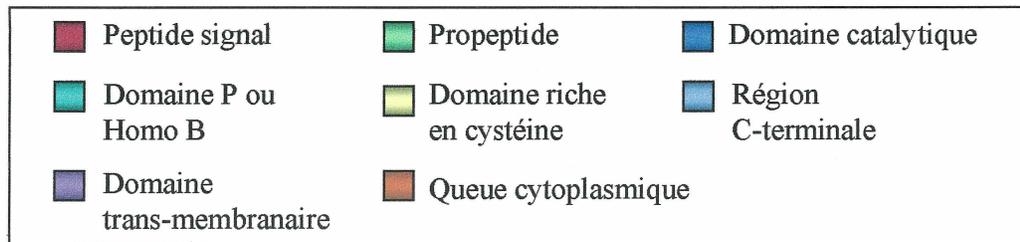
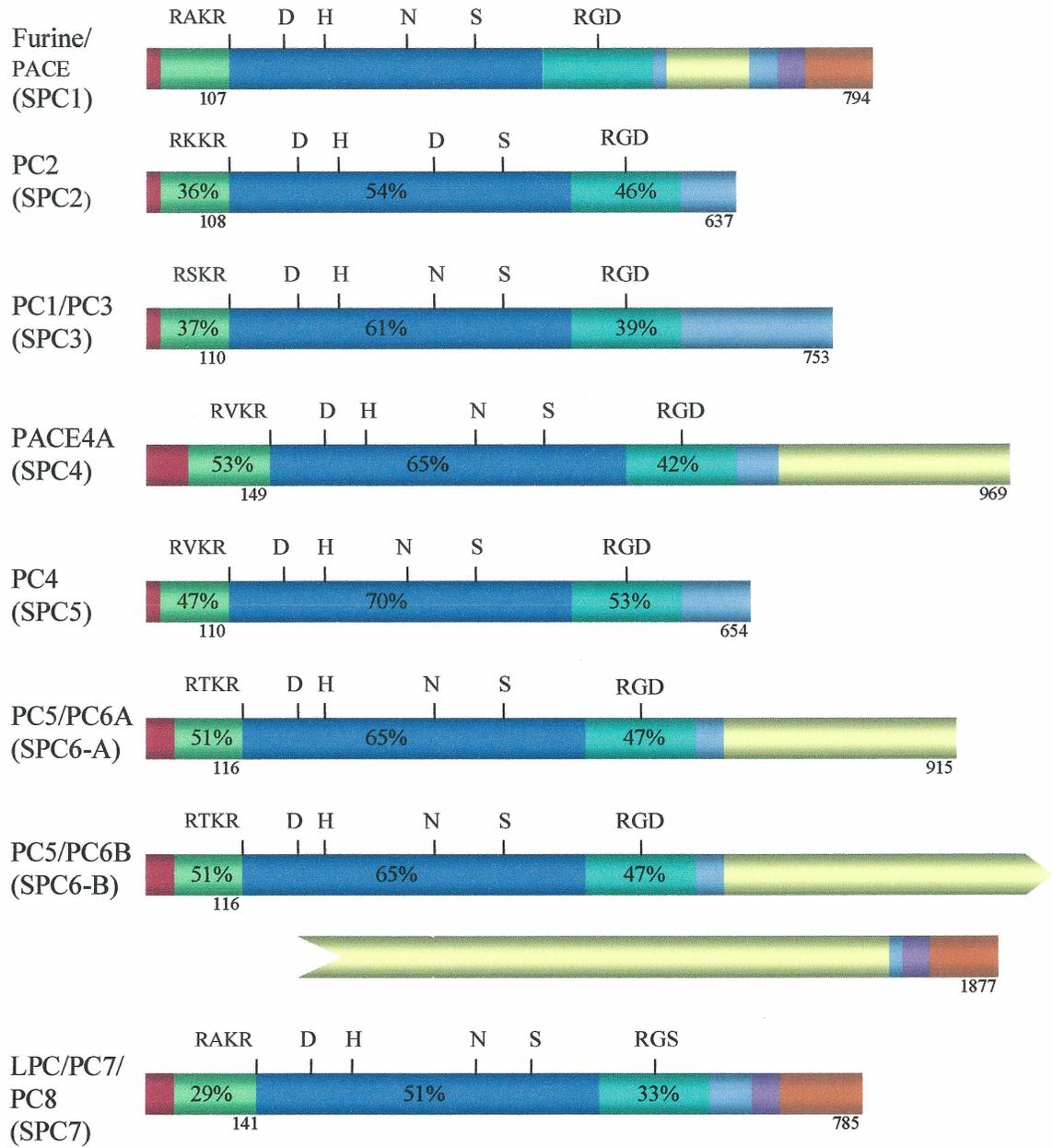
convertase identifiée chez les mammifères, elle est la mieux connue, ce qui en fait le prototype des convertases de mammifères.

1.2.2 Structure générale des convertases de proprotéines

Les sept convertases de proprotéines identifiées à ce jour partagent plusieurs caractéristiques structurales tel qu'illustré à la figure 2. D'abord, elles possèdent un peptide signal qui sert à diriger les peptides nouvellement synthétisés vers la voie de sécrétion. Elles possèdent aussi un domaine qui est clivé par autocatalyse en C-terminale de la séquence consensus Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg (Leduc et al., 1992; Creemers et al, 1993; Goodman et Gorman, 1994). Une fois clivé, le propeptide demeure associé à la convertase jusqu'à ce que celle-ci ait atteint sa destination, servant de pseudo-chaperonne afin d'assurer le repliement adéquat de la protéine. De plus, ce propeptide peut agir en tant qu'inhibiteur de la protéine. (Goodman et Gorman, 1994; Zhong et al., 1999). Le domaine catalytique de type subtilisine est une région hautement conservée chez les convertases des eukaryotes. Cette région comprend la triade catalytique typique des subtilisines composée des acides aminés Asp, His et Ser ainsi qu'un résidu Asn qui stabilise la cavité oxianiotique (Bryan et al., 1986). Le domaine P ou homo-B est un autre domaine conservé. Il contient la séquence de reconnaissance des intégrines : RGD, sauf chez PC7. Ce domaine sert à stabiliser le domaine catalytique (Lipkind et al., 1998) et il est essentiel au clivage des zymogènes (Hatsuzawa et al., 1992a; Creemers et al., 1993; Gluschankof et al., 1994; Zhong et al., 1996). De plus, ce domaine aurait un rôle à jouer dans la dépendance de l'enzyme au pH et au calcium, ainsi qu'à la spécificité de l'enzyme pour ses substrats (Zhou et al., 1998). Finalement la région C-terminale est le domaine le plus variable entre

Figure 2. Les membres de la famille des convertases à proprotéines.

Représentation schématique des différents domaines retrouvés chez chacun des membres de la famille des convertases ainsi que les pourcentages d'homologie par rapport à la furine. Au niveau du domaine catalytique, on retrouve la triade d'acides aminés essentiels à l'activité : Asp (D), His (H) et Ser (S) ainsi que le résidu interagissant avec le substrat dans la poche catalytique soit Asn (N) ou Asp (D) pour la PC2. De plus, on remarque que le motif RGD au niveau du domaine P est présent chez toutes les convertases.



Adapté de Nakayama, 1997

les convertases : la furine, PACE4, PC5/PC6 A et B y présentent un domaine riche en cystéines, et la furine, PC5/6B et LPC/PC7/PC8/SPC7 possèdent une portion transmembranaire dans cette région.

1.2.3 Localisation tissulaire et intracellulaire des convertases

La localisation des convertases dans les tissus est très diversifiée : la furine (Schalken et al., 1987; Day et al., 1993; Schafer et al., 1993; Zheng et al., 1994), PACE4 (Kiefer et al., 1991; Dong et al., 1995; Nagamune et al., 1995), PC5/PC6 (Nakagawa et al., 1993; Lusson et al., 1993; Dong et al., 1995) et LPC/PC7/PC8/SPC7 (Meerabux et al., 1996; Bruzzaniti et al., 1996; Seidah et al., 1996, Constam et al., 1996) sont exprimées dans une grande variété de tissus et de lignées cellulaires. L'expression des autres convertases est limitée à certains types particuliers de tissus. Les convertases PC1/PC3 et PC2 (Seidah et al., 1990; 1991; Smeekens et al., 1990, 1991; Nakayama et al., 1991; Schafer et al., 1993; Zheng et al., 1994, Nagamune et al., 1995; Marcinkiewicz et al., 1993; Marcinkiewicz et al., 1994) sont localisées dans les tissus neuroendocriniens tels que les îlots pancréatiques, les glandes pituitaires et surrénales et le cerveau alors que PC4 est retrouvée exclusivement dans les cellules spermatogéniques des testicules (Nakayama et al., 1992; Seidah et al., 1992; Torii et al., 1993).

Au niveau intracellulaire, les convertases peuvent être retrouvées dans différents compartiments. Par exemple, PC2 et PC1/PC3 sont exclusivement retrouvées dans les granules de sécrétion où elles interagissent avec les substrats de la voie régulée (Smeekens et al., 1992; Malide et al., 1995; Tanaka et al., 1996). La convertase PC5/PC6B peut aussi se retrouver dans les granules de sécrétion, mais elle est aussi observée en faible

concentration dans l'appareil de Golgi (De Bie et al., 1996). Deux autres convertases possédant un domaine transmembranaire sont retrouvées dans le réseau du trans-Golgi et les vésicules associées : la furine (Molloy et al., 1994; Schafer et al., 1995; Shapiro et al. 1997) et LPC/PC7/PC8/SPC7 (van de Loo et al., 1997; Bosshart et al, 1994; Wouters et al., 1998).

1.2.4 Régulation, expression et distribution tissulaire de la furine

Le gène *fur* encodant la furine est régulé par 3 promoteurs : le P1, P1A et P1B. Le promoteur P1 est inductible alors que les promoteurs P1A et P1B possèdent des caractéristiques de promoteurs constitutifs (Ayoubi et al., 1994). Au niveau de la régulation, le TGF- β 1 a été démontré comme inducteur de l'expression du gène *fur* des synoviocytes de rats (Blanchette et al. 1997). Cette régulation se fait par la voie des Smad (Blanchette et al. 2001a). De plus, une étude récente a démontré que la voie de p42/p44 des MAP kinase est impliquée dans l'activation du gène *fur* suggérant une interaction entre la voie des Smad et de p42/p44 MAPK dans la cascade d'activation (Blanchette et al., 2001b).

L'étude de l'expression d'ARNm de la furine au cours du développement embryonnaire de rats a démontré qu'elle est exprimée au niveau de l'endoderme et du mésoderme à partir du jour e7 et demeure stable jusqu'au jour e10, où son expression augmente au niveau du cœur et du foie. À partir de la moitié du stade embryonnaire jusqu'au stade final, l'expression de la furine s'étend dans les tissus périphériques (Zheng et al., 1994). Ce schéma d'expression coïncide avec l'expression du pro-TGF- β 1 (Lehnert et Akhurst, 1988) et du facteur de croissance de type pro-insuline (pro-insuline like growth factor) (Lee et al., 1990). De plus, l'inactivation du gène de la furine chez la souris mène à

la mort embryonnaire au jour e11-e12 causée par une insuffisance hémodynamique associée à des malformations au niveau du cœur et du système vasculaire ainsi qu'à l'incapacité d'entrer en rotation axial (Roebroek et al., 1998). Ces résultats suggèrent donc un rôle critique de la furine au niveau du développement, particulièrement dans la maturation de facteurs de croissance.

1.2.5 Maturation et localisation intracellulaire de la furine

La furine est synthétisée sous forme de précurseur inactif (figure 3). Le zymogène est clivé par autocatalyse intramoléculaire du côté C-terminale de la séquence consensus de reconnaissance furine : Arg-Thr-Lys-Arg¹⁰⁷. Cette maturation s'effectue dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Leduc et al., 1992; Creemers et al., 1993 Molloy et al., 1994; Vey et al., 1994; Creemers et al., 1995). Le propeptide demeure associé à la furine, agissant en tant qu'autoinhibiteur. Aussitôt que le complexe propeptide-furine se retrouve dans l'environnement acide (pH = 6) et riche en calcium du réseau trans-Golgien, le propeptide subit un deuxième clivage au site Arg⁷⁰-Gly-Val-Thr-Lys-Arg⁷⁵. Suite à ce clivage, les deux fragments se dissocient de la furine qui devient active (Anderson et al., 1997). Par des analyse immunocytochimiques, la furine a été localisée majoritairement dans le réseau du trans-Golgi (Molloy et al., 1994; Schafer et al., 1995; Shapiro et al., 1997) mais elle est aussi présente dans les vésicules de clathrine et à la surface membranaire (Schafer et al., 1995). De plus, il a été démontré que la furine circule du TGN à la surface de la cellule et vice-versa via les endosomes (Molloy et al., 1994; Jones et al., 1995; Liu et al., 1997). La localisation de la furine dans le TGN ainsi que le recyclage à partir de la surface cellulaire sont dues au domaine transmembranaire, puisque des études ont démontré

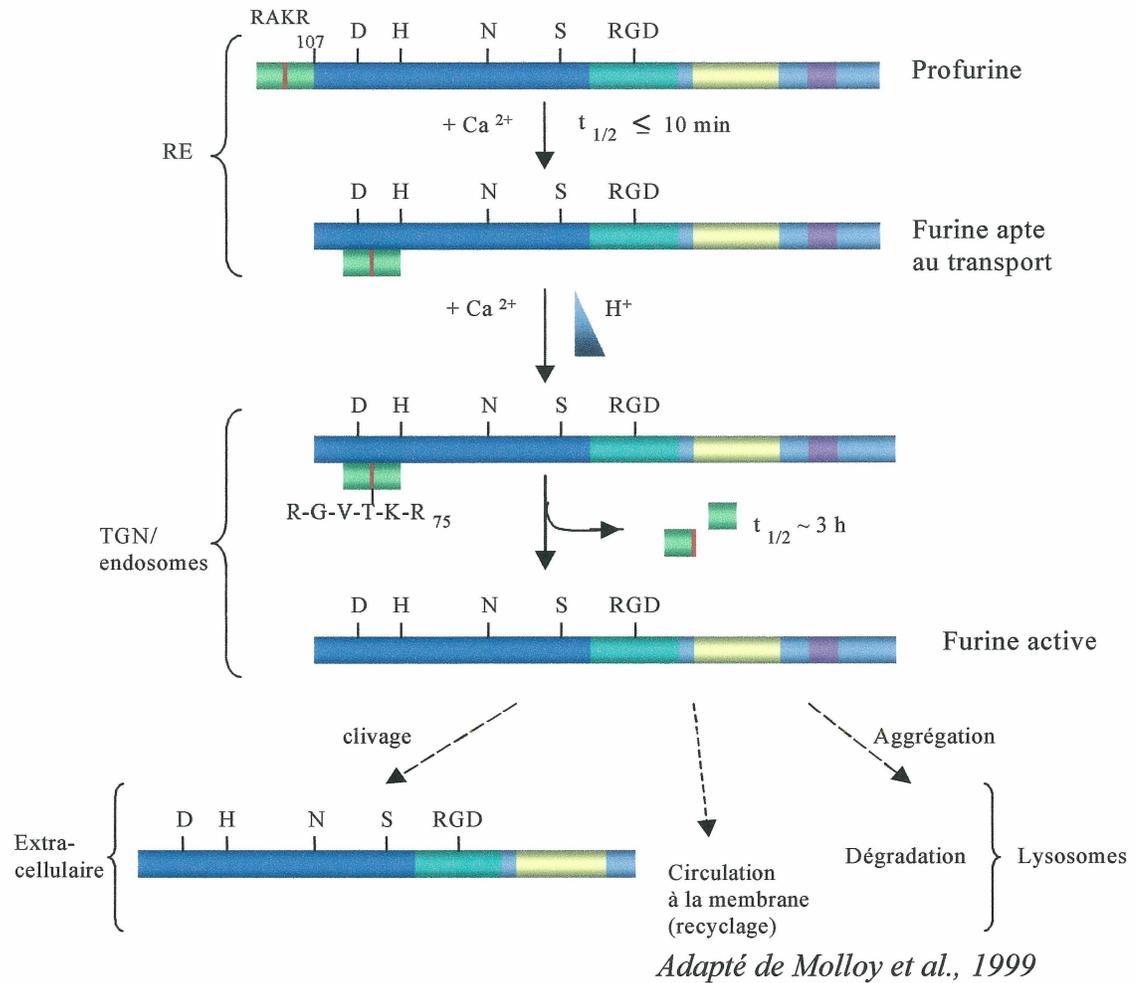


Figure 3. Étapes menant à l'activation de la furine.

A l'entrée du réticulum endoplasmique (RE), la furine subit un premier clivage en C-terminal du site Arg-Thr-Lys-Arg¹⁰⁷, lui permettant de quitter le RE. Toutefois le propeptide demeure associé à la furine. Arrivée au TGN, l'environnement riche en calcium et acide permet un deuxième clivage du propeptide au site Arg⁷⁰-Gly-Val-Thr-Lys-Arg⁷⁵. Suite à ce clivage, les fragments se dissocient de la furine qui devient active. Celle-ci peut s'accumuler dans le TGN pour ensuite être dégradée dans les lysosomes, être sécrétée suite à un clivage au niveau du domaine transmembranaire à une site non caractérisé, ou circuler jusqu'à la membrane cellulaire.

que la délétion de ce domaine cause une localisation aberrante de la furine (Bosshart et al, 1994; Schafer et al., 1995).

Par ailleurs, la furine peut aussi subir un autre clivage en amont de son domaine transmembranaire à un site encore inconnu. Il a été proposé que cette furine soit sécrétée, pour ainsi maturer des substrats extracellulaires (Wise et al., 1990; Vidricaire et al., 1993; Vey et al., 1994).

1.2.6 Les substrats de la furine

La furine possède une grande variété de substrats. Il est connu qu'elle reconnaît préférentiellement le site consensus Arg-X-Arg/Lys-Arg qu'elle clive de façon spécifique en C-terminale (Hosaka et al., 1991; Molloy et al., 1992). Cependant, une séquence minimale de reconnaissance Arg-X-X-Arg permet aussi le clivage de substrats par la furine, cependant avec une efficacité dix fois moins grande. (Klimpel et al., 1992; Molloy et al., 1992; Hatsuzawa et al., 1992b). Ce site minimal de reconnaissance augmente la diversité de substrats potentiels.

Le tableau 1 donne un aperçu des substrats de la furine. Ainsi, la furine clive différents types de molécules précurseurs telles que des facteurs et hormones de croissance (ex. le pro-TGF- β 1), des récepteurs (ex. le pro-récepteur de l'insuline humaine), des protéines plasmatiques (ex. la pro-albumine humaine), des métalloprotéinases de la matrice (ex. la stromélysine-3), des glycoprotéine de l'enveloppe virale (ex. la protéine gp160 du VIH), des exotoxines bactériennes (ex. la toxine de la diphtérie) et encore d'autres substrats non classifiés comme la pro-furine, la pro-7B2 de la souris, etc.

Tableau 1 : Proprotéines clivées par la furine

	P6		P4		P2	P1↓	P1'	P2'
Protéines sériques								
Proalbumine	R	G	V	F	R	R	D	A
Pro-facteur IX	L	N	R	P	K	R	Y	N
Pro-protéine C	R	S	H	L	K	R	D	T
Facteur du Pro-von Willebrand	S	H	R	S	K	R	S	L
Hormones et facteurs de croissance								
Pro-facteur de croissance neuronale	T	H	R	S	K	R	S	S
Précurseur du BMP-4	R	R	R	A	K	R	S	P
Pro-BNP	T	L	R	A	P	R	S	P
Hormone pro-parathyroïdienne	K	S	V	K	K	R	S	V
Pro-semaphorine D	K	R	R	T	R	R	Q	D
Pro-TGF β1	S	S	R	H	R	R	A	L
Récepteurs de surface cellulaire								
Pro-récepteur de l'insuline	P	S	R	K	R	R	S	L
Récepteur NOTCH 1	G	G	R	Q	R	R	E	L
Récepteur du facteur de dispersion	E	K	R	K	K	R	S	T
Pro-récepteur de la vitamine B 12	L	Q	R	Q	K	R	S	I
Protéine chaperonne								
Pro-7B2	Q	R	R	K	R	R	S	V
Protéines de la matrice extracellulaire								
BMP-1	R	S	R	S	R	R	A	A
rol-6 de <i>C.elegans</i>	S	N	R	V	R	R	Q	Q
sqt-1 de <i>C. elegans</i>	S	K	R	V	R	R	Q	Y
MT1-MMP humain	N	V	R	R	K	R	Y	A
chaîne α3 de l'intégrine	P	Q	R	R	R	R	Q	L
Profibrilline	R	G	R	K	R	R	S	T
Stromélysine-3	R	N	R	Q	K	R	F	V
XMMP de <i>Xenopus laevis</i>	K	I	R	R	K	R	F	L
ZP1	I	A	R	R	R	R	S	S
ZP2	S	L	R	S	K	R	E	A
ZP3α	A	A	R	R	R	R	S	S
Toxines bactériennes								
Toxine PA de l'Anthrax	N	S	R	K	K	R	S	T
Toxine α de <i>Clostridium septicum</i>	K	R	R	G	K	R	S	V
Toxine de la diphtérie	G	N	R	V	R	R	S	V
Proaérollysine	K	V	R	R	A	R	S	V
Exotoxine A de <i>Pseudomonas</i>	R	H	R	Q	P	R	G	W
Toxine de Shiga	A	S	R	V	A	R	M	A
Protéine d'enveloppe virale								
Ha du virus influenza	R	R	R	K	K	R	G	L
Virus de la maladie de Borna	L	K	R	R	R	R	D	T
gB du Cytomegalovirus	T	H	R	T	R	R	S	T
GP du virus Ebola Zaire	G	R	R	T	R	R	E	A
gB du virus Epstein-Barr	L	R	R	R	R	R	D	A
gp 160 du VIH	V	Q	R	E	K	R	A	V
Virus E2 de la bronchite infectieuse	T	R	R	F	R	R	S	I
M de l'encephalite B du Japon	S	K	R	S	R	R	S	V
Fo du virus de la rougeole	S	R	R	H	K	R	F	A
F du virus respiratoire-syncytial	K	K	R	K	R	R	F	L
Env du virus du Sarcome de Rous	G	I	R	R	K	R	S	V
M du virus de la fièvre jaune	S	G	R	S	R	R	S	V

Adapté de Molloy et al., 1999

Cette capacité à cliver différents substrats confère un rôle multifonctionnel à la furine. Celle-ci, comme il en a déjà été question, joue un rôle dans la maturation de proprotéines impliquées dans le développement, mais mature aussi des substrats impliqués dans la coagulation sanguine, la régulation hormonale et dans la régulation de la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, elle pourrait être impliquée dans différentes maladies telles que le sida ou la diphtérie, ou dans des maladies impliquant plusieurs substrats potentiels de la furine, telle que la polyarthrite rhumatoïde (hypothèse du laboratoire d'accueil).

1.2.6.1 Substrats furine connus ou putatifs ayant été étudiés dans l'étude

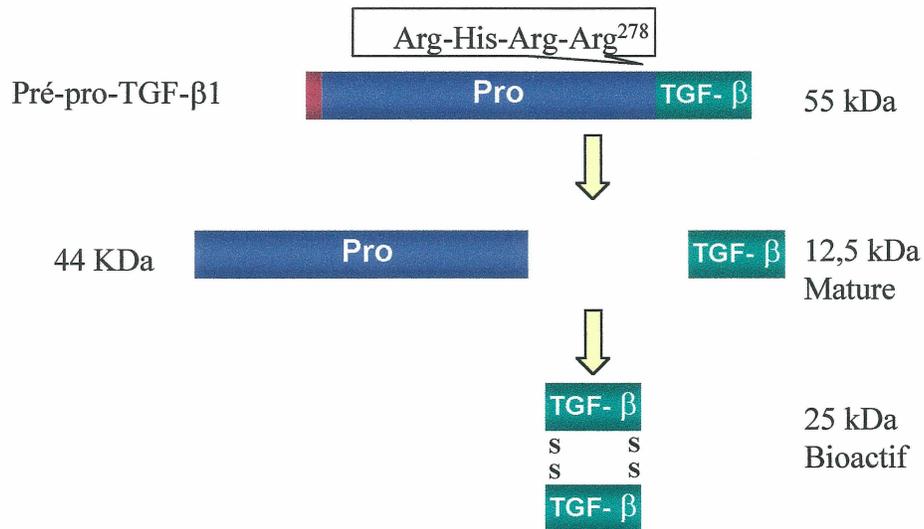
1.2.6.1.1 Le TGF- β 1

Le terme TGF- β (transforming growth factor beta) a été attribué voilà environ 20 ans aux protéines pouvant transformer le phénotype des fibroblastes non-néoplasiques de reins de rats, et pouvant induire la croissance indépendante de l'ancrage de fibroblastes de rats normaux en culture semi-solide (Todaro et al., 1980; Roberts et al, 1981). Trois isoformes du TGF- β sont exprimés chez les mammifères : β_1 , β_2 , β_3 (Derynck et al., 1985; Madisen et al., 1988; Derynck et al., 1988). Le TGF- β 1 est le prototype de la superfamille du TGF- β qui comprend plus de 30 membres dont les activines/inhibines, les BMPs (bone morphogenic protein), la sous-famille du TGF- β , le produit du gène de la *Drosophile decapentaplegic* (dpp), la substance inhibitrice de Mullerian et encore d'autres qui sont groupées selon leur similarités structurelles et fonctionnelles (Centrella, 1994).

Au niveau moléculaire, le TGF- β 1 est d'abord synthétisé sous la forme de précurseur biologiquement inactif qui doit subir un clivage protéolytique afin de relâcher la forme mature (figure 4). Il a été démontré dans le laboratoire du Dr Dubois que le pro-TGF- β 1 possédant un poids de 55 kDa est clivé enzymatiquement par la furine en C-terminale de la séquence Arg²⁷⁵-His-Arg-Arg²⁷⁸ (Dubois et al., 1995; Dubois et al., 2001). Suite à ce clivage, la pro-région de 44 kDa et la forme mature de 12,5 kDa sont relâchés. Il y aura ensuite formation de liens disulfures entre 2 monomères de 12,5 kDa pour former un homodimère de 25 kDa biologiquement actif (Assoian et al., 1983; Gentry et al., 1988). Une fois actif, le TGF- β 1 est alors impliqué dans l'induction de l'expression sa propre enzyme de conversion en stimulant l'expression du gène *fur*, formant ainsi une boucle d'amplification (Blanchette et al., 1997; Blanchette et al., 2001a; Blanchette et al., 2001b).

La localisation du TGF- β , une cytokine pléiotropique, et de ses récepteurs est ubiquiste. Le TGF- β est impliqué dans l'embryogenèse et dans la régulation du cycle cellulaire au début de la phase G1 (Derynck, 1994). Il est aussi impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse et dans l'induction de synthèse de composantes de la matrice extracellulaire (ECM) tels que la fibronectine, le collagène de type 1, le biglycan. D'autre part il régule à la baisse l'activité protéolytique responsable de la dégradation de la matrice (Gleizes et al., 1997).

Au niveau immunitaire, ce dernier est produit par toutes les populations de leucocytes et il contrôle la différenciation, la prolifération et l'état d'activation de ces cellules. Il participe à la réponse inflammatoire en modulant l'expression des molécules d'adhésion et en fournissant un gradient chimiotactique attirant les leucocytes et les autres cellules impliquées dans l'inflammation, suggérant un rôle important dans la pathologie de



Adapté de Dubois et al., 1995

Figure 4. Maturation du TGF-β1 par la furine.

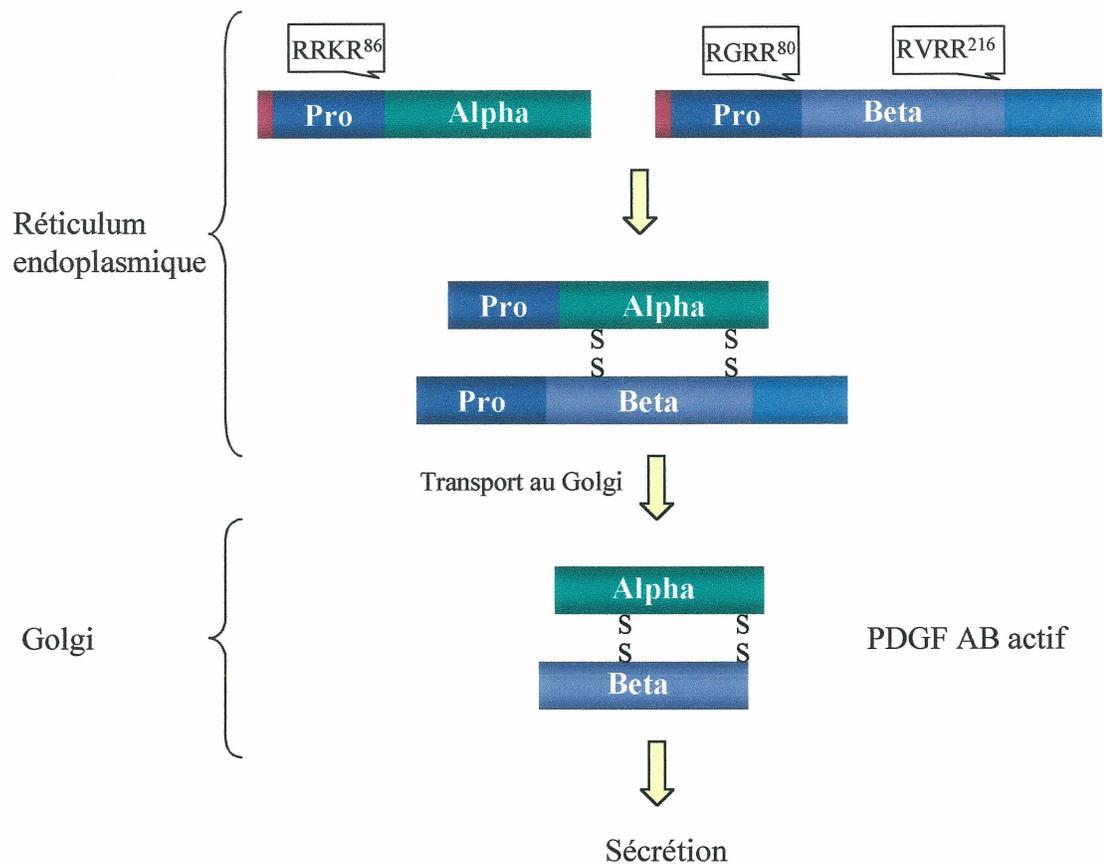
Le TGF-β1 est produit sous une forme de précurseur inactif de 55 kDa appelé pré-pro-TGF-β1. Celui-ci doit subir un clivage protéolytique par la furine en C-terminale de la séquence de reconnaissance de la convertase Arg-His-Arg-Arg²⁷⁸ et ce, au niveau du Golgi. Ce clivage permet le relâchement de la forme mature monomérique de 12,5 kDa. Ensuite, la formation de liens disulfures entre deux monomères matures (12,5 kDa) mène à la formation du TGF-β1 bioactif de 25 kDa.

l'arthrite. Toutefois, il régule cette réponse en inhibant ces cellules activées (Wahl et al., 1987; Fava et al., 1991; Letterio et al., 1998).

L'inactivation du gène du TGF- β chez les souris a montré l'évidence de son implication dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'inflammation puisque les souris développent des inflammations spontanées et meurent entre trois et cinq semaines suivant la naissance (Shull et al., 1992; Kulkarni et al., 1993).

1.2.6.1.2 Le PDGF AB

Le PDGF est une molécule composée de deux chaînes reliées par des ponts disulfures. Trois formes peuvent être retrouvées selon l'association des chaînes : le PDGF AA, le PDGF BB et le PDGF AB, cette dernière forme étant majoritaire. Les chaînes alpha et bêta du PDGF AB sont produites sous forme de précurseurs de 211 et 241 acides aminés respectivement (Betsholtz et al., 1986; Josephs et al., 1984). Ces chaînes sont ensuite liées pour donner lieu aux trois différentes formes. Ensuite le clivage protéolytique des deux chaînes résulte en la production du PDGF mature (figure 5) (Östman et al., 1988). La séquence en acide aminés des deux chaînes matures démontre que le clivage se fait en C-terminale d'un site putatif de reconnaissance furine : chaîne A : $^{83}\text{RRKR}^{86}$, chaîne B : $^{77}\text{RGRR}^{80}$ et $^{213}\text{RVRR}^{216}$ (Östman et al., 1988; Betsholtz et al., 1986; Robbins et al., 1983; Beckmann et al., 1988; Bywater et al., 1988). Toutefois aucune preuve directe n'a démontré clairement l'implication de la furine dans la maturation de ces chaînes. Cependant, des études dans le laboratoire du Dr Dubois indiquent qu'il y a absence de PDGF AB mature sécrété par les cellules Lovo, une lignée cellulaire ne produisant pas de furine active. La transfection de l'ADN encodant la furine de type sauvage restaure la production de PDGF



Adapté de Östman et al., 1988; Östman et al., 1992

Figure 5. Maturation du PDGF AB.

Les chaînes alpha et bêta composant le PDGF AB sont synthétisées sous forme de molécules précurseurs inactives. Une fois entrées dans le réticulum endoplasmique, les chaînes précurseurs forment des hétérodimères suite à la formation de lien disulfures. Les molécules sont ensuite acheminées au niveau de l'appareil de Golgi où elles subiront un clivage par la furine à chacun de leur site de reconnaissance de la convertase, pour finalement relâcher l'hétérodimère actif qui sera par la suite sécrété.

AB mature chez ces cellules, permettant de proposer le PDGF AB en tant que substrat de la furine.

Bien que les granules α représentent le réservoir principal du PDGF, ce dernier est également sécrété par les cellules endothéliales, les cellules vasculaires des muscles lisses, les monocytes et les macrophages activés et les fibroblastes (Kaplan et al., 1979; Dicorleto et Bowen-pope, 1983; Seifert et al., 1984; Shimokado et al., 1985; Heldin et Westermark, 1999).

Le PDGF possède plusieurs rôles biologiques. Les souris déficientes en chaînes B développent des malformations des reins avec absence de cellules mésangiales et des malformations des vaisseaux sanguin et du cœur. (Leveen et al., 1994; Soriano, 1994). Les souris déficientes en chaîne A démontrent des malformations aux alvéoles des poumons ressemblant à un phénotype d'emphysème grave et menant à la mort environ trois semaines suivant la naissance (Boström et al., 1996).

Le PDGF joue aussi un rôle dans l'angiogénèse cardiaque (Edelberg, 1998). Il participe à la coagulation sanguine en tant que régulateur négatif de l'agrégation plaquettaire (Vassbotn et al., 1994) et dans l'hémostase en participant à la maintenance de la pression des fluides interstitiels (Rodt et al., 1996).

Par ailleurs, il participe à l'initiation de la cicatrisation en agissant comme agent chimioattractant, puis il stimule les macrophages à produire et à sécréter d'autres facteurs de croissance impliqués dans ce phénomène (Ross et al., 1986). De plus, il stimule la production de protéines de la matrice telle que la fibronectine (Blatti et al., 1988; Sarkissian et al., 1998).

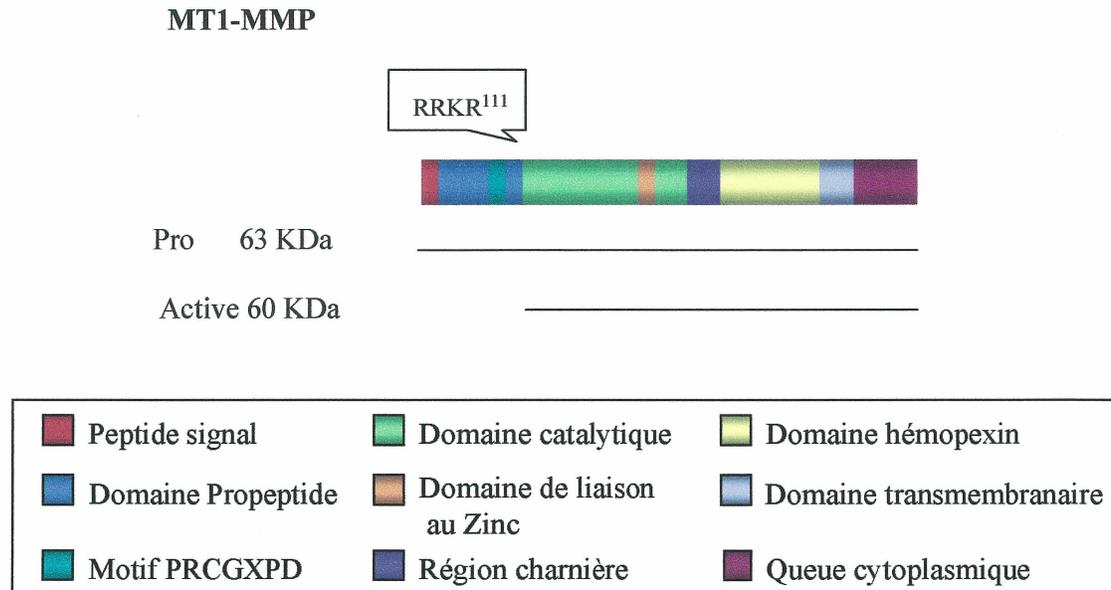
Au niveau de la genèse de la PR, nous avons vu qu'il agit en tant qu'agent mitogène en activant la prolifération des fibroblastes résultant en un phénotype de cellules tumorales (Lafyatis et al., 1989a). Ceci contribue ainsi à l'hyperplasie de la membrane synoviales et par conséquent à la formation du pannus (Feldmann et al., 1996b).

1.2.6.13 La MT1-MP

La description des substrats de la furine mène à discuter de 4 MMPs ayant attiré notre attention lors de cette étude étant donné leurs implications majeures dans la PR. Ces enzymes sont des endoprotéases dépendantes du zinc et du calcium aptes à dégrader plusieurs composantes de la matrice extracellulaire (MEC).

La première métalloprotéinase abordée diffère des autres enzymes de ce groupe puisqu'elle n'est pas sécrétée, étant plutôt transmembranaire. Il s'agit de la MT1-MMP (Membrane type 1 Matrix Metalloproteinase) ou MMP-14. Elle fait partie d'un sous-groupe de MMPs, les MT-MMPs comportant 6 membres à ce jour (Pei, 1999b).

Au niveau de sa structure (figure 6), la MT1-MMP possède un peptide signal, un domaine pro possédant une séquence hautement conservée PRCGXPD qui aide à stabiliser le zymogène dans un état catalytique inactif, un domaine catalytique contenant des sites de liaisons au zinc et au calcium qui sont nécessaires à l'activité catalytique de l'enzyme et un domaine hémapexin (Woessner, 1991; Birkedal-Hansen et al., 1993). La présence d'une queue cytoplasmique et d'un domaine transmembranaire la distingue des autres MMPs (Sato et al., 1994) en excluant les MT-MMPs (Will et Hinzmann, 1995; Takino et al., 1995; Puente et al., 1996; Pei, 1999a, b). Une autre particularité des MT-MMPs est la présence d'un site de reconnaissance furine à l'extrémité carboxyle du domaine pro. Il a ainsi été



Adapté de Yu et al., 1996

Figure 6. Représentation schématique de la MT1-MMP.

La MT1-MMP possède un peptide signal, un domaine pro contenant le motif hautement conservé PRCGXPD qui sert à stabiliser la molécule dans un état catalytique inactif. De plus, l'extrémité C-terminale de ce propeptide contient une séquence de reconnaissance par la furine Arg-Arg-Lys-Arg¹¹¹ permettant à la convertase de cliver la molécule afin de la rendre active. Elle possède aussi un domaine catalytique comprenant les sites de liaison au zinc et au calcium ainsi qu'un domaine hémopexin. La présence du domaine transmembranaire et de la queue cytoplasmique différencie les MT-MMPs (dont la MT1-MMP) des autres métalloprotéinases.

suggéré que les MT-MMPs soient synthétisées sous forme de précurseurs (63 KDa) qui nécessitent un clivage endoprotéolytique à l'extrémité C-terminale du motif de reconnaissance furine (Sato et al., 1999). La furine a d'ailleurs été démontrée, *in vitro* comme étant responsable de ce clivage, libérant une forme mature de 60 KDa (Pei et Weiss, 1996; Sato et al., 1996; Imai et al., 1996; Yana et Weiss, 2000). De plus, l'implication de la furine dans l'activation de la MT1-MMP a été observée de façon endogène, chez les cellules HT1080 ainsi que chez les fibroblastes du col utérin humain (Maquoi et al., 1998; Sato et al., 1999). Toutefois, le groupe de Sato et al., a démontré que la furine n'était pas impliquée dans la maturation de la MT1-MMP chez les fibroblastes du derme des lapins. Cette controverse, permet de suggérer que l'implication de la furine dans le processus d'activation de la MT1-MMP puisse dépendre des types de cellules impliquées (Sato et al., 1999).

Une fois activée, la MT1-MMP peut être impliquée dans la maturation/activation de deux autres MMPs: la MMP-2 (Sato et al., 1996; Kinoshita et al., 1996; Will et al., 1996) et la MMP-13 (Knäuper et al., 1996; Cowell et al., 1998). De plus, la MT1-MMP peut digérer plusieurs composantes de la matrice extracellulaire telles que le collagène de type I, II et III, la fibronectine, la vitronectine, le protéoglycan, et la gélatine (Pei et al., 1996; Ohuchi et al., 1997; d'Ortho et al., 1997), lui suggérant un rôle dans le remodelage de la matrice. Cette hypothèse a été appuyée par le groupe de Holmbeck qui ont inactivé le gène encodant pour la MT1-MMP chez la souris. Ces souris souffrent de dimorphisme crâniofacial, d'arthrite, d'ostéopénie, de nanisme et de fibrose des tissus conjonctifs lâches dû à l'absence d'activité collagénolytique qui est essentielle dans le remodelage des tissus squelettiques et des tissus conjonctifs extra-squelettiques (Holmbeck et al., 1999). Ainsi,

ces résultats illustrent la nécessité du remodelage de la matrice par la MT1-MMP pour le développement et le maintien adéquat des tissus associés au squelette.

1.2.6.1.4 La MMP-2

La seconde métalloprotéinase ayant été étudiée dans le cadre de ma maîtrise est la MMP-2 ou gélatinase A (figure 7 A). Cette MMP présente une structure de base similaire aux membres de la familles des MMPs et possède en plus trois domaines contigus de liaison à la fibronectine de type 2 insérés dans le domaine catalytique. Contrairement à la majorité des MMPs qui subissent une autoprotéolyse afin de devenir actives, la gélatinase A peut être activée à l'aide de la MT1-MMP. Chez certains types cellulaires, la MT1-MMP clive la pro-MMP-2 de 72 KDa en une forme intermédiaire de 64 KDa. Une autoprotéolyse s'ensuit permettant d'acquérir la forme active (62 kDa). Une redondance entre les MT-MMPs existe puisque la MT2-MMP et la MT3-MMP peuvent également cliver la gélatinase A de la même façon (Sato et al., 1997). D'autres activateurs de la MMP-2 sont connus. La protéine C pourrait activer directement la gélatinase A (Nguyen et al., 2000) de façon indépendante de la MT1-MMP. La thrombine pourrait elle aussi activer la MMP-2 cependant deux groupes de chercheurs sont arrivés à des conclusions controversées au sujet du mode d'activation. Le groupe de Nguyen et al. stipule que l'activation de la MMP-2 par la thrombine chez les cellules HUVEC se fait indépendamment de la MT1-MMP, puisqu'une forme active de MMP-2 de 59 KDa est observée en présence de phénantroline, un inhibiteur des métalloprotéinases (Nguyen et al., 1999). Le groupe de Lafleur et al. ont aussi démontré que la thrombine était impliquée dans la maturation de la MMP-2 des cellules HUVEC en bloquant cette maturation en présence d'hirudine, un inhibiteur

spécifique de la thrombine. Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs des métalloprotéinases (la phénantroline, le BB94, le BB3113, la TIMP-2 et la TIMP-4) bloque l'activation de la MMP-2 induite par la thrombine. Ainsi, ce groupe d'auteurs suggère que l'activation de cette métalloprotéinase par la thrombine se fasse de façon dépendante de la MT1-MMP (Lafleur et al., 2001). Finalement, ces résultats contradictoires suggèrent que le mécanisme d'activation de la MMP-2 par la thrombine nécessite d'être étudié plus en détails.

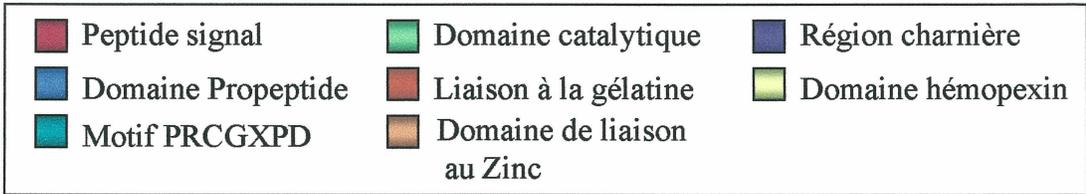
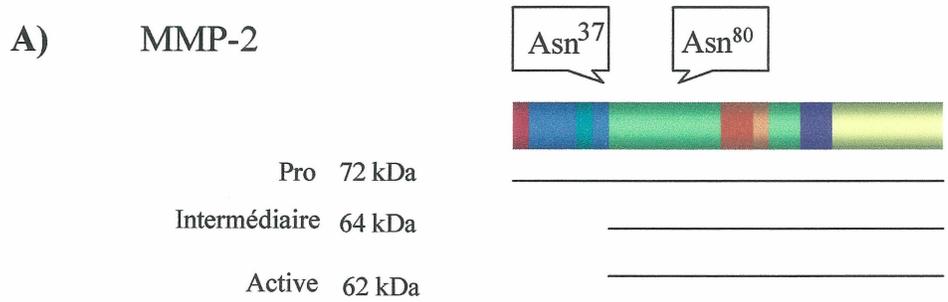
Le modèle d'activation de la MMP-2 par la MT1-MMP est celui qui a été le plus étudié jusqu'à présent (figure 7 B). Cette activation se fait au niveau de la membrane cellulaire et implique la TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase). D'abord, l'extrémité N-terminale de la TIMP-2 lie le site actif de la MT1-MMP qui est exprimée à la surface cellulaire et qui joue un rôle de récepteur (Butler et al., 1998).

Ensuite, la région C-terminale de la TIMP-2 lie le domaine hémapexin de la pro-MMP2 (Strongin et al., 1995; Butler et al., 1998; Fernandez-Catalan et al., 1998; Zucker et al. 1998; Hernandez-Barrantez et al., 2000; Toth et al., 2000). Ce complexe tertiaire permettrait l'association de la pro-MMP-2 avec la MT1-MMP membranaire (non liée à une TIMP-2) qui cliverait le lien peptidique entre l'asparagine 37 et la leucine en position 38 de la pro-MMP2 (Atkinson et al., 1995). Par la suite, le passage de la forme intermédiaire à la forme active se ferait par autoprotéolyse du lien peptidique entre les acides aminés Asn⁸⁰ et Tyr⁸¹ (Nagase et al., 1992; Strongin et al., 1993). Ainsi, l'activation de la pro-MMP-2 se fait à de faibles concentrations de TIMP-2 permettant la présence de MT1-MMP libre afin que celle-ci soit disponible pour activer la pro-MMP-2 (Jo et al., 2000).

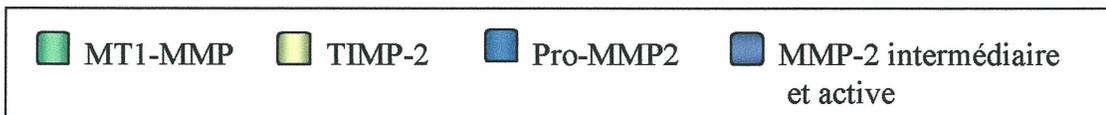
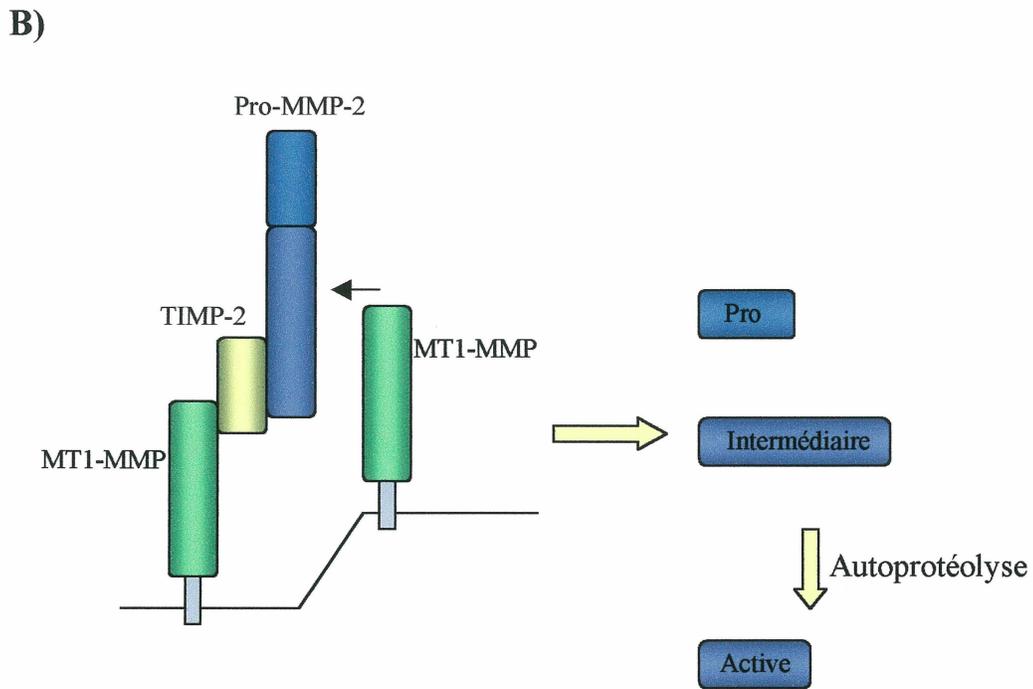
La localisation de la MMP-2 a été démontrée initialement à la surface de membrane plasmiques de cellules cancéreuses du pancréas humaines (Zucker et al., 1990)

Figure 7. Structure et modèle d'activation de la MMP-2.

La structure de la MMP-2 illustrée à la figure 7 A contient un domaine pro, un domaine catalytique, un domaine de liaison au zinc, ainsi qu'un domaine de liaison à la gélatine et finalement un domaine hémopexin. Cette métalloprotéinase est synthétisée sous une forme précurseur qui est clivé en C-terminale de son domaine pro au site Asn³⁷ pour donner une forme intermédiaire. Par la suite, une autoprotéolyse au site Asn⁸⁰ lui permet d'acquérir une forme active. Le modèle d'activation de la MMP-2 peut être observé en B. Ainsi l'extrémité N-terminale de la TIMP-2 lie le site actif de la MT1-MMP exprimée à la surface cellulaire. La région C-terminale de la TIMP-2 lie le domaine hémopexin de la Pro-MMP-2. Le complexe permet l'association de la pro-MMP-2 avec une MT1-MMP libre qui clive le domaine pro, relâchant une forme intermédiaire de MMP-2. Finalement, l'autoprotéolyse survient, relâchant la MMP-2 active.



Adapté de Seiki, 1999; Murphy et al., 1999



Adapté de Seiki, 1999

et des synoviocytes de type B de patients arthritiques (Okada et al., 1992). Elle a été par la suite retrouvée dans la plupart des tissus conjonctifs non enflammés, ce qui suggère un rôle dans le remodelage de la matrice (Beranger et al., 1994; Rodgers et al., 1994; Tournier et al., 1994; Creemers et al. 1998) étant donné sa capacité de dégrader une grande variété de composantes de la matrice telles que le collagène de type I, IV, V, VII, XI, le collagène dénaturé, l'élastine, le protéoglycan, la laminine et la fibronectine (Zucker et al., 1990; Woessner, 1991; Matrisian, 1992; Stetler-Sevensen, 1993). De plus, elle joue un rôle dans la coagulation en stimulant l'agrégation des plaquettes (Sawicki et al., 1997).

Durant le développement embryonnaire de la souris, les MT-MMPs, la TIMP-2 et la gélatinase A sont coexprimées dans les ostéoblastes des os en développement tels que de la mandibule, le maxillaire supérieur, le crâne, les côtes les fémurs ainsi que dans les chondrocytes des côtes et des fémurs. Elles sont aussi détectées au niveau du cœur et de l'intestin. De plus, la MMP-2 se retrouve sous forme active dans ces tissus (Kinoh et al, 1996). Ces résultats indiquent que le système MT-MMP-gélatinase A joue un rôle important dans le remodelage des tissus durant l'organogenèse. Par ailleurs, la MMP-2 active et la MT1-MMP sont aussi colocalisées au niveau de la matrice extracellulaire de patients souffrant d'ostéoarthrite, au niveau du pannus des patients arthritiques (Konttinen et al., 1998) et dans de nombreux tissus tumoraux tels que les tumeurs du poumon, de l'estomac, du colon et du sein. Ceci suggère que la MMP-2 et la MT1-MMP jouent un rôle important dans le développement du cancer et de l'arthrite.

1.2.6.1.5 La TACE et les agrécanases

La TACE et les agrécanases sont d'autres membres d'intérêt de la famille des MMPs, puisqu'elles sont des substrats potentiels de la furine et qu'elles sont impliquées dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde (figure 8).

Tel que son nom l'indique, la TACE (TNF α converting enzyme) ou ADAM-17 est l'enzyme de conversion du TNF α (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Cette enzyme appartient à la famille des ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) qui fait partie de la superfamille des metzincines regroupant les métalloprotéinases dépendantes du zinc (Stocker et al., 1995). Le clonage de cette enzyme a permis d'analyser sa composition en acide aminés et celle-ci démontre un site de reconnaissance de type furine 211 RVKR 214 entre le domaine pro et catalytique (figure 8 A) (Black et al., 1997, Moss et al., 1997).

L'implication de la furine dans la maturation de la TACE demeure hypothétique (Schlöndorff et al., 2000). Toutefois, des études dans le laboratoire du Dre Dubois utilisant des cellules LoVo, déficientes en furine active, ont démontré que la maturation de la TACE n'était que partielle en absence de furine. La complémentation génétique des cellules LoVo avec la furine sauvage induit la maturation complète de la TACE. De plus, d'autres convertases seraient impliquées dans la maturation de la TACE puisque l'utilisation d'inhibiteurs résulte en une diminution de la maturation de façon plus importante que celle observé en absence de furine seulement. Le clivage *in vitro* de peptide contenant le site de clivage de la TACE par la furine et PC2 confirme cette hypothèse.

La TACE induit la relâche du TNF α membranaire (Black et al., 1997) et comme lu précédemment, celui-ci joue un rôle majeur dans l'inflammation des patients arthritiques

Figure 8. Représentation de la structure de la TACE/ADAM17 et des agrécanases 1 et 2 humaines (ADAMTS-4 et ADAMTSA-5/ADAMTS-11).

La TACE et les agrécanases partagent des domaines similaires. Ainsi elles possèdent un peptide signal et un domaine pro qui pourrait potentiellement être clivé par la furine en C-terminale de leur domaine pro : RVKR²¹⁴ pour la TACE, RAKR²¹² et RRRR²⁶¹ pour l'agrécanase 1 et 2 respectivement. Elles ont aussi un domaine catalytique comprenant un site de liaison au zinc et un domaine de type désintégrine. Les structures différenciant la TACE sont la présence d'une région riche en cystéine, un domaine de type EGF, un domaine trans-membranaire et une queue cytoplasmique. Les agrécanases, quant à elle, possèdent un domaine thrombospondin de type 1 (tsp). De plus, l'agrécanase-2 possède également un sous domaine thrombospondin.

A)

Tace/ADAM-17

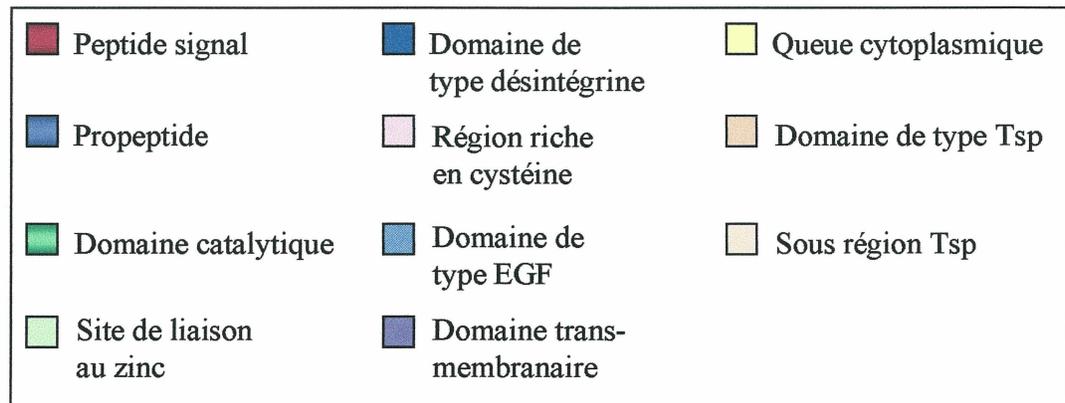


B)

Agrécanase-1/ADAMTS-4



Agrécanase-2/ADAMTS-5/ADAMTS-11



Adapté de Black et al. 1997; Abbaszade et al., 1999

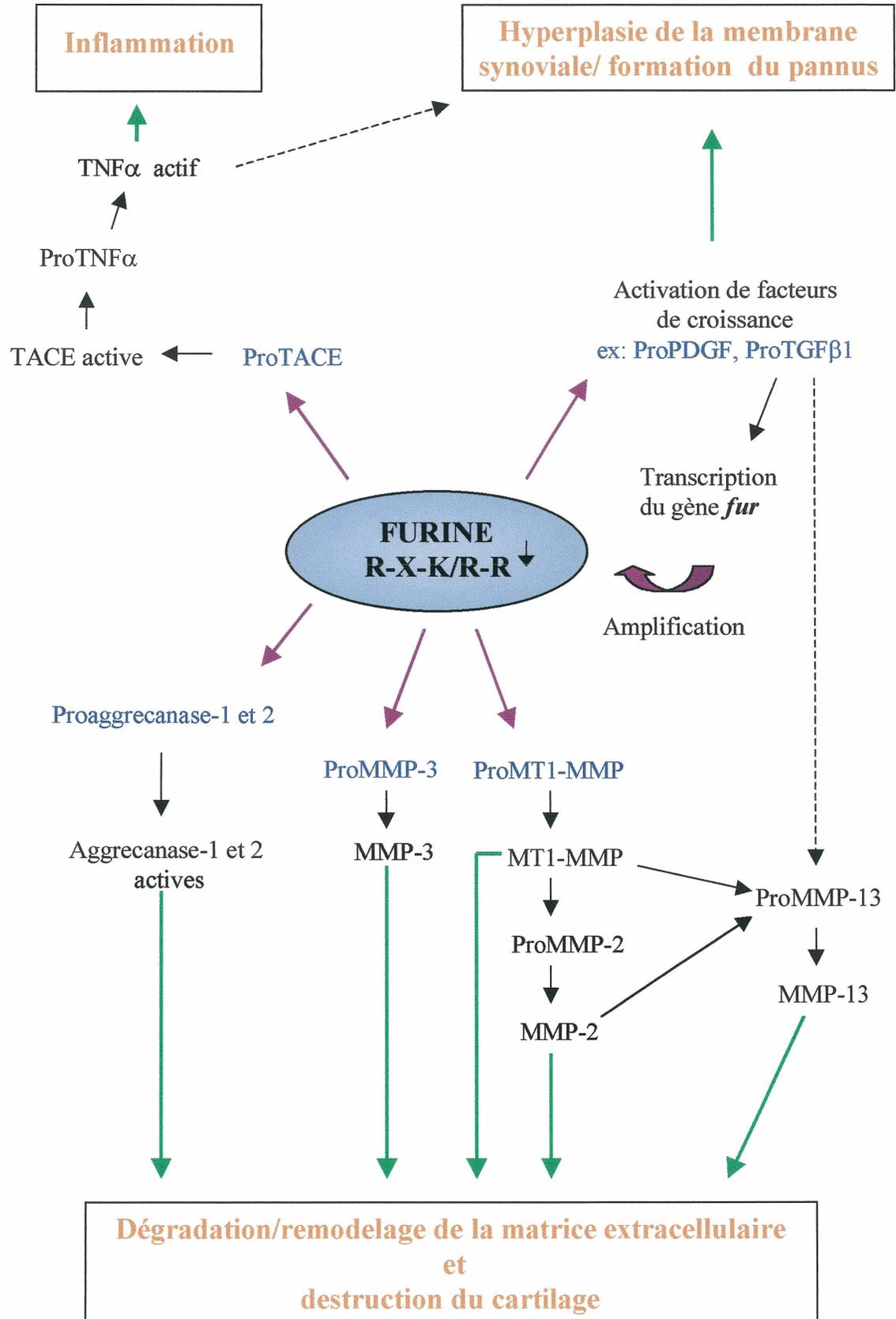
(Feldmann et al., 1996a). Ainsi, la maturation de la TACE par la furine pourrait avoir un impact dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde.

La dernière classe de MMPs comprend les agrécanases dont les gènes ont été récemment clonés. Jusqu'à ce jour, deux membres faisant partie de la famille des ADAMTS (ADAM with thrombospondin motif) sont connus : l'agrécane-1 (ADAMTS-4) et l'agrécane 2 (ADAMTS-11 ou ADAMTS-5) (Tortorella et al., 1999; Abbaszade et al. 1999). Au niveau de la structure (figure 8 B), elles possèdent une séquence signal, un domaine pro et catalytique, un domaine de liaison aux intégrines et un domaine COOH comprenant un motif thrombospondin qui est nécessaire à la reconnaissance de l'agrécane. (Tortorella et al., 1999; Abbaszade et al., 1999; Tortorella et al., 2000b). De plus, elles présentent un motif de reconnaissance furine à la jonction du domaine pro et du domaine catalytique : ADAMTS-4 : $^{208}\text{RAKR}^{212}$ et ADAMTS-5 : $^{257}\text{RRRRR}^{261}$. L'agrécane est une composante importante du cartilage qui permet la résistance à la pression mécanique. Nous avons vu précédemment que des néoépitopes formés suite au clivage de l'agrécane par les agrécanases sont observés dans le liquide synovial ainsi qu'au niveau de la matrice des articulations des patients arthritiques. Par ailleurs, l'agrécane est la première composante de la matrice dont la perte est mesurable et qui mène à la perte de fonction du cartilage. (Tortorella et al., 2000a).

Bien que la furine ne soit pas impliquée dans la maturation de toutes les molécules participant dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde, les informations disponibles laissent croire qu'elle pourrait maturer des substrats qui se trouvent au début de cascade la d'activation, participant ainsi à l'établissement et à la perpétuation de la maladie. La figure 9 résume l'implication potentielle de la furine dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde.

Figure 9. Résumé de l'implication potentielle de la furine dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde.

La furine pourrait être impliquée dans l'hyperplasie de la membrane synoviale et la formation du pannus, dans l'inflammation et dans la dégradation de la matrice selon la maturation/activation des substrats participant activement à ces événements.



1.3 L' α_1 -antitrypsine PDX, un inhibiteur puissant de la furine

La caractérisation des convertases a mené à la conception de nombreux inhibiteurs de ces protéases. Le groupe de Thomas et al. a généré un inhibiteur de type protéique spécifique à la furine, nommé α_1 -antitrypsine PDX (α_1 -PDX). Par mutagenèse dirigée, la séquence du site actif Ala³⁵⁵-Ile-Pro-Met³⁵⁸ de l' α_1 -antitrypsine a été remplacée par la séquence Arg³⁵⁵-Ile-Pro-Arg³⁵⁸, générant un site consensus de reconnaissance (Anderson et al., 1993). L' α_1 -antitrypsine de type sauvage est un inhibiteur physiologique de l'élastase qui fait partie de la famille des serpinines. (Perlmutter et al., 1989). La substitution limitée des acides aminés de l' α_1 -antitrypsine a permis à l' α_1 -PDX de conserver les propriétés biochimiques des serpinines (Dufour et al., 1998). Ainsi, l'inhibition des substrats se fait suite à la formation d'un lien stable entre deux résidus d'acides aminés qui sont situés dans le site actif de chacune des molécules. Ceci mène à la formation rapide d'un complexe irréversible qui est résistant à la chaleur et aux autres agents dénaturants. L' α_1 -PDX est considéré comme un inhibiteur suicide étant donné que sa liaison au substrat (furine) résulte soit en sa protéolyse, soit en la production d'un complexe SDS-stable qui inhibe l'activité enzymatique (Dufour et al., 1998; Jean et al., 1998). Le groupe de Benjannet et al. a démontré que l' α_1 -PDX progresse dans la voie de sécrétion constitutive et qu'il est localisé majoritairement dans le TGN sous une forme de 64 kDa. Toutefois, une forme de 56 kDa a été observée dans les vésicules de sécrétions (Benjannet et al., 1997).

Des études *in vitro* ont démontré que l' α_1 -PDX est un inhibiteur puissant de la furine avec une K_i de 0,6 nM. Il inhibe aussi la PC6B de façon moins importante, avec une

K_i de 2,3 nM (Jean et al., 1998). De plus, cet inhibiteur est incapable d'inhiber l'élastase qui est le substrat naturel de l' α_1 -antitrypsine de type sauvage (Anderson et al., 1993).

Par conséquent, la stabilité, la sélectivité ainsi que l'efficacité de l' α_1 -PDX suggèrent que cet inhibiteur puisse être utilisé comme agent thérapeutique afin de contrer l'activité de la furine.

1.4 La thérapie génique

Les recherches récentes sur la polyarthrite rhumatoïde ont permis de découvrir que certains facteurs tels des cytokines et enzymes de dégradation sont surexprimés lors de la pathologie. Des thérapies utilisant des protéines inhibitrices de ces agents en surexpression sont présentement offertes. Par exemple, l'injection d'anticorps neutralisant le TNF α résulte entre autres en une diminution des cytokines pro-inflammatoires (Maini et al., 1997). Toutefois, ces traitements requièrent des administrations répétées due à la courte demi-vie et ce, sur une longue période de temps. Également, la production d'anticorps par exemple, est très coûteuse et l'immunogénicité semble diminuer l'efficacité dans le temps. Par ailleurs, ces agents thérapeutiques doivent être injectés à des concentrations élevées, induisant parfois des effets secondaires tel que l'auto-immunité humorale (Robbins et al., 1998; Charles et al., 2000).

En plus de contrer les aspects négatifs de la courte demi-vie des protéines thérapeutiques, la thérapie génique pourrait permettre la biodisponibilité des molécules thérapeutiques de façon spécifique dans les tissus cibles (Pap et al., 2000; Evans et Robbins, 1999; Ghivizzani et al., 2001). Il existe différents vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, virus de l'herpès simplex et les virus adéno-associés) et non viraux (liposomes)

pouvant être utilisés pour délivrer des gènes thérapeutiques par des approches *in vivo* ou *ex-vivo*. Nous avons choisi de travailler avec l'adénovirus. Les avantages de ce système sont : l'obtention de titres élevés lors de la production des virus, la capacité de modifier leur génome afin de les rendre non répliatifs, leur expression transitoire dans les cellules et la capacité d'infecter des cellules en division ou au repos (G_0/G_1) (Lewis et mathews, 1980; Robbins, 1998; Evans et Robbins., 1999). Toutefois, les adénovirus sont immunogéniques. Ainsi il est impossible d'envisager un traitement répété. Afin de résorber ce problème, une deuxième génération d'adénovirus a vu le jour contenant une délétion en E4 en plus de celles en E1 et E3 afin de les rendre moins immunogènes, puis une troisième génération a été créée en déléant tous les gènes viraux, appelée "gutté vector ou null virus". Ainsi, certains groupes affirment que l'utilisation d'un virus de seconde génération atténue les effets de réponses immunes par l'hôte, et par conséquent diminue la toxicité et prolonge la présence du transgène *in vivo* (Wang et al., 1997 ; Ji et al., 1999 ; Qian et al., 2001). Toutefois il a été proposé que la délétion de la région E4 (vecteur de 3^e génération) soit responsable de la diminution plus rapide de l'expression du transgène (Wen et al., 2000; Andrews et al., 2001). Bien que les résultats obtenus avec ces nouvelles générations de virus semblent prometteurs, d'autres études doivent toutefois être réalisées afin de prouver leur potentiel pour des fins de traitement chez les humains.

Même s'il n'est pas encore prouvé que ces virus seraient sécuritaires pour fin de thérapie génique chez l'humain, ces vecteurs sont de merveilleux outils de recherche pour le travail chez les modèles animaux. En effet, lorsqu'il est important de prouver l'implication d'une protéine dans un mécanisme ou une maladie donnée, ils peuvent

permettent la surexpression de la protéine dans un tissu ciblé ou de façon systémique. Donc ils demeurent un outil fort utile au développement de concepts.

1.5 Objectifs et pertinence de recherche

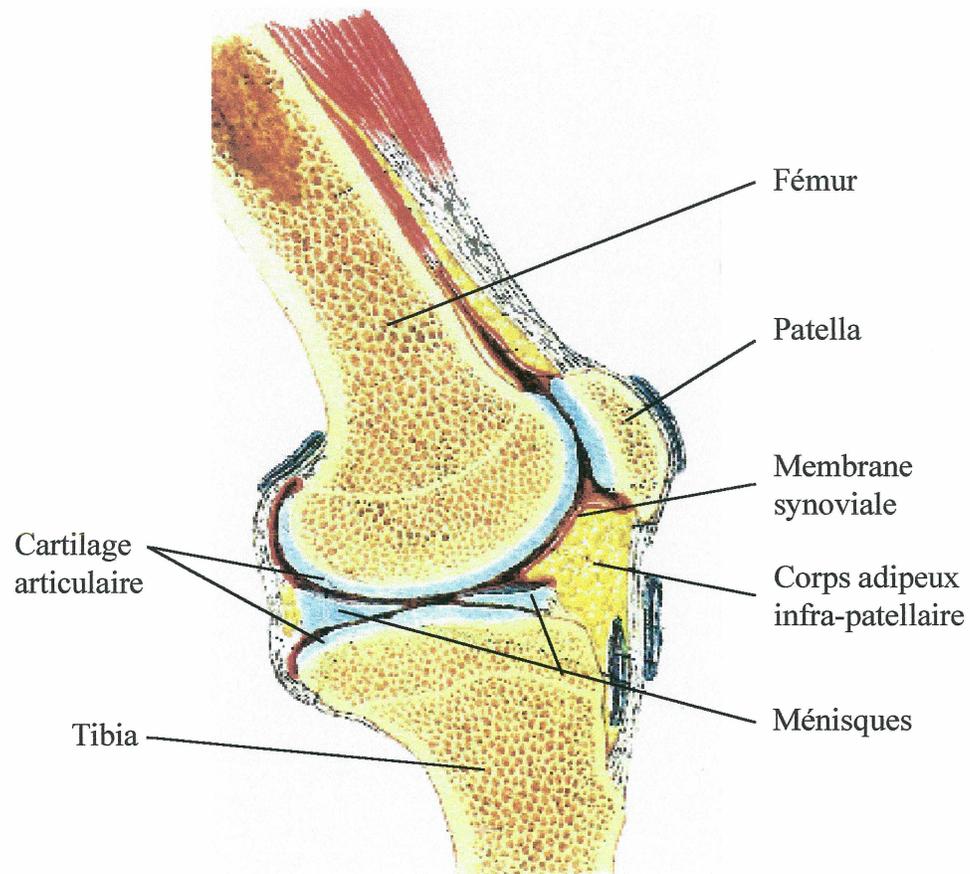
Il a été mentionné précédemment que la furine est responsable de la maturation de plusieurs substrats impliqués dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde dont certains facteurs de croissance (TGF- β 1, PDGF AB) et des métalloprotéinases (MT1-MMP, MMP-3, TACE et agrécanases). Afin de vérifier l'implication de la furine dans la polyarthrite rhumatoïde, un modèle d'arthrite induite par le collagène chez le rat a été développé dans notre laboratoire. Ainsi, des résultats préliminaires suggèrent que l'ARNm de la furine soit augmentée chez des membranes synoviales prélevées des rats arthritiques (Riendeau, 2000). Afin de vérifier l'impact de la furine dans le développement de la pathologie, un système adénoviral encodant l'ADNc de l' α_1 -PDX, un inhibiteur de la furine, a été construit et caractérisé chez les cellules 293.

Ainsi, les objectifs de mon projet de maîtrise consistaient 1) à vérifier la capacité d'infection de l'adénovirus AdTR5PDX ainsi que la production de la protéine α_1 -PDX chez les synoviocytes en culture primaire; 2) à déterminer l'impact de l'inhibition de la furine sur la maturation des substrats TGF- β 1, PDGF AB et MT1-MMP/MMP-2 produits par les synoviocytes; 3) à démontrer la fonctionnalité du système adénoviral *in vivo*, chez des rats arthritiques; 4) à démontrer que le système d'expression était modulable *in vivo*; et 5) à vérifier l'effet de l'inhibition de la furine dans le développement de l'arthrite induite au collagène chez le rat.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture primaire de synoviocytes de type B

Les rats Lewis femelles (100-124 gr) (HARLAN SPRAGUE DAWLEY INC., Indianapolis, IN, USA) ont été sacrifiés et les corps adipeux infra-patellaires (figure 10) recouvrants les membranes synoviales ont été prélevés et déposés dans des pétris contenant de la saline tamponnée au phosphate (PBS 1X ; 140 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) en présence de 1% d'antibiotique "Pen-Strep" (100 U de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine (SIGMA, Oakville, ON, CAN)). Ils ont été lavés dans le PBS 1X contenant 1% de "Pen-Strep" pendant 20 minutes sur la glace. Ensuite, ils ont été coupés en morceaux fins et digérés dans 2 µg/ml de collagénase de type IV (SIGMA) dissoute dans du PBS 1X contenant 1% de "Pen-Strep" et incubés pendant 2 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂. Ensuite, les morceaux de tissus ont été centrifugés pendant 10 minutes à 172 x g puis les culots ont été resuspendus dans du milieu DMEM-F12 ("Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutriment Mixture F-12 (HAM) (1 :1)"; GIBCO BRL, Burlington, ON, CAN) contenant : 20% de sérum de veau fœtal (FBS ; BIO-MEDIA Canada, Drummondville, QC, CAN), 2 mM de L-glutamine (GIBCO BRL), 40 µg/ml de gentamicine ("GARAMYCIN"; SCHERING CANADA INC, Pointe-Claire, QC, CAN), 1% de "Pen-Strep" et incubés à 37°C en présence de 5% de CO₂. Après deux semaines de culture, l'ajout de la solution de "Pen-Strep" a cessé et la concentration en sérum a été diminuée à 10%. Par visualisation au microscope inversé, une population homogène de cellules de type fibroblastique a été observée. Des études antérieures utilisant cette méthode de mise en culture ont démontré par microscopie électronique, par



Adapté de Netter F.H, 1997

Figure 10. Coupe sagittale de l'articulation du genou humain.

La membrane synoviale en rouge, tapisse les surfaces cartilagineuses et est recouverte d'un corps gras, le corps adipeux infra-patellaire.

ingestion de billes de latex et par marquage non spécifique d'estérase, qu'après 7 à 10 jours de culture, seuls les synoviocytes de types B poussent en culture, avec un taux d'impureté inférieur à 0,1% (Lafyatis et al., 1989a; Krey et al., 1976; Klippel et Dieppe, 1998).

2.2 Vecteurs adénoviraux

Les vecteurs utilisés pour la production des protéines d'intérêt dans cette étude sont des adénovirus recombinants humains de type 5 qui ont été construits lors d'un projet de maîtrise antérieur (Bouchard, 2000). La possibilité de réplication des virus est empêchée par la délétion des régions E1A et E1B. La région E3 a aussi été délétée afin de permettre l'insertion de gène dans le génome viral. Ainsi, la séquence codant pour l'ADNc de l' α_1 -PDX ou la furine a été insérée dans le site de clonage multiple du plasmide de transfert pAdTR5-DC-GFP et placée dans une cassette d'expression dicistronique contenant le gène rapporteur de la protéine verte fluorescente (GFP). Cette cassette d'expression est sous le contrôle du promoteur CMV (*cytomegalovirus*) modifié afin de le rendre régulable à la tetracycline (voir ci-dessous). Les virus ont été construits *in vitro* par recombinaisons homologues dans des cellules 293. Ils ont ensuite été amplifiés et resuspendus dans du milieu DMEM contenant 5% de FBS, 2 mM de L-glutamine et 40 μ g/ml de gentamicine. Une partie des virus a aussi été purifiée par gradient de chlorure de césium puis les sels ont été éliminés par dialyse en utilisant un tampon de purification (Tris 10 mM, pH 7,4, 1 mM $MgCl_2$, 10% glycérol).

Afin de produire le transactivateur nécessaire à l'induction de la transcription des gènes α_1 -PDX (ou furine) et GFP, un adénovirus, le AdCMVtTa, fournit par Docteur Bernard Massie est utilisé. Cet adénovirus possède les mêmes caractéristiques que le virus

décrit plus haut, cependant il ne contient pas de cassette d'expression dicistronique et il n'exprime pas la GFP. Le transactivateur (tTa) est produit de façon constitutive sous le contrôle du promoteur CMV. Il possède une forte affinité pour la tetracycline ou un analogue, la doxycycline. Lorsque l'antibiotique est présent, le tTa se lie à ce dernier et change de conformation. Ceci résulte en une perte d'affinité du tTa pour le promoteur CMV modifié, et par conséquent, la transcription des gènes d'intérêts est bloquée. Ainsi, cinq virus ont été utilisés lors de cette étude soit l'AdTR5GFP et l'AdCMVGFP qui servent de virus contrôles négatifs, les virus AdTR5PDX et l'AdTR5FUR, qui sont identiques à l'AdTR5GFP, mais qui encodent en plus l'ADNc de l' α_1 -PDX et de la furine respectivement. Finalement, le virus AdCMVtTa sert à produire le transactivateur.

Les titres des virus encodant la GFP (AdTR5GFP, AdTR5FUR, AdTR5PDX et AdCMVGFP) ont été évalués par la méthode de titration au cytofluorimètre développée par le groupe du docteur Massie (Massie et al., manuscrit en rédaction). Ainsi, un nombre donné de cellules 293S-tTA ont été infectées par différentes dilutions de la suspension virale à titrer puis le pourcentage de cellules infectées a été analysé en fonction de la dilution utilisée. À l'aide de la formule statistique de la Loi de Poisson, $\Pr(Y>0, N) = 1 - \exp(-N)$ où $N =$ espérance d'un nombre donné d'événements dans un domaine donné ($\text{MOI} = \text{virus exprimant la GFP (gtu)/cellule}$), $Y =$ observation d'un nombre donné d'événements dans un domaine donné (% de cellules infectées), il a été possible de tracer le graphique de $-\ln(1-Y)$ en fonction de V/C à partir des valeurs connues : le nombre de cellules (C) et le pourcentage de cellules infectées pour chaque dilution de virus (V). Le titre viral a été obtenu par le calcul de la pente de la droite. Ainsi, 1×10^6 cellules 293S tTA ont été déposées tôt dans la matinée dans les puits d'une plaque à six puits et infectées en fin de

journée avec différentes dilutions de la suspension virale à titrer. Les dilutions ont été faites en série dans un volume final de 9 ml de DMEM soit 1×10^{-3} , $3,33 \times 10^{-4}$, $1,11 \times 10^{-4}$, $3,7 \times 10^{-5}$, $1,23 \times 10^{-5}$, $4,11 \times 10^{-6}$, $1,37 \times 10^{-6}$. Le milieu de culture a été retiré des puits et 1 ml de chacune des dilutions a été ajouté en triplicata aux cellules pour l'infection. Vingt-quatre heures suivant l'infection, la fluorescence des cellules a été analysée au cytofluorimètre selon la méthode décrite plus haut.

Étant donné que le virus AdCMVtTa n'exprime pas la GFP, celui-ci a été titré par la méthode de plaque de lyse de cellules infectées en milieu semi-solide. D'abord, 3×10^5 cellules 293A ont étéensemencées, en fin de journée, dans des pétris de 60 mm dans du milieu DMEM contenant 5% de FBS. Le lendemain matin, le milieu des cellules a été enlevé et celles-ci ont été infectées en triplicata avec 1 ml des différentes dilutions de la suspension virale à titrer. Les dilutions ont été faites en série dans un volume final de 5 ml de DMEM soit 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} et 1×10^{-11} . Suite à une incubation de 90 minutes à 37°C, les suspensions virales ont été enlevées, les cellules ont été asséchées puis 5 ml de milieu contenant 5% de FBS et 1% d'agarose ("Sea Plaque Agarose"; MANDEL SCIENTIFIQUE COMPANY, Guelph, ON, CAN) a été ajouté aux cellules. Les pétris ont été laissés 15 minutes à la température ambiante afin de permettre la coagulation de l'agarose, puis ils ont été incubés à 37°C jusqu'à l'apparition de plaque de lyse, soit environ 7 à 15 jours. Afin de calculer le titre de la solution virale, les pétris présentant entre 10 à 100 plages de lyse ont été choisis. Ces plages ont été comptées et la moyenne des 3 pétris a été faite. Afin d'obtenir le titre en pfu/ml, le nombre de plaque de lyse a été multiplié par la dilution des pétris utilisés et divisé par le volume de la dilution ayant servi à l'infection.

2.3 Infection des synoviocytes

Selon le type d'analyse en vue, 500 000 cellules ont été distribuées dans des plaques de 6 puits (tests d'ELISA et analyses de cytofluorométrie) ou 2,5 X10⁶ cellules ont été déposées dans des pétris de 10 cm de diamètre (analyses d'immunobuvardage) dans du milieu DMEMF12 contenant 10% de FBS. Lorsque les cellules ont adhéré à la paroi, le milieu a été enlevé, les cellules ont été rincées au PBS 1X et les virus, dilués dans du milieu HSFM ("Hybridoma Serum Free Medium"; GIBCO BRL), ont été déposés sur les cellules. L'infection s'est effectuée dans un volume total de milieu HSFM de 600 µl pour les plaques de 6 puits et dans 2,4 ml pour les pétris de 10 cm. Les cellules ont été infectées à des MOI (Multiplicity of Infection) croissantes d'AdTR5PDX (variants de 0 à 250) et à une MOI de 50 d'AdCMVtTa. Le virus AdTR5GFP, qui sert de virus contrôle, a aussi été utilisé pour compléter l'infection à une MOI finale de 300. Les plaques ou pétris ont ensuite été déposés sur un balancier dont le mouvement a été réglé à 6 balancements par minute. Après huit heures d'incubation, les cellules ont été rincées au PBS 1X. Le milieu HSFM a été ajouté dans chaque puits à 1 ml/puits alors que pour les pétris de 10 cm, 4,2 ml ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées de nouveau pour une durée d'infection total de 48 heures. Toutes les incubations ont été faites à 37°C en présence de 5% de CO₂.

2.4 Analyse des protéines par immunobuvardage

A la fin de l'infection, les lysats cellulaires ont été préparés de la façon suivante : les surnageants ont été prélevés, les cellules ont été lavées au PBS 1X et décollées en

utilisant une solution de trypsine (0.05% de trypsine (GIBCO BRL), 136 mM NaCl, 2,68 mM KCL, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ et 0,5 mM EDTA disodique (SIGMA)). Par la suite, elles ont été resuspendues dans le tampon de lyse (50 mM NaPP, 10 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 10% NP-40 et 10% de cocktail d'inhibiteur de protéine ("Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail"; ROCHE, Laval, QC, CAN)).

Les lysats cellulaires ont ensuite été incubés pendant 30 minutes à 4 °C sur un rotor puis centrifugés pendant 30 minutes à 15000 x g à 4°C. Les surnageants ont été recueillis et le contenu en protéine a été dosé à l'aide d'un essai colorimétrique, selon les directives du fournisseur ("BCA™ proteins assay kit", PIERCE, Rockford, IL, USA). La lecture de la plaque a été effectuée à l'aide d'un lecteur de plaque automatique à une longueur d'onde de 550 nm ("Modèle 3550", BIO-RAD, Mississauga, ON, CA). Ensuite la concentration en protéine a été évaluée à l'aide du logiciel "Microplate Manager", inclus avec l'appareil. Quinze microgrammes de protéines ont été mélangées à un volume égal de tampon d'échantillon 2X (0,125 M Tris-HCl pH 6,8 , 4% SDS, 20% glycerol, 0,025% bleu de bromophenol et 10% 2-mercaptoethanol). Les échantillons ont été bouillis pendant cinq minutes et déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Le gel condensateur était composé d'une solution 4% bis-acrylamide (29,2% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide), 24% de tampon condensateur (0,5 M Tris-Base, 4% SDS, pH 6,8). Le gel séparateur contenait 10% de la solution bis-acrylamide (29,2% acrylamide, 0.8% Bis-acrylamide), 25% de tampon séparateur (4% SDS, 1,5 M Tris-Base pH 8,8). L'électrophorèse a été effectuée à 120 volts pendant 120 minutes à l'aide d'un appareil de migration électrophorétique de type "Mini-PROTEAN II CELL" (BIO-RAD, Mississauga, ON, CAN), dans un tampon d'électrophorèse (1% SDS, 25 mM Tris-Base, 0,25 M glycine). Les protéines séparées ont

ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose PVDF (ROCHE DIAGNOSTIQUE, Laval, QC, CAN) pendant 75 minutes à 110 volts à l'aide du tampon de transfert (25 mM tris-base, 0,2 M glycine et 20% méthanol). Suite au transfert, les membranes ont été bloquées pendant 30 minutes avec agitation à 24°C dans une solution composée de 5% de lait en poudre "CARNATION" (NESTLÉ, Don Mills, ON, CAN) et de tampon Tris salin (TBS) (137 mM NaCl, 25 mM Tris-Base, pH 7,5). Ensuite, les membranes ont été incubées pendant la nuit sur un rotor à 4°C avec un premier anticorps : un IgG de chèvre (1:500) dirigé contre l' α_1 -antitrypsine humaine (ICN BIOMEDICALS, Costa Mesa, CA, USA). Les membranes ont été lavées trois fois pendant 10 minutes à 24°C dans du TBS contenant 0,05% de Tween-20 (BIO-RAD). Ensuite les membranes ont été incubées avec le deuxième anticorps, un IgG anti-chèvre (1 :8000) couplé à la peroxydase (AMHERSHAM, Oakville, ON, CAN) pendant 3 heures à 24°C sur un rotor, puis elles ont été relavées au TBS-Tween tel que décrit plus haut. La révélation des bandes correspondant aux protéines ayant été liées par les anticorps a été faite à l'aide d'une trousse de révélation ECL (AMHERSHAM) selon les directives du fabricant. Suite à la révélation, les membranes ont été déposées dans une cassette d'exposition sur un film ("Hyperfilm ECL", AMERSHAM) afin de visualiser les bandes immunoréactives.

2.5 Dosage du TGF- β 1 biologiquement actif et du PDGF AB

Les surnageants recueillis suite aux infections ont été utilisés afin de mesurer la concentration des facteurs de croissances TGF- β 1 et PDGF AB relâchés par les synoviocytes. Le dosage se fait par la méthode d'ELISA "Enzyme Link Immunosorbant Assay" suivant les directives du fabricant ("Quantikine", R&D Systems, Minneapolis, MN,

USA). Pour la détection du TGF- β 1, le récepteur soluble recombinant humain du TGF- β est d'abord lié aux puits. Ce récepteur reconnaît trois isoformes du TGF- β biologiquement actif : le TGF- β 1 β 2 β 3. Par la suite, un anticorps polyclonal conjugué à la peroxydase de raifort spécifique au TGF- β 1 est ajouté. L'ajout des substrats de la peroxydase (peroxyde d'hydrogène et tetraméthylbenzidine) permettent la détection colorimétrique qui est proportionnelle à la quantité de TGF- β 1 lié.

Le système permettant le dosage du PDGF AB utilise un anticorps monoclonal murin spécifique à la chaîne A du PDGF. Cet anticorps est lié aux puits et il reconnaît alors les formes de PDGF AA et AB présentes dans les surnageants. Ensuite, un deuxième anticorps polyclonal, spécifique à la chaîne B du PDGF, lié à la peroxydase de raifort est ajouté. Ainsi, seules les formes de PDGF AB sont détectées. Comme ci-haut, les substrats de la peroxydase sont ajoutés et la détection colorimétrique permet le calcul de la concentration en PDGF AB.

2.6 Expression de la GFP in vitro

L'expression de la GFP a été mesurée au cytofluorimètre (FACScan, BECTON DICKINSON, San Jose, CA, USA). L'excitation de la fluorescence a été faite à 488 nm par un laser argon-ion et l'intensité de l'émission, captée par un filtre optique à 530/30 nm, a été mesurée.

Au préalable, les cellules infectées ont été rincées au PBS 1X puis fixées pendant 30 minutes à 4 °C dans la paraformaldehyde 2% (POLYSCIENCES INC., Warrington, PA, USA) diluée dans du PBX 1X. Dans ce cas-ci, la fixation est utilisée afin de neutraliser le virus. Les cellules ont été resuspendues dans du PBS 1X puis filtrées sur un coton filtre

(SEFAR, Ville Mont-Royal, QC). L'acquisition de cinq mille événements ainsi que l'analyse ont été faites à l'aide du logiciel CellQuest (BECTON DICKINSON)

2.7 Préparation de milieux conditionnés

Cinq cent mille cellules ont été infectées tel que décrit précédemment, à l'exception que les virus ont été en contact avec les cellules pendant 18 heures au lieu de 8 heures. De plus, un quatrième virus, l'AdTR5FUR, a été utilisé à une MOI de 250. Ensuite, les cellules ont été rincées au PBS 1X puis elles ont été stimulées avec 5 µg/ml de concanavaline A (SIGMA) dans 500 µl de HSFM pour 48 heures à 37°C, 5% CO₂. A la fin de la stimulation, les milieux conditionnés (MC) ont été récoltés et centrifugés à 15000 x g pendant 15 minutes afin d'enlever les débris cellulaires.

2.8 Étude de l'activité gélatinolytique

L'étude de l'activité gélatinolytique de la MMP-2 a été faite en utilisant les MC. Vingt µl de MC ont été mélangés à 5 µl de tampon d'échantillon (0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 10% SDS, 50% glycerol). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 15 minutes à 37°C et déposés sur un gel de polyacrylamide 10% contenant 0,1% de gélatine (ICN BIOMEDICAL INC, Aurora, Ohio, USA). L'électrophorèse a été effectuée à 110 volts, pendant 5 heures dans des conditions non-dénaturantes, à l'aide d'un appareil de migration électrophorétique de type "PROTEAN II xi Cell" (BIO-RAD). Ensuite, les gels ont été lavés 2 fois pendant 15 minutes à 24°C sous agitation dans une solution contenant 2,5% de "Triton X-100" (ICN BIOMEDICAL INC). Ils ont ensuite été rincés à l'eau distillée

jusqu'à ce qu'il ne reste plus de trace de savon, puis incubés en présence d'un tampon d'activation enzymatique (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM CaCl₂) à 37°C pendant 18 heures sous agitation lente. Suite à l'incubation, les gels ont été colorés à l'aide de la solution de coloration (0,5% bleu de Coomassie, 30% Méthanol, 10% Acide acétique glacial, 60% eau distillée) sous agitation lente pendant 30 minutes, puis décolorés par la solution de décoloration (30% Méthanol, 10% Acide acétique glacial, 60% eau distillée), jusqu'à ce que les bandes claires indiquant la dégradation de gélatine soient visibles. En guise de contrôle positif, un puits avait été chargé de 10 ng de MMP-2 recombinante humaine (CHEMICON INTERNATIONAL INC., Temecula, CA, USA). Cette protéine recombinante exprime la forme inactive et la forme active de la MMP-2. Ainsi, il est possible d'évaluer les différentes formes de MMP-2 présentes dans les différents échantillons en comparant la migration des bandes obtenues avec celle de la MMP-2 recombinante.

2.9 Induction de l'arthrite au collagène chez le rat (C.I.A)

Tel que mentionné à la section 1.1.10 de l'introduction, le modèle d'induction d'arthrite expérimentale au collagène bovin de type II est un modèle bien établi et caractérisé. Afin d'induire l'arthrite chez le rat, le collagène hétérologue bovin de type II (SIGMA) a été solubilisé pendant 18 heures à 4°C avec rotation dans 0,01 M d'acide acétique, filtré à l'aide d'un filtre de 0,22 µm ("MILLEX-GV"; MILLIPORE, Molsheim, FR), puis mélangé dans un volume égal d'adjuvant complet de Freund (SIGMA) pendant 20 minutes. Par la suite, un volume de 200 µl du mélange (250 µg de collagène final) a été injecté de façon intradermique à la base de la queue des rats Lewis femelles (100-124 gr)

(HARLAN SPRAGUE DAWLEY INC.). Les rats contrôles ont été injectés de la même façon avec un mélange composé de PBS et d'adjuvant complet de Freund utilisé à un ratio 1:1.

2.10 Évaluation de l'arthrite induite par le collagène

Afin de suivre le développement de la maladie, l'épaisseur du pied au niveau de la jonction entre le tarse et le métatarse ainsi que la largeur de la cheville ont été mesurées quotidiennement à l'aide d'un caliper (BEL-ART PRODUCTS, Pequannock, NJ, USA). La sévérité de la maladie a aussi été évaluée par l'index articulaire qui se définit par l'observation de rougeur et/ou d'enflure au niveau de la patte des rats et est établie de 0 à 4. Un index de 0 signifie qu'il n'y a aucun signe, 1 signifie que seulement la cheville est touchée, 2 signifie que la cheville et la moitié du tarse proximal sont atteints, 3 signifie que la cheville et le tarse et le métatarse sont inflammés et 4 signifie que l'inflammation s'étend de la cheville aux orteils.

2.11 Transfert de gène in vivo

Les rats ont été immunisés au collagène bovin de type II au jour zéro tel que décrit précédemment. Au jour 7, un groupe de rats a été injecté au niveau de l'articulation du genou alors que l'autre groupe a été injecté dans l'articulation de la cheville. Au préalable les virus purifiés AdTR5PDX, AdCMVtTa et AdCMVGFP ont été dilués dans le tampon de purification (Tris 10 mM pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 10% glycérol). Ainsi, trois préparations virales ont été faites : la première comprenait l'AdTR5PDX et l'AdCMVtTa (ratio 1 :1), la

seconde contenait l'AdCMVGFP et l'AdCMVtTa (ratio 1 :1), puis la troisième préparation contenait seulement l'AdCMVtTa.

L'injection au niveau des genoux s'est faite comme suit : les rats ont d'abord été anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange de ketamine (Kalean)/Xylazine (Xylamax) (les deux produits venants de la compagnie BIMEDA-MTC SANTÉ ANIMALE INC., Cambridge, ON, CAN). La kétamine est injectée à 87 mg/Kg alors que la posologie de la xylazine est de 13 mg/Kg. Ensuite, 7,4 µl (équivalent à une MOI de 6×10^8) du mélange de virus AdTR5PDX-AdCMVtTa ont été injectés dans les articulations des genoux de rats à l'aide de seringues à chromatographie (HAMILTON, Reno, Ne, USA). Les rats contrôles ont reçu 7,2 µl (MOI de 3×10^8) d'AdCMVtTa seulement. Afin de vérifier que le système est bien réglable in vivo, certains rats injectés avec le mélange viral AdTR5PDX-AdCMVtTa ont reçu 1 mg/ml de doxycycline (SIGMA) dans l'eau. L'administration de l'antibiotique s'est arrêtée 7 jours suivant l'injection des adénovirus pour une partie du groupe de rats afin de vérifier la reprise potentielle du système viral. L'administration d'antibiotique s'est poursuivie pour l'autre partie du groupe. Aux jours 7, 15, 21 et 24 suivant l'injection des virus, les rats ont été sacrifiés, puis les corps adipeux infra-patellaires ont été prélevés. Pour l'analyse par RT-PCR, ils ont été congelés dans l'azote liquide alors que pour l'analyse par microscopie à fluorescence, ils ont été recueillis dans du PBS 1X sur glace.

Pour l'injection dans l'articulation de la cheville, les virus ont été préparés tel que mentionné plus haut. Les rats contrôles ont reçu 8,2 µl (MOI de 6×10^8) du mélange viral AdCMVGFP-AdCMVtTa, à l'articulation de la cheville gauche alors que celle de la

cheville droite a reçu 7,4 µl (MOI de 6×10^8) du mélange de viral AdTR5PDX-AdCMVtTa. Les rats contrôles ont été injectés avec 8 µl de PBS 1X. Par la suite, l'évaluation du développement de la maladie a été observée tel que décrit à la section "évaluation de l'arthrite induite par le collagène", tout en comparant la patte droite par rapport à la patte gauche qui sert de contrôle.

2.12 Expression de la GFP in vivo

Les niveaux de production de GFP par les synoviocytes de genoux de rats injectés aux adénovirus ont été analysés par microscopie à fluorescence. Les tissus ont été examinés avec un microscope confocal à balayage (NORAN INSTRUMENTS INC., Middleton, WI, USA) muni d'un laser au krypton/argon et couplé à un microscope inversé avec un objectif 40X (NIKON Japon) à immersion d'huile. La fluorescence des cellules a été excitée à 488 nm et l'émission a été mesurée en utilisant le filtre 525-550 nm pour le FITC. Les sections optiques ont été captées à des intervalles de distance de 1µm sur une épaisseur totale de balayage de 200 µm avec une ouverture de 25 µm de l'orifice du laser. Les images numériques obtenues (128 prises d'images au total) et ont été traitées avec le logiciel INTERVISION (NORAN INSTRUMENTS INC.) sur une station informatique Silicon Graphics O2 opérant avec le système d'exploitation UNIX

2.13 Analyse par RT-PCR

L'ARN des corps adipeux infra-patellaires (comprenant la membrane synoviale) des rats injectés aux adénovirus a été isolé à l'aide du "TRI-reagent" (MOLECULAR

RESEARCH CENTER INC, Cincinnati, OH, USA). Ils ont d'abord été homogénéisés dans la solution de TRIZOL puis les étapes subséquentes ont été faites selon les directives du fabricant. La concentration finale en ARN a été dosée au spectrophotomètre.

Pour la transcription inverse (RT), 2,5 µg d'ARN, 1 pM de décamères alléatoires (AMBION, Austin, TX, USA), 1 mM de dNTP, 1X de "First-Strand Buffer" (GIBCO BRL) et 200 U de "Superscript II" (GIBCO BRL) ont été additionnés dans un volume final de 20 µl. La réaction s'est déroulée pendant une heure à 42°C. Pour l'amplification de l'ADNc, 2,5 µl de RT, le tampon de PCR 1X (QIAGEN INC, Mississauga, ON, CAN), 1 mM de dNTP, 50 pmole de chacun des oligonucléotides de synthèse 3' et 5' et 1,5 U de taq polymérase (QIAGEN INC) ont été préparés dans un volume final de 50 µl complété avec de l'eau. La réaction de PCR a été faite pendant 35 cycles aux conditions suivantes : 30 s à 94°C, 30 s à 60°C et 1 min à 72°C. La réaction a été précédée d'une étape de dénaturation pendant 1 minutes à 94°C et terminée par une étape d'élongation à 72°C pendant 6 minutes. Le 18S a été utilisé en guise de contrôle interne de la réaction de PCR. Les produits de PCR ont ensuite été migrés sur un gel d'agarose 1,5% contenant 0,33 µg/ml de bromure d'éthidium, permettant la détection des bandes d'ADN lors de la visualisation aux UV.

Afin de s'assurer d'amplifier seulement l'ADNc du PDX produit par le vecteur adénoviral, nous avons pris avantage de la séquence correspondant à "l'internal ribosome entry site (IRES)" pour y produire un oligonucléotide antisens: 5' GATGAGAAAGGGACTGAAGCTG 3' spécifique à la construction adénovirale tandis que la séquence de PDX a servi à produire l'oligonucléotide sens: 5' GTCGCTACAGACGTTGTTTGTC 3'. Ceci permet d'amplifier un fragment de 479 paires de bases. L'IRES est situé dans la cassette d'expression dicistronique entre la fin de la

séquence de PDX et le début de celle de la GFP et permet la synthèse d'un long ARNm. Pour le 18S, l'oligonucléotide sens 5' AGGAATTGACGGAAGGGCAC 3' et l'antisens 5' GTGCAGCCCCGGACATCTAAG 3' permettent d'amplifier un fragment de 330 paires de bases.

3. RÉSULTATS

3.1 Capacité d'infection des synoviocytes de type B par les adénovirus recombinants

Au cours de ses études de maîtrise, David Bouchard avait caractérisé le système adénoviral de production de l' α_1 -PDX à l'aide de cellules 293stTa (Bouchard, 2000). Afin de vérifier l'impact de l'inhibition de la furine dans un modèle d'arthrite, nous avons tout d'abord vérifié la capacité des adénovirus à infecter les synoviocytes de type B. Par conséquent, des cultures primaires de synoviocytes de type B ont été coinfectedes avec des MOI croissantes de virus AdTR5PDX (12,5, 50, 100, 150 et 250), en présence du virus AdCMVtTa à une MOI de 50. Quarante-huit heures suivant l'infection, les cellules ont été fixées à l'aide de paraformaldehyde 2%, puis elles ont été analysées au cytofluorimètre de flux afin de déterminer le pourcentage de cellules exprimant la GFP et qui sont par conséquent infectées par l'adénovirus.

Ainsi, les résultats observés à la figure 11 démontrent que le pourcentage de synoviocytes de type B infectés augmente de façon dépendante de la MOI, atteignant un maximum d'infection de 55% des cellules à une MOI de 250. De plus, la fluorescence moyenne des cellules observées était de $10,83 \pm 0,22$, $30,49 \pm 0,25$, $76,22 \pm 0,88$, $123,16 \pm 4,5$, $148,7 \pm 5,33$ et $183,59 \pm 6,95$ aux MOI croissantes d'AdTR5PDX soit 0, 12,5, 50, 100, 150 et 250 respectivement (résultats non montrés). Ces résultats démontrent donc que l'AdTR5PDX est apte à infecter les synoviocytes en culture et que l'expression du transgène GFP est dépendante de la MOI utilisée pour l'infection des cellules.

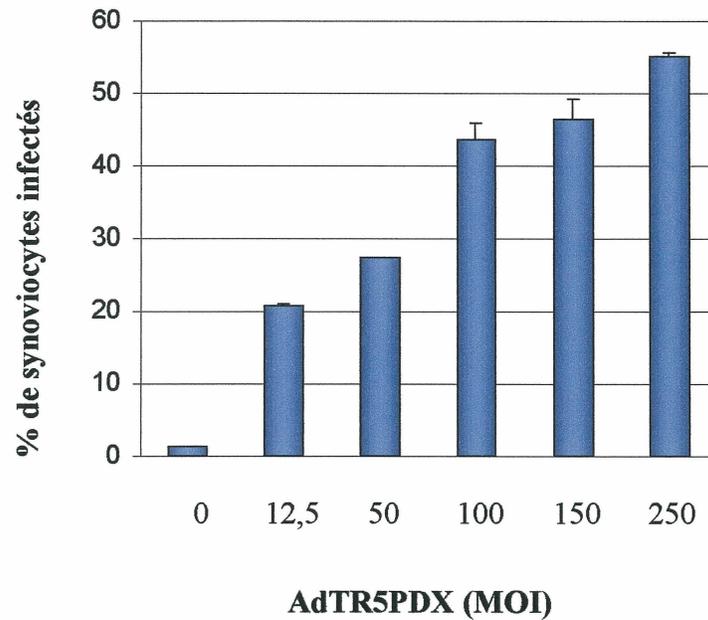


Figure 11. Analyse de la capacité d'infection des synoviocytes de type B par l'AdTR5PDX.

Les synoviocytes ont été coinfectés 48 heures à des MOI de 12,5, 50, 100, 150, 250 d'AdTR5PDX et à une MOI de 50 d'AdCMVtTa. Les cellules ont été fixées dans 2% de paraformaldehyde, puis elles ont été analysées par cytométrie de flux afin d'évaluer le pourcentage de cellules infectées qui se traduit par la détection de GFP chez les cellules.

3.2 Production de l' α_1 -PDX par les synoviocytes infectés

Après avoir vérifié la capacité d'infection des synoviocytes par les adénovirus, nous avons vérifié la capacité de ces derniers à produire la protéine α_1 -PDX dans ce système. Ainsi, les cellules ont été coinfectedes avec des MOI croissantes de virus AdTR5PDX (6, 12,5, 25, 50, 100, 150 et 250), en présence du virus AdCMVtTa à une MOI de 50. Le virus de type sauvage AdTR5GFP a été utilisé pour équilibrer les charges virales à une MOI de 300 pfu/ml. Quarante-huit heures suivant l'infection, la production d' α_1 -PDX intracellulaire a été analysée par immunobuvardage de type Western à l'aide d'un anticorps dirigé contre l' α_1 -antitrypsine.

Les résultats obtenus en figure 12 démontrent que la production d' α_1 -PDX des synoviocytes se fait de façon dépendante de la MOI, débutant à un MOI de 12,5 d'AdTR5PDX. Chez les cellules non-infectées et chez les cellules infectées par le vecteur de type sauvage (AdTR5GFP), aucune bande correspondant à l' α_1 -PDX n'a été observée. Il est à noter que l'anticorps utilisé permet de détecter des bandes de 3 poids moléculaires différents : les bandes situées à environ 65 kDa correspondent à l' α_1 -PDX active, les bandes situées à environ de 55 kDa correspondent à la forme clivée de l' α_1 -PDX, probablement par la furine (Benjannet et al., 1997), et les bandes d'environ 42 kDa correspondent à un produit de dégradation puisque ces bandes ne sont observées que lorsque l' α_1 -PDX est fortement surexprimée soit à des MOI de 100, 150 et 250 (figure 12). Ces résultats démontrent donc que l'AdTR5PDX est apte à produire efficacement l' α_1 -PDX, et ce de façon dépendante de la MOI. Ainsi, le système adénoviral est fonctionnel pour notre étude.

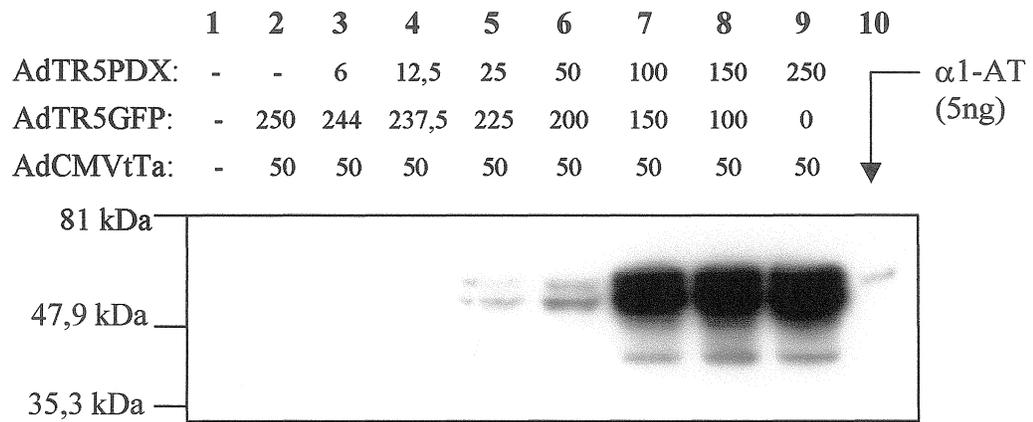


Figure 12. Analyse par immunobuvardage de la production d' α_1 -PDX des synoviocytes infectés à des MOI croissantes d'AdTR5PDX.

Les synoviocytes ont été coinfectés 48 heures à des MOI de 6, 12,5, 50, 100, 150 et 250 d'AdTR5PDX et à une MOI de 50 d'AdCMVtTa. Le vecteur de type sauvage, AdTR5GFP, a été utilisé pour compléter les charges virales à une MOI de 300. Les cellules ont été lysées, puis 15 μ g de protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 10% et transférées sur une membrane de PDVF qui a été incubée avec un anticorps spécifique à l' α_1 -antitrypsine humaine. L' α_1 -antitrypsine recombinante (5 ng) sert de contrôle positif. La figure est représentative de 2 expériences effectuées en duplicata.

3.3 Effet de l'inhibition de la furine sur la production de TGF- β 1 mature

Plusieurs substrats de la furine, dont le TGF- β , sont impliqués dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, l'impact de l'inhibition de la furine sur la maturation du TGF- β 1 a été analysé. Les synoviocytes ont été coïnfectés 48 heures avec l'AdTR5PDX à des MOI de 12,5, 50, 100, 150 et 250 en présence de l'AdCMVtTa à une MOI de 50. Puis les concentrations virales ont été complétées à une MOI de 300 à l'aide du vecteur adénoviral de type sauvage, l'AdTR5GFP. Par la suite, le contenu en TGF- β 1 mature des surnageants a été analysé par la méthode d'ELISA. Les résultats illustrés à la figure 13 montrent une diminution de production de TGF- β 1 de façon dépendante de la MOI jusqu'à un maximum d'inhibition (60%) obtenu à une MOI de 250. Cependant, l'inhibition de la production du TGF- β 1 est incomplète ce qui est probablement dû à l'incapacité d'infecter toutes les cellules tel que démontré à la figure 11.

Ces résultats indiquent que l' α_1 -PDX produit par l'AdTR5PDX inhibe la production de la forme mature du TGF- β 1, médiée par les protéases endogènes. Étant donné que la furine est connue pour être un substrat authentique du TGF- β 1, et ce dans divers types cellulaires (Blanchette et al., 1997; Dubois et al., 2001), nos résultats indiquent également que l' α_1 -PDX produit par le système adénoviral est apte à bloquer l'activité de la furine endogène.

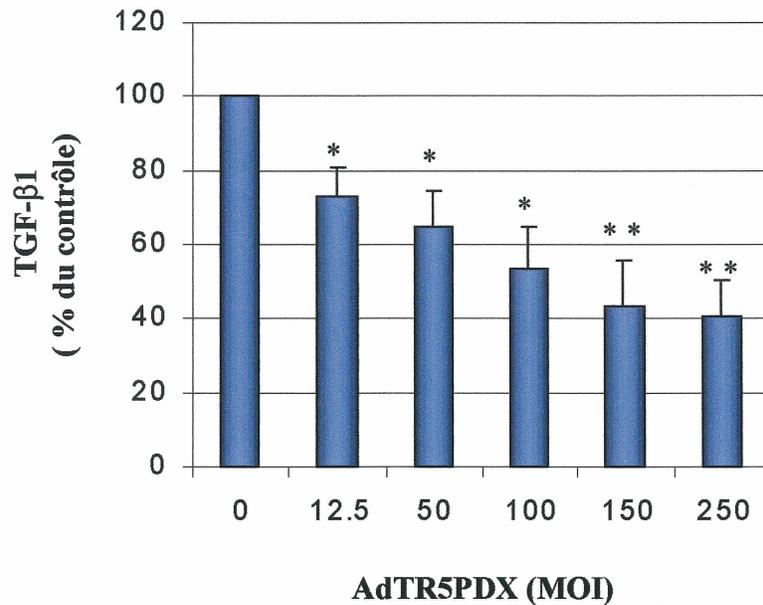


Figure 13. Effet de l' α_1 -PDX sur la production de TGF- β 1 mature.

Les synoviocytes ont été coinfectés 48 heures à des MOI croissantes d'AdTR5PDX de 12,5, 50, 100, 150 et 250, à une MOI de 50 d'AdCMVtTa. L'AdTR5GFP a été utilisé pour compléter les charges virales à une MOI de 300. Suite à l'infection, les surnageants ont été récupérés et la mesure de TGF- β 1 mature a été effectuée par la méthode d'ELISA. Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle (cellules infectées avec l'AdTR5GFP). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences effectuées en duplicata. * $p < 0,05$
** $p < 0,01$.

3.4 Effet de l'inhibition de la furine sur la production de PDGF AB mature

La production de PDGF AB suite à l'inhibition de la furine a aussi été analysée par ELISA. L'infection des synoviocytes a été effectuée tel que mentionné pour le TGF- β 1 à des MOI de 6, 50, 100 et 250 d'AdTR5PDX. De même que pour le TGF- β 1, une diminution de production de PDGF AB est observée (figure 14), et ce de façon dépendante de la MOI. Toutefois, cette diminution est plus marquée. Ainsi, elle atteint une inhibition maximale de production de PDGF AB de 87,7% à une MOI de 250 d'AdTR5PDX. Finalement, ce résultat démontre que l'inhibition de la furine bloque la maturation du substrat PDGF AB, un facteur de croissance impliqué, entre autres, dans la pathologie de l'arthrite.

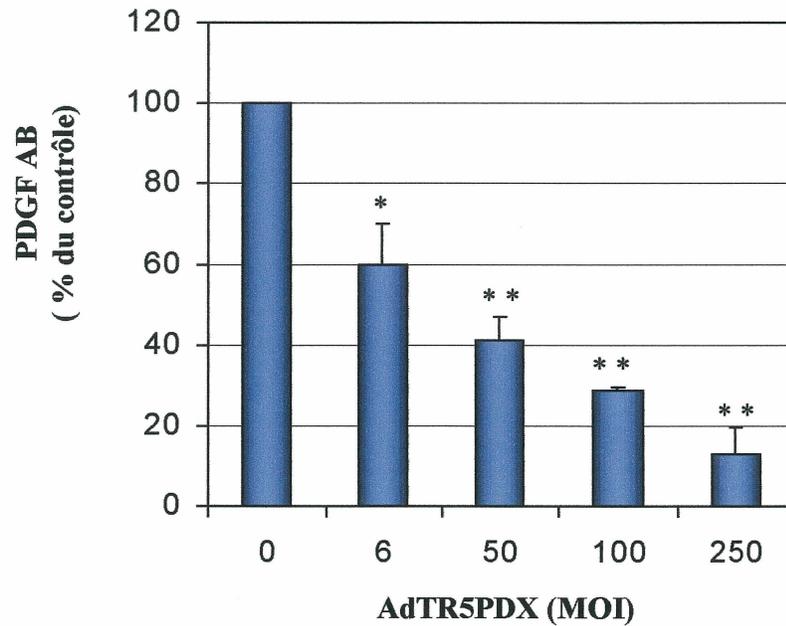


Figure 14. Effet de l' α_1 -PDX sur la production de PDGF AB mature.

Les synoviocytes ont été coïnfectés 48 heures à des MOI de 6, 50, 100, 250 d'AdTR5PDX, et de 50 d'AdCMVtTa. L'AdTR5GFP a été utilisé afin de compléter les charges virales. Le contenu en PDGF AB mature des surnageants cellulaires a été analysé par la méthode d'ELISA. Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle (synoviocytes infectés avec l'AdTR5GFP). Les résultats représentent une moyenne de 3 expériences distinctes effectuées en duplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

3.5 Impact de l'inhibition de la furine sur l'activation/maturation de la MMP-2

Il a été mentionné précédemment que la furine pouvait agir indirectement sur l'activation de la MMP-2, en mariant la MT1-MMP (Sato et al., 1996). Ainsi, nous avons voulu vérifier si la furine agissait de cette façon dans notre système. Pour ce faire, l'impact de l'inhibition de la furine sur l'activation/maturation de la MMP-2 a été étudié. Les synoviocytes ont été infectés avec l'AdTR5PDX, l'AdTR5GFP ou l'AdTR5FUR à des MOI de 250, et ce, en présence du transactivateur (MOI= 50). Dix huit heures plus tard, les cellules ont été stimulées à la concanavaleine A (Con A) (5µg/ml) qui est reconnue pour induire la production de la MT1-MMP, et par conséquent, augmente l'activation de la pro-MMP-2 (Sato et al., 1999). Finalement, 48 heures suivant le début de l'infection, les surnageants ont été récupérés et le contenu des différentes formes de MMP-2 a été analysé par zymographie.

Le contrôle positif (MMP-2 recombinante humaine) a été utilisé afin d'identifier les différentes formes de MMP-2 contenues dans les échantillons. Tel que démontré à la figure 15 A, piste 5, la MMP-2 recombinante produit, en gel SDS-PAGE, trois bandes de poids moléculaire distincts. La bande du haut de 72 kDa correspond à la pro-MMP-2, celle du centre (64 kDa) représente la forme intermédiaire, alors que celle du bas (62 kDa) correspond à la forme active de la MMP-2. Les résultats expérimentaux démontrent que lorsque les synoviocytes sont traités avec 5µg/ml de Con A (piste 1), on observe une conversion de la pro-forme en formes intermédiaires et actives, par rapport aux cellules non traitées (non montrées). Ces résultats sont en accord avec des publications précédentes démontrant la capacité de la Con A à activer la MMP-2 et ce, dans plusieurs types cellulaires (Sato et al., 1999; Lafleur et al., 2001). Lorsque les cellules sont infectées avec

l'adénovirus de type sauvage et stimulées avec la Con A, on note en piste 2 une augmentation des formes pro, intermédiaires et actives de la MMP-2, ce qui suggère que les virus puissent avoir un effet stimulateur sur la synthèse protéique ou la relâche de la MMP-2. En piste 3, les surnageants des cellules ayant été infectées avec l'AdTR5FUR et stimulées à l'aide de la Con A ne montrent aucune différence sur les niveaux de MMP-2 comparativement avec les cellules infectées avec le virus de type sauvage (piste 2). Finalement, en piste 4, les cellules ayant été infectées avec l'AdTR5PDX et stimulées avec la con A montrent une baisse des formes intermédiaires et actives ainsi qu'une augmentation de la forme pro.

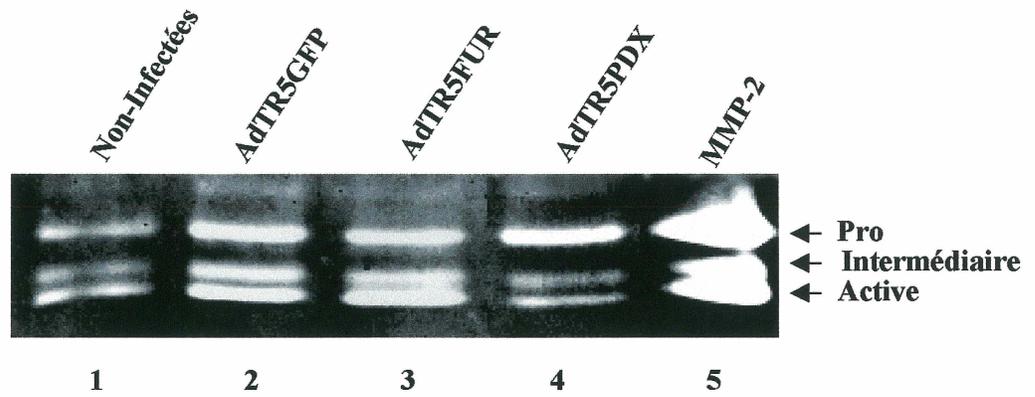
Afin de quantifier ces résultats, les gels de zymographie ont été scannés et les différentes formes de MMP-2 ont été évaluées par densitométrie. La figure 15 B représente les ratios de la valeur densitométrique de la pro-MMP-2 par rapport à la forme intermédiaire additionnée de la forme active. Les contenus des surnageants de cellules stimulées à la Con A seulement, ou bien stimulées et infectées avec soit l'AdTR5GFP ou l'AdTR5FUR montrent un ratio semblable de $0,67 \pm 0,004$, $0,66 \pm 0,033$ et de $0,62 \pm 0,077$ respectivement. La surexpression de furine ne mène donc à aucun changement au niveau des formes de MMP-2, ce qui suggère que les niveaux de furine soient saturants dans ce système. Quant aux surnageants des cellules infectées avec l'AdTR5PDX, ceux-ci montrent un ratio de forme pro/active de $1,63 \pm 0,16$. Ce ratio démontre une augmentation de la forme pro-MMP-2 de 2,4 fois par rapport aux surnageants des cellules non-infectées, mais stimulées à la Con A et aussi par rapport aux cellules ayant été infectées avec le virus de type sauvage.

Ainsi, ces résultats démontrent que l' α_1 -PDX inhibe la maturation de la pro-MMP-2 en MMP-2 intermédiaire et active. Par conséquent, la furine est impliquée dans la maturation de la MMP-2 dans ce système. Ceci fait de la MMP-2 un autre substrat de la furine pertinent à l'arthrite puisque la MMP-2 joue un rôle dans le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire de l'articulation (Kontinen et al., 1999).

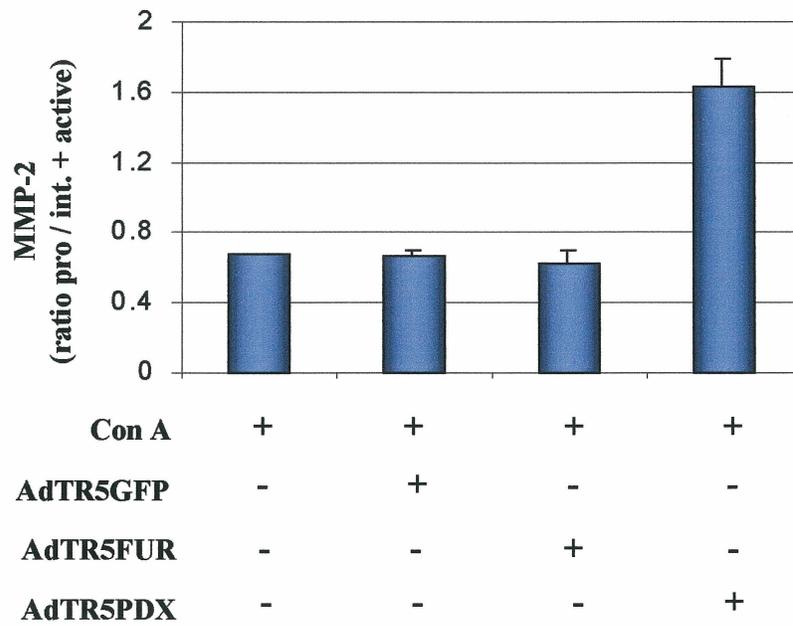
Figure 15. Analyse par zymographie de l'effet de l' α_1 -PDX sur la maturation de la MMP-2.

Les synoviocytes ont été coïnfectés 18 heures avec l'AdTR5GFP, l'AdTR5FUR ou l'AdTR5PDX à une MOI de 250, et ce, en présence de l'AdCMVtTa à une MOI de 50. Par la suite, les cellules ont été stimulées à la concanavaline A (5 μ g/ml) pour une incubation finale de 48 heures. Les surnageants ont ensuite été séparés sur gel SDS-PAGE contenant 0,01 % de gélatine. Après une incubation de 18 heures dans un tampon enzymatique, les gels ont été colorés dans une solution de 0.5% de bleu de Coomassie, 30% méthanol et 10% acide acétique glacial. En A, les bandes claires montrent la dégradation de la gélatine par la gélatinase A (MMP-2). La MMP-2 recombinante humaine a été utilisée en tant que contrôle positif. En B, les résultats sont exprimés sous forme de ratios de la valeur densitométrique de la pro-forme par rapport à celles obtenues pour les formes intermédiaires et actives. La zymographie en A est représentative de 2 expériences distinctes et les résultats en B sont la moyenne de 2 expériences.

A)



B)



3.6 Régulation de la cassette transcriptionnelle de l'AdTR5PDX par la doxycycline

Afin de vérifier la capacité de la doxycycline à réguler les vecteurs adénoviraux chez les synoviocytes, ceux-ci ont été coinfecteds 48 heures avec des MOI de 250 d'AdTR5PDX et avec l'adénovirus produisant le transcritivateur (AdCMVtTa) à une MOI de 50, et ce, en présence ou en absence de doxycycline (1 µg/ml). Ensuite, les cellules ont été analysées pour leur production de protéines à fluorescence verte (GFP) en cytofluorimétrie. L'ADNc de la GFP est inséré dans une cassette dicistronique à la suite de l'ADNc de l' α_1 -PDX. Les deux séquences sont sous le contrôle du même promoteur ce qui fait que la GFP sert de traceur.

Les résultats à la figure 16 A indiquent que 55,8% des cellules misent en présence de l'AdTR5PDX produisent la GFP. L'ajout de 1 µg/ml de doxycycline ramène la fluorescence au niveau de celle des cellules contrôles. Ceci montre que le système adénoviral est fermé en présence de doxycycline, donc la transcription est inhibée ce qui mène à une absence de production de GFP.

Dans le but de démontrer si la régulation du système adénoviral pouvait avoir un impact sur la maturation de facteurs impliqués dans la polyarthrite rhumatoïde, l'effet de la doxycycline sur la maturation des substrats TGF- β 1 et PDGF AB a été vérifié par ELISA. Les synoviocytes ont été infectés avec soit le vecteur contrôle (AdTR5GFP), ou le vecteur AdTR5PDX à des MOI de 250 en présence de l'AdCMVtTa à une MOI de 50. Les cellules infectées avec l'AdTR5PDX ont été mises en présence ou non de 1 µg/ml de doxycycline. Les contenus en TGF- β 1 et PDGF AB des surnageants ont ensuite été analysés. À la figure 16 B, les cellules infectées avec l'adénovirus AdTR5PDX et mises en absence de

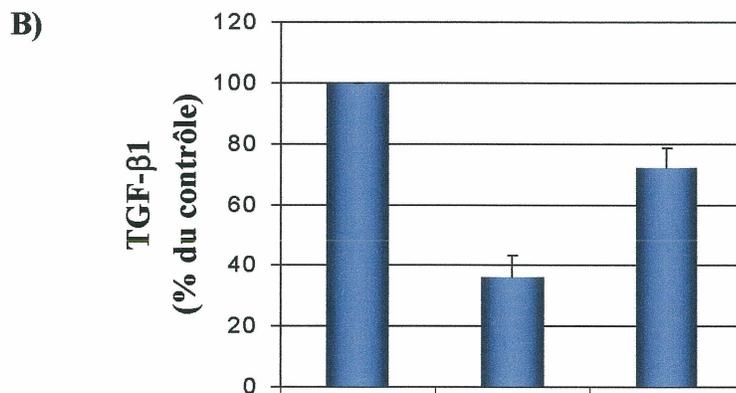
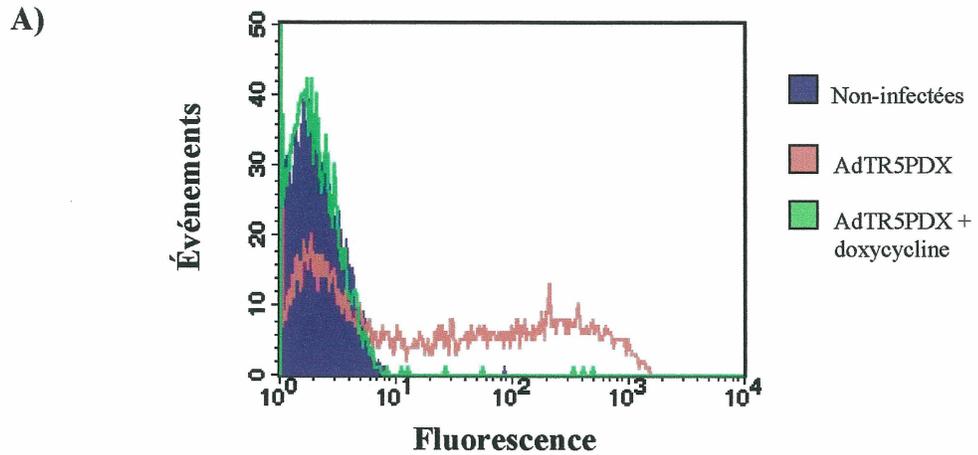
doxycycline montrent une production de 36% de TGF- β 1 par rapport au contrôle. Les cellules infectées par l'AdTR5PDX en présence de doxycycline, quant à elles, ont une augmentation significative (72%) de production de TGF- β 1 par rapport aux cellules traitées avec l'AdTR5PDX seulement. Toutefois, la reprise de production de TGF- β 1 ne se fait pas à 100%.

Au niveau de la maturation du PDGF (figure 16 C), la doxycycline semble avoir un effet similaire : d'abord, en présence d'AdTR5PDX il y a une production de PDGF AB mature de 15,5% seulement. Cette baisse de production est significative par rapport au contrôle (AdTR5GFP). Les cellules infectées à l'AdTR5PDX en présence de doxycycline montrent une production de 63,3% de PDGF AB mature. Cette augmentation est 4 fois plus grande, mais aussi significative par rapport à la production observée par les cellules traitées avec l'AdTR5PDX en absence de doxycycline. De façon semblable aux résultats présentés pour le TGF- β 1, la reprise de production de PDGF AB n'est pas complète.

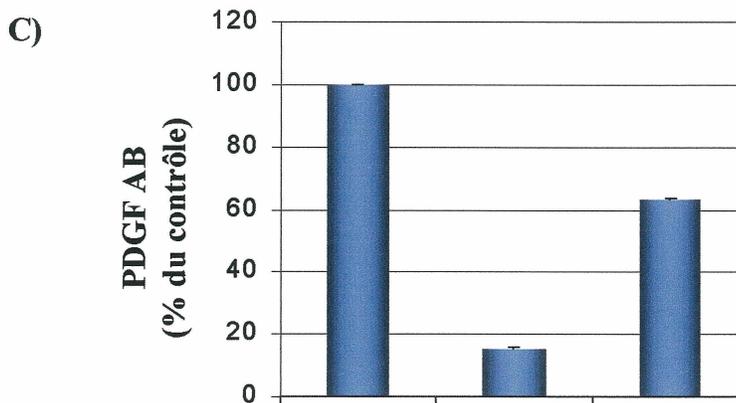
Ces résultats indiquent qu'en présence de doxycycline, la production du transgène α_1 -PDX est supprimée et la furine n'est donc plus inhibée, ce qui permet la maturation des substrats par cette dernière. Donc, le système régulable à la doxycycline est fonctionnel dans un système *in vitro* utilisant les synoviocytes.

Figure 16. Effet de la doxycycline sur la régulation du système adénoviral.

Les synoviocytes ont été coinfecteds 48 heures avec des MOI de 250 soit d'AdTR5GFP, ou d'AdTR5PDX en présence de l'AdCMVtTa (MOI =50) et en présence ou en absence de doxycycline 1 µg/ml. La figure 5 A représente l'analyse cytofluorométrique des synoviocytes fixés à la paraformaldehyde 2%. La population en mauve représente les cellules non-infectées; la population délimitée par la ligne orange représente les cellules infectées avec l'AdTR5PDX en absence de doxycycline; la population délimitée par la ligne verte contient les cellules infectées avec l'AdTR5PDX et traitées avec la doxycycline. Le TGF-β1 (B) ou le PDGF AB (C) des surnageants a été mesuré par la méthode d'ELISA. La figure A est représentative de 4 expériences alors que les figures B et C représentent les moyennes de 2 expériences en duplicata et sont exprimées en pourcentage du contrôle.



AdTR5GFP	250	-	-
AdTR5PDX	-	250	250
Doxycycline (μ g/ml)	-	-	1



AdTR5GFP	250	-	-
AdTR5PDX	-	250	250
Doxycycline (μ g/ml)	-	-	1

3.7 Expression du transgène α_1 -PDX *in vivo* par le vecteur AdTR5PDX

Afin de vérifier la capacité du virus AdTR5PDX à produire le transgène α_1 -PDX *in vivo*, les rats arthritiques ont été injectés dans les genoux avec le virus AdCMVtTa en présence ou non du virus AdTR5PDX (MOI = 3×10^8) pour une MOI finale de 6×10^8 . L'infection a été effectuée sept jours suivant l'induction de l'arthrite. Aux jours 7, 15, et 21 *post*-injection adénovirale, les rats ont été sacrifiés et l'ARN des corps adipeux infra-patellaires a été extrait afin de vérifier l'expression du transgène α_1 -PDX par la méthode de RT-PCR. Étant donné que l' α_1 -PDX possède une grande similarité d'acides aminés avec l' α_1 -antitrypsine endogène, nous avons dû trouver une stratégie afin d'amplifier de façon sélective l' α_1 -PDX. Ainsi, l'un des oligonucléotides de synthèse a été produit selon la séquence de l'IRES, puisque le virus transcrit un long ARNm codant pour l' α_1 -PDX, l'IRES et la GFP. Le deuxième oligonucléotide de synthèse a été produit selon la séquence codante pour l' α_1 -PDX.

À la figure 17 A, on remarque une absence d'amplification du transgène chez l'ARN provenant de rats ayant été traités uniquement avec le virus AdCMVtTa (qui sert de contrôle négatif). Par ailleurs, l'ARNm des rats ayant été injectés avec les 2 virus (AdCMVtTa et AdTR5PDX) démontrent une amplification d'une bande correspondant à la valeur théorique de l'amplicon de 479 pb. De plus, un contrôle positif avait été utilisé à partir du plasmide encodant le génome du virus AdTR5PDX, l'AdcPDX. La bande amplifiée a migré à la même hauteur que les autres bandes provenant de l'ARNm des rats traités à l'AdTR5PDX. Ceci permet de conclure que le fragment correspondant à l' α_1 -PDX

a été amplifié et ce, de façon spécifique. De plus, bien que ce RT-PCR ne soit pas quantitatif, les bandes amplifiées au jour 7 semblent plus faibles que celles des jours 15 et 21.

La figure 17 B représente l'amplification du 18S (amplicon de 330pb) qui a été utilisé afin de s'assurer de l'intégrité de l'ARN extrait. Il est à noter que l'absence de bande pour l'AdcPDX est normale étant donné qu'il n'y a pas d'ARN correspondant au 18S dans cette préparation de plasmide.

Ainsi, ces résultats permettent de conclure que la méthode d'extraction d'ARN permet de garder l'ARNm des corps gras infra-patellaires intact. De plus, ils nous permettent de constater que le virus AdTR5PDX produit *in vivo* le transgène α_1 -PDX, et ce, au niveau des corps gras infra-patellaires des articulations injectées.

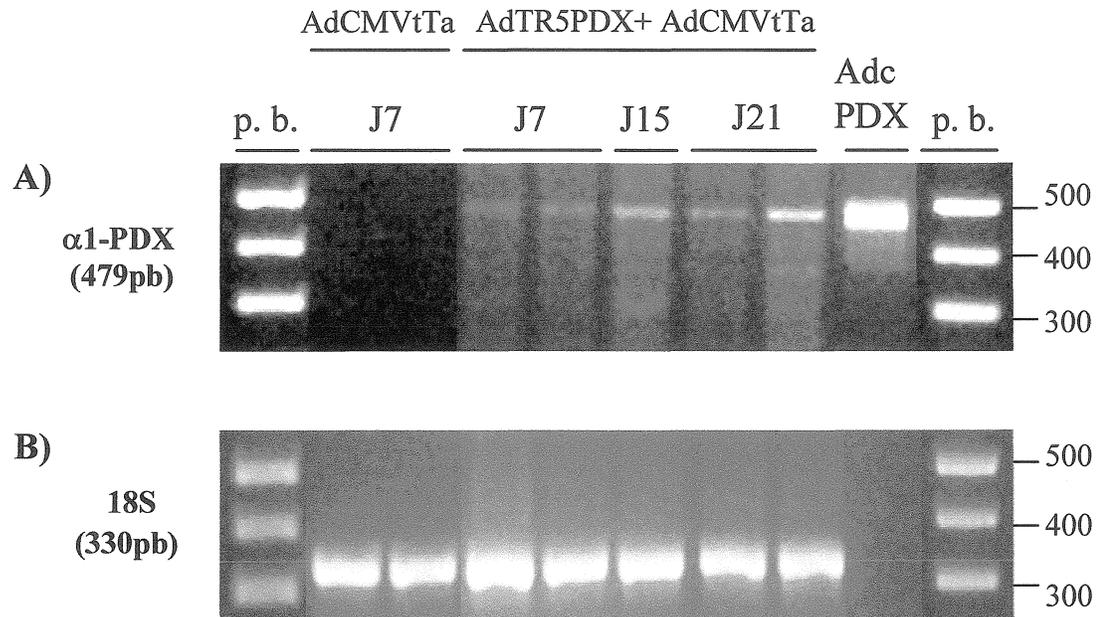


Figure 17. Analyse par RT-PCR de l'expression du transgène α_1 -PDX chez les genoux de rats arthritiques injectés à l'AdTR5PDX.

Les rats arthritiques ont été injectés dans les genoux avec l'AdCMVtTa en présence ou non de l'AdTR5PDX ($\text{MOI}=3 \times 10^8$) pour une MOI finale de 6×10^8 . Aux jours 7, 15 et 21 suivant les injections adénovirales, les corps adipeux infra-patellaires des rats sacrifiés ont été prélevés et l'ARN a été extrait pour l'analyse par RT-PCR de l'expression de l' α_1 -PDX (en A) ou pour l'expression du 18S (en B). La longueur théorique de l'amplicon est exprimée entre parenthèse du côté gauche de la figure. Le contrôle positif AdcPDX provient du plasmide encodant le génome de l'AdTR5PDX. p.b. = paires de bases.

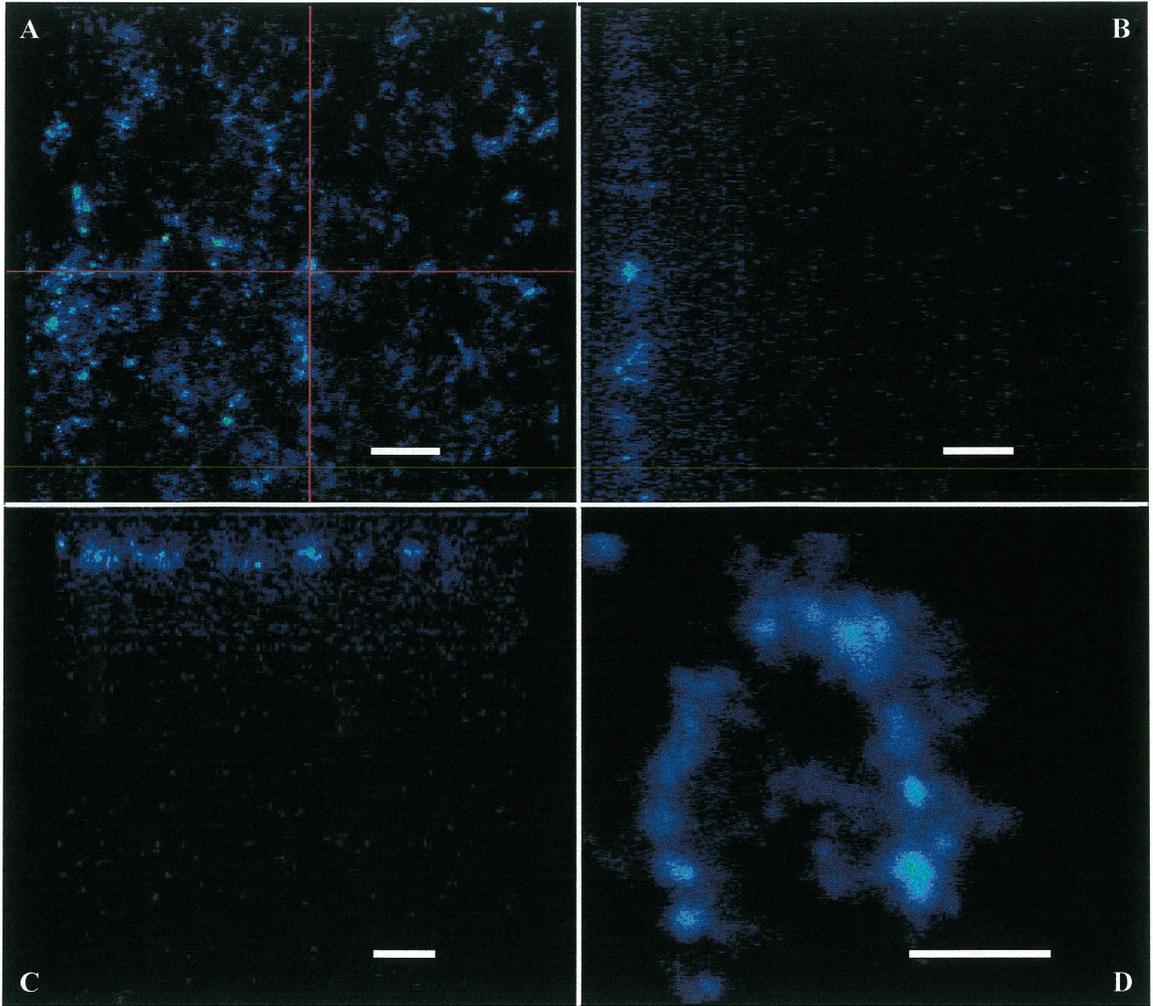
3.8 Localisation de l'expression de la GFP *in vivo*

Nous avons précédemment démontré l'expression de l'ARNm du transgène α_1 -PDX chez le corps gras infra-patellaire. Cependant, ceci ne permet pas de dire quel type de cellule exprimait le transgène. Est-il exprimé par les synoviocytes qui sont prélevés en même temps que le corps gras, ou bien par les adipocytes qui composent majoritairement ce tissu ? Pour répondre à cette question, des rats arthritiques ont été injectés dans les genoux avec l'AdTR5PDX en présence du transactivateur à une MOI de 3×10^8 chacun. La production du traceur GFP permet de vérifier le type cellulaire infecté par les vecteurs adénoviraux. Ainsi, 7 jours suivant l'injection adénovirale, les corps adipeux infra-patellaires ont été analysés par microscopie confocale à fluorescence. Cette technologie a été utilisée car elle permet d'analyser la fluorescence au niveau des différentes couches d'un tissu. La figure 18 A illustre l'expression de GFP du corps gras infra-patellaire. De plus, des images ayant été prises dans le plan transversale des tissus adipeux (fig. 18 C) montrent que la fluorescence se situe exclusivement dans la partie apicale du tissu, soit au niveau de la membrane synoviale, alors que les couches d'adipocytes ne démontrent pas de fluorescence (B et C). En D, un grossissement de 8,6 X de la couche synoviale montre que la fluorescence se situe principalement dans le cytoplasme de la cellule et à une intensité moindre dans le noyau.

Les résultats ont permis de conclure que parmi les cellules composant le corps adipeux infra-patellaire, les synoviocytes sont infectés de façon spécifique lors des injections intra-articulaires au niveau du genou. De plus, la détection de la GFP indique que les produits des transgènes sont produits *in vivo*.

Figure 18. Localisation de l'expression de la GFP par analyse microscopique.

Les rats arthritiques ont été injectés avec l'AdTR5PDX en présence du transactivateur AdCMVtTa, puis sacrifiés 7 jours suivant l'infection. Les corps adipeux ont été prélevés et observés au microscope confocal à fluorescence. La figure 18 A représente l'expression de la fluorescence dans le plan longitudinale au niveau de la membrane synoviale. Les images prises en plan transversal (dans l'épaisseur du tissu) en B et C montrent la fluorescence localisée au niveau de la couche des synoviocytes et absente au niveau des adipocytes. La figure D représente le grossissement de 8,6 X d'une cellule fluorescente. Les résultats montrés sont représentatifs de deux expériences différentes utilisant 4 articulations chacune. Les images originales ont été prises à l'aide d'un objectif 40X. Les barres représentent 20 microns (A, B, C) et 5 microns (D).



3.9 Rôle de la doxycycline dans la modulation de la GFP *in vivo*

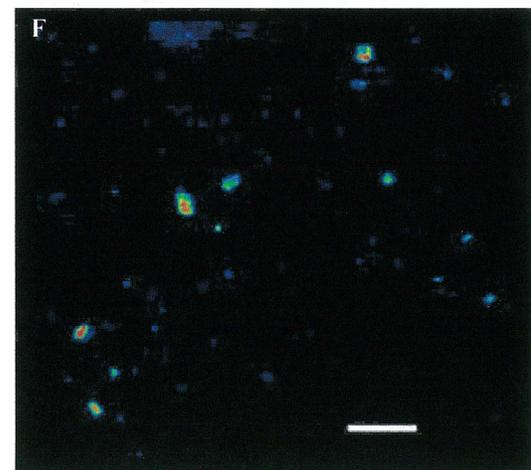
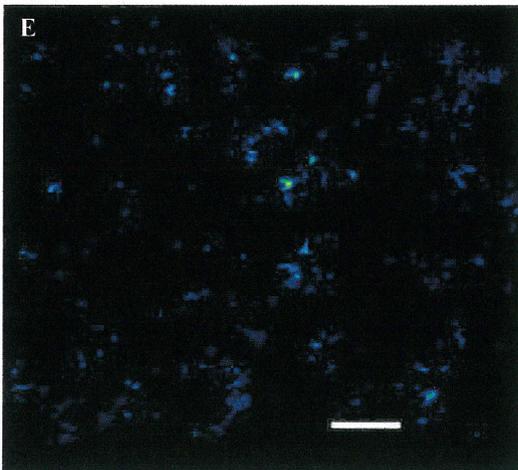
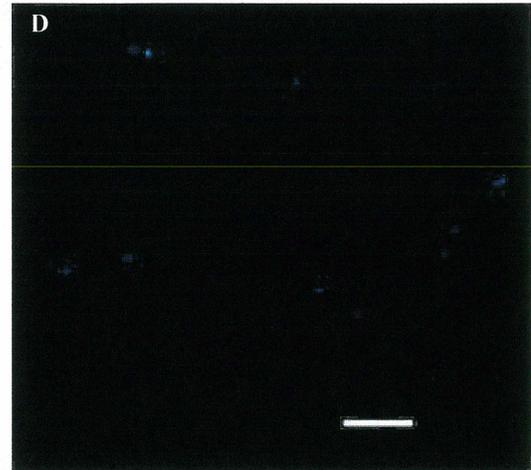
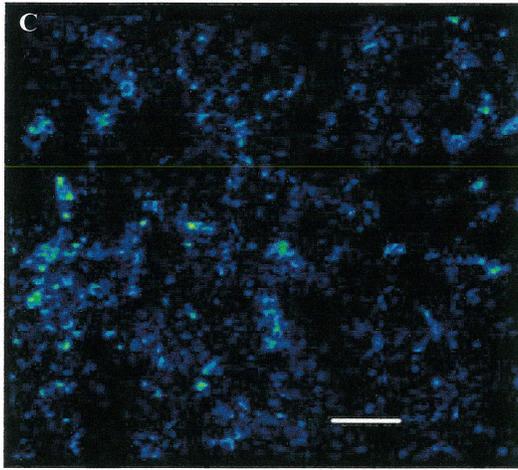
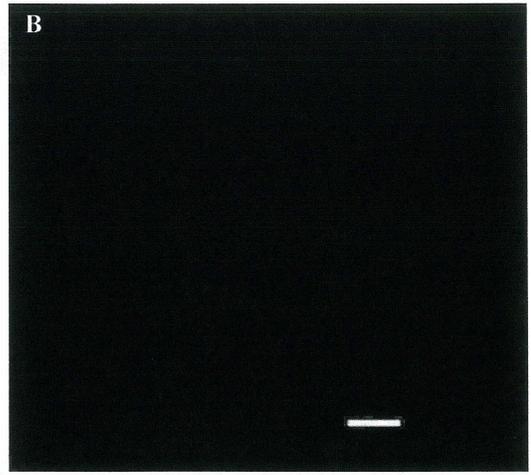
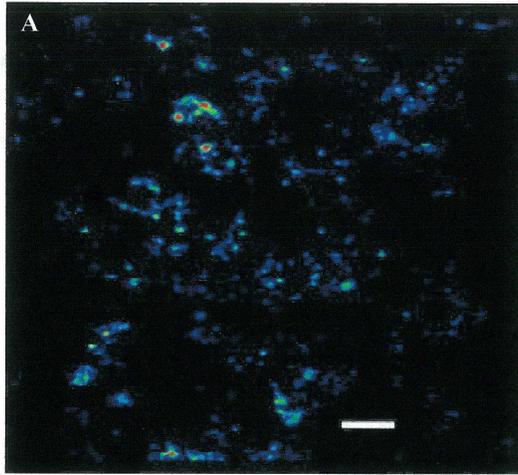
Afin de vérifier la capacité de régulation du système adénoviral par la doxycycline *in vivo*, nous avons évalué les niveaux d'inhibition de l'expression de GFP par l'antibiotique ainsi que la capacité de reprise d'expression de fluorescence après l'arrêt d'administration de la doxycycline. Ainsi, des rats arthritiques ont été injectés dans les genoux avec l'AdTR5PDX en présence de l'AdCMVtTa et en présence ou non de doxycycline (1mg/ml) administrée dans l'eau. Ce traitement a débuté 2 jours avant l'injection des virus et s'est poursuivi tout au long de l'expérimentation pour un groupe de rat. Un deuxième groupe de rats a été traité avec l'antibiotique pendant 7 jours suivant les injections adénovirales, puis l'administration de l'antibiotique a cessé. Ensuite, les rats ont été sacrifiés à différents temps et l'analyse de la fluorescence au niveau de la membrane synoviale a été effectuée par microscopie confocale à fluorescence. Au jour 7 suivant les injections adénovirales, les membranes synoviales des rats injectés avec l'AdTR5PDX et l'AdCMVtTa et n'ayant pas reçu de doxycycline (figure 19 A), montrent une fluorescence modérée alors que celles des rats ayant reçu la doxycycline n'expriment pas de fluorescence (figure 19 B). Au jour 15, les tissus synoviaux des rats ayant été injectés avec les virus en absence de doxycycline montrent un pic de fluorescence (figure 19 C) alors que ceux ayant reçu l'antibiotique n'expriment toujours pas de GFP (figure 19 D). Vingt-cinq jours suivant l'injection des adénovirus, la fluorescence est toujours présente, cependant son intensité est plus faible que celle observée au jour 15 (figure 19 E). La figure 19 F représente la fluorescence des membranes du groupe de rats ayant été injectés avec les adénovirus et ayant reçu la doxycycline pendant 7 jours. Ainsi, 25 jours suivant les injections adénovirales (soit 18 jours suivant l'arrêt d'administration de doxycycline), il y a production de GFP au niveau

des membranes synoviales, ce qui signifie que la transcription des transgènes s'est réactivée. Cette production de GFP n'était pas détectée 7 jours après l'arrêt d'administration de doxycycline (résultat non montré), ceci suggère donc que la doxycycline ne soit pas éliminée rapidement *in vivo* et ce, au niveau du tissu synovial.

Ces résultats ont permis de vérifier que la transcription du transgène GFP, et par conséquent l' α_1 -PDX, par le système adénoviral est bloquée par l'administration de doxycycline *in vivo*. En plus de démontrer que la doxycycline peut empêcher l'activité transcriptionnelle du système, les résultats indiquent que l'arrêt de l'administration de l'antibiotique permet la reprise transcriptionnelle du système adénoviral. Les résultats ont aussi permis de déterminer que le pic de production des protéines recombinantes se situe au jour 15. Ainsi, ces résultats permettent de conclure que le système adénoviral est régulable *in vivo* par la doxycycline.

Figure 19. Analyse de l'effet de la doxycycline sur la modulation de l'expression de la GFP *in vivo*.

Analyse par microscopie confocale à fluorescence des membranes synoviales de rats arthritiques injectés avec les virus AdTR5PDX et AdCMVtTa en absence (A, C, E) ou en présence de 1 mg/ml de doxycycline (B, D). En F, les rats injectés avec les adénovirus ont été traités de façon transitoire (7 premiers jours) avec de la doxycycline (1mg/ml), puis sacrifiés à 25 jours. L'analyse a été effectuée aux jours 7, 15 et 25 suivant l'injection des virus. Les images originales ont été prises à l'aide d'un objectif 40X. Les barres représentent 20 microns. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences.



3.10 Impact de l'administration des adénovirus sur l'inflammation et l'index articulaire de rats sains

Un des buts de la recherche était de démontrer l'effet de l'inhibition de la furine chez les rats arthritiques par l'utilisation de vecteurs adénoviraux produisant l' α_1 -PDX. Il a été nécessaire dans un premier temps, de vérifier l'effet de l'administration de ces adénovirus sur l'inflammation et l'index articulaire des chevilles de rats contrôles (ayant reçu du PBS à la place du collagène). Ainsi, cinq jours suivant l'administration de PBS, les rats ont été injectés au niveau de l'articulation des chevilles avec l'AdTR5PDX ou l'AdCMVGFP en présence de l'AdCMVtTa, chacun à des MOI de 3×10^8 . Puis, l'inflammation et l'index articulaire ont été évalués aux 2-3 jours, et ce pour une période de 36 jours. Afin de vérifier si les adénovirus pouvaient induire de l'inflammation, cette dernière a été évaluée à l'aide d'un caliper mesurant l'épaisseur des pattes arrière de rats à la jonction du tarse et du métatarse. L'évaluation de l'index articulaire, a été effectuée par l'observation de rougeur et/ou d'enflure au niveau des pattes des rats et a été établie selon une échelle de 0 à 4 tel que décrit dans la section "matériel et méthodes". La figure 20 A représente l'effet des adénovirus sur l'inflammation des pattes des rats. On observe une inflammation modérée et transitoire 24 heures suivant l'injection des virus. Cependant, cette inflammation diminue aussitôt. La mesure revient au niveau basal (5mm) à compter du jour 8 et demeure stable jusqu'à la fin de l'expérience (jours 36). La figure 20 B représente l'effet des adénovirus sur l'index articulaires des rats. Cette figure montre que les rats injectés avec le virus contrôle ou le virus encodant l' α_1 -PDX ont conservé un index articulaire de 0. Ainsi, les adénovirus n'induisent pas d'effet détectable sur la mesure

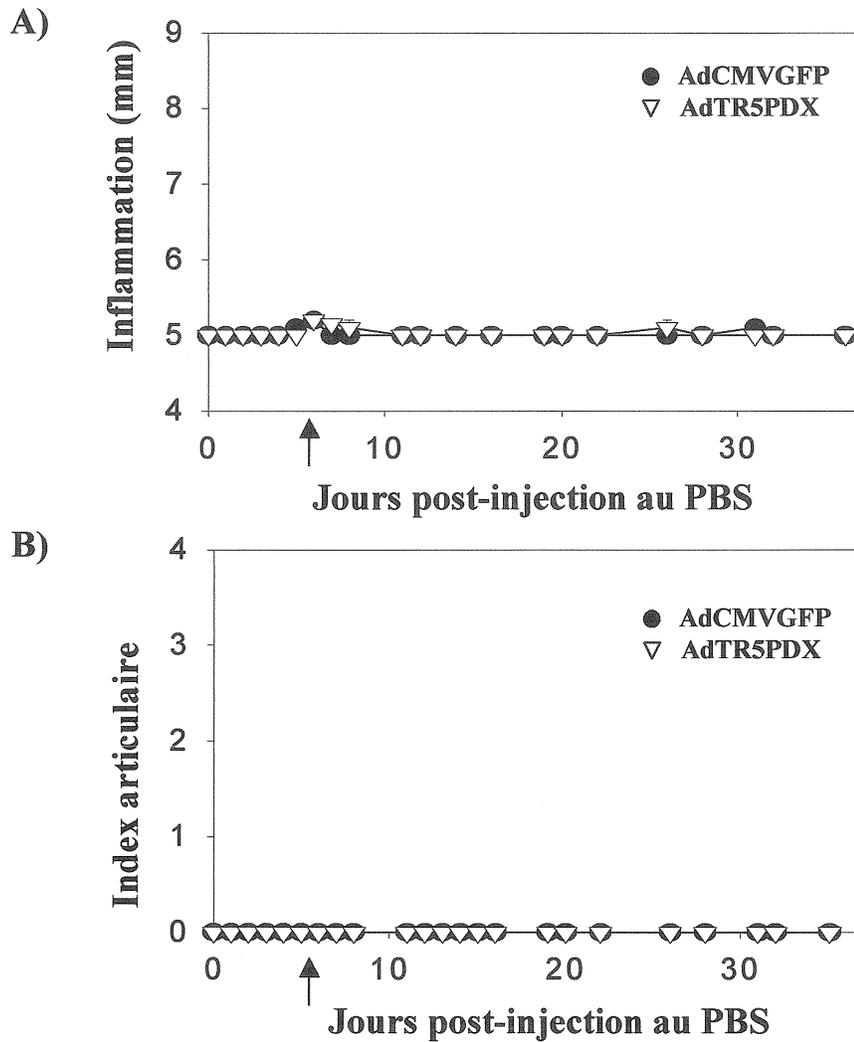


Figure 20. Effet des adénovirus sur la mesure de l'inflammation et de l'index artriculaire au niveau des pattes de rats contrôles.

Les rats contrôles ont été injectés à la base de la queue avec 200 μ l d'un mélange d'adjuvant de Freund et de PBS. Cinq jours suivant cette injection, les adénovirus (AdCVMGFP ou AdTR5PDX MOI = 3×10^8) ont été injectés en présence du transactivateur AdCVMtTa (MOI = 3×10^8) au niveau des chevilles. L'inflammation (A) a été évaluée par la mesure de l'épaisseur du tarse à l'aide d'un caliper. L'index artriculaire (B) a également été évalué. Les flèches représentent le jour de l'injection adénovirale. N=2.

de l'index articulaire.

Par conséquent, l'administration des virus au niveau des chevilles des rats contrôles n'induit pas d'effet sévère au niveau de l'inflammation et de l'index articulaire, ce qui permet leur utilisation dans un modèle expérimental d'arthrite chez le rat.

3.11 Impact de l'administration de l'AdTR5PDX sur l'inflammation et l'index articulaire des rats traités au collagène de type II

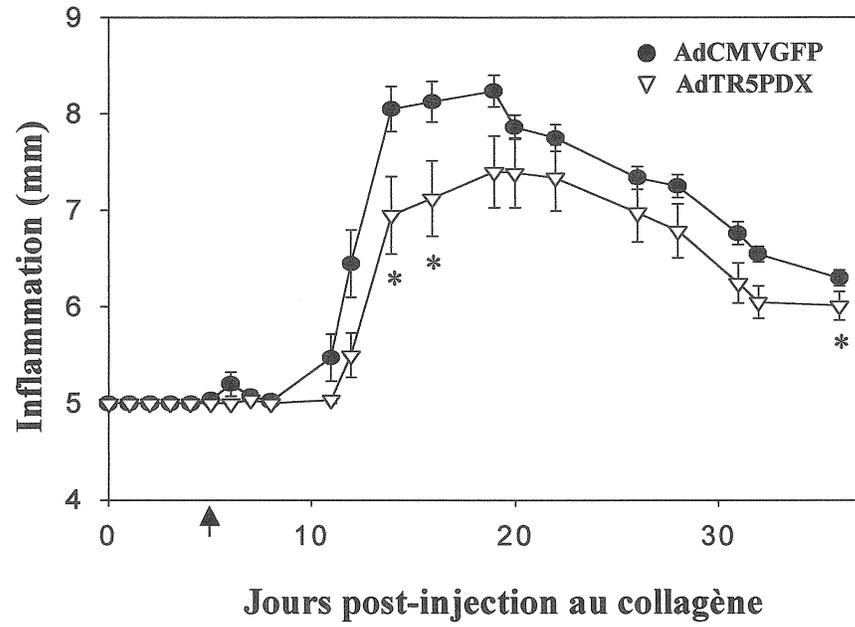
Des rats traités au collagène de type II ont été injectés au niveau des articulations des chevilles avec les adénovirus 5 ou 7 jours suivant l'induction de l'arthrite. Le virus contrôle AdCMVGFP et l'AdCMVtTa ont été injectés dans les chevilles gauches à des MOI de 3×10^8 chacun. Le virus AdTR5PDX et l'AdCMVtTa ont été injectés dans les chevilles droites à des MOI de 3×10^8 chacun. Étant donné que l'arthrite induite par le collagène se développe généralement de façon symétrique au niveau des articulations (Joe et Wilder, 1999), la cheville gauche a servi de contrôle à la cheville droite.

L'effet du traitement par l'AdTR5PDX a été analysé par la mesure de l'inflammation des pattes à la jonction entre le tarse et le métatarse à l'aide d'un caliper. Dans ce cas-ci, l'injection des adénovirus a été effectuée au jour 5 suivant l'induction de la pathologie. A la figure 21 A, les rats injectés avec le vecteur contrôle montrent d'abord une inflammation modérée 24 heures suivant l'injection adénovirale, qui n'est pas détectée chez les chevilles traitées à l'AdTR5PDX. Cette inflammation disparaît par la suite et la mesure du tarse revient au niveau basal de 5 mm au jour 8. Au jour 11, les pattes des rats injectés avec le virus contrôle montrent une augmentation d'inflammation avec un pic observé au jour 19 alors que les pattes injectées avec l'AdTR5PDX montrent une augmentation de l'inflammation à partir du jour 12, soit 24 heures plus tard que les pattes contrôles. Cette augmentation d'inflammation chez les pattes injectées avec l'AdTR5PDX se fait à un degré beaucoup plus faible que l'inflammation observée chez les pattes contrôle. Cette inflammation augmente jusqu'au jour 19, mais de façon plus modérée que les pattes

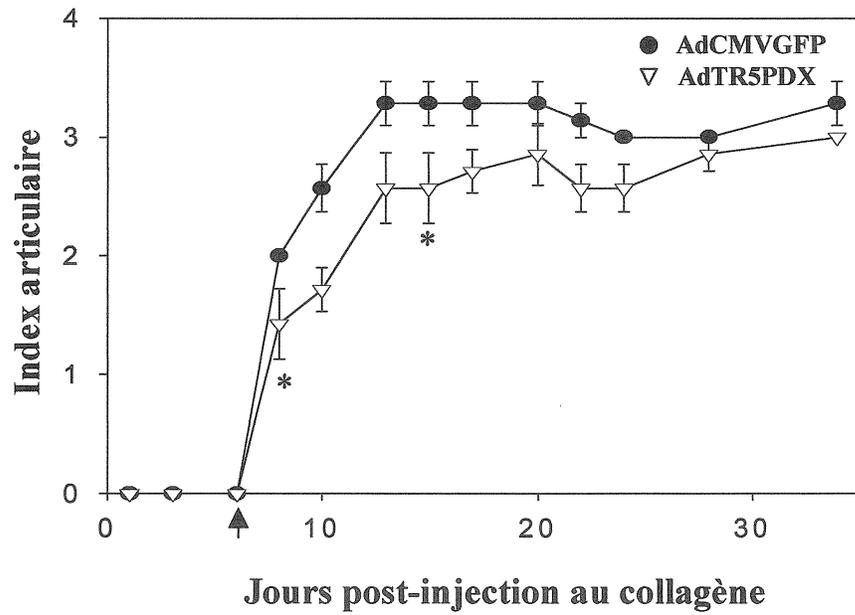
Figure 21. Effet de l'AdTR5PDX au niveau du développement de l'arthrite évalué par l'inflammation et l'index articulaire.

Cinq jours (A) ou sept jours (B) après avoir été traités au collagène, les rats arthritiques ont été injectés dans les chevilles gauches avec l'AdCMVtTa et l'AdCVMGFP (MOI = 3×10^8 chacun) et dans les chevilles droites avec l'AdTR5PDX et l'AdCMVtTa (MOI = 3×10^8 chacun). L'effet des virus sur le développement de la maladie a été observé selon la mesure de l'inflammation des pattes arrières au niveau du tarse dans le temps en A et selon la mesure de l'index articulaire dans le temps en B. Les flèches représentent le jour de l'injection adénovirale. Les résultats sont des figures représentatives de 2 expériences N= 7 en A et N= 8 en B. * $p < 0,05$.

A)



B)



injectées avec le virus contrôle. De plus, les données des jours 14 et 16 sont significatives : au jour 14, l'épaisseur des pattes droites (traitées avec l'AdTR5PDX) est de $6,95 \pm 0,4$ mm alors que l'inflammation des pattes gauches est de $8,05 \pm 0,23$ mm. Au jour 16, la moyenne des pattes droites est de $7,13 \pm 0,39$ mm et celle des pattes gauches est de $8,13 \pm 0,21$ mm. A partir du jour 20, l'inflammation diminue chez les 2 groupes, cependant les pattes droites (injectées à l'AdTR5PDX) continuent à montrer une inflammation inférieure à celle des pattes gauches (injectées à l'AdCMVGFP), et ce jusqu'au jour 36.

La sévérité du développement de l'arthrite a été évaluée à l'aide de l'index articulaire. Les résultats exprimés à la figure 21 B indiquent à partir du jour 8 une diminution de la sévérité de l'arthrite chez les pattes de rats injectés au jour 7 à l'AdTR5PDX (pattes droites) par rapport aux pattes gauches injectées avec le vecteur contrôle. Deux points sont significatifs lors des tests pairés soit au jour 8 où l'index articulaire des pattes droites est de $1,43 \pm 0,3$ par rapport à un index de $2 \pm 0,0$ pour les pattes contrôles. Le deuxième point significatif se situe au jour 15 suivant l'induction de l'arthrite où l'index articulaire des pattes droites est de $2,57 \pm 0,3$ par rapport à $3,29 \pm 0,18$ pour les pattes gauches.

Bien que seulement 2 points soient significatifs, une tendance d'inhibition de la sévérité de la maladie est observée tout au long de l'évaluation des pattes traitées à l'AdTR5PDX. De plus, l'effet d'inhibition semble plus marqué au début du développement de la maladie, ce qui suggère que le traitement avec le virus AdTR5PDX puisse procurer un effet de ralentissement du développement de la maladie.

Il est important de spécifier que le graphique représentant les niveaux d'inflammation (figure 21A) et celui rapportant l'index articulaire (figure 21 B)

proviennent de 2 expériences distinctes. Ceci explique pourquoi le développement de l'arthrite expérimentale est observé à des jours différents dans ces graphiques.

Enfin, ces résultats suggèrent que la furine soit impliquée dans le développement de l'arthrite et que son inhibition via l'AdTR5PDX diminue les niveaux de sévérité de la maladie et d'inflammation.

4. DISCUSSION

La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une inflammation et une hypertrophie de la membrane synoviale causant des dommages irréversibles tels que la destruction progressive du cartilage et des os. Bien que plusieurs études aient été effectuées depuis les dernières années, les causes exactes de la maladie demeurent inconnues. Par ailleurs, on sait que ces événements sont régis par des molécules pro-inflammatoires et des enzymes potentiellement activées par la furine, ce qui fait de celle-ci une cible thérapeutique intéressante.

David Bouchard (Bouchard, 2000) avait construit et caractérisé au cours de ses études de maîtrise un adénovirus recombinant pour un inhibiteur puissant de la furine, soit l' α_1 -PDX (Anderson et al., 1993). Le but de cette construction était de pouvoir modifier in vivo l'activité de la furine, et par conséquent d'étudier le rôle de cette dernière dans la l'arthrite expérimentale chez le rat.

Ainsi, les premières expériences ont consisté à vérifier la capacité d'infection et la production de l' α_1 -PDX chez les synoviocytes de type B de rat en culture primaire (afin de se rapprocher d'un contexte d'arthrite). Donc les premiers résultats ont permis d'observer la production d' α_1 -PDX par les synoviocytes infectés. Par conséquent, ces résultats indiquent que les synoviocytes sont infectables. De plus, la production protéique est dépendante de la MOI et le patron de bandes obtenu en gel SDS-PAGE concorde avec les résultats de Benjennet et al. (Benjennet et al. 1997) à l'exception de la présence d'une bande d'environ 42 kDa qui n'est pas observée par ce groupe, mais qui pourrait correspondre à une forme dégradée de l' α_1 -PDX puisque celle-ci n'est présente que lorsque l' α_1 -PDX est fortement

exprimé (figure 12). Ainsi, l'adénovirus recombinant s'avère efficace dans l'infection et dans la production de l' α_1 -PDX chez les synoviocytes en culture.

Par ailleurs, il est important de préciser que l'utilisation d'une MOI de 50 du virus AdCMVtTa a été choisi suite à des essais préliminaires visant à déterminer l'expression maximale des transgènes pour une charge virale minimale. De plus, dans la section 3.1 des résultats, une augmentation de transduction du transgène GFP à une MOI supérieure à 100 d'AdTR5PDX est observée et ce, même si la MOI du virus AdCMVtTa est de 50. Ceci peut s'expliquer par les différentes méthodes de titration des virus utilisées. Les virus encodant l'ADNc de la GFP ont été titrés à l'aide de la loi de Poisson alors que le virus AdCMVtTa n'encodant pas la GFP a été titré par la méthode usuelle de plaque de lyse de cellules infectées. Afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de différence entre les titres, il serait favorable d'utiliser une méthode de titration identique pour les deux types de virus. Si cette hypothèse s'avère exacte, les titres réels des 2 virus pourraient être identiques et la majorité des cellules serait donc infectée par les 2 virus.

La deuxième explication de ces résultats est qu'il existe une différence entre les 2 promoteurs insérés dans le génome des 2 types de virus, ce qui conduit en une expression protéique différente. Ainsi, le virus AdCMVtTa contient un puissant promoteur constitutif, le promoteur CMV, pouvant induire une très grande production de la protéine tTa Cette protéine active ensuite le promoteur du virus AdTR5PDX. Par conséquent, il est possible de voir des augmentations de production des transgènes lorsqu'une cellule est infectée par un ratio différent d'AdCMVtTa par rapport à l'AdTR5PDX (1 :5 dans ce cas). D'ailleurs, dans la section 3.1 des résultats, une augmentation de la fluorescence moyenne des cellules infectées a été rapportée suite à une MOI croissante du virus AdTR5PDX, tout en gardant

la MOI du virus AdCMVtTa à 50. Ceci indique que l'expression des transgènes est dépendante de la MOI du virus AdTR5PDX utilisée. On peut aussi conclure que le tTa est produit en quantité suffisante pour activer le promoteur de tous les virus AdTR5PDX qui sont entrés dans la cellule.

De plus, suite à l'observation des cellules au bleu de trypan, les virus utilisés à des MOI maximales (250) n'ont pas d'impact sur la viabilité des synoviocytes à 48 heures. L'impact de l'infection virale sur la viabilité des cellules à plus long terme n'a pas été étudié.

Étant donné que le but de l'utilisation de cet adénovirus était d'inhiber la furine *in vivo*, nous avons vérifié l'effet de ce dernier sur la maturation des substrats TGF- β_1 et PDGF AB par les synoviocytes infectés (figure 13 et 14). Ces deux substrats ont été utilisés en tant que contrôle d'efficacité d'inhibition de la furine pour deux raisons : d'abord il a été démontré dans le laboratoire que la furine mature le TGF- β_1 (Dubois et al., 1995; 2001) ainsi que le PDGF AB (Laprise et Dubois, résultats non publiés). La seconde raison de leur utilisation est parce qu'ils sont impliqués dans la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, les résultats ont démontré que l'inhibition de la furine empêchait la maturation subséquente de ces substrats, et ce, de façon dépendante de la MOI. Toutefois, ce système ne nous permet pas d'inhiber la maturation à 100%. Ceci peut s'expliquer par une incapacité d'infecter 100% des cellules. D'ailleurs nos études utilisant la GFP en tant que traceur indiquent qu'environ 55% des synoviocytes sont infectables dans nos conditions expérimentales (figure 11). Une explication alternative est que d'autres convertases de la famille des PCs puissent maturer ces substrats. D'ailleurs il existe une redondance entre certaines convertases de proprotéines. Ainsi, la PC7, la PACE4 et la PC6B, qui sont exprimées dans

une grande variété de tissus, pourraient maturer le TGF- β 1 et le PDGF AB. Il a déjà été démontré qu'une surexpression de ces convertases par le virus vaccinia recombinant, engendre une maturation du pro-TGF- β 1 chez les cellules Lovo et BSC-40, mais à un niveau beaucoup moins élevé que la furine (Dubois et al., 2001). Tel que mentionné dans l'introduction, l' α ₁-PDX possède également une affinité pour la PC6B, quoique plus faible que celle pour la furine, alors qu'il a très peu d'effet sur la PACE4 et la PC7 (Jean et al., 1998). Puisque, ces convertases sont faiblement inhibées par l' α ₁-PDX, leur activité pourrait donc être responsable de l'inhibition incomplète de la maturation des substrats TGF- β 1 et PDGF AB. Toutefois, les 2 facteurs de croissances ont montré des niveaux d'inhibition différents. L'hypothèse pouvant expliquer ces différences est que les convertases énumérées ci-haut, en particulier la furine, auraient une plus grande affinité face au site de reconnaissance du pro-TGF- β 1 par rapport à celui du pro-PDGF AB, ce qui nécessiterait des concentrations plus élevées d' α ₁-PDX pour inhiber la maturation du TGF- β 1 que celle du PDGF AB. L'importance de l'inhibition de ces 2 facteurs découle de leur participation dans la réponse inflammatoire lors de polyarthrite rhumatoïde, en agissant soit en tant qu'agents mitogènes, chimioattractants, ou en modulant l'expression de molécules d'adhésion. Finalement, l'inhibition de la maturation de ces substrats démontre que la furine est inhibée par l' α ₁-PDX produit par les synoviocytes infectés.

L'implication de la furine dans l'activation de la MT1-MMP/MMP-2 peut dépendre des types cellulaires tel que l'a démontré le groupe de Sato et al. Ce groupe avait observé que chez les fibroblastes du derme de lapin, l'activation de la MMP-2 médiée par la MT1-MMP se faisait de façon indépendante de la furine, alors que chez les fibroblastes du col utérin humain, l'activation de la MMP-2 via la MT1-MMP était dépendante de la

convertase (Sato et al. 1999). Ainsi, après avoir vérifié la capacité d'inhibition de la furine chez les synoviocytes, nous avons voulu vérifier l'effet de son inhibition sur la maturation de la MT1-MMP et de la MMP-2 chez ces cellules. Tel qu'élaboré en introduction, les deux métalloprotéinases sont impliquées au niveau du remodelage et de la dégradation de la matrice extra-cellulaire dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde (Konttinen et al., 1999b).

Les résultats visualisés par zymographie ont démontré (figure 15) que l'inhibition de la furine par l' α_1 -PDX mène à une diminution d'activité gélatinolytique des formes intermédiaires et actives de la MMP-2 des synoviocytes, ainsi qu'à une augmentation de la forme pro. Ceci suggère donc que l'inhibition de l'activité de la furine empêche la maturation de la MT1-MMP et par conséquent l'activation de la MMP-2. Ainsi, la maturation de la MT1-MMP/MMP-2 chez les synoviocytes semble se faire via l'action de cette enzyme. Encore une fois, l'inhibition incomplète de la maturation de ces métalloprotéinases pourrait s'expliquer, en partie, par l'incapacité d'infecter 100% des cellules. De plus, comme nous en avons parlé plus tôt, d'autres convertases de proprotéines telles que la PC7, la PACE4 et PC6B pourraient maturer la MT1-MMP puisqu'elles sont exprimées dans une grande variété de tissus et sont très faiblement inhibées par l' α_1 -PDX (Jean et al., 1998). Bien que l'inhibition des substrats ne soit pas complète, les résultats permettent tout de même de suggérer l'implication de la furine dans l'activation de la MMP-2 (via la MT1-MMP) dans l'arthrite étant donné que les synoviocytes de type B sont de grands producteurs de ces 2 enzymes (Konttinen et al., 1999). Afin de supporter l'implication de la furine dans la maturation de la MT1-MMP chez les synoviocytes, nous avons tenté de démontrer une diminution de la maturation de cette métalloprotéinase par

buvardage de type western, toutefois les anticorps disponibles commercialement possèdent peu d'affinité pour la MT1-MMP de rats donc cet aspect du travail n'a pu être développé davantage.

Le système adénoviral que nous avons utilisé possède un promoteur régulier à la doxycycline. Par conséquent, nous avons tout d'abord testé la capacité régulatrice de ce vecteur dans notre système utilisant des synoviocytes en culture. Dans un premier temps, nous avons observé une absence de production du gène rapporteur GFP chez les cellules infectées avec l'AdTR5PDX et mises en présence de 1 µg/ml de doxycycline (figure 16 a). Ceci confirme l'inhibition de la transcription des gènes par le promoteur CMV modulable. Nous avons aussi vérifié cette capacité régulatrice au niveau de la maturation des substrats TGF-β1 et PDGF AB. Ainsi, les cellules infectées avec l'AdTR5PDX en présence de doxycycline montrent une maturation de 72% pour le TGF-β1 (figure 16 b) et de 63.3% de PDGF AB (figure 16 c). Cependant, la production des substrats est plus faible que les cellules contrôles ayant été infectées avec le vecteur vide, ce qui suggère que la doxycycline ait un effet d'inhibition de la production de ces substrats et ce, possiblement au niveau de la synthèse d'ADN. D'ailleurs, des études ont démontré l'action inhibitrice de la doxycycline sur la synthèse d'ADN chez les lymphocytes à des concentrations thérapeutiques (Pötts et al., 1983). Il a aussi été démontré que la doxycycline, à des concentrations de 5µg/ml, induit l'apoptose des cellules tumorales du cancer de la prostate et du sein (Fife et al., 1998) ainsi que chez les cellules d'ostéosarcome (Fife et al., 1997). Afin de vérifier l'effet de la doxycycline sur les cellules étudiées, nous aurions pu vérifier les niveaux de synthèse d'ADN par un test d'incorporation à la thymidine.

Bien que la reprise de production de substrats matures ne soit pas complète, nous pouvons tout de même conclure de cette expérience que l'AdTR5PDX est régulable puisqu'une forte augmentation de maturation est observée par les cellules infectées avec cet adénovirus et traitées à la doxycycline. Il faudra toutefois vérifier l'effet inhibiteur de la doxycycline sur la synthèse d'ADN lors des prochaines études impliquant cette dernière.

Étant donné que nous avons démontré que le système est fonctionnel *in vitro* chez les synoviocytes de type B en culture, l'étape suivante a été de démontrer sa fonctionnalité *in vivo* chez des rats arthritiques induits au collagène de type II. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression du transgène α_1 -PDX dans les genoux en injectant l'adénovirus AdTR5PDX dans ces articulations, puis en prélevant les corps adipeux infra-patellaires pour en mesurer l'ARNm par RT-PCR. Ainsi, les résultats ont démontré qu'il y avait une expression du transgène aux jours 7, 15, et 21 se traduisant par l'amplification d'une bande d'une longueur équivalente à la longueur théorique (figure 17). De plus, les bandes amplifiées aux jours 15 et 21 sont plus intenses que celles du jour 7, ce qui suggère que l'expression du transgène soit plus forte à ces temps expérimentaux. Toutefois on ne peut vraiment conclure sur les différences des niveaux d'expression des transgènes puisque le RT-PCR effectué n'était pas quantitatif. La faible quantité d'ARN extraite des tissus ne nous a pas permis d'établir une courbe afin de déterminer le nombre de cycle correspondant à la phase de linéarité, permettant par la suite de faire le PCR quantitatif.

Bien que nous ayons démontré l'expression du transgène *in vivo*, il nous était impossible de déterminer le(s) type(s) cellulaire(s) où celui-ci était exprimé puisque la méthode développée pour prélever la membrane synoviale prélève en même temps le corps adipeux infra-patellaire qui est composé d'adipocytes. Prenant avantage du fait que

l'adénovirus recombinant contient un gène rapporteur GFP introduit dans une cassette dicistronique à la suite de l' α_1 -PDX, nous avons vérifié le type de cellules exprimant le transgène par microscopie confocale à balayage. Au cours d'une étude préalable, il avait été démontré que la production de la GFP était proportionnelle à celle de l' α_1 -PDX (Bouchard, 2000). Les images obtenues du corps adipeux infra-patellaire ont permis de conclure que la fluorescence, donc la production d' α_1 -PDX, se situait exclusivement au niveau de la membrane synoviale (figure 18). Par conséquent, l'absence de fluorescence au niveau des adipocytes (qui ont été observés dans le visible avant de prendre les images de fluorescence) indique que ces derniers ne semblent pas avoir été infectés. Ceci peut s'expliquer par la méthode d'injection qui relâche les virus dans la cavité articulaire, soit à proximité de la membrane synoviale, plutôt que dans la couche adipeuse. De plus, l'image à plus fort grossissement d'une cellule permet de constater que la fluorescence se trouve majoritairement au cytoplasme et une expression plus faible est détectée au noyau, ce qui concorde avec la localisation de la protéine GFP de type sauvage (Ogawa et al., 1995; Gerdes et Kaether, 1996).

Nous avons démontré au cours de la recherche que l'adénovirus recombinant AdTR5PDX était modulable par la doxycycline chez les synoviocytes en cultures. De plus, nous savons maintenant que celui-ci permet l'expression des transgènes lorsqu'il est injecté dans les genoux de rat. Par conséquent, nous avons voulu vérifier si la doxycycline administrée dans l'eau des rats arthritiques pouvait inhiber l'expression des transgènes des virus injectés dans les genoux des animaux. Les résultats en microscopie à fluorescence démontrent que l'antibiotique inhibe la production de fluorescence et par conséquent la production du transgène α_1 -PDX (Figure 19 B et D). Ces résultats sont comparables à

d'autres études ayant démontré que l'administration de doxycycline (débutant avant les injections) empêchait la transcription des transgènes 3 ou 7 jours suivant l'infection (Smith-Arica et al., 2001; Harding et al., 1998) De plus, nous avons pu vérifier que l'arrêt d'administration de l'antibiotique réactive la cassette transcriptionnelle en permettant la transcription des transgènes 18 jours suivant l'arrêt d'administration de la doxycycline (figure 19 F). Cette reprise de transcription est légèrement plus lente que celle rapportée par le groupe de Smith-Arica et al. qui ont détecté une reprise de transcription au niveau de la glande pituitaire 7 jours suivant l'arrêt d'administration de l'antibiotique (Smith-Arica et al., 2001). D'autre part, la reprise d'expression de notre système est beaucoup plus rapide que celle observée au niveau de l'hippocampe par le groupe de Harding et al., qui se produisait 11 semaines suivant l'arrêt d'administration de la doxycycline (Harding et al., 1998). Ceci suggère donc que notre système soit plus efficace que celui du groupe de Harding au niveau de la régulation par la doxycycline, puisque la remise en marche du système se fait dans un délai plus court. Cette différence de rapidité de reprise de transcription des systèmes pourrait s'expliquer par une variation au niveau de la demi-vie de la doxycycline dépendant des différents tissus.

Les expériences en microscopie à fluorescence ont aussi permis de constater que la production de GFP était maximale au jour 15 suivant l'injection adénoviral (figure 19 C). De plus, la fluorescence est toujours détectée au jour 25 *post*-injection, ayant toutefois diminuée en intensité (figure 19 E). Ces résultats permettent de conclure que le système adénoviral utilisé est efficace en ce qui concerne sa capacité d'infection spécifique des synoviocytes, sa production du transgène α_1 -PDX et sa capacité régulatrice par la doxycycline.

Le but ultime de l'étude était de vérifier l'effet de l'inhibition de la furine sur le développement de l'arthrite expérimentale induite par le collagène de type II chez le rat. Dans un premier temps, nous avons vérifié par l'index articulaire et par la mesure de l'épaisseur des chevilles, si l'adénovirus injecté dans ces articulations produisait un effet chez les rats contrôles. Ces résultats se sont avérés concluants puisqu'une légère inflammation observée au site d'injection 24 heures suivant l'administration s'est par la suite résorbée (figure 20). Ensuite nous avons évalué le développement de l'arthrite des pattes de rats injectées au niveau des chevilles avec l'AdTR5PDX en comparaison avec les pattes injectées avec l'AdCMVGFP qui sert de vecteur contrôle.

Au niveau de l'index articulaire, les résultats ont démontré une diminution de la sévérité de l'arthrite dans les pattes injectées avec l'AdTR5PDX sans toutefois empêcher complètement le développement de la pathologie (figure 21 B). D'ailleurs, les résultats concernant les mesures de l'inflammation montrent aussi un niveau plus faible d'inflammation, toujours chez les pattes injectées avec l'adénovirus produisant l' α_1 -PDX, sans toutefois bloquer complètement l'inflammation (figure 21 A). De plus, l'inhibition de la pathologie semble plus marquée jusqu'au jour 20, ensuite les différences entre les rats contrôles et traités à l'AdTR5PDX sont moins importantes, ce qui suggère que la furine puisse avoir une implication plus importante dans les stades précoces de la pathologie. L'incapacité d'inhiber complètement l'inflammation ainsi que le développement de la pathologie s'explique possiblement par l'injection trop tardive des adénovirus (jour 5 ou 7 *post*-injection au collagène) comparativement à l'enclenchement de la maladie induite par le collagène. D'ailleurs nous avons observé à la figure 19 C une production maximale du transgène au jour 15 suivant l'injection des adénovirus ce qui suggère que dans les

expériences *in vivo*, l'inhibition de la furine s'est probablement produite trop tard puisque les signes de la maladie (rougeur et inflammation) dans ce modèle d'arthrite sont détectables aux environs du jour 10. Étant donné que nous voulions vérifier l'effet de l'inhibition de la furine dans l'initiation de la maladie, nous aurions par conséquent dû injecter l'adénovirus avant l'induction au collagène afin de s'assurer d'une production maximale du transgène, avant que les signes de la pathologie soient évidents et avant que la cascade d'activation des molécules pro-inflammatoires et des enzymes impliquées dans la dégradation ne soit enclenchée. Parmi les effets anti-inflammatoires potentiels de l' α_1 -PDX, il est important de souligner que l'inhibition de la TACE, un substrat potentiel de la furine, pourrait empêcher la maturation du TNF α qui est à l'apex de la cascade d'activation des cytokines pro-inflammatoires (Feldmann et al., 1996). D'ailleurs, il a été démontré dans le laboratoire du Dre Dubois que la TACE est maturée en partie par la furine et par d'autres convertases de proprotéines dont la PC2. (manuscrit en préparation). De plus, nous avons vu en introduction que plusieurs autres métalloprotéinases, entre autres la MMP-2, la MT1-MMP, la MMP-1, la MMP-8, MMP-13, la MMP-9 (Konttinen et al., 1999 a, b) sont impliquées dans la pathologie et que la furine participe à la maturation de plusieurs d'entre elles et ce, de façon directe ou indirecte.

Par ailleurs, tel que mentionné précédemment, d'autres convertases (PC7, PACE4 et PC6B), étant faiblement inhibées par l' α_1 -PDX, pourraient maturer les différents substrats impliqués dans la PR et conduire à une inhibition incomplète de l'inflammation et de la sévérité de la maladie. D'autres substances pourraient aussi jouer un rôle dans la maturation des substrats que nous avons étudié. Par exemple, la plasmine peut activer le TGF- β *in vivo* (Khalil et al., 1996; Chu et Kawinski, 1998).

Le liquide synovial pourrait participer à l'incapacité de l'AdTR5PDX à inhiber totalement *in vivo* l'inflammation puisque ce dernier contient des protéases qui pourraient possiblement affecter les protéines d'attachement du virus, empêchant celui-ci d'infecter les cellules. Il a aussi été démontré que 70% des patients arthritiques possèdent des anticorps neutralisant contre l'adénovirus humain de type 5 (Goossens et al., 2001). Toutefois, il serait surprenant de retrouver ces anticorps chez les rats puisque ceux-ci sont n'ont jamais été en contact avec des agents pathogènes avant l'injection des adénovirus.

Une autre explication concernant l'incapacité de l'AdTR5PDX à inhiber totalement les conséquences articulaires de l'arthrite expérimentale est due au fait que l'adénovirus est reconnu pour avoir une pénétrance tissulaire limitée. Il a été démontré chez des cellules de carcinome oral (Tu138), que l'infection avec des adénovirus, répétée 2 fois dans un intervalle de 18 heures, résulte en une pénétrance d'un maximum de 4 couches de cellules (Clayman et al., 1995). En se basant sur ces résultats, nous pouvons suggérer que dans notre système, les virus n'infectent qu'une partie des synoviocytes. Nous croyons également que d'autres types cellulaires tels que les chondrocytes, ne soient pas infectables par le virus, puisque ces cellules sont situées au niveau du cartilage, donc à un niveau trop profond pour la pénétrance de l'adénovirus. Nous avons tenté de vérifier si l'adénovirus infectait ces cellules en faisant des coupes de genoux enrobés dans la paraffine. Malheureusement, nous perdions le signal de fluorescence. Les temps de décalcification nécessaires à la coupe des tissus étaient probablement trop longs et pouvaient engendrer une dégradation de la GFP. De plus, la paraffine est responsable d'une forte auto fluorescence (Ikawa et al. 1999), ce qui nous empêchait de détecter l'expression de GFP au microscope à fluorescence. Des essais de coupes de tissus congelés à l'aide de cryostat ont

aussi été effectués, cependant les coupes étaient de mauvaise qualité due à la difficulté de couper le tissu osseux et n'adhéraient pas aux lames traitées à la polylysine. Ainsi, nous n'avons pu vérifier si l'adénovirus infectait d'autres cellules que les synoviocytes de la membrane synoviale. Toutefois, nous avons vu que les chondrocytes produisent un bon nombre de métalloprotéinases en condition pathologique. Ainsi, l'incapacité d'inhiber la furine de ces cellules pourrait être une des causes de la faible inhibition du développement de la maladie observée.

Afin de remédier à ce problème, l'utilisation d'une thérapie combinée pourrait s'avérer des plus utiles. Il a été mentionné précédemment que la doxycycline pouvait inhiber la synthèse d'ADN ainsi qu'induire l'apoptose des cellules. De plus, cette dernière est capable d'inhiber l'activité de la MMP-1, la MMP-13 (Shlopov et al., 2001) la MMP-8 (Nordstrom et al., 1998) la MMP-2 ainsi que la destruction des tissus (Amin et al., 1996). D'ailleurs, l'administration par voie orale de doxycycline chez des chiens atteints d'ostéoarthrite (maladie impliquant la dégradation du cartilage et des os) diminue de façon marquée la sévérité de la maladie (Yu et al., 1992)

Ainsi, il aurait été bénéfique de construire le vecteur adénoviral de façon à ce que l'expression des transgènes soit activée en présence de doxycycline, et inhibée en absence de l'antibiotique, ce qui aurait conduit à une thérapie combinée comprenant le transgène et l'antibiotique. Par ailleurs, ce système est beaucoup plus dispendieux et nous n'aurions pu conclure que les effets observés sont dus à l'inhibition de la furine.

5. CONCLUSION

Le but ultime de cette étude consistait à vérifier l'effet de l'inhibition de la furine dans la pathologie de l'arthrite expérimentale. Pour parvenir à nos fins, nous avons caractérisé l'AdTR5PDX *in vitro* chez des synoviocytes de type B en culture, ensuite *in vivo* chez des rats arthritiques. Les résultats nous ont permis de conclure que l'adénovirus était fonctionnel *in vitro* et *in vivo*. D'ailleurs, il est important de souligner qu'il n'a encore jamais été publié de recherches utilisant un système adénoviral modulable dans l'étude de l'arthrite expérimentale.

L'étape finale de l'étude a consisté à vérifier l'effet de l'inhibition de la furine sur le développement de l'arthrite expérimentale induite par le collagène de type II. Ces résultats ont d'ailleurs démontré une diminution de l'inflammation et de la sévérité de la pathologie, sans toutefois parvenir à empêcher totalement le développement. Ces données suggèrent toutefois que la furine puisse jouer un rôle dans la pathologie. D'ailleurs, il serait intéressant de refaire une expérience *in vivo* en injectant les adénovirus avant d'induire la pathologie chez les rats. Ceci pourrait optimiser nos résultats tout en confirmant l'implication de la furine dans la maturation de molécules impliquées dans des stades précoces de cette pathologie. De plus, l'adénovirus AdTR5FUR dont nous disposons dans le laboratoire, code pour la protéine furine et pourrait être injecté dans les chevilles de rats sains. Il serait ainsi possible de vérifier si la surexpression de la furine peut induire l'arthrite expérimentale. Nous obtiendrions donc une preuve additionnelle de l'implication de la furine dans la maladie. Afin de démontrer que la furine est responsable de la maturation de plusieurs substrats impliqués dans l'arthrite, la maturation de la TACE a aussi été étudiée dans notre laboratoire. Il serait aussi intéressant d'étudier la maturation de l'agrécane

puisque celle-ci possède un site putatif de reconnaissance par la furine. De plus, elle est impliquée dans la dégradation des articulations des patients arthritiques, puisqu'elle est responsable du clivage de l'agrécan, la composante majeure du cartilage hyalin articulaire (Fosang et al., 1996).

Il est bien évident que tant que l'étiologie de la pathologie demeurera inconnue, cette dernière restera probablement incurable. Toutefois, l'inhibition par la furine d'une grande quantité de molécules impliquées dans la pathologie pourrait mener à une nouvelle stratégie thérapeutique afin de prévenir l'inflammation ainsi que les dommages articulaires.

6. REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier Dre Claire Dubois qui m'a donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire et de m'initier à la rigueur scientifique. Je la remercie également pour sa patience et ses encouragements face aux difficultés rencontrées au cours de ces deux années ainsi que pour sa généreuse contribution à ma formation scientifique.

Je tiens à remercier Dr Bernard Massie de l'Institut de recherche en biotechnologie de Montréal pour nous avoir fournis ses adénovirus ainsi que son expertise.

Merci aux membres du laboratoire pour leur agréable présence. Je remercie particulièrement ma bonne amie Stéphanie McMahon d'avoir toujours pris le temps nécessaire pour répondre à mes nombreuses interrogations et pour tout le plaisir que j'ai pu avoir en sa compagnie. Je remercie Francine Grondin pour sa générosité et son aide apportée tout au long de la maîtrise. Merci à François Blanchette pour ses judicieux conseils et les discussions enrichissantes. J'aimerais aussi remercier Marie-Hélène Laprise pour son écoute et sa jovialité.

Je dis un gros merci à Léonid Volkov pour son dévouement lors des prises d'images en microscopie confocale ainsi que pour le traitement des données.

Je tiens à remercier mes parents pour leur support, leurs encouragements et parce qu'ils ont toujours cru en moi.

Finalement je remercie tous les membres du département d'immunologie pour les nombreux échanges qui m'ont permis d'élargir mes connaissances scientifiques.

RÉFÉRENCES

- Abbaszade I., Liu R.Q., Yang F., Rosenfeld S.A., Ross O.H., Link J.R., Ellis D.M., Tortorella M.D., Pratta M.A., Hollis J.M., Wynn R., Duke J.L., George H.J., Hillman M.C. Jr, Murphy K., Wiswall B.H., Copeland R.A., Decicco C.P., Bruckner R., Nagase H., Itoh Y., Newton R.C., Magolda R.L., Trzaskos J.M. et Burn T.C. (1999). Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* 1999 274 : 23443-50.
- Akama H., Ichikawa Y., Matsushita Y., Shinozawa T. et Homma M. (1990). Mononuclear cells enhance prostaglandin E2 production of polymorphonuclear leukocytes via tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 168 : 857-862.
- Albani S., Keystone E.C., Nelson J.L., Ollier W.E., La Cava A., Montemayor A.C., Weber D.A., Montecucco C., Martini A. et Carson D.A. (1995) Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1: 448-452.
- Allard S.A., Bayliss M.T. et Maini R.N. (1990). The synovium-cartilage junction of the normal human knee. Implications for joint destruction and repair. *Arthritis Rheum* 33 : 1170-1179.
- Allen J.B., Manthey C.L., Hand A.R., Ohura K., Ellingsworth L. et Wahl S.M. (1990). Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 171 : 231-47.
- Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Brown C.B., Kaushansky K. et Firestein G.S. (1991). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 146 : 3365-3371.
- Amin A.R., Attur M.G., Thakker G.D., Patel P.D., Vyas P.R., Patel R.N., Patel I.R. et Abramson S.B. (1996). A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 14014-9.
- Anderson E.D., Thomas L., Hayflick J.S. et Thomas G. (1993). Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem* 268 : 24887-91.
- Anderson E.D., VanSlyke J.K., Thulin C.D., Jean F. et Thomas G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 16 : 1508-1518.

- Andrews J.L., Kadan M.J., Gorziglia M.I., Kaleko M. et Connelly S. (2001). Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII. *Mol Ther* 3 : 329-36.
- Assoian R.K., Komoriya A., Meyers C.A., Miller D.M. et Sporn M.B. (1993). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 258 : 7155-7160.
- Atkinson S.J., Crabbe T., Cowell S., Ward R.V., Butler M.J., Sato H., Seiki M., Reynolds J.J. et Murphy G. (1995). Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of progelatinase A by cell membranes. *J Biol Chem* 270 : 30479-85.
- Aupperle K.R., Boyle D.L., Hendrix M., Seftor E.A., Zvaifler N.J., Barbosa M. et Firestein G.S. (1998). Regulation of synoviocytes proliferation, apoptosis and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 152 : 1091-1098.
- Ayoubi T.A., Creemers J.W., Roebroek A.J. et Van de Ven W.J. (1994). Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J Biol Chem* 269 : 9298-303.
- Bathurst I.C., Brennan S.O., Carrell R.W., Cousens L.S., Brake A.J. et Barr P.J. (1987). Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science* 235 : 348-350.
- Beckmann M.P., Betsholtz C., Heldin C.H., Westermark B., Di Marco E., Di Fiore P.P., Robbins K.C. et Aaronson S.A. (1988). Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains. *Science* 241 : 1346-1349.
- Benjannet S., Savaria D., Laslop A., Munzer J.S., Chretien M., Marcinkiewicz M. et Seidah N.G. (1997). Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 272 : 26210-8.
- Beranger J.Y., Godeau G., Frances C., Robert L. et Hornebeck W. (1994). Presence of gelatinase A and metalloelastase type protease at the plasma membrane of human skin fibroblasts. Influence of cytokines and growth factors on cell-associated metalloendopeptidase levels. *Cell Biol Int* 18 : 715-22.
- Betsholtz C., Johnsson A., Heldin C.H., Westermark B., Lind P., Urdea M.S., Eddy R., Shows T.B., Philpott K., Mellor A.L., et al. (1986). cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320 : 695-699.
- Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A. et Engler J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4 : 197-250.

- Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J. et Cerretti D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385** : 729-33.
- Blanchette F., Day R., Dong W., Laprise M.H. et Dubois C.M. (1997). TGF β 1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest* **99** : 1974-1983.
- Blanchette F., Rivard N., Rudd P., Grondin F., Attisano L. et Dubois C.M. (2001b). Cross-talk between the p42/p44 MAP Kinase and Smad Pathways in Transforming Growth Factor beta 1-induced Furin Gene Transactivation. *J Biol Chem* **276** : 33986-33994.
- Blanchette F., Rudd P., Grondin F., Attisano L. et Dubois C.M. (2001a). Involvement of Smads in TGF β 1-induced furin (fur) transcription. *J Cell Physiol* **188** : 264-273.
- Blatti S.P., Foster D.N., Ranganathan G., Moses H.L. et Getz M.J. (1988). Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** : 1119-1123.
- Bosshart H., Humphrey J., Deignan E., Davidson J., Drazba J., Yuan L., Oorschot V., Peters P.J. et Bonifacino J.S. (1994). The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol* **126** : 1157-72.
- Bostrom H., Willetts K., Pekny M., Leveen P., Lindahl P., Hedstrand H., Pekna M., Hellstrom M., Gebre-Medhin S., Schalling M., Nilsson M., Kurland S., Tornell J., Heath J.K. et Betsholtz C. (1996). PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* **85** : 863-873.
- Bouchard, D. (2000). Production et caractérisation d'un système inductible de l' α 1 AT-PDX : un inhibiteur puissant de la furine. Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Brandes M.E., Allen J.B., Ogawa Y. et Wahl S.M. (1991). Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest* **87** : 1108-1113.
- Brennan F.M., Chantry D., Jackson A., Maini R. et Feldmann M. (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2** : 244-247.
- Brennan F.M., Gibbons D.L., Mitchell T., Cope A.P., Maini R.N. et Feldmann M. (1992). Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. *Eur J Immunol* **22** : 1907-1912.

- Bresnihan B. (1999). Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **26** : 717-719.
- Bruzzaniti A., Goodge K., Jay P., Taviaux S.A., Lam M.H., Berta P., Martin T.J., Moseley J.M. et Gillespie M.T. (1996). PC8, a new member of the convertase family. *Biochem J* **314** : 727-731.
- Bryan P., Pantoliano M.W., Quill S.G., Hsiao H.Y. et Poulos T. (1986). Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83** : 3743-3745.
- Burmester G.R., Stuhlmuller B., Keyszer G. et Kinne R.W. (1997). Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* **40** : 5-18.
- Butler G.S., Butler M.J., Atkinson S.J., Will H., Tamura T., van Westrum S.S., Crabbe T., Clements J., d'Ortho M.P. et Murphy G. (1998). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* **273** : 871-80.
- Bywater M., Rorsman F., Bongcam-Rudloff E., Mark G., Hammacher A., Heldin C.H., Westermark B. et Betsholtz C. (1988). Expression of recombinant platelet-derived growth factor A- and B-chain homodimers in rat-1 cells and human fibroblasts reveals differences in protein processing and autocrine effects. *Mol Cell Biol* **8** : 2753-2762.
- Centrella M., Horowitz M.C., Wozney J.M. et McCarthy T.L. (1994). Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev* **15** : 27-39.
- Charles P.J., Smeenk R.J., De Jong J., Feldmann M. et Maini R.N. (2000) Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. *Arthritis Rheum* **43** : 2383-90.
- Chretien M. et Li C.H. (1967). Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotrophic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem* **45** : 1163-1174.
- Chu T.M. et Kawinski E. (1998). Plasmin, subtilisin-like endoproteases, tissue plasminogen activator, and urokinase plasminogen activator are involved in activation of latent TGF-beta 1 in human seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **253** : 128-34.
- Clark D.A. et Coker R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* **30** : 293-298.

- Clayman G.L., Trapnell B.C., Mittereder N., Liu T.J., Eicher S. et Shillitoe E.J. (1995). Transduction of normal and malignant oral epithelium by an adenovirus vector: the effect of dose and treatment time on transduction efficiency and tissue penetration. *Can Gene Ther* 2 : 105-111.
- Constam D.B., Calton M. et Robertson E.J. (1996). SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J Cell Biol* 134 : 181-191.
- Cook A.D., Rowley M.J., Mackay I.R., Gough A. et Emery P. (1996). Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression. *Arthritis Rheum* 39 : 1720-1727.
- Cook A.D., Rowley M.J., Stockman A., Muirden K.D. et Mackay I.R. (1994). Specificity of antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21 : 1186-91.
- Cowell S., Knauper V., Stewart M.L., D'Ortho M.P., Stanton H., Hembry R.M., Lopez-Otin C., Reynolds J.J. et Murphy G. (1998). Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J* 331 : 453-8.
- Creemers L.B., Jansen I.D., Docherty A.J., Reynolds J.J., Beertsen W. et Everts V. (1998). Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. *Matrix Biol* 17 : 35-46.
- Creemers J.W., Siezen R.J., Roebroek A.J., Ayoubi T.A., Huylebroeck D. et Van de Ven W.J. (1993). Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 268 : 21826-21834.
- Creemers J.W., Vey M., Schafer W., Ayoubi T.A., Roebroek A.J., Klenk H.D., Garten W. et Van de Ven W.J. (1995). Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270 : 2695-2702.
- Day R., Schafer M.K., Cullinan W.E., Watson S.J., Chretien M. et Seidah N.G. (1993). Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 149 : 27-30.
- Dayer J.M., de Rochemonteix B., Burrus B., Demczuk S. et Dinarello C.A. (1986). Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest* 77 : 645-648.
- De Bie I., Marcinkiewicz M., Malide D., Lazure C., Nakayama K., Bendayan M. et Seidah N.G. (1996). The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol* 135 : 1261-1275.
- Derynck R. (1994). TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem* 19 : 548-553.

- Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., Assoian R.K., Roberts A.B., Sporn M.B. et Goeddel D.V. (1985). Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316** : 701-705.
- Derynck R., Lindquist P.B., Lee A., Wen D., Tamm J., Graycar J.L., Rhee L., Mason A.J., Miller D.A., Coffey R.J. et al. (1988). A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* **7** : 3737-3743.
- DiCorleto P.E. et Bowen-Pope D.F. (1983). Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80** : 1919-1923.
- Dong W., Marcinkiewicz M., Vieau D., Chretien M., Seidah N.G. et Day R. (1995). Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J Neurosci* **15** : 1778-1796.
- d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L et Murphy G. (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* **250** : 751-7.
- Dubois C.M., Blanchette F., Laprise M.H., Leduc R., Grondin F. et Seidah N.G. (2001). Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* **158** : 305-316.
- Dubois C.M., Laprise M.H., Blanchette F., Gentry L.E. et Leduc R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270** : 10618-10624.
- Dufour E.K., Denault J.B., Hopkins P.C. et Leduc R. (1998). Serpin-like properties of alpha1-antitrypsin Portland towards furin convertase. *FEBS Lett* **426** : 41-6.
- Durie F.H., Fava R.A. et Noelle R.J. (1994). Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* **73** : 11-18.
- Ebringer A., Khalafpour S. et Wilson C. (1989) Rheumatoid arthritis and Proteus: a possible aetiological association. *Rheumatol Int* **9** : 223-228.
- Edelberg J.M., Aird W.C., Wu W., Rayburn H., Mamuya W.S., Mercola M. et Rosenberg R.D. (1998). PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J Clin Invest* **102** : 837-843.
- Evans C.H. et Robbins P.D. (1999). Gene therapy of arthritis. *Intern Med* **38** : 233-9.
- Fava R., Olsen N., Keski-Oja J., Moses H. et Pincus T. (1989). Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions. *J Exp Med* **169** : 291-296.

- Fava R.A., Olsen N.J., Postlethwaite A.E., Broadley K.N., Davidson J.M., Nanney L.B., Lucas C. et Townes A.S. (1991). Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J Exp Med* **173** : 1121-1132.
- Feldmann M., Brennan F.M. et Maini R.N. (1996a). Rheumatoid Arthritis. *Cell* **85** : 307-310.
- Feldmann M., Brennan F.M. et Maini R.N. (1996b) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **14** : 397-440.
- Fernandez-Catalan C., Bode W., Huber R., Turk D., Calvete J.J., Lichte A., Tschesche H. et Maskos K. (1998). Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J* **17** : 5238-48.
- Fife R.S., Rougraff B.T., Proctor C. et Sledge G.W. Jr. (1997). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. *J Lab Clin Med* **130** : 530-4.
- Fife R.S., Sledge G.W. Jr, Roth B.J. et Proctor C. (1998). Effects of doxycycline on human prostate cancer cells in vitro. *Cancer Lett* **127** : 37-41.
- Firestein G.S. (1996). Invasive fibroblaste-like synoviocytes in rheumatoid arthritis Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* **39** : 1781-1790.
- Firestein G.S., Nguyen K., Aupperle K.R., Yeo M., Boyle D.L. et Zvaifler N.J. (1996). Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* **149** : 2143-51.
- Fosang A.J., Last K., Knauper V., Murphy G. et Neame P.J. (1996). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* **380** : 17-20.
- Fosang A.J., Last K., Neame P.J., Murphy G., Knauper V., Tschesche H., Hughes C.E., Caterson B. et Hardingham T.E. (1994). Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373-A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan. *Biochem J* **304** : 347-351.
- Fuller R.S., Brake A.J. et Thorner J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. **246** : 482-486.
- Geiler T., Kriegsmann J. Keyser G.M., Gay R.E. et Gay S. (1994). A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* **37** : 1664-1671.

- Gentry L.E., Lioubin M.N., Purchio A.F. et Marquardt H. (1988). Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* **8** :4162-4168.
- Gerdes H.H. et Kaether C. (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* **389** : 44-7.
- Ghivizzani S.C., Oligino T.J., Glorioso J.C., Robbins P.D. et Evans C.H. (2001). Direct gene delivery strategies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Discov Today* **6** : 259-267.
- Gleizes P.E., Munger J.S., Nunes I., Harpel J.G., Mazzieri R., Noguera I. et Rifkin D.B. (1997). TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* **15** : 190-197.
- Gluschankof P. et Fuller R.S. (1994). A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *EMBO J* **13** : 2280-2288.
- Goodman L.J. et Gorman C.M. (1994). Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem Biophys Res Commun* **201** : 795-804.
- Goossens P.H., Vogels R., Pieterman E., Havenga M.J., Bout A., Breedveld F.C., Valerio D. et Huizinga T.W. (2001). The influence of synovial fluid on adenovirus-mediated gene transfer to the synovial tissue. *Arthritis Rheum* **44** : 48-52.
- Gowen M., Wood D.D., Ihrie E.J., McGuire M.K. et Russell R.G. (1983). An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* **306** : 378-380.
- Gregersen P.K., Silver J. et Winchester R.J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis rheum* **30** : 1205-1213.
- Hanemaaijer R., Sorsa T., Konttinen Y.T., Ding Y., Sutinen M., Visser H., van Hinsbergh V.W., Helaakoski T., Kainulainen T., Ronka H., Tschesche H. et Salo T. (1997) Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *J Biol Chem* **272** : 31504-31509.
- Harding T.C., Geddes B.J., Murphy D. Knight D. et Uney J.B. (1998). Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system. *Nature Biotech* **16** : 553-555.
- Harris E.D. Jr, DiBona D.R. et Krane S.M. (1969). Collagenases in human synovial fluid. *J Clin Invest* **48** : 2104-2113.

- Hatsuzawa K., Murakami K. et Nakayama K. (1992a). Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo)* **111** : 296-301.
- Hatsuzawa K., Nagahama M., Takahashi S., Takada K., Murakami K. et Nakayama K. (1992b). Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **267** : 16094-16099.
- Heldin C.H. et Westermark B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* **79** : 1283-1316.
- Hernandez-Barrantes S., Toth M., Bernardo M.M., Yurkova M., Gervasi D.C., Raz Y., Sang Q.A. et Fridman R. (2000). Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol* **275** : 12080-9.
- Hiraiwa K., Yaamanaka K., Kwok W.W., Mickelson E.M., Masewicz S., Hansen J. A. Radka S.F. et Nepom G.T. (1990). Structural requirements recognition of the HLA-Dw14 class II epitope : a key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 8051-8055.
- Holmbeck K., Bianco P., Caterina J., Yamada S., Kromer M., Kuznetsov S.A., Mankani M., Robey P.G., Poole A.R., Pidoux I., Ward J.M. et Birkedal-Hansen H. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99** : 81-92.
- Hosaka M., Nagahama M., Kim W.S., Watanabe T., Hatsuzawa K., Ikemizu J., Murakami K. et Nakayama K. (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* **266** : 12127-12130.
- Ikawa M., Yamada S., Nakanishi T. et Okabee M. (1999). Green fluorescent protein as a vital marker in mammals. *Current topics in developmental biology* **44** : 1-20.
- Imai K., Ohuchi E., Aoki T., Nomura H., Fujii Y., Sato H., Seiki M. et Okada Y. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Res* **56** : 2707-2710.
- Inazuka M., Tahira T., Horiuchi T., Harashima S., Sawabe T., Kondo M., Miyahara H. et Hayashi K. (2000). Analysis of p53 tumour suppressor gene somatic mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Rheumatology (Oxford)* **39** : 262-266.
- Isomäki P. et Punnonen J. (1997). Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals Med* **29** : 499-507.

- Jean F., Stella K., Thomas L., Liu G., Xiang Y., Reason A.J. et Thomas G. (1998). Alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 7293-8.
- Ji L., Bouvet M., Price R.E., Roth J.A. et Fang B. (1999). Reduced toxicity, attenuated immunogenicity and efficient mediation of human p53 gene expression in vivo by an adenovirus vector with deleted E1-E3 and inactivated E4 by GAL4-TATA promoter replacement. *Gene Ther* **6** : 393-402.
- Jo Y., Yeon J., Kim H.J. et Lee S.T. (2000). Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on pro-matrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/insect-cell expression system. *Biochem J* **345** : 511-9.
- Joe B. et Wilder R.L. (1999). Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol Med Today* **5** : 367-369.
- Jones B.G., Thomas L., Molloy S.S., Thulin C.D., Fry M.D., Walsh K.A. et Thomas G. (1995). Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J* **14** : 5869-5883.
- Jorgensen C., Picot M.C., Bologna C. et Sany J. (1996). Oral contraception, parity, breast feeding, and severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **55** : 94-98.
- Joosten L.A., Helsen M.M., Saxne T., van De Loo F.A., Heinegard D. et van Den Berg W.B. (1999). IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* **163** : 5049-5055.
- Josephs S.F., Ratner L., Clarke M.F., Westin E.H., Reitz M.S. et Wong-Staal F. (1984). Transforming potential of human c-sis nucleotide sequences encoding platelet-derived growth factor. *Science* **225** : 636-639.
- Julius D., Brake A., Blair L., Kunisawa R. et Thorner J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37** : 1075-1089.
- Kanik K.S. et Wilder R.L. (2000). Hormonal alterations in rheumatoid arthritis, including the effects of pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* **26** : 805-823.
- Kaplan D.R., Chao F.C., Stiles C.D., Antoniades H.N. et Scher C.D. (1979). Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood* **53** : 1043-1052.
- Katsikis P.D., Chu C.Q., Brennan F.M., Maini R.N. et Feldmann M. (1994). Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* **179** : 1517-1527.

- Kawakami A., Eguchi K., Matsuoka N., Tsuboi M., Kawabe Y., Aoyagi T. et Nagataki S. (1996). Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor beta 1. *Arthritis Rheum* **39** : 1267-76.
- Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., Kaslaris E., Kioussis D. et Kollias G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* **10** : 4025-4031.
- Khalil N., Corne S., Whitman C. et Yacyshyn H. (1996). Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15** : 252-9.
- Kiefer M.C., Tucker J.E., Joh R., Landsberg K.E., Saltman D. et Barr P.J. (1991). Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol* **10** : 757-769.
- Kinoh H., Sato H., Tsunozuka Y., Takino T., Kawashima A., Okada Y. et Seiki M. (1996). MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci* **109** : 953-9.
- Kinoshita T., Sato H., Takino T., Itoh M., Akizawa T. et Seiki M. (1996). Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* **56** : 2535-2538.
- Klimpel K.R., Molloy S.S., Thomas G. et Leppla S.H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** : 10277-10281.
- Klippel J.H. et Dieppe P.A. (1994). Rheumatology. Mosby, St-Louis, MO, ÉU.
- Klippel J.H. et Dieppe P.A. (1998). Rheumatology. Mosby, St-Louis, MO, ÉU.
- Knäuper V., Lopez-Otin C., Smith B., Knight G. et Murphy G. (1996b). Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* **271** : 1544-50.
- Knäuper V., Will H., Lopez-Otin C., Smith B., Atkinson S.J., Stanton H., Hembry R.M. et Murphy G. (1996a). Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* **271** : 17124-17131.
- Koch A.E. (1998). Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **41** : 951-962.
- Koch A.E., Polverini P.J., Kunkel S.L., Harlow L.A., DiPietro L.A., Elnor V.M., Elnor S.G. et Strieter R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258** : 1798-1801.

- Kohem C.L., Brezinschek R.I., Wisbey H., Tortorella C., Lipsky P.E. et Oppenheimer-Marks N. (1996). Enrichment of differentiated CD45RBdim,CD27- memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39 : 844-854.
- Konttinen Y.T., Ainola M., Valleala H., Ma J., Ida H., Mandelin J., Kinne R.W., Santavirta S., Sorsa T., Lopez-Otin C. et Takagi M. (1999b). Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58 : 691-697.
- Konttinen Y.T., Ceponis A., Takagi M., Ainola M., Sorsa T., Sutinen M., Salo T., Ma J., Santavirta S. et Seiki M. (1998). New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: destruction from above. *Matrix Biol* 17 : 585-601.
- Konttinen Y.T., Lindy O., Kempainen P., Saari H., Suomalainen K., Vauhkonen M., Lindy S. et Sorsa T. (1991). Collagenase reserves in polymorphonuclear neutrophil leukocytes from synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 11 : 296-301.
- Konttinen Y.T., Salo T., Hanemaaijer R., Valleala H., Sorsa T., Sutinen M., Ceponis A., Xu J.W., Santavirta S., Teronen O. et Lopez-Otin C. (1999a). Collagenase-3 (MMP-13) and its activators in rheumatoid arthritis: localization in the pannus-hard tissue junction and inhibition by alendronate. *Matrix Biol* 18 : 401-12.
- Koopman W.J. (2001). Arthritis and allied conditions, A textbook of rheumatology. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, ÉU.
- Krey P.R., Scheinberg M.A. et Cohen A.S. (1976). Fine structural analysis of rabbit synovial cells. II Fine structure and rosette-forming cells of explant and monolayer cultures. *Arthritis and rheum* 19 : 581-592.
- Kriegsmann J., Keyszer G.M., Geiler T., Brauer R., Gay R.E. et Gay S. (1995). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Lab Invest* 72 : 209-214.
- Kulkarni A.B., Huh C.G., Becker D., Geiser A., Lyght M., Flanders K.C., Roberts A.B., Sporn M.B., Ward J.M. et Karlsson S. (1992). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 770-774.
- Kumkumian G.K., Lafyatis R., Remmers E.F., Case J.P., Kim S.J. et Wilder R.L. (1989). Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol* 143 : 833-837.

- Kurosaka M. et Ziff M. (1983). Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium. *J Exp Med* **158** : 1191-210.
- Lafleur M.A., Hollenberg M.D., Atkinson S.J., Knauper V., Murphy G. et Edwards D.R. (2001). Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochem J* **357** : 107-15.
- Lafyatis R., Remmers E.F., Roberts A.B., Yocum D.E., Sporn M.B. et Wilder R.L. (1989a). 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.
- Lafyatis R., Thompson N.L., Remmers E.F., Flanders K.C., Roche N.S., Kim S.J., Case J.P., Sporn M.B., Roberts A.B. et Wilder R.L. (1989b). 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* **143** : 1142-1148.
- Lahita R.G. (1990). Sex hormones and the immune system--Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol* **4** : 1-12.
- Lanchbury J.S., Jaeger E.E., Sansom D.M., Hall M.A., Wordsworth P., Stedeford J., Bell J.I. et Panayi G.S. (1991). Strong primary selection for the Dw4 subtype of DR4 accounts for the HLA-DQw7 association with Felty's syndrome. *Hum Immunol* **32** : 56-64.
- Lark M.W., Bayne E.K., Flanagan J., Harper C.F., Hoerrner L.A., Hutchinson N.I., Singer II, Donatelli S.A., Weidner J.R., Williams H.R., Mumford R.A. et Lohmander L.S. (1997). Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* **100** : 93-106.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A., et Thomas, G. (1992). Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem* **267** : 14304-8.
- Lee J.E., Pintar J. et Efstratiadis A. (1990). Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* **110** : 151-159.
- Lehnert S.A. et Akhurst R.J. (1988). Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development* **104** : 263-273.
- Letterio J.J. et Roberts A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* **16** : 137-161.

- Leveen P., Pekny M., Gebre-Medhin S., Swolin B., Larsson E. et Betsholtz C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* **15** : 1875-1887.
- Lewis J.B. et Mathews, M.B. (1980). Control of adenovirus early gene expression : a class of immediate early products. *Cell* **21** : 303-313.
- Lipkind G.M., Zhou A. et Steiner D.F. (1998). A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 7310-7315.
- Liu G., Thomas L., Warren R.A., Enns C.A., Cunningham C.C., Hartwig J.H. et Thomas G. (1997). Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J Cell Biol* **139** : 1719-1733.
- Lohmander L.S., Neame P.J. et Sandy J.D. (1993). The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **36** : 1214-1222.
- Lusson J., Vieau D., Hamelin J., Day R., Chretien M. et Seidah N.G. (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **15** : 90:6691-6695.
- Madisen L., Webb N.R., Rose T.M., Marquardt H., Ikeda T., Twardzik D., Seyedin S. et Purchio A.F. (1988). Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA* **7** : 1-8.
- Maini R.N., Elliott M., Brennan F.M., Williams R.O. et Feldmann M. (1997). TNF blockade in rheumatoid arthritis: implications for therapy and pathogenesis. *APMIS* **105** : 257-63.
- Maini R.N. et Feldmann M. (1998). Oxford Textbook of Rheumatology. Oxford University Press, New-York, USA.
- Maini R.N., Plater-Zyberk C. et Andrew E. (1987). Autoimmunity in rheumatoid arthritis. An approach via a study of B lymphocytes. *Rheum Dis Clin North Am* **13** : 319-338.
- Malide D., Seidah N.G., Chretien M. et Bendayan M. (1995). Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. *J Histochem Cytochem* **43** : 11-19.
- Maquoi E., Noel A., Frankenne f., Angliker H., Murphy G. et Foidart J.M. (1998). Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett* **13** : 262-266.

- Marcinkiewicz M., Day R., Seidah N.G. et Chretien M. (1993). Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** : 4922-4926.
- Marcinkiewicz M., Ramla D., Seidah N.G. et Chretien M. (1994). Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* **135** : 1651-1660.
- Matrisian L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. **14** : 455-63.
- McCartney-Francis N.L. et Wahl S.M. (1994). Transforming growth factor beta: a matter of life and death. *J Leukoc Biol* **55** : 401-409.
- McInnes I.B., Leung B.P. et Liew F.Y. (2000). Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells. *Arthritis Res* **2** : 374-378.
- McInnes I.B., Leung B.P., Sturrock R.D., Field M. et Liew F.Y. (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* **3** : 189-95.
- Meerabux J., Yaspo M.L., Roebroek A.J., Van de Ven W.J., Lister T.A. et Young B.D. (1996). A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res* **56** : 448-451.
- Meikle M.C., Bord S., Hembry R.M. et Reynolds J.J. (1995). The synthesis of collagenase, gelatinase-A (72 kDa) and -B (95 kDa), and TIMP-1 and -2 by human osteoblasts from normal and arthritic bone. *Bone* **17** : 255-260.
- Mizuno K., Nakamura T., Ohshima T., Tanaka S. et Matsuo H. (1988). Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* **156** : 246-254.
- Moldovan F., Pelletier J.P., Hambor J., Cloutier J.M. et Martel-Pelletier J. (1997). Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* **40** : 1653-1661.
- Molloy S.S., Anderson E.D., Jean F. et Thomas G. (1999). Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* **9** : 28-35.
- Molloy S.S., Bresnahan P.A., Leppla S.H., Klimpel K.R. et Thomas G. (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* **267** : 16396-16402.

- Molloy S.S., Thomas L., VanSlyke J.K., Stenberg P.E. et Thomas G. (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* **13** : 18-33.
- Moss M.L., Jin S.L., Milla M.E., Bickett D.M., Burkhart W., Carter H.L., Chen W.J., Clay W.C., Didsbury J.R., Hassler D., Hoffman C.R., Kost T.A., Lambert M.H., Leesnitzer M.A., McCauley P., McGeehan G., Mitchell J, Moyer M., Pahel G., Rocque W., Overton L.K., Schoenen F., Seaton T., Su J.L. et Becherer J.D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385** : 733-6.
- Muller-Ladner U., Gay R.E. et Gay S. (1999). Signaling and effector pathways. *Curr Opin Rheumatol* **11** : 194-201.
- Muller-Ladner U., Kriegsmann J., Franklin B.N., Matsumoto S., Geiler T., Gay R.E. et Gay S. (1996). Synovial fibroblast of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* **149** : 1607-1615.
- Murphy G., Stanton H., Cowell S., Butler G., Knauper V., Atkinson S. et Gavrilovic J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. **107** : 38-44.
- Myers L.K., Rosloniec E.F., Cremer M.A. et Kang A.H. (1997). Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* **61** : 1861-1878.
- Nagamune H., Muramatsu K., Akamatsu T., Tamai Y., Izumi K., Tsuji A. et Matsuda Y. (1995). Distribution of the Kexin family proteases in pancreatic islets: PACE4C is specifically expressed in B cells of pancreatic islets. *Endocrinology* **136** : 357-360.
- Nagase H., Suzuki K., Morodomi T., Enghild J.J. et Salvesen G. (1992). Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. *Matrix Suppl* **1** : 237-44.
- Nakagawa T., Hosaka M., Torii S., Watanabe T., Murakami K. et Nakayama K. (1993). Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J Biochem (Tokyo)* **113** : 132-135.
- Nakayama K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* **327** : 625-635.
- Nakayama K., Hosaka M., Hatsuzawa K. et Murakami K. (1991). Cloning and functional expression of a novel endoprotease involved in prohormone processing at dibasic sites. *J Biochem (Tokyo)* **109** : 803-806.

- Nakayama K., Kim W.S., Torii S., Hosaka M., Nakagawa T., Ikemizu J., Baba T. et Murakami K. (1992). Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem* **267** : 5897-5900.
- Nakazawa M., Ishii H., Aono H., Takai M., Honda T., Aratani S., Fukamizu A., Nakamura H., Yoshino S., Kobata T., Nishioka K. et Nakajima T. (2001). Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* **44** : 1545-54.
- Nepom G.T., Beyers P., Seyfried C., Healey L.A. et Wilske K.R., Stage D. et Nepom B.S. (1989). HLA genes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **32** : 15-21.
- Nepom G.T. et Erlich H. (1991). MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **9** : 493-525.
- Nguyen M., Arkell J. et Jackson C.J. (1999). Thrombin rapidly and efficiently activates gelatinase A in human microvascular endothelial cells via a mechanism independent of active MT1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest* **79** : 467-75.
- Nguyen M., Arkell J. et Jackson C.J. (2000). Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem* **275** : 9095-8.
- Nordstrom D., Lindy O., Lauhio A., Sorsa T., Santavirta S. et Konttinen Y.T. (1998). Anti-collagenolytic mechanism of action of doxycycline treatment in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **17** : 175-80.
- Ogawa H., Inouye S., Tsuji F.I., Yasuda K. et Umesono K. (1995). Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** : 11899-903.
- Ohuchi E., Imai K., Fujii Y., Sato H., Seiki M. et Okada Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* **272** : 2446-51.
- Okada Y., Morodomi T., Enghild J.J., Suzuki K., Yasui A., Nakanishi I., Salvesen G. et Nagase H. (1992). Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem* **194** : 721-30.
- Östman A., Rall L., Hammacher A., Wormstead M.A., Coit D., Valenzuela P., Betsholtz C., Westermarck B. et Heldin C.H. (1988). Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer. *J Biol Chem* **263** : 16202-16208

- Östman A., Thyberg J., Westermark B. et Heldin C.H. (1992). PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly. *J Cell Biol* **118** : 509-519.
- Panayi G.S., Lanchbury J.S. et Kingsley G.H. (1992). The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **35** : 729-35.
- Pap T., Gay R.E. et Gay S. (2000). Gene transfer: from concept to therapy. *Curr Opin Rheumatol* **12** : 205-10.
- Pei D. (1999a). Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem* **274** : 8925-8932.
- Pei D. (1999b). Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res* **9** : 291-303.
- Pei D. et Weiss S.J. (1996). Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* **271** : 9135-9140.
- Perlmutter D.H. et Pierce J.A. (1989). The alpha 1-antitrypsin gene and emphysema. *Am J Physiol* **257** : L147-62.
- Philip R. et Epstein L.B. (1986). Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature* **323** : 86-9.
- Potts R.C., Hassan H.A., Brown R.A., MacConnachie A., Gibbs J.H., Robertson A.J. et Beck J.S. (1983). In vitro effects of doxycycline and tetracycline on mitogen stimulated lymphocyte growth. *Clin Exp Immunol* **53** : 458-64.
- Puente X.S., Pendas A.M., Llano E., Velasco G. et Lopez-Otin C. (1996). Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* **56** : 944-9.
- Pulsatelli L., Dolzani P., Piacentini A., Silvestri T., Ruggeri R., Gualtieri G., Meliconi R. et Facchini A. (1999). Chemokine production by human chondrocytes. *J Rheumatol* **26** : 1992-2001.
- Qian H.S., Channon K., Neplioueva V., Wang Q., Finer M., Tsui L., George S.E. et McArthur J. (2001). Improved adenoviral vector for vascular gene therapy : beneficial effects on vascular function and inflammation. *Circ Res* **88** : 911-7.

- Qu Z., Garcia C.H., O'Rourke L.M., Planck S.R., Kohli M. et Rosenbaum J.T. (1994). Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* **37** : 212-20.
- Rashid T., Darlington G., Kjeldsen-Kragh J., Forre O., Collado A. et Ebringer A. (1999). Proteus IgG antibodies and C-reactive protein in English, Norwegian and Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* **18** : 190-5.
- Riendeau M.C. (2000). Mise au point d'une méthode de RT-PCR et d'hybridation *in situ* afin de mesurer les niveaux d'expression des convertases à proprotéines de type Subtilisine (SPCs) dans l'arthrite expérimentale chez le rat. Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Roberts A.B., Anzano M.A., Lamb L.C., Smith J.M. et Sporn M.B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78** : 5339-5343.
- Robbins K.C., Antoniades H.N., Devare S.G., Hunkapiller M.W. et Aaronson S.A. (1983). Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. *Nature* **305** : 605-608.
- Robbins P.D., Evans C.H. et Chernajovsky Y. (1998). Gene therapy for rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **20** : 197-209.
- Rodgers W.H., Matrisian L.M., Giudice L.C., Dsupin B., Cannon P., Svitek C., Gorstein F. et Osteen K.G. (1994). Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* **94** : 946-53.
- Rodt S.A., Ahlen K., Berg A., Rubin K. et Reed R.K. (1996). A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis. *J Physiol* **495** : 193-200.
- Roebroek A.J., Schalken J.A., Bussemakers M.J., van Heerikhuizen H., Onnekink C., Debryne F.M., Bloemers H.P. et Van de Ven W.J. (1986a). Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Mol Biol Rep* **11** : 117-125.
- Roebroek A.J., Schalken J.A., Leunissen J.A., Onnekink C., Bloemers H.P. et Van de Ven W.J. (1986b). Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J* **5** : 2197-2202.
- Roebroek A.J., Umans L., Pauli I.G., Robertson E.J., van Leuven F., Van de Ven W.J. et Constam D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* **125** : 4863-76.

- Roebroek A.J., Umans L., Pauli I.G., Robertson E.J., van Leuven F., Van de Ven W.J. et Constam D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* **125** : 4863-76.
- Ross R., Raines E.W. et Bowen-Pope D.F. (1986). The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* **46** : 155-169.
- Roudier J., Petersen J., Rhodes G.H. Luka J. et Carson D.A. (1989). Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** : 5104-5108.
- Sandy J.D., Flannery C.R., Neame P.J. et Lohmander L.S. (1992). The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* **89** : 1512-1516.
- Sangha O. (2000). Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* **39** :3-12.
- Sarkissian M. et Lafyatis R. (1998). Transforming growth factor-beta and platelet derived growth factor regulation of fibrillar fibronectin matrix formation by synovial fibroblasts. *J Rheumatol* **25** : 613-622.
- Sato H., Kinoshita T., Takino T., Nakayama K. et Seiki M. (1996). Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* **393** : 101-4.
- Sato T., Kondo T., Fujisawa T., Seiki M. et Ito A. (1999). Furin-independent pathway of membrane type 1-matrix metalloproteinase activation in rabbit dermal fibroblasts. *J Biol Chem* **274** : 37280-37284.
- Sato H., Okada Y. et Seiki M. (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thromb Haemost* **78** : 497-500.
- Sato H., Takino T., Okada Y., Cao J., Shinagawa A., Yamamoto E. et Seiki M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370** : 61-65.
- Sawicki G., Salas E., Murat J., Miszta-Lane H. et Radomski M.W. (1997). Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* **10** : 616-9.
- Schafer M.K., Day R., Cullinan W.E., Chretien M., Seidah N.G. et Watson S.J. (1993). Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J Neurosci* **13** : 1258-79.

- Schafer W., Stroh A., Berghofer S., Seiler J., Vey M., Kruse M.L., Kern H.F., Klenk H.D. et Garten W. (1995). Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* 14 : 2424-2435.
- Schalken, J.A., Roebroek A.J., Oomen P.P., Wagenaar S.S., Debruyne F.M., Bloemers H.P. et Van de Ven W.J. (1987). fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest* 80 : 1545-9.
- Schlondorff J., Becherer J.D. et Blobel C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347 : 131-8.
- Seidah N.G., Day R., Hamelin J., Gaspar A., Collard M.W. et Chretien M. (1992). Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol* 6 : 1559-1570.
- Seidah N.G., Gaspar L., Mion P., Marcinkiewicz M., Mbikay M. et Chretien M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol* 9 : 415-424.
- Seidah N.G., Hamelin J., Mamarbachi M., Dong W., Tardos H., Mbikay M., Chretien M. et Day R. (1996). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 3388-3393.
- Seidah N.G., Marcinkiewicz M., Benjannet S., Gaspar L., Beaubien G., Mattei M.G., Lazure C., Mbikay M. et Chretien M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol* 5 : 111-122.
- Seifert R.A., Schwartz S.M. et Bowen-Pope D.F. (1984). Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature* 311 :669-671.
- Seiki M. (1999). Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 107 : 137-43.
- Shapiro J., Sciaky N., Lee J., Bosshart H., Angeletti R.H. et Bonifacino J.S. (1997). Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J Histochem Cytochem* 45 : 3-12.
- Shimokado K., Raines E.W., Madtes D.K., Barrett T.B., Benditt E.P. et Ross R. (1985). A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43 : 277-286.

- Shlopov B.V., Stuart J.M., Gumanovskaya M.L. et Hasty K.A. (2001). Regulation of cartilage collagenase by doxycycline. *J Rheumatol* **28** : 835-42.
- Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B., Pawlowski S., Diebold R.J., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G., Calvin D., et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359** : 693-699.
- Smeeckens S.P., Avruch A.S., LaMendola J., Chan S.J. et Steiner D.F. (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** : 340-344.
- Smeeckens S.P., Montag A.G., Thomas G., Albiges-Rizo C., Carroll R., Benig M., Phillips L.A., Martin S., Ohagi S., Gardner P. et al. (1992). Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** : 8822-8826.
- Smeeckens S.P. et Steiner D.F. (1990). Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem* **265** : 2997-3000.
- Smith C.A. et Arnett F.C. (1991). Epidemiologic aspects of rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Rel Res* **265** : 23-35.
- Smith-Arica J.R., Williams J.C., Stone D., Smith J., Lowenstein P.R. et Castro M.G. (2001). Switching on and off transgene expression within lactotrophic cells in the anterior pituitary gland in vivo. *Endocrinology* **142** : 2521-2532.
- Soriano P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* **8** : 1888-1896.
- Spector T.D., Roman E. et Silman A.J. (1990). The pill, parity, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **33** : 782-789.
- Steiner D.F., Cunningham D. et Spigelman L. et Aten B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* **157** : 697-700.
- Steiner G., Tohidast-Akrad M., Witzmann G., Vesely M., Studnicka-Benke A., Gal A., Kunaver M., Zenz P. et Smolen J.S. (1999). Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **38** : 202-213.
- Stetler-Stevenson W.G., Aznavoorian S. et Liotta L.A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* **9** : 541-73.

- Stocker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Ruth F.X., McKay D.B. et Bode W. (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 4 : 823-40.
- Strongin A.Y., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A. et Goldberg G.I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270 : 5331-8.
- Strongin A.Y., Marmer B.L., Grant G.A et Goldberg G.I. (1993). Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J Biol Chem* 268 : 14033-9.
- Sun Y., Sun Y., Wenger L., Rutter J.L., Brinckerhoff C.E. et Cheung H.S. (1999). p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (Collagenase-1) gene expression. *J Biol Chem* 274 : 11535-11540.
- Szekanecz Z., Szegedi G. et Koch A.E. (1998). Angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic and clinical significance. *J Investig Med* : 46:27-41.
- Takino T., Sato H., Shinagawa A. et Seiki M. (1995). Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* 270 : 23013-23020.
- Tanaka S., Kurabuchi S., Mochida H., Kato T., Takahashi S., Watanabe T., et Nakayama K. (1996). Immunocytochemical localization of prohormone convertases PC1/PC3 and PC2 in rat pancreatic islets. *Arch Histol Cytol* 59 : 261-271.
- Tessier P., Audette M., Cattaruzzi P. et McColl S.R. (1993). Up-regulation by tumor necrosis factor alpha of intercellular adhesion molecule 1 expression and function in synovial fibroblasts and its inhibition by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 36 : 1528-1539.
- Tetlow L.C. et Woolley D.E. (1998b). Comparative immunolocalization studies of collagenase 1 and collagenase 3 production in the rheumatoid lesion, and by human chondrocytes and synoviocytes in vitro. *Br J Rheumatol* 37 : 64-70.
- Thomas G., Thorne B.A., Thomas L., Allen R.G., Hruby D.E., Fuller R. et Thorner J. (1988). Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 241 : 226-230.
- Todaro G.J., Fryling C. et De Larco J.E. (1980). Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 : 5258-5262.

- Todd J.A., Acha-Orbea H., Bell J.I., Chao N., Fronck Z., Jacob C.O., McDermott M., Sinha A.A., Timmerman L., Steinman L., et al. (1988). A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* **240** : 1003-1009.
- Torii S., Yamagishi T., Murakami K. et Nakayama K. (1993). Localization of Kex2-like processing endoproteases, furin and PC4, within mouse testis by in situ hybridization. *FEBS Lett* **316** : 12-16.
- Tortorella M.D., Burn T.C., Pratta M.A., Abbaszade I., Hollis J.M., Liu R., Rosenfeld S.A., Copeland R.A., Decicco C.P., Wynn R., Rockwell A., Yang F., Duke J.L., Solomon K., George H., Bruckner R., Nagase H., Itoh Y., Ellis D.M., Ross H., Wiswall B.H., Murphy K., Hillman M.C. Jr, Hollis G.F. et Arner E.C. (1999). Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* **284** : 1664-1666.
- Tortorella M., Pratta M., Liu R.Q., Abbaszade I., Ross H., Burn T. et Arner E. (2000b). The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* **275** : 25791-7.
- Tortorella M.D., Pratta M., Liu R.Q., Austin J., Ross O.H., Abbaszade I., Burn T. et Arner E. (2000a). Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* **275** : 18566-18573.
- Toth M., Bernardo M.M., Gervasi D.C., Soloway P.D., Wang Z., Bigg H.F., Overall C.M., DeClerck Y.A., Tschesche H., Cher M.L., Brown S., Mobashery S. et Fridman R. (2000). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem* **275** : 41415-23.
- Tournier J.M., Polette M., Hinnrasky J., Beck J., Werb Z. et Basbaum C. (1994). Expression of gelatinase A, a mediator of extracellular matrix remodeling, by tracheal gland serous cells in culture and in vivo. *J Biol Chem* **269** : 25454-64.
- Van Eden W., Holoshitz J., Nevo Z., Frenkel A., Klajman A. et Cohen I.R. (1985). Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** : 5117-5120.
- Van de Loo J.W., Creemers J.W., Bright N.A., Young B.D., Roebroek A.J. et Van de Ven W.J. (1997). Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase. *J Biol Chem* **272** : 27116-27123.
- Van Eden W., Holoshitz J., Nevo Z., Frenkel A., Klajman A. et Cohen I.R. (1985). Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** : 5117-20.

- Van Meurs J.B.J., Van Lent P.L.E.M., Holthuysen A.E.M., Singer I.I., Bayne E.K. et Van Den Berg, W.B. (1999) Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase- induced neoepitopes in various stages of cartilage destruction in murin arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **42** : 1128-1139
- Vassbotn F.S., Havnen O.K., Heldin C.H. et Holmsen H. (1994). Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem* **269** : 13874-13879.
- Vey E., Burger D. et Dayer J.M. (1996). Expression and cleavage of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors by human monocytic cell lines upon direct contact with stimulated T cells. *Eur J Immunol* **26** : 2404-2409.
- Vey M., Schafer W., Berghofer S., Klenk H.D. et Garten W. (1994). Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* **127** : 1829-1842.
- Vidricaire G., Denault J.B. et Leduc R. (1993). Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochem Biophys Res Commun* **195** : 1011-1018.
- Wahl S.M. (1994). Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* **180** : 1587-1590.
- Wahl S.M., Allen J.B., Costa G.L., Wong H.L. et Dasch J.R. (1993). Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta. *J Exp Med* **177** : 225-230.
- Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M., McCartney-Francis N., Wahl L.M., Roberts A.B. et Sporn M.B. (1987). Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** : 5788-5792.
- Wahl S.M., Hunt D.A., Wong H.L., Dougherty S., McCartney-Francis N., Wahl L.M., Ellingsworth L., Schmidt J.A., Hall G., Roberts A.B., et al. (1988). Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol* **140** : 3026-3032.
- Wang Q., Greenburg G., Bunch D., Farson D. et Finer M.H. (1997). Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther* **4** : 393-400.
- Wen S., Schneider D.B., Driscoll R.M., Vassalli G., Sassani A.B. et Dichek D.A. Second-generation adenoviral vectors do not prevent rapid loss of transgene expression and vector DNA from the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20** : 1452-8.

- Werb Z., Tremble P.M., Behrendtsen O., Crowley E. et Damsky C.H. (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol* **109** : 877-889.
- Werb Z., Tremble P. et Damsky C.H. (1990). Regulation of extracellular matrix degradation by cell-extracellular matrix interactions. *Cell Differ Dev* **32** : 299-306.
- Wernick R.M., Lipsky P.E., Marban-Arcos E., Maliakkal J.J., Edelbaum D. et Ziff M. (1985). IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum* **28** : 742-52.
- Weyand C.M. (2000). New insight into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **39** : 3-8.
- Wilkinson L.S., Edwards J.C., Poston R.N. et Haskard D.O. (1993). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in normal and inflamed synovium. *Lab Invest* **68** : 82-88.
- Will H., Atkinson S.J., Butler G.S., Smith B. et Murphy G. (1996). The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* **271** : 17119-23.
- Will H. et Hinzmann B. (1995). cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* **231** : 602-608.
- Williams R.O. (1998). Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol* **114** : 330-332.
- Williams R.O., Feldmann M. et Maini R.N. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** : 9784-9788.
- Wise R.J., Barr P.J., Wong P.A., Kiefer M.C., Brake A.J. et Kaufman R.J. Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** : 9378-9382.
- Woessner J.F. Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* **5** : 2145-2154.
- Wouters S., Leruth M., Decroly E., Vandenbranden M., Creemers J.W., van de Loo J.W., Ruyschaert J.M. et Courtoy P.J. (1998). Furin and proprotein convertase 7 (PC7)/lymphoma PC endogenously expressed in rat liver can be resolved into distinct post-Golgi compartments. *Biochem J* **336** : 311-316.

- Yamamura M., Kawashima M., Taniai M., Yamauchi H., Tanimoto T., Kurimoto M., Morita Y., Ohmoto Y. et Makino H. (2001). Interferon-gamma-inducing activity of interleukin-18 in the joint with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **44** : 275-285.
- Yana I. et Weiss S.J. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* **11** : 2387-401.
- Yocum D.E. (1999). T Cells : Pathogenic cells and therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.***29** : 27-35.
- Yoshihara Y., Nakamura H., Obata K., Yamada H., Hayakawa T., Fujikawa K. et Okada Y. (2000) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **59** : 455-461.
- Yu A.E., Hewitt R.E., Kleiner D.E. et Stetler-Stevenson W.G. (1996). Molecular regulation of cellular invasion--role of gelatinase A and TIMP-2. *Biochem Cell Biol* **74** : 823-831.
- Yu L.P. Jr, Smith G.N. Jr, Brandt K.D., Myers S.L., O'Connor B.L. et Brandt D.A. (1992). Reduction of the severity of canine osteoarthritis by prophylactic treatment with oral doxycycline. *Arthritis Rheum* **35** : 1150-9.
- Zheng M., Seidah N.G. et Pintar J.E. (1997). The developmental expression in the rat CNS and peripheral tissues of proteases PC5 and PACE4 mRNAs: comparison with other proprotein processing enzymes. *Dev Biol* **181** : 268-283.
- Zheng M. Streck R.D., Scott R.E., Seidah N.G. et Pintar J.E. (1994). The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *J Neurosci* **14** : 4656-4673.
- Zhong, M., Benjannet, S., Lazure, C., Munzer, S., et Seidah, N. G. (1996). Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform. *FEBS Lett* **396** : 31-6
- Zhong M., Munzer J.S., Basak A., Benjannet S., Mowla S.J., Decroly E., Chretien M. et Seidah N.G. (1999). The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *J Biol Chem* **274** : 33913-33920.
- Zhou A., Martin S., Lipkind G., La Mendola J. et Steiner D.F. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem* **273** : 11107-11114.
- Ziegler B., Gay R.E., Huang G.Q., Fassbender H.G. et Gay S. (1989). Immunohistochemical localization of HTLV-I p19- and p24-related antigens in synovial joints of patients with rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* **135** : 1-5.

- Zucker S., Drews M., Conner C., Foda H.D., DeClerck Y.A., Langley K.E., Bahou W.F., Docherty A.J. et Cao J. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem* **273** : 1216-22.
- Zucker S., Moll U.M., Lysik R.M., DiMassimo E.I., Stetler-Stevenson W.G., Liotta L.A. et Schwedes J.W. (1990). Extraction of type-IV collagenase/gelatinase from plasma membranes of human cancer cells. *Int J Cancer* **45** : 1137-42.
- Zvaifler N.J. et Firestein G.S. (1994). Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **6** : 783-789.