

INRS-Institut Armand-Frappier

**ANALYSE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE NETTE DES LIQUIDES
SYNOVIAUX DE PATIENTS ARTHRITIQUES RÉSULTANT DE L'ÉQUILIBRE
ENTRE LES PROTÉASES ACTIVES ET LES INHIBITEURS ENDOGÈNES**

**Par
Nathalie Simard**

**Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Immunologie et Virologie**

Jury d'évaluation

**Président du jury
Et examinateur interne**

Dr. Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

**Dr. Marc Pouliot
Département d'anatomie et physiologie
Université Laval**

Directeur de recherche

Dr. Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier

Droits réservés de Nathalie Simard, 2004

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Yves St-Pierre. Tout au long de ma maîtrise, il a su orienter mes recherches. Je lui suis reconnaissante pour sa disponibilité, ses précieux conseils, sa confiance et ses encouragements qui m'ont stimulée à poursuivre mes études au doctorat.

De plus, j'aimerais remercier les Dr. Gilles Boire et Arthur de Brum-Fernandes, médecins spécialistes en rhumatologie au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS), pour leur précieuse collaboration à la mise sur pied de la banque de liquides synoviaux et pour la collecte des données cliniques et biologiques.

Je remercie également Doris Legault pour son assistance technique, Marcel Desrosiers pour les nombreuses discussions et ses conseils pour la cytométrie en flux, ainsi que les étudiants du laboratoire du Dr. Yves St-Pierre pour leur amitié.

Enfin je remercie le Réseau Canadien de l'Arthrite et la Fondation Armand-Frappier pour leur soutien financier tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures et tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Résumé général.....	ix

CHAPITRE 1

Revue de littérature

I. Les arthropathies.....	2
1.1 Pathologie de l'ostéoarthrite.....	2
1.2 Pathologie des arthrites inflammatoires.....	3
1.2.1 Les arthrites inflammatoires aseptiques.....	4
1.2.1.1 La polyarthrite rhumatoïde.....	4
1.2.2 Les arthrites septiques.....	6
1.2.2.1 La maladie de Lyme.....	6
1.2.3 Les arthropathies microcristallines.....	7
1.2.3.1 La goutte.....	7
1.3 Thérapies.....	9
1.3.1 Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS).....	9
1.3.2 Les corticostéroïdes.....	10
1.3.3 Les médicaments modifiant l'évolution de l'affection rhumatismale (DMARD).....	10
1.3.4 Autres alternatives thérapeutiques.....	11
II. Les protéases impliquées dans l'arthrite.....	13
2.1 Les métalloprotéases de la matrice (MMP).....	13
2.1.1 Présentation de la famille des MMP.....	13
2.1.2 Régulation de l'expression.....	14
2.1.3 Régulation de l'activité.....	16

2.1.3.1	Activation des MMP.....	16
2.1.3.2	Inhibition de l'activité des MMP.....	17
2.1.4	Rôles biologiques des MMP.....	18
2.2	Les autres classes de protéases.....	19
2.2.1	Les protéases produites par les neutrophiles.....	19
2.2.2	Les protéases produites par les cellules du tissu articulaire.....	20
2.2.3	Les protéases exprimées de façon ubiquiste.....	20
III.	Rôles des MMP dans la pathologie de l'arthrite.....	22
3.1	La dégradation du cartilage par les MMP.....	23
3.2	Régulation de l'inflammation par les MMP.....	25
3.3	Les MMP : des cibles thérapeutiques potentielles.....	27
CHAPITRE 2		
Net proteolytic activity in synovial fluids of patients with different forms of		
arthritis resulting from the equilibrium between active proteases and		
endogenous inhibitors.....		
		35
	Contribution des auteurs.....	36
	Résumé.....	37
	Introduction.....	42
	Patients et méthodes.....	44
	Résultats.....	47
	Discussion.....	51
	Références.....	54
	Légendes des figures.....	59
	Figures.....	61
	Discussion générale.....	68

Conclusions	76
Annexes	78
Références	82

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

1. FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1. Représentation schématique de la structure des MMP.....	31
---	----

CHAPITRE 2

Figure 1. Proteolytic activity in SF of patients with osteoarthritis (OA) and inflammatory arthropathies (IA).....	61
Figure 2. Correlation between the level of proteolytic activity found in SF and the number of infiltrating leukocytes.....	62
Figure 3. Correlation between the level of proteolytic activity found in SF and CRP.....	63
Figure 4. Net proteolytic activity in RA patients undergoing therapy.....	64
Figure 5. Zymography analysis of MMP2 and MMP9 levels in SF of patients with various arthropathies.....	65
Figure 6. Effect of hydroxamate-based inhibitors on proteolytic activity found in SF.....	66
Figure 7. Levels of TIMP-1 in SF of RA patients.....	67

2. TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau I. Substrats susceptibles d'être clivés par les MMP.....	33
Tableau II. Facteurs modulant l'expression des MMP.....	34

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
α_2 -M	Alpha-2 macroglobuline
AINS	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
APN	Activité protéolytique nette
C2C	néoépitope Col2-3/4C _{Long mono}
CCL	<i>CC motif ligand</i>
CD	Classe de différenciation
CHUS	Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CRP	Protéine C-réactive
DMARD	Médicaments modifiant l'évolution de l'affection rhumatismale
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FASC	<i>Fluorescent activated substrate conversion</i>
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HLE	<i>Human leucocyte elastase</i>
IA	<i>Inflammatory arthritis</i>
JAK	Kinases Janus
IL	Interleukine
PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéases de la matrice
MTX	Méthotrexate
MT-MMP	MMP membranaire
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NPA	<i>Net proteolytic activity</i>
OA	Ostéoarthrite/ <i>Osteoarthritis</i>
PG	Prostaglandine
PR	Polyarthrite rhumatoïde
RA	<i>Rheumatoid arthritis</i>
DSF	<i>Stromal Cell-Derived Factor</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficient</i>
SF	<i>Synovial fluid</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TCR	Récepteur de la cellule T
TGF	<i>Transforming growyh factor</i>
TIMP	Inhibiteurs tissulaires des MMP/ <i>Tissue inhibitors of MMP</i>
TNF	Facteur de nécrose des tumeurs
UMS	Urate monosodique
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
UPA	<i>Undifferentiated or recent-onset polyarthritis</i>

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Un des symptômes associés à l'arthrite est la destruction des tissus formant l'articulation. Ce phénomène est causé par l'action de protéases sur les macromolécules de la matrice extracellulaire (MEC). Dans des conditions physiologiques normales, l'activité des protéases extracellulaires responsables de la dégradation des composantes de la MEC, telles que les métalloprotéases de la matrice (MMP), est contrôlée par l'action d'inhibiteurs naturels endogènes. De nombreuses études ont mis en évidence des niveaux anormalement élevés de protéases extracellulaires dans les liquides synoviaux et le sérum de patients atteints d'arthrite. Conséquemment, plusieurs efforts sont présentement déployés pour la synthèse de molécules favorisant l'inhibition de l'activité des MMP. Malheureusement, l'absence de méthode simple et efficace pour mesurer l'activité protéolytique nette (APN) dans les liquides biologiques constitue un obstacle majeur au développement d'inhibiteurs thérapeutiques. En effet, la plupart des méthodes conventionnelles utilisées pour détecter la présence des protéases ne tiennent pas compte des inhibiteurs naturels présents dans ces liquides. Afin de résoudre ce problème, nous avons employé le *fluorescent activated substrate conversion assay* (FASC). Cette méthode utilise des microsphères enrobées d'un substrat qui est lui-même couplé à la fluoresceine isothiocyanate (FITC). Le choix du substrat est basé sur la nature des protéases d'intérêt. Le FASC permet une mesure quantitative efficace et reproductible de l'APN par cytométrie en flux. Dans ce mémoire, nous avons montré que l'APN est plus élevée dans les liquides synoviaux des patients atteints d'une forme inflammatoire d'arthrite que dans ceux des patients atteints d'ostéoarthrite. De plus, chez les patients atteints d'une forme inflammatoire d'arthrite, l'APN est en corrélation avec le nombre de leucocytes recrutés au niveau de l'articulation et la quantité de protéine C-réactive, ce qui suggère que l'inflammation joue un rôle clé dans la cascade protéolytique responsable de la destruction du cartilage. Cependant, le fait que la réduction du nombre de leucocytes infiltrés soit insuffisante pour diminuer l'APN indique que des protéases sécrétées par d'autres cellules sont impliquées dans ce processus. Nous avons également déterminé que les métalloprotéases de la matrice (MMP) contribuent significativement à l'APN. Cette contribution est moindre dans les liquides synoviaux ayant une APN élevée en raison de la plus grande quantité d'inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP) retrouvée dans ces

derniers. Puisque la production de TIMP est associée avec le nombre de leucocytes, ces résultats indiquent que ces cellules influencent le répertoire de protéases actives en induisant, directement ou indirectement, la production d'inhibiteurs de MMP ou de protéases. Dans l'ensemble, ces résultats illustrent pour la première fois la contribution de protéases dans la cascade protéolytique responsable de la dégradation du cartilage chez les patients atteints d'arthrite.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

I. LES ARTHROPATHIES

Le terme arthropathie regroupe toutes les maladies rhumatismales, soit les affections douloureuses, aiguës ou chroniques, qui gênent le bon fonctionnement de l'appareil locomoteur. Les principales arthropathies peuvent être réparties en deux groupes majeurs: l'ostéoarthrite et les arthrites inflammatoires. Bien que ces groupes incluent des maladies dont l'issue commune est la destruction du cartilage, ils se distinguent par les causes responsables de la pathologie. Nous traiterons ici brièvement les points importants qui distinguent les principales arthropathies et qui permettent de mieux cerner la problématique entourant le rôle des protéases dans le processus dégénératif associé aux différents types d'arthrite. Étant donné que notre travail vise à moyen et à long terme à développer de nouvelles approches thérapeutiques, et que notre étude a évalué l'importance de traitements actuels dans leur capacité à moduler l'activité protéolytique dans les différentes formes d'arthrite, nous avons crû bon de faire un bref survol des principaux traitements présentement utilisés pour lutter contre ces maladies.

1.1 Pathologie de l'ostéoarthrite

L'ostéoarthrite (OA) affecte environ 3 millions de canadiens, et ce autant les femmes que les hommes. C'est la forme la plus commune de toutes les arthrites. Bien que la plupart des gens développent la maladie après 45 ans, elle peut se manifester à tout âge. Les premiers signes précurseurs de la maladie sont l'apparition de douleurs et de raideurs au niveau des articulations, accompagnées d'enflures, et ce pour des périodes de plus en plus longues (plusieurs semaines). Parmi les articulations les plus fréquemment atteintes, on retrouve les hanches, les genoux, les pieds et la colonne vertébrale. L'OA est caractérisée par la perte du cartilage articulaire, le remodelage de l'os et une inflammation restreinte de la membrane synoviale. La dégénérescence du cartilage résulte de son usure normale, mais elle peut être accélérée par un défaut congénital, une blessure, une infection ou l'obésité. Cette pathologie a donc une origine mécanique.

Les mécanismes sous-jacents à la dégradation du cartilage chez les patients atteints d'OA ne sont pas encore très bien connus. Ils semblent impliquer un système complexe d'interactions mécaniques, biologiques et enzymatiques (Martel-Pelletier *et al.*

2001). Par exemple, la présence d'une charge excessive sur l'articulation peut exercer une force biomécanique détectée par certains récepteurs situés à la surface des chondrocytes (Poole et Webb 2000). Une étude récente a montré que des forces compressives pouvaient induire l'expression des métalloprotéases de la matrice MMP2 et MMP9 (Blain *et al.* 2001). Suite à leur sécrétion dans le milieu extracellulaire, ces protéases peuvent dégrader certaines molécules de la matrice entourant les chondrocytes, dont la fibronectine et le collagène (St-Pierre et Van Themsche 2003). Certains de ces fragments de fibronectine sont présents en quantité élevée chez les patients atteints d'OA (Homandberg 1999). *In vitro*, l'interaction de ces fragments avec des intégrines situées à la surface des fibroblastes peut stimuler l'expression de MMP1 (Werb *et al.* 1989). Ainsi, il est possible que les produits de dégradation générés par les protéases jouent un rôle important dans le maintien de la protéolyse du cartilage chez les sujets atteints d'OA (Poole et Webb 2000).

Chez les patients atteints d'OA, la dégradation de la matrice est accompagnée de la synthèse de nouveau cartilage comme en témoignent les niveaux élevés d'ostéocalcine, un marqueur de la formation des os retrouvés dans les liquides synoviaux (Sharif *et al.* 1995). En fait, la vitesse de synthèse de plusieurs composés de la matrice extracellulaire (MEC), incluant le glycosaminoglucane, l'acide hyaluronique, le collagène et les protéoglycans, est accrue dans les articulations affectées par la maladie. Cette tentative de réparation de l'organisme est, entre autre, responsable de l'apparition de petites excroissances osseuses, les ostéophytes, situés au pourtour de la surface articulaire. N'entraînant par eux-mêmes aucune douleur, les ostéophytes servent à réintroduire une certaine stabilité dans une articulation autrement fragile (Poole et Webb 2000).

1.2 Pathologie des arthrites inflammatoires

Ce sont des affections inflammatoires aiguës ou chroniques touchant une ou plusieurs articulations. On parle de monoarthrite lorsqu'une seule articulation est touchée, d'oligoarthrite lorsque 2 à 4 articulations sont atteintes et de polyarthrite lorsque la maladie touche plus de 4 articulations. Ces affections sont classées dans quatre catégories : les arthrites inflammatoires aseptiques, les arthrites septiques, les

arthropathies microcristallines et les arthrites nerveuses. Pour expliquer les différences entre ces catégories, un exemple de chacun des trois premiers groupes sera traité en détail. Les arthrites nerveuses observées au cours de certaines maladies du système nerveux ne seront pas décrites.

1.2.1 Les arthrites inflammatoires aseptiques

Ce groupe, très varié, inclut : la polyarthrite rhumatoïde, les arthrites réactionnelles, qui apparaissent en réaction à une infection siégeant en dehors de l'articulation, la polyarthrite chronique juvénile et les spondylarthropathies, un groupe d'affections caractérisées par une atteinte articulaire vertébrale et associées à des degrés variés avec le gène HLA-B27. La cause de l'inflammation de la synoviale observée lors de ces pathologies est inconnue. Dans cette catégorie, nous décrivons la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde puisque c'est le plus fréquent des grands rhumatismes inflammatoires.

1.2.1.1 La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique des articulations affectant environ 1% de la population mondiale. On la retrouve deux fois plus souvent chez la femme. La plupart des gens développent cette forme d'arthrite entre l'âge de 25 et 50 ans, bien qu'on puisse la retrouver chez les enfants de bas âge et les personnes âgées. C'est une maladie systémique qui se manifeste souvent avec des signes extra-articulaires. Son évolution aboutit à la destruction articulaire, une déformation et, dans certains cas, à une invalidité importante. Les articulations les plus fréquemment touchées sont au niveau des mains et des pieds, et ce de façon symétrique. Les coudes, les épaules, le cou, la mâchoire, et les hanches sont aussi parfois ciblés. La colonne vertébrale n'est généralement pas affectée. Les signes précurseurs sont l'apparition de raideurs matinales qui durent plus de 30 minutes au niveau des articulations et de douleurs dans au moins trois articulations de façon simultanée, et ce de façon symétrique. Ces symptômes peuvent également être accompagnés de fatigue et de fièvre dans certains cas. Les causes exactes responsables de l'initiation de la maladie ne sont pas connues.

Elles sembleraient impliquer un mélange de facteurs héréditaires et environnementaux. Des études génétiques ont montré que les personnes portant certains allèles du gène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH) HLA-DR β 1 sont plus susceptibles de développer une PR (Nepom 2000). Ces allèles ont en commun un élément structural défini par la séquence d'acides aminés QRRAA ou QKRAA que l'on nomme l'épitope partagé. Il a été suggéré qu'une réponse immune caractérisée par la stimulation de cellules T ayant une faible affinité pour l'épitope partagé pourrait être initiée par un antigène exogène possédant une séquence semblable à cet épitope (mimétisme moléculaire) (Albani et Carson 1996). Une exposition intermittente à des peptides possédant la séquence de l'épitope partagé, tels que des peptides dérivés de certaines molécules de HLA ou des peptides exogènes comme la protéine d'origine bactérienne DnaJ, conduirait à l'activation des cellules T spécifiques pour la séquence QR/KRAA et par conséquent le développement de la PR (Albani et Carson 1996). D'autres mécanismes possibles pour expliquer le rôle de HLA-DR β 1 ont été proposés. Ceux-ci incluent l'hypothèse d'un déséquilibre de liaison entre l'épitope partagé et certains allèles associés avec une augmentation ou une diminution de l'expression de molécules pro ou anti-inflammatoires, comme le facteur de nécrose des tumeurs- α (TNF- α) ou l'interleukine-10 (IL-10) (Pope et Perlman 2000).

La réponse inflammatoire excessive qui suit l'initiation est responsable du développement des signes et des symptômes typiques associés à la PR. Ceux-ci incluent l'inflammation de la membrane synoviale avec une infiltration massive de lymphocytes. Avec la progression de la maladie, une hypertrophie synoviale apparaît avec des franges dilatées et un tissu de granulation, appelé « pannus », envahie et détruit le cartilage et l'os. Cette érosion est en partie causée par la libération de grandes quantités d'enzymes destructrices, telles les métalloprotéases de la matrice (MMP), par les fibroblastes activés situés à la jonction pannus-cartilage ou pannus-os. Ces enzymes peuvent provenir aussi d'autres types de cellules incluant les macrophages, présents surtout dans la membrane synoviale, et les polymorphonucléaires, présents en forte quantité dans le liquide synovial.

1.2.2 Les arthrites septiques

Ces arthrites sont développées suite à l'entrée d'un germe dans l'articulation. L'identification du germe responsable et le traitement des ces arthrites doivent être effectués rapidement puisque des dommages irréversibles à l'articulation peuvent être causés en quelques jours seulement. Ce groupe d'arthrite inclut entre autres la maladie de Lyme, les arthrites brucelliennes, les arthrites sexuellement transmises et les arthrites virales.

1.2.2.1 La maladie de Lyme

Diagnostiquée pour la première fois en 1975 chez un jeune adolescent de la petite municipalité d'Old Lyme, au Connecticut, la maladie de Lyme peut être causée par trois espèces de spirochètes : *Borrelia burgdorferi*, *B. afzelii* et *B. garinii*. Ces pathogènes sont introduits dans l'articulation suite à une morsure de tique. Ce type d'arthrite, dont on retrouve des formes équivalentes en Europe, en Asie, en Union Soviétique et en Australie, peut frapper à tout âge, bien que la prévalence soit élevée chez les jeunes adolescents, notamment chez les amateurs d'escalade. En Amérique, elle est surtout restreinte aux régions du nord-est des États-Unis et des Provinces de l'Ontario et du Québec. Les protéines situées à la surface de ces spirochètes déclenchent une réponse immunitaire en stimulant d'abord des récepteurs situés à la surface des macrophages, tels que les récepteurs Toll (Wooten *et al.* 2002) et Fcγ (Talkington et Nickell 2001), et en induisant la migration des neutrophiles dans l'articulation (Brown *et al.* 2003) (Brown *et al.* 2004). Parallèlement à cette réponse innée, une réponse adaptative se développe avec la production d'anticorps spécifiques à plusieurs constituants de *Borrellia* (Akin *et al.* 1999). Parmi les anticorps générés, seulement ceux ayant une spécificité pour la protéine Arp (« arthritis-related protein ») ont démontré une habileté à diminuer la sévérité de la maladie lorsque transférés dans des souris SCID (*severe combined immunodeficient*) atteintes de la maladie de Lyme (Feng *et al.* 2000).

Les signes histologiques de l'inflammation de l'articulation chez les patients atteints de la maladie de Lyme sont similaires à ceux des autres formes d'arthrite inflammatoires, incluant la PR. Ainsi, on note un épaissement de la membrane synoviale avec une infiltration de leucocytes et une augmentation de l'expression de TNF

et d'IL-1 par les cellules inflammatoires et les synoviocytes (Harjacek *et al.* 2000). De plus, une étude a démontré que la présence de *B. burgdorferi* pouvait entraîner la dégradation du cartilage et que celle-ci était inhibée par l'utilisation d'un inhibiteur sélectif pour les MMP (Hu *et al.* 2001). La culture *in vitro* de chondrocytes a permis de révéler que le contact avec *B. burgdorferi* induisait une augmentation de la production de MMP1 et de MMP3 (Lin *et al.* 2001). *In vivo*, ces deux MMP ont été détectées en quantité accrue dans les liquides synoviaux de patients non traités atteints de la maladie de Lyme (Lin *et al.* 2001). En comparaison, l'expression de deux autres MMP, MMP8 et MMP9, prédomine dans les liquides synoviaux de patients résistants aux antibiotiques (Lin *et al.* 2001).

1.2.3 Les arthropathies microcristallines

Les arthropathies microcristallines sont déclenchées par l'accumulation de microcristaux dans les articulations. Il en existe trois types que l'on différencie selon la nature des microcristaux responsables de la maladie : la goutte, déclenchée par une accumulation de cristaux d'urate monosodique; la pseudogoutte, déclenchée par une accumulation de cristaux de pyrophosphate de calcium; et la maladie des calcifications multiples, induite par des dépôts de cristaux d'apatite.

1.2.3.1 La goutte

La goutte affecte 500 000 canadiens, soit un canadien sur 30. Elle est d'ailleurs beaucoup plus fréquente dans les pays où le niveau de vie est élevé. Les hommes sont quatre fois plus susceptibles d'en être la cible que les femmes. De façon générale, les hommes développent la goutte entre 30 et 50 ans, alors que les femmes sont plus susceptibles de développer la maladie après l'âge de 60 ans. C'est la cause la plus fréquente d'arthrite inflammatoire chez les hommes de plus de 40 ans. Le signe précurseur qui se manifeste, et ce sans aucune raison apparente, est une douleur persistante au niveau du gros orteil, souvent la nuit, pendant le sommeil. Généralement, ce sont les articulations des jambes qui sont touchées. Dans certains cas, les attaques se prolongent et la maladie devient chronique.

La goutte est caractérisée par des dépôts de cristaux d'urate monosodique (UMS) dans les tissus. Cette accumulation de cristaux est due à des prédispositions génétiques associées à un régime riche en purine (ex. café, cacao, thé, fruits de mer, foie, les sauces, les pois, et les épinards. C'est d'ailleurs pourquoi cette maladie était connue depuis l'antiquité sous le nom de la « maladie des rois » car elle survenait fréquemment dans les familles royales). L'observation que l'injection de cristaux d'UMS dans les articulations d'humains et de chiens en santé reproduise la maladie suggère que l'amoncellement de ces cristaux dans les articulations est l'élément déclencheur de cette forme d'arthrite (Faires et McCarty 1962).

Récemment, quelques facteurs responsables de l'intensité de l'inflammation présente dans les articulations des patients souffrant de la goutte ont été identifiés. Entre autre, le degré d'inflammation serait influencé par le stade de différenciation des macrophages. Lorsque des cristaux d'UMS sont ajoutés à différentes cultures de monocytes/macrophages, ceux-ci ne sont phagocytés que par les cellules ayant atteint un certain niveau de différenciation (Yagnik *et al.* 2000). Il est intéressant de noter que la production des cytokines proinflammatoires TNF- α , IL-1 et IL-6 provoquée par l'ingestion de cristaux d'UMS diminue avec la progression du processus de différenciation (Landis *et al.* 2002), tandis que la sécrétion de TGF- β n'est observée que chez les macrophages différenciés (Yagnik *et al.* 2004). L'expression de ce patron de cytokines par les macrophages peu différenciés induit la production de E-sélectine par les cellules endothéliales, alors que le TGF- β produit par les macrophages différenciés la supprime. Cette régulation a des conséquences importantes sur l'intensité de l'inflammation puisque la E-sélectine induit le recrutement des neutrophiles dans les articulations. La phagocytose des cristaux par les neutrophiles provoque la libération de grandes quantités d'enzymes et de médiateurs de l'inflammation. En effet, puisque les neutrophiles ne peuvent détruire les cristaux phagocytés, ces derniers causent d'importants dommages à la membrane lysosomale entraînant ainsi la libération du contenu des lysosomes.

1.3 Thérapies

Les récents progrès dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie des maladies arthritiques ont contribué aux développements de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour évaluer l'efficacité d'un traitement, les cliniciens ont recours à certaines mesures incluant : le nombre d'articulations douloureuses ou enflées, la présence de marqueurs de l'inflammation, tel que le niveau sérique de protéine C-réactive (CRP, « C-reactive protein »), et les réponses des patients à un questionnaire concernant l'évaluation fonctionnelle de leur maladie. Les médicaments utilisés pour traiter l'arthrite peuvent être divisés en trois catégories : les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), les corticostéroïdes, et les médicaments modifiant l'évolution de l'affection rhumatismale (DMARD).

1.3.1. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont fréquemment employés pour soulager la douleur et les raideurs de l'articulation. Les plus récents, les COXIB (celecoxib et rofecoxib), agissent sur le processus inflammatoire en inhibant la cyclooxygénase (COX), une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des prostaglandines (Hinz et Brune 2002). Il existe deux isoformes de la COX, la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est exprimée de façon constitutive dans les tissus. Elle est responsable de la production physiologique de prostaglandines (PG) assurant, entre autre, la protection de la muqueuse gastrique. L'expression de la COX-2 est induite chez les monocytes, les macrophages et les synoviocytes par des stimuli inflammatoires, telles que l'IL-1, le TNF- α , et les radicaux oxygénés produits par les neutrophiles (Crofford *et al.* 1994). Elle est également induite chez ces derniers en réponse à l'IL-13 (Yu *et al.* 1998). La COX-2 est responsable de l'augmentation de la synthèse des PG pro-inflammatoires qui agissent en intensifiant les propriétés vasodilatatrices des kinines et de l'histamine. La vasodilatation des vaisseaux sanguins peut faciliter par la suite la migration des leucocytes. Bien que les AINS soient bien tolérés à court terme, l'administration des ces médicaments à long terme peut provoquer notamment des troubles de l'appareil gastro-intestinal : irritation gastrique, ulcères peptiques, hémorragie et perforation. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de la

COX-2, tels que le celecoxib (Celebrex©) et le rofecoxib (Vioxx©) permet de diminuer les risques de troubles gastro-intestinaux (FitzGerald et Patrono 2001) (Silverstein *et al.* 2000). Cependant, certaines études ont rapporté que l'incidence de thrombose était plus élevée chez les patients traités avec des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (Strand et Hochberg 2002). Tout récemment, nous avons d'ailleurs assisté au retrait sur le marché du rofecoxib en raison des risques associés aux troubles cardiaques. Ce retrait met en lumière notre compréhension incomplète de l'action des COXIB et des PG.

1.3.2. Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont utilisés comme anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs et représentent une option pour les patients intolérants aux AINS. Selon la dose, la prise de ces médicaments présente peu de danger à court terme à condition de respecter un régime pauvre en sel. En revanche, s'ils sont administrés sur une longue période, les corticostéroïdes entraînent de nombreux effets indésirables, dont la raréfaction osseuse. Le mécanisme d'action des corticostéroïdes reste mal connu. Il a été rapporté que les glucocorticostéroïdes, des corticostéroïdes de synthèse, pourraient agir en induisant la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Verhoef *et al.* 1999) ou en inhibant l'expression de la COX-2 (Kojima *et al.* 2002). De plus, les glucocorticostéroïdes pourraient jouer un rôle comme agents modifiant l'évolution de la maladie, comme le suggère une étude de Saito dans laquelle l'utilisation de dexaméthasone freine la dégradation du collagène induite, *in vitro*, par la combinaison d'IL-1 et de plasminogène, probablement en inhibant l'expression des MMP (Saito *et al.* 1999).

1.3.3. Les médicaments modifiant l'évolution de l'affection rhumatismale (DMARD)

Les DMARD sont définis comme des médicaments capables de retarder ou d'empêcher la progression de la maladie. Leur efficacité est clairement démontrée par les radiographies montrant le ralentissement de l'érosion du cartilage. Cependant, les doses

prescrites de DMARD doivent être minutieusement calculées en raison de la toxicité de ces substances.

Certaines cytokines semblent contribuer significativement à la réponse inflammatoire développée chez les patients atteints d'arthrite. Ainsi, dans un modèle murin, l'expression constitutive de TNF- α est suffisante pour induire le développement d'une polyarthrite inflammatoire chronique (Keffer *et al.* 1991). Le traitement des ces animaux avec un anticorps monoclonal anti-TNF atténue l'inflammation de la synoviale et l'érosion du cartilage (Shealy *et al.* 2002). De façon similaire, les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 ainsi que la plupart des souris déficientes en TNF- α sont résistantes au développement des symptômes reliés à l'arthrite (Ji *et al.* 2002). Basé sur des observations semblables, trois DMARD inhibant le TNF- α (l'infliximab, l'étaernercept et l'adalimumab) et un DMARD inhibant l'action de l'IL-1 (l'anakinra) ont été développés. Par exemple, l'infliximab consiste en un anticorps anti-TNF chimérique, la partie liant le TNF étant d'origine murine. Les essais cliniques chez des patients souffrant de RA ont montré que l'infliximab était efficace pour atténuer le niveau d'inflammation de l'articulation (Elliott *et al.* 1993). Un des mécanismes d'action possibles est la diminution de l'expression de molécules d'adhésion, notamment la E-sélectine et la molécule d'adhérence intercellulaire-1 (ICAM-1), induite par le TNF, ce qui a pour effet de diminuer le nombre de cellules recrutées dans l'articulation (Nakada *et al.* 1998). Cependant, l'immunogénicité de l'infliximab, due à sa portion murine, peut représenter une limitation à son utilisation.

1.3.4. Autres alternatives thérapeutiques

Une alternative pour ralentir ou arrêter l'évolution de l'arthrite est de cibler directement les enzymes responsables de la dégradation du cartilage. À cet égard, plusieurs thérapies dirigées contre les MMP ont été envisagées (Close 2001). Ces thérapies prennent avantage des efforts déployés pour développer des inhibiteurs de MMP visant à freiner le cancer, notamment en réduisant l'angiogénèse. Bien que plusieurs de ces inhibiteurs aient été testés avec succès dans des modèles expérimentaux d'arthrite, aucun ne s'est avéré jusqu'à maintenant efficaces chez l'humain pour contrer

la progression de l'arthrite. Il semble qu'une meilleure compréhension du rôle et des propriétés des MMP, ainsi que de leur relation avec les autres protéases impliquées dans la destruction du cartilage soit nécessaire afin de déterminer quelles cibles parmi les différents membres de la familles des MMP doivent être visées dans le contexte des différentes formes d'arthrite.

II. LES PROTÉASES IMPLIQUÉES DANS L'ARTHRITE

De par leurs actions sur les composés formant la matrice extracellulaire (MEC), les protéases jouent un rôle important dans plusieurs phénomènes biologiques comme l'embryogenèse, la croissance, la reproduction, l'apoptose et la réparation de tissus. La contribution de chacune des protéases dans le remodelage des tissus varie selon la situation. Néanmoins, dans chacun des cas, la synthèse et la dégradation des molécules de la MEC doivent conserver un certain équilibre pour éviter d'entraîner l'apparition de conditions pathologiques.

Il existe plusieurs types de protéases que l'on peut classer en quatre groupes selon la particularité de leur site catalytique : les protéases à cystéine, les protéases à sérine, les protéases aspartiques et les métalloprotéases. De plus, la dégradation des molécules peut être effectuée via deux voies protéolytiques différentes: la voie intracellulaire où des protéases aspartiques et à cystéine hydrolysent les protéines dans un milieu à faible pH, et la voie extracellulaire dans laquelle des protéases à sérine et des métalloprotéases dégradent les protéines dans des conditions de pH neutre. Parmi les protéases impliquées dans la pathologie de l'arthrite, les métalloprotéases, plus particulièrement les métalloprotéases de la matrice (MMP), semblent jouer un rôle clé dans la dégradation du cartilage. D'autres enzymes comme les protéases à sérine et à cystéine semblent aussi jouer un rôle important, mais plutôt comme activateurs des MMP (Martel-Pelletier *et al.* 2001). La section qui suit sera principalement consacrée aux MMP. Nous discuterons à la toute fin d'autres types d'enzymes susceptibles de contribuer significativement à la progression des maladies arthritiques.

2.1 Les métalloprotéases de la matrice (MMP)

2.1.1 Présentation de la famille des MMP

Les MMP sont des endopeptidases calcium et zinc dépendantes collectivement capables de dégrader plusieurs molécules de la matrice extracellulaire (MEC) (Woessner et Nagase 2000) (Tableau I). Elles forment une famille composée d'au moins 25

membres que l'on peut diviser en cinq groupes majeurs selon leurs propriétés structurales et fonctionnelles : (i) les collagénases (MMP1, MMP8, MMP13, MMP18), (ii) les stromélysines (MMP3, MMP10, MMP11), (iii) les gélatinases (MMP2, MMP9), (iv) les MMP membranaires (MT1-MMP à MT6-MMP) et (v) un groupe hétérogène incluant la matrilysine (MMP7), l'énamélysine (MMP20), l'élastase des macrophages (MMP12) et MMP19.

Bien que distinctes, les MMP possèdent toutes au moins trois domaines bien conservés : un prodomaine en N-terminal responsable de la latence de l'enzyme, un domaine catalytique liant le zinc et le calcium et responsable de l'activité catalytique de l'enzyme, et un domaine en C-terminal apparenté à l'hémopexine qui est responsable de la liaison aux substrats (Woessner et Nagase 2000) (Fig.1). Certaines MMP contiennent des domaines additionnels. Par exemple, les gélatinases possèdent trois domaines apparentés au module de type II de la fibronectine qui leur permettent de se lier à la gélatine. Les MMP membranaires (MT-MMP) sont caractérisées, quant à elles, par une région transmembranaire suivie d'une courte queue intracytoplasmique. Une séquence hydrophobique en N-terminal forme le peptide signal responsable du ciblage des enzymes vers le réticulum endoplasmique, puis l'appareil de Golgi et enfin leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Woessner et Nagase 2000). Puisque les MMP ont une activité biologique sur un large éventail de molécules, elles doivent être contrôlées précisément afin d'éviter des dommages inutiles aux tissus. Cette régulation peut s'effectuer à différents niveaux, notamment lors de la synthèse des MMP, leur activation par clivage protéolytique, et finalement la présence d'inhibiteurs spécifiques naturels (Martel-Pelletier *et al.* 2001).

2.1.2 Régulation de l'expression

Les MMP sont produites par plusieurs types de cellules. Au niveau du tissu articulaire, les principales cellules responsables de leur sécrétion sont les chondrocytes, les fibroblastes, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules inflammatoires (telles que les macrophages, lymphocytes et neutrophiles) (St-Pierre *et al.* 2003) (Grassi *et al.* 2004) (Rifas et Arackal 2003). Dans des conditions physiologiques normales, on les retrouve

exprimées en faibles quantités dans les cellules du cartilage et de la membrane synoviale. En effet, la transcription de la plupart des gènes codant pour les MMP chez la plupart des types cellulaires n'est pas constitutive, mais est plutôt induite suite à la présence de modulateurs spécifiques, tels que des cytokines inflammatoires ou des facteurs de croissance (Tableau II) (St-Pierre et Van Themsche 2003). Par exemple, chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, on mesure des niveaux élevés de TNF- α et d'IL-1 dans le tissu articulaire (Goldring et Gravallesse 2000). Ces deux cytokines peuvent induire l'expression de MMP3 par les fibroblastes (MacNaul *et al.* 1990) (Fuchs *et al.* 2004) et les chondrocytes (Sakai *et al.* 2001) (Lazzerini *et al.* 2004) en agissant de façon autocrine ou paracrine. Les interactions cellulaires jouent également un rôle important dans la régulation de l'expression des MMP. Ainsi, la signalisation via les intégrines semble intervenir dans la production de MT1-MMP chez les fibroblastes cultivés *in vitro* sur des gels de collagène de type I (Zigrino *et al.* 2001). De même, le contact entre les lymphocytes T et l'endothélium vasculaire régule, et ce de façon bi-directionnelle, l'expression des MMP (Aoudjit *et al.* 1998) (Van Themsche *et al.* 2004). Finalement, l'interaction du récepteur CD40L présent chez les lymphocytes T activés avec le récepteur CD40 des monocytes stimule l'expression de MMP9 chez ces derniers (Malik *et al.* 1996).

Plusieurs études ont démontré que l'expression de MMP spécifiques implique des cascades de signalisation distincte. Par exemple, l'oncostatine M peut activer les cascades des JAK/STAT et des MAP kinases chez les chondrocytes, entraînant ainsi la production de MMP1, MMP3 et MMP13 (Li *et al.* 2001). La production de MMP1 chez les fibroblastes de la membrane synoviale suite à l'action de l'IL-1 peut également impliquer la participation du facteur de transcription NF- κ B (Vincenti *et al.* 1998), un facteur de transcription impliqué dans la régulation de plusieurs MMP suite à l'exposition de divers types cellulaires aux cytokines inflammatoires (St-Pierre et Van Themsche 2003).

Certains facteurs peuvent cependant inhiber la transcription des gènes des MMP. Les corticostéroïdes (Richardson et Dodge 2003) et, dépendamment du type de cellule et des isoformes, le TGF- β (Shlopov *et al.* 1999) en sont des exemples. De plus, des travaux récents ont démontré que la régulation transcriptionnelle de plusieurs MMP, dont MMP3

et MMP9, impliquait un contrôle épigénétique. Plus spécifiquement, ces études ont démontré que la méthylation de CpG au niveau du promoteur des gènes codant pour ces MMP joue un rôle important non seulement en inhibant l'expression constitutive de celles-ci, mais également en contrôlant leur expression induite par des agents inflammatoires, tel que TNF α et l'IL-1 (Chicoine *et al.* 2002) (Sato *et al.* 2003).

2.1.3 Régulation de l'activité

Suite à leur transcription et leur traduction, les MMP sont sujettes à un deuxième niveau de régulation, soit le contrôle de leur activité. Cette régulation se fait via deux mécanismes principaux. D'abord, les MMP sécrétées doivent être activées par un mécanisme physiologique faisant appel à un clivage protéolytique de leur pro-domaine. Puis, les MMP actives sont, à leur tour, contrôlées par des inhibiteurs de protéases endogènes qui se lient au niveau du site catalytique de l'enzyme.

2.1.3.1 Activation des MMP

La plupart des MMP sont sécrétées sous forme de précurseurs inactifs, les proMMP, qui doivent être activées par clivage protéolytique. Cette activation a lieu dans l'espace extracellulaire (sauf pour les MT-MMP et pour MMP11 dont l'activation se produit notamment au niveau membranaire et intracellulaire, respectivement (St-Pierre et Van Themsche 2003) et peut être effectuée par plusieurs protéases, dont les autres MMP, ou par le système d'activation du plasminogène (Woessner et Nagase 2000). Ces dernières agissent en attaquant un résidu cystéine conservé présent dans la séquence du prodomaine de toutes les MMP. Cette attaque entraîne la déstabilisation de l'interaction cystéine-zinc qui maintient les MMP sous une forme latente exposant ainsi un site d'activation finale susceptible à un second clivage protéolytique (Springman *et al.* 1990).

Étant donné que l'on peut facilement distinguer sa forme active de sa forme latente sur un gel de zymographie sur gélatine, MMP2 est un des membres de la famille des MMP dont l'activation a été le plus caractérisée. L'activation de la proMMP2 a lieu à la surface des cellules. Le clonage en 1994 de l'ADNc de MT1-MMP et sa transfection dans les cellules COS ont montré que la MT1-MMP pouvait activer la proMMP2, mais

non la proMMP9 (Sato *et al.* 1994). Six MT-MMP ont été dénombrées à ce jour. Elles sont caractérisées par la présence d'une séquence RXKR reconnue par des protéases appartenant à la famille de la furine. Cette séquence conservée, située entre le pro-domaine et le domaine catalytique, permet l'activation des MT-MMP dans l'appareil de Golgi (Pei et Weiss 1995) (Woessner et Nagase 2000). Parmi celles-ci, il a été montré que toutes, à l'exception de la MT5-MMP, étaient capables d'activer la proMMP2. Une fois actives, les MMP peuvent activer d'autres enzymes déclenchant ainsi une cascade protéolytique. Par exemple, une fois activée, la MMP2 peut activer la proMMP9 (Fridman *et al.* 1995). Elle peut aussi, de concert avec la MT1-MMP, activer la proMMP13 (Knauper *et al.* 1996).

2.1.3.2 Inhibition de l'activité des MMP

Une fois activées, les MMP sont régulées par plusieurs inhibiteurs endogènes tels que l' α_2 -macroglobuline et les TIMP (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) (Woessner et Nagase 2000). L' α_2 -macroglobuline est une grosse protéine d'environ 750 kDa synthétisée par le foie. On la retrouve dans le sérum et le liquide synovial des personnes en santé et à des niveaux plus élevés chez les patients arthritiques où elle semble être responsable de l'inhibition non spécifique des protéases actives.

Les TIMP sont considérés comme étant les inhibiteurs physiologiques spécifiques des MMP. Ils sont généralement produits par les mêmes cellules qui produisent les MMP, et souvent suite aux mêmes signaux d'activation cellulaire, permettant ainsi à la cellule de contrôler de façon rigoureuse l'activité des MMP (Martel-Pelletier *et al.* 2001). Identifiée pour la première fois en 1975, la famille des TIMP compte aujourd'hui quatre membres (TIMP-1, -2, -3 et -4). Ces derniers sont caractérisés par la présence de 12 résidus cystéines conservés permettant la formation de six ponts disulfures et d'un domaine N-terminal nécessaire à l'activité inhibitrice des TIMP (Williamson *et al.* 1990). Toutes les MMP sont inhibées par les TIMP en formant des complexes stochiométriques dont le ratio est 1 :1. L'activité inhibitrice des TIMP résulte de la liaison de leur domaine N-terminal avec le site catalytique des MMP actives (Murphy *et al.* 1991) (DeClerck *et al.* 1993). Les TIMP ont aussi la capacité de se lier aux proMMP, comme les progélatinases (proMMP2, proMMP9) (Goldberg *et al.* 1989) (Murphy *et al.* 1989).

Cette capacité à inhiber les progélatinases est attribuée à la liaison du domaine C-terminal des TIMP avec le domaine apparenté à l'hémopexine des progélatinase de manière à ce que la partie N-terminale des TIMP soit alignée avec le site actif de la proenzyme (Woessner et Nagase 2000).

Dans un milieu biologique, l'activité protéolytique nette des MMP est donc déterminée par la balance entre les inhibiteurs des MMP et les MMP actives (Woessner et Nagase 2000) (Nagase et Brew 2002). Dans les conditions physiologiques normales, la quantité d'inhibiteurs est en équilibre avec la quantité de MMP empêchant ainsi la dégradation excessive de la MEC (Tchetverikov *et al.* 2004) (Nagase et Brew 2002).

2.1.4 Rôles biologiques des MMP

Étant donné la grande diversité de leurs substrats (Tableau I), les MMP sont impliquées dans plusieurs processus biologiques. La contribution réelle des MMP dans les divers processus demeure néanmoins difficile à évaluer. En effet, les méthodes conventionnelles employées pour étudier leurs rôles ne permettent pas de mesurer directement leur activité nette résultant de l'équilibre entre les niveaux de MMP actives et de leurs inhibiteurs. De plus, il est difficile de déterminer le rôle joué par chacune des MMP puisque les inhibiteurs naturels ou chimiques utilisés lors de la plupart des études ne sont généralement pas spécifiques à un seul membre de la famille ou à un sous-groupe particulier. Par conséquent, la plupart de nos connaissances des MMP sont basées sur l'association entre l'augmentation de l'expression des MMP et un processus physiologique spécifique. Il a ainsi été démontré que les MMP sont impliquées à la fois dans des mécanismes physiologiques normaux ou pathologiques. Parmi les phénomènes normaux où l'on dénote une augmentation de l'expression des MMP, on retrouve ceux nécessitant le remodelage des tissus, tels que le développement embryonnaire, la guérison des blessures et la résorption osseuse (Woessner et Nagase 2000). La participation des MMP dans ces phénomènes est probablement liée à leur capacité à cliver les composants de la MEC. Outre leur rôle dans la modification des tissus, de plus en plus d'études indiquent que les MMP participent à la régulation positive et négative de

l'inflammation grâce à leur action sur les cytokines et les chimiokines (St-Pierre et Van Themsche 2003).

Cependant, lorsque l'activité des MMP devient trop élevée, l'apparition de maladies peut survenir. Le développement de cancers et l'arthrite figurent parmi les plus importantes. Dans le premier cas, la surexpression des MMP faciliteraient la migration et l'invasion des cellules tumorales ainsi que la formation de métastases (Stetler-Stevenson *et al.* 1996). Chez les patients arthritiques, l'activité protéolytique excessive des MMP serait responsable en partie de la dégradation du cartilage articulaire (Martel-Pelletier *et al.* 2001).

2.2 Les autres classes de protéases

On connaît mal les mécanismes protéolytiques responsables des symptômes observés chez les patients arthritiques. Des études menées avec l'utilisation d'inhibiteurs de protéases dans des cultures de cartilage ont suggéré que d'autres enzymes, appartenant à des classes différentes de celle des métalloprotéases, étaient aussi impliquées directement ou indirectement dans l'érosion des os.

2.2.1 Les protéases produites par les neutrophiles

Les formes inflammatoires d'arthrite sont caractérisées par la présence d'une quantité abondante de neutrophiles recrutés dans le liquide synovial. Bien que l'habileté des neutrophiles à détruire le cartilage n'ait jamais été démontrée *in vivo*, plusieurs études *in vitro* supportent cette hypothèse (Keiser *et al.* 1976) (Halliday *et al.* 2000). La destruction du cartilage pourrait avoir lieu lorsque les neutrophiles libèrent les enzymes contenus dans leurs granules dans le liquide synovial. Cette libération aurait lieu soit lors de la mort cellulaire ou lors de la phagocytose des complexes immuns déposés sur le cartilage (phagocytose frustrée). Parmi les protéases présentes dans les granules des neutrophiles et susceptibles de jouer un rôle dans la pathologie de l'arthrite, on note l'élastase des leucocytes et la cathepsine G, deux protéases à sérine (Janusz et Doherty 1991) (Janusz et Durham 1997). L'élastase est sans doute la protéase retrouvée en

quantité la plus abondante dans les granules azurophiliques des neutrophiles. Des études *in vitro* ont démontré qu'ensemble, l'élastase et la cathepsine G étaient capables de dégrader plusieurs protéines de la MEC, dont le collagène, la fibronectine, la laminine et des protéoglycans. De plus, ces deux protéases pourraient également jouer un rôle indirect dans la pathologie de l'arthrite par leur habileté à activer les procollagénases, les prostromélysines et les progélatinases. Des études ont démontré que l'élastase des leucocytes peut libérer les MMPs actives associées à leurs inhibiteurs endogènes par dégradation protéolytique de ces derniers (Itoh et Nagase 1995). Toutes ces données réunies suggèrent que ces enzymes pourraient constituer un des principaux mécanismes par lesquels les neutrophiles détruisent le cartilage.

2.2.2 Les protéases produites par les cellules du tissu articulaire

L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) est une protéase à sérine sécrétée par les chondrocytes (Bunning *et al.* 1987) et les fibroblastes de la membrane synoviale (Mochan *et al.* 1986) (Vitti et Hamilton 1988) en réponse à des stimuli inflammatoires, dont l'IL-1. Cette protéase est responsable de la conversion du plasminogène en plasmine, laquelle peut promouvoir directement ou indirectement la dégradation des composés du cartilage. En effet, la plasmine peut agir en dégradant les protéoglycans du cartilage (Lack et Rogers 1958) ou en activant des MMP latentes (MMP1, MMP3 et MMP9) (Martel-Pelletier *et al.* 2001). L'activité de l'uPA et de la plasmine est contrôlée principalement par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI). Dans les liquides synoviaux des patients arthritiques, on observe une surexpression de l'uPA (Belcher *et al.* 1996). De plus, il a été montré que chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, l'augmentation de l'activité de l'uPA est associée à la sévérité de la maladie (Brommer *et al.* 1992).

2.2.3 Les protéases exprimées de façon ubiquiste

Plusieurs maladies inflammatoires, comme l'arthrite rhumatoïde, font intervenir la libération extracellulaire d'enzymes lysosomiales qui dégradent les tissus

environnants. Parmi les plus relevantes, citons la cathepsine B, une protéase à cystéine, dont les niveaux d'expression sont surélevés dans les cellules du tissu articulaire des patients atteints d'arthropathies (Hashimoto *et al.* 2001). La cathepsine B est normalement impliquée dans le système intracellulaire de dégradation des protéines. Toutefois, on la retrouve dans l'espace extracellulaire chez les personnes atteintes de certaines pathologies. Tout comme les protéases mentionnées précédemment, la cathepsine B pourrait jouer un rôle directe dans le processus dégénératif relié à l'arthrite en dégradant les molécules de la MEC (Mort *et al.* 1998) ou indirectement en activant des MMP (Eeckhout et Vaes 1977) ou en dégradant leurs inhibiteurs (Kostoulas *et al.* 1999). Même si elle est pratiquement inactive aux conditions de pH neutre régnant dans le milieu extracellulaire, la cathepsine B reste néanmoins active à certains endroits dans le tissu articulaire. Son activité est d'ailleurs favorisée, comparativement à celle des MMP, dans le microenvironnement formé au site d'attachement des macrophages et des ostéoclastes à la jonction pannus-cartilage ou pannus/os où le pH est plus acide (Silver *et al.* 1988).

III. RÔLES DES MMP DANS LA PATHOLOGIE DE L'ARTHRITE

Différentes approches laissent supposer que les MMPs pourraient être impliquées dans le processus dégénératif associé à l'arthrite. Par exemple, l'amplitude du processus de dégradation du cartilage peut être évaluée par la quantification des néoépitoques générés lors du remodelage des tissus et libérés dans le liquide synovial. Or, le clivage du collagène de type II, le principal constituant du cartilage humain, peut être effectué par les collagénases (MMP1, MMP8 et MMP13). Ce clivage résulte en la production du néoépitope Col2-3/4C_{Long mono} (C2C) que l'on peut quantifier par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Chez les patients souffrant d'une arthrite inflammatoire débutante, le taux de C2C présent dans les liquides synoviaux est en corrélation avec les niveaux de MMP-1, de TNF- α et de CRP (Fraser *et al.* 2003).

Le processus de dégénérescence du cartilage est aussi mis en évidence par la présence anormalement élevée de protéases, telles que les MMP, dans les tissus articulaires (Tchetverikov *et al.* 2004) (Yoshihara *et al.* 2000). Bien que, *ex vivo*, les niveaux d'expression des MMP corrént avec la dégradation du collagène (Kozaci *et al.* 1997), leur contribution nette dans la cascade protéolytique responsable de l'érosion du cartilage demeure inconnue. En effet, l'étude des MMP est basée principalement sur des méthodes, comme l'ELISA et la zymographie, qui permettent de détecter seulement leur présence. Il existe quelques techniques pour mesurer l'activité protéolytique des MMP, incluant l'utilisation de substrats fluorogéniques et l'immunobuvardage de type Western. Malheureusement, étant donné leur niveau de sensibilité relativement faible, celles-ci requièrent souvent l'activation préalable des formes proactives. Ces méthodes ne fournissent donc qu'une mesure approximative de l'activité protéolytique nette des MMP qui résulte de la balance entre les MMP actives et leurs inhibiteurs.

Afin d'adresser spécifiquement le rôle des MMP dans les maladies arthritiques, différents modèles *in vivo* ont donc été développés. Les études effectuées avec des souris déficientes pour une ou plusieurs MMP sont particulièrement intéressantes à ce propos. Elles questionnent notamment la pertinence de certaines MMP, comme MMP3, qui ne semble pas jouer un rôle important dans la dégradation du cartilage malgré sa surexpression dans les liquides synoviaux chez les patients arthritiques (Mudgett *et al.* 1998) (Clements *et al.* 2003). Elle soulève ainsi la possibilité que l'expression des

MMPs, ou du moins de certaines, serait le résultat d'une réaction inflammatoire, mais non la cause de la maladie. La mesure des niveaux de celles-ci pourrait néanmoins servir de marqueurs pour indiquer le stade de la maladie. Une autre étude effectuée sur des souris déficientes pour MMP2, MMP9, ou une combinaison des deux, suggèrent que les MMP sont des acteurs pouvant favoriser ou diminuer la progression de l'arthrite et que le développement de thérapie ciblant les MMP nécessitera la connaissance de la fonction dominante de chacune d'elle (Itoh *et al.* 2002). Récemment, il a été proposé que les MMP pourraient aussi jouer un rôle indirect dans la physiopathologie de l'arthrite en tant qu'antigène du soi stimulant les cellules T et B autoréactives (ter Steege *et al.* 2003) (van Bilsen *et al.* 2004). Dans un même ordre d'idée, il a été démontré que la quantité d'autoanticorps anti-MMP3 sérique augmentait suite à l'induction de l'arthrite par adjuvant chez le rat (van Bilsen *et al.* 2004). Ainsi, la question demeure à savoir si les MMP constituent de simples marqueurs de la réponse inflammatoire ou si elles participent directement au processus arthritique à partir de leurs propriétés enzymatiques, ou indirectement à partir de leurs propriétés arthrogéniques.

3.1 La dégradation du cartilage par les MMP

Les MMP sont généralement connues pour leur habileté à dégrader plusieurs molécules entrant dans la composition de la MEC (Tableau II). La MEC forme un réseau complexes de polysaccharides et de protéines sécrétés par les cellules à qui elle sert de support et en influence le développement et la physiologie. Même si elle semble statique, une activité de dégradation et de synthèse assure le renouvellement constant de la MEC. La dégradation, qui normalement se déroule lentement et en équilibre avec la synthèse des nouveaux composés, est accélérée dans les tissus des articulations des patients arthritiques.

La matrice qui forme le cartilage et les os contient principalement du collagène et de l'aggrécan. Parmi les 19 molécules différentes de collagène identifiées, les types II, V, VI, IX, X et XI sont retrouvés dans le cartilage tandis que les types I, III et V entrent dans la composition des os (Okada 2000). Tous ces types de collagène peuvent être dégradés, avec une efficacité différente, par l'ensemble des MMP. On observe également

un chevauchement dans le spectre des molécules de collagène servant de substrats aux différentes MMP. Ainsi, les types de collagène I, II et III sont susceptibles au clivage par les collagénases (MMP1, MMP8, MMP13). Toutefois des études biochimiques ont montré que MMP1, MMP8 et MMP13 dégradent préférentiellement les types de collagène III, I et II respectivement (Welgus *et al.* 1981) (Hasty *et al.* 1987) (Knauper *et al.* 1996).

La dégradation du cartilage par les MMP peut également impliquer la collaboration d'autres enzymes. En effet, beaucoup de MMP ont la capacité de dégrader des inhibiteurs non spécifiques de protéases, tel que l' α_2 -macroglobuline (St-Pierre et Van Themsche 2003). La dégradation de ces inhibiteurs entraîne la libération des protéases séquestrées qui potentialisent ultérieurement la destruction du cartilage. Par exemple, le clivage de l' α_1 -antitrypsine peut libérer l'élastase qui agit alors à son tour en activant des proMMP ou en attaquant le complexe proMMP9-TIMP1. La proMMP9 ainsi libérée sert alors de substrat à d'autres protéases, comme la MMP3 (Itoh et Nagase 1995).

Parce que les MMP sont capables de dégrader les constituants majeurs du cartilage et parce qu'elles sont surexprimées dans les tissus articulaires des patients atteints d'arthrite, il est logique de croire qu'elles jouent un rôle clé dans l'érosion du cartilage. Cependant, une étude effectuée sur des souris déficientes en MMP2 et MMP9 indique qu'elles peuvent en réalité avoir des effets opposés sur la progression de l'arthrite. Ainsi, la MMP2 et la MMP9 semblent impliquées dans l'érosion du cartilage parce qu'elles peuvent cliver les sous-produits du collagène générés par les collagénases. Cependant, malgré leur spécificité semblable pour les molécules de la MEC, la suppression de ces gènes dans un modèle expérimental d'arthrite indique que ces deux protéases ont un rôle opposé (Itoh *et al.* 2002). Comparativement aux souris de type sauvage, les souris déficientes en MMP2 développent une arthrite plus sévère, au contraire des souris déficientes en MMP9 qui présentent une réduction des symptômes. Il est donc possible que la MMP2 exerce un effet protecteur sur le développement de la maladie. Donc, malgré une activité enzymatique similaire, les raisons pour lesquelles ces protéases produisent ces effets contraires sont inconnues. La possibilité que l'activité des MMP puisse influencer l'évolution de la maladie en clivant des médiateurs de

l'inflammation pourrait être une explication à ce paradoxe (McQuibban *et al.* 2000) (McCawley et Matrisian 2001).

3.2 Régulation de l'inflammation par les MMP

L'inflammation est une réponse initiée par une blessure ou une infection ayant pour but de protéger et de réparer les dommages causés aux tissus de l'organisme. Elle implique l'action coordonnée d'une multitude de facteurs, incluant des chimiokines et des cytokines pro- et anti-inflammatoires, dont l'équilibre détermine l'issue de la réponse. La capacité de l'organisme à interrompre la réponse inflammatoire suite à la réparation des lésions est primordiale. En effet, plusieurs maladies inflammatoires causant des dommages au tissu de l'organisme, dont l'arthrite, sont associées à un déséquilibre constant en faveur des facteurs pro-inflammatoires.

Plusieurs signaux inflammatoires sont régulés dans l'espace extracellulaire. Récemment, il a été rapporté que plusieurs cytokines et chimiokines pouvaient être clivées par les MMP (McCawley et Matrisian 2001). Par conséquent, en plus d'avoir un rôle dans la dégénérescence du cartilage, les MMP pourraient être impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire. Par exemple, en modulant l'activité des chimiokines, les MMP pourraient influencer négativement ou positivement le taux de recrutement des leucocytes au niveau des articulations. L'activité de la MMP2 sur la chimiokine CCL7 (« CC Motif Ligand 7 ») a été parmi les premières à être caractérisée. En utilisant un système de levure double hybride, McQuibban *et al.* ont démontré que la MMP2 pouvait inactiver la chimiokine CCL7 suite au clivage des quatre acides aminés situés dans sa portion N-terminale (McQuibban *et al.* 2000) (McQuibban *et al.* 2002). La liaison de la CCL7 inactive aux récepteurs de chimiokine-CC-1, -2 et -3 n'induit pas de signal calcique et une réduction significative de la migration des cellules mononuclées est observée *in vivo* (McQuibban *et al.* 2000). Subséquemment, il a été montré que plusieurs chimiokines peuvent être clivées par la même MMP et qu'il existe un chevauchement dans le spectre de chimiokines pouvant être clivées par les différentes MMP. En effet la même équipe a aussi démontré que MMP1, MMP13 et MT1-MMP

(MMP14) peuvent inactiver la CCL7 (McQuibban *et al.* 2002). D'une façon similaire, CCL2, CCL8 et CCL13 sont inactivées par la MMP1 et la MMP3 (McQuibban *et al.* 2002). Ce type de régulation est aussi observé chez certains membres appartenant au groupe de chimiokines CXC. Par exemple, le clivage de SDF-1 α (« Stromal Cell-Derived Factor 1 α ») par la MMP9 empêche sa liaison à son récepteur CXCR-4 et par conséquent, entraîne la perte de son activité chimiotactique (McQuibban *et al.* 2001). En revanche, le clivage d'autres chimiokines peut promouvoir l'inflammation. Ainsi, le clivage protéolytique de CXCL8 à son extrémité carboxyterminale par la MMP9 augmente de 10 à 27 fois sa capacité à induire la migration des neutrophiles (Van den Steen *et al.* 2000).

La régulation de la migration des leucocytes par les MMP ne se limite pas à la modification des chimiokines. Elles peuvent aussi moduler indirectement l'activité des chimiokines en modifiant leur gradient chimiotactique. *In vivo*, les chimiokines se fixent à des molécules de la MEC ou à la surface des cellules pour créer un gradient orientant la migration des leucocytes vers le site d'infection. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les MMP ont la propriété de dégrader plusieurs composés de la MEC. Par cette action, elles peuvent contribuer à la formation du gradient de chimiokines. Un des systèmes les mieux caractérisés à ce propos est la contribution de MMP7 à la formation d'un gradient de CXCL1 par son action sur la molécule de syndécan-1 (Li *et al.* 2002). Le gradient pour la chimiotaxie des neutrophiles est créé par la dispersion des molécules de syndécan-1 sur lesquelles est liées la CXCL1.

En plus des chimiokines, les MMP peuvent moduler l'activité d'autres cytokines, dont TNF- α et l'IL-1, deux molécules fortement exprimées dans les liquides synoviaux provenant de patients arthritiques. L'activation de la forme latente du TNF (proTNF) située à la surface des macrophages a été démontrée en utilisant des cellules provenant de souris déficientes pour la MMP7 et la MMP12 (Haro *et al.* 2000) (Churg *et al.* 2003). *In vitro*, d'autres MMP, incluant MMP3 et MMP9, ont dévoilé leur capacité à activer le proTNF (Mohan *et al.* 2002) ainsi que le précurseur de l'IL-1 β (Ito *et al.* 1996). Toutefois, bien que l'incubation de la proIL-1 β avec la MMP3 mène à l'activation de cette cytokine, un contact prolongé entraîne la dégradation de la molécule mature d'IL-

1 β (Schonbeck *et al.* 1998). Ces résultats suggèrent que les MMP peuvent être impliquées dans l'activation et l'inactivation des médiateurs de l'inflammation. Comme discuté dans le chapitre II, les molécules de TNF- α et d'IL-1 β matures (clivées) peuvent induire l'expression de MMP. À leur tour, les MMP peuvent alors moduler la chimiotaxie des leukocytes et l'activation ou l'inactivation de cytokines. Ainsi, la présence d'un déséquilibre entre les MMP et leurs inhibiteurs pourrait entraîner un déséquilibre entre les signaux pro- et anti-inflammatoires, contribuant ainsi à la formation d'un cercle vicieux favorisant la destruction du cartilage.

3.3 Les MMP : des cibles thérapeutiques potentielles

Étant donné l'accumulation d'études expérimentales impliquant les MMPs dans les processus dégénératifs caractérisés par le remodelage de la matrice extracellulaire, dont l'arthrite et le cancer, et étant donné le pourcentage élevé de la population atteint par ces maladies chroniques, les compagnies pharmaceutiques ont initié de vastes programmes de recherches et investi des milliards de dollars dans le développement d'inhibiteurs sélectifs visant à inhiber l'activité enzymatique des MMP. Bien que diverses stratégies puissent être employées pour supprimer l'activité des MMP, le blocage du site catalytique a été privilégié. De nombreux inhibiteurs, la plupart ayant une capacité commune à inhiber l'atome de zinc situé dans le site catalytique des protéases, sont alors apparus au cours des années 1990 et on fait l'objet de nombreux tests précliniques et cliniques.

Le premier inhibiteur oral à être testé en clinique, Marimastat (BB2516; British Biotech), fût développé pour le traitement du cancer (Drummond *et al.* 1999). Il s'agit d'un hydroxamate inhibant un large spectre de MMP. Selon les opinions à l'époque, l'utilisation de molécules à large spectre d'inhibition était préférable puisqu'elle permettrait d'inhiber des MMP non identifiées potentiellement impliquées dans le processus de la maladie. Cependant, un des problèmes liés à l'usage de ces inhibiteurs est le grand nombre d'effets secondaires engendrés. L'apparition de douleurs musculaires et de tendinites étant les effets secondaires les plus fréquemment associés avec la prise

d'inhibiteurs de MMP (Drummond *et al.* 1999). Ces effets furent d'ailleurs observés avec le Marimastat lors d'essais cliniques.

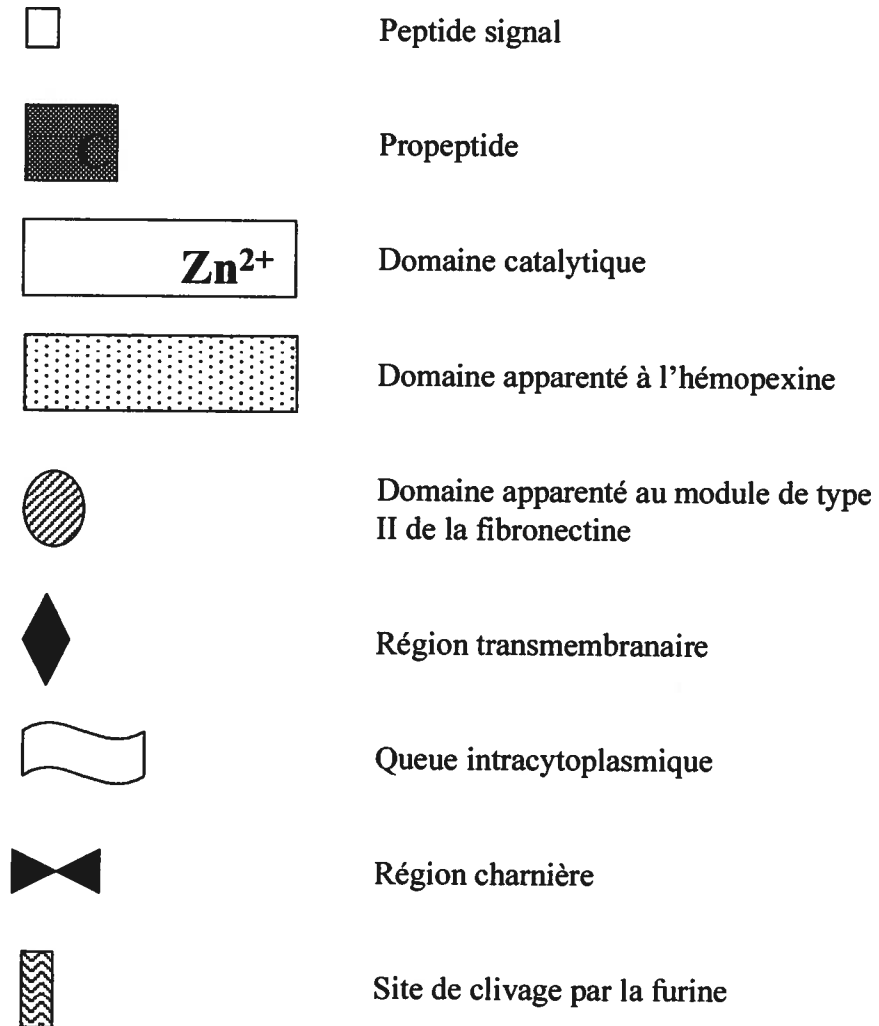
Étant donné les résultats prometteurs obtenus lors des expériences dans les modèles animaux, plusieurs des inhibiteurs de MMP développés ont été testés en clinique. Parmi eux, le Trocade (Ro-32-3555), un inhibiteur sélectif des collagénases, a complété les tests cliniques en phase III nécessaires pour évaluer son efficacité chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Close 2001). Malheureusement, les résultats obtenus sur les radiographies des patients n'ont montré aucun ralentissement dans l'évolution de la maladie. Le Bay-12-9566 (Bayer), un inhibiteur spécifique pour les gélatinases et les stromélysines, a également été testé jusqu'en phase III. Malheureusement, l'essai clinique a dû être interrompu étant donné que les patients traités avec l'inhibiteur voyaient leur état s'aggraver plus rapidement que le groupe témoin recevant le placebo. D'autres essais pour le traitement de l'arthrite ont également dû être interrompus en phase I ou II à cause de la biodisponibilité (D-5410 (CellTech) ou de la toxicité (BB-2983), un problème fréquemment observé dans l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs. En effet, des problèmes de fibromyalgie et le syndrome musculo-squeletique sont parmi les effets secondaires les plus importants de ces nouveaux médicaments. Or, dans le contexte où la douleur joue un rôle prépondérant dans le tableau clinique de l'arthrite, il devient important de déterminer si ces effets sont dus à l'inhibition de MMP spécifiques ou de l'ensemble des MMP. Ces observations questionnent également la pertinence des inhibiteurs de collagénases dans le traitement de l'arthrite et la validité des tests effectués dans les modèles animaux. Présentement, le seul inhibiteur de MMP disponible sur le marché est le Périostat. Ce médicament appartient au groupe des tétracyclines. Comme pour beaucoup d'autres antibiotiques à large spectre administrés par voie orale ou parentérale, la prise de Périostat peut entraîner, notamment, l'apparition de troubles gastro-intestinaux (Staeben 2004).

Bien entendu, d'autres stratégies possibles pour contrôler l'activité des MMP incluent l'induction de la production de TIMP par des agents tel que le polysulfate pentosan de calcium et l'inhibition de la synthèse des MMP (Bigg et Rowan 2001). Par

exemple, il est peut être possible de bloquer la production de MMP en inhibant l'action de certaines cytokines. Ceci constitue un des mécanismes d'action de l'infliximab, un anticorps anti-TNF chimérique (Brennan *et al.* 1997). Une alternative pour empêcher l'expression des MMP est de nuire aux cascades de signalisation intracellulaires. De tels inhibiteurs ont été utilisés pour démontrer entre autre le rôle des kinase ERK et p38 dans l'induction de l'expression de MMP-1 (Brauchle *et al.* 2000). Il n'en demeure pas moins que le succès de ces stratégies repose sur l'identification du répertoire de protéases extracellulaires actives dans les différentes formes d'arthrites et de nouvelles méthodes permettant de mesurer l'activité protéolytique nette au niveau des articulations.

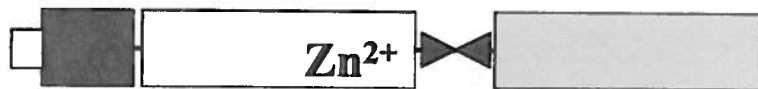
L'objectif général des travaux de recherche présentés dans ce mémoire était d'établir une banque de liquides synoviaux de patients atteints de différentes formes d'arthrite dans le but d'en étudier la cascade protéolytique. Pour ce faire, nous avons d'abord mis au point le *Fluorescent Activated Substrate Conversion* afin de mesurer les niveaux d'activités protéolytiques nettes (APN) contenus dans chacun des liquides synoviaux obtenus à partir d'une banque mise sur pied en collaboration avec les Dr G. Boire et A. de Brum-Fernandes, de l'Université de Sherbrooke. Puisque plusieurs études indiquent que les métalloprotéases de la matrice (MMP) pourraient jouer un rôle important dans la pathogénie de l'arthrite, nous avons comparé les résultats du FASC avec ceux obtenus sur zymographie, une méthode couramment utilisée pour étudier l'expression des MMP dans les processus physiologiques. Nous avons ensuite mesuré l'efficacité d'inhibiteurs sélectifs de MMP afin d'obtenir un aperçu de la contribution de ces enzymes dans la cascade protéolytique retrouvée au niveau des articulations. Finalement, nous avons cherché à établir s'il existait des corrélations entre les niveaux d'APN, la contribution des MMP et certains paramètres biologiques, notamment ceux reliés au processus inflammatoire (formes d'arthrite, âge, comptes leucocytaires, CRP, TIMP-1 etc.).

Figure 1. Représentation schématique de la structure des MMP.

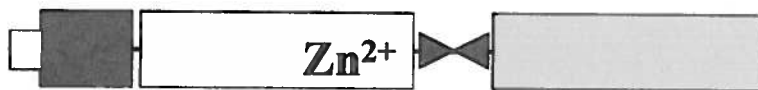


Adaptée de Posthumus *et al.*, 2004

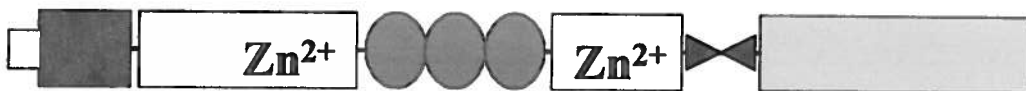
(i) Collagénases (MMP1, MMP8, MMP18)



(ii) Stromélysines (MMP3, MMP10, MMP11)



(iii) Gélatinases (MMP2, MMP9)



(iv) MMP membranaires (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25)

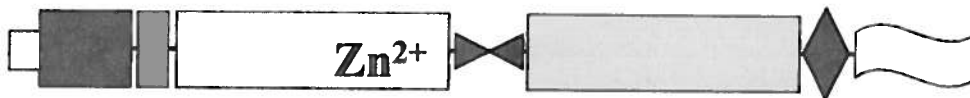


Tableau I. Substrats susceptibles d'être clivés par les métalloprotéases de la matrice

Enzyme	Protéines de la MEC	Autres
MMP1	Collagènes (I, II, III, VII, VIII, X), gélatine, aggrecan, nidogène, entactine	α_1 -antitrypsine, α_1 -chymotrypsine, α_2 -M, MBP, TNF, L-sélectine, IL-1 β , sérum amyloïde A, MMP2, MMP3, MMP9
MMP2	Collagènes (I, IV, V, VII, X, XI), gélatine, élastine, fibronectine, laminine-1 et V, aggrecan, décorine	Galectine-3, MBP, TNF, IL-1 β , amyloïde β , α_1 -antitrypsine, IGF, FGF-R1, CCL7, MMP9, MMP13
MMP3	Collagènes (III, IV, V, IX), gélatine, aggrecan, perlécan, décorine, élastine, fibronectine, laminine, entactine, caséine	α_1 -antitrypsine, α_1 -antichymotrypsine, antithrombine-III, α_2 -M, MBP, TNF, IL-1 β , sérum amyloïde A, fibrinogène, plasminogène, MMP1, MMP7, MMP8, MMP9, MMP13
MMP7	Collagènes (IV, X), gélatine, aggrecan, décorine, fibronectine, laminine, entactine, élastine, caséine	MBP, α_1 -antitrypsine, TNF, plasminogène, MMP1, MMP8, MMP9, MMP13, L-sélectine
MMP8	Collagènes (I,II, III, V, VII, VIII, X), gélatine, aggrecan, fibronectine	α_1 -antitrypsine, α_1 -antichymotrypsine, α_2 -antiplasmine, L-sélectine
MMP9	Collagènes (IV, V, VII, X), gélatine, élastine, aggrecan, fibronectine, entactine, laminine, vitronectine	α_1 -antitrypsine, galectine-3, MBP, TNF, IL-1 β , amyloïde β , plasminogène, FGF-R1, MMP2, MMP13
MMP10	Collagens (III, IV, V, X), gélatine, caséine, aggrecan, élastine, entactine	MMP1, MMP7, MMP8, MMP9, fibrinogène
MMP11	Collagène IV, caséine, laminine, fibronectine, gélatine, aggrecan	α_1 -antitrypsine, α_2 -M
MMP12	Collagène IV, gélatine, élastine, caséine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine	α_1 -antitrypsine, MBP, fibrinogène, fibrine, plasminogène
MMP13	Collagènes (I, II, III, IV, IX, X), gélatine, aggrecan, perlécan, fibronectine	α_1 -antitrypsine, PAI-2, MMP2, MMP9, α_2 -M, α_1 -antichymotrypsine
MMP14	Collagène (I, II, III), gélatine, caséine, élastine, fibronectine, laminine, vitronectine, entactine	α_1 -antitrypsine, α_2 -M, MMP2, MMP13

Adapté de St-Pierre et Van Themsche 2003

Tableau II. Facteurs modulant l'expression des métalloprotéases de la matrice

Enzyme	Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs
MMP-1	PDGF, EGF, FGF α , FGF β , FGF-7, FGF-9, HGF, TGF α , TGF β 1, VEGF, TNF α , TNF β , IFN β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, MIF	FGF β , FGF-9, IGF-1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, IFN γ , IL-1, IL-4, IL-11, IL-13
MMP-2	PDGF, EGF, FGF β , FGF-3, GM-CSF, IGF, TGF- α , TGF- β 1, VEGF, IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-13	IFN- β , IFN- γ , IL-4, IL-10
MMP-3	PDGF, EGF, FGF β , HGF, IGF, TGF- α , TGF- β 1, VEGF, IFN β , IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α	TGF- β 1, IFN γ , IL-4, IL-11, IL-13
MMP-7	EGF, FGF α , FGF β , FGF-9, FGF-10, IFN- γ , TGF- β 1, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, TNF α	IL-4, IL-10, IFN γ
MMP-8	TNF α , IL-1 β	TGF- β 1
MMP-9	PDGF, EGF, FGF β , FGF-3, GM-CSF, HGF, IGF, TGF- α , TGF- β 1, VEGF, IFN α , IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α , TNF β , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	TGF- β 1, TGF- β 2, IFN β , IFN γ , IL-1, IL-4, IL-10, TNF α
MMP-10	EGF, KGF, TGF- α , TGF- β 1, TNF α , IL-1 β	PDGF
MMP-11	PDGF, EGF, FGF β , IGF, IL-6	PDGF, FGF-2
MMP-12	PDGF, GM-CSF, VEGF, IL-1 β , IL-13, TNF α , MCP-1	M-CSF, TGF- β 1, IFN γ ,
MMP-13	PDGF, EGF, FGF β , FGF-7, IGF, TGF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-13, TNF α	IGF, IFN γ , IL-4, IL-13
MMP-14	GM-CSF, HGF, IL-1 α , IL-1 β , IL-13, TNF α	TNF α , IL-1 β , PDGF

Adapté de St-Pierre et Van Themsche 2003

CHAPITRE 2

**NET PROTEOLYTIC ACTIVITY IN SYNOVIAL FLUIDS OF PATIENTS
WITH DIFFERENT FORMS OF ARTHRITIS RESULTING FROM THE
EQUILIBRIUM BETWEEN ACTIVE PROTEASES AND ENDOGENOUS
INHIBITORS**

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai réalisé tous les travaux de recherche décrits dans ce mémoire sous la direction du Dr. Yves St-Pierre. Dans l'article intitulé « *Net proteolytic activity in synovial fluids of patients with different forms of arthritis resulting from the equilibrium between active proteases and endogenous inhibitors* », le prélèvement des liquides synoviaux et des sérums chez les patients arthritiques ainsi que la collecte des données cliniques (diagnostics, traitements) et biologiques (comptes cellulaires différentiels, mesure des niveaux de CRP) rattachées à ces derniers ont été effectués par les Dr. Boire et de Brum-Fernandes, médecins au centre hospitalier de l'Université de Sherbrooke (CHUS).

RÉSUMÉ

Dans les conditions physiologiques normales, l'activité des protéases extracellulaires responsables de la dégradation des composés de la matrice, telles que les métalloprotéases de la matrice (MMP), est contrôlée par l'équilibre dynamique résultant de la synthèse et de la dégradation de la matrice. L'activation des protéases et la présence de leurs inhibiteurs jouent un rôle déterminant dans cet équilibre. La destruction des tissus et la résorption osseuse sont des symptômes observés chez les patients souffrant d'arthrite. L'action de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles peuvent induire l'expression des MMP, et l'infiltration massive de cellules inflammatoire contenant des MMP sont responsables des quantités élevées de protéases et d'inhibiteurs détectées dans les liquides synoviaux (LS). Par conséquent, la question demeure à savoir si les niveaux élevés de protéases sont directement reliés à l'activité protéolytique responsable de la destruction du cartilage ou s'ils sont simplement le reflet du degré d'inflammation. Dans cette étude, nous avons analysé l'activité protéolytique nette présente dans les LS de 25 patients souffrant d'osteoarthrite (OA) et de 69 patients atteints de différentes formes d'arthrite inflammatoire, incluant la polyarthrite rhumatoïde (PR), les spondylarthropathies, l'arthrite juvénile chronique et les arthropathies microcristallines. Premièrement, nous avons démontré que les LS des patients atteints d'arthrite inflammatoire avaient une activité protéolytique supérieure à celle des LS de patients atteints d'OA, démontrant clairement que les articulations des patients souffrant d'arthrite contiennent des enzymes protéolytiquement actives malgré la sécrétion d'inhibiteurs endogènes. Chez les patients atteints d'arthrite inflammatoire, cette activité était corrélée de façon positive avec le nombre de leucocytes infiltrés dans le LS et le niveau sérique de CRP. En revanche, aucune de ces corrélations n'a été observée avec les patients souffrant d'OA. Il est intéressant de noter que bien que le traitement des patients avec des inhibiteurs sélectifs pour la cyclooxygénase-2 (COX-2) diminue de façon significative le nombre de leucocytes dans les LS, l'activité protéolytique demeure relativement stable. Finalement, à l'aide d'inhibiteurs sélectifs, nous avons montré que les MMP contribuaient significativement à l'activité protéolytique nette présente dans les LS des patients arthritiques. Cependant, nous avons trouvé que dans les LS de patients

atteints de PR la contribution des MMP diminuait significativement lorsque la concentration de TIMP-1 augmentait. Étonnamment, les niveaux de TIMP-1 sont en corrélation positive avec l'activité protéolytique et le nombre de leucocytes, soulignant l'implication d'autres classes de protéases ou d'inhibiteurs dans la cascade protéolytique responsable du processus dégénératif de l'arthrite.

Message d'origine-----

De : The JI [<mailto:admin@ji-emts.org>]

Envoyé : 10 septembre 2004 09:37

À : St-Pierre, Yves (IAF)(LAVAL)

Objet : The JI Submission Confirmation

Importance : Haute

Submission #: 38240639791778742473

Run Title: Proteolytic activity during arthritis.

Dear Dr. St-pierre:

You recently uploaded a manuscript "Net proteolytic activity in synovial fluids of patients with different forms of arthritis resulting from the equilibrium between active proteases and endogenous inhibitors" to The Journal of Immunology online submission site.

Your manuscript is being checked for adherence to the guidelines outlined in the Information for Authors.

Please download the submission and color forms from:

<http://www.ji-emts.org/files/submit.pdf>

<http://www.ji-emts.org/files/color.pdf>

These forms must be printed, signed and faxed to 301-634-7831 before your manuscript can be processed. Once the signed forms are received you will be sent an email containing your manuscript identification number. Please refer to the manuscript identification number in all future correspondence.

Sincerely,

The Journal of Immunology Staff

Net proteolytic activity in synovial fluids of patients with different forms of arthritis resulting from the equilibrium between active proteases and endogenous inhibitors.

Nathalie Simard ¹, Gilles Boire ², Artur J. de Brum-Fernandes ², and Yves St-Pierre ^{1,3}.

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, University of Québec,
Laval, Québec, Canada, H7V 1B7,

² Division of Rheumatology, Department of Medicine, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

Running title: Proteolytic activity during arthritis.

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; MMP, matrix metalloproteinase; SF, synovial fluids, RA, rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis; CRP, C-Reactive protein; FASC, fluorescent-activated substrate conversion.

Key words: Arthritis, matrix metalloproteinases, osteoarthritis, inflammation.

Footnotes: Supported by a grant from the Canadian Arthritis Network. Y.S.P and A. d. F. are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). N.S. is supported by a studentship from La Fondation Armand-Frappier and the Canadian Arthritis Network.

³ To whom requests should be addressed, at INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. Phone : 450-686-5354 ; Fax : 450-686-5501 ; E-mail : yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

ABSTRACT

In arthritis, which is associated with severe tissue destruction and bone resorption, the action of pro-inflammatory cytokines, which activate MMP gene expression, and the massive infiltration of inflammatory cells containing MMPs are both responsible for the elevated levels of proteases and their inhibitors found in synovial fluids of arthritic patients. The question thus remains whether high levels of proteases relate directly to the proteolytic activity responsible for cartilage destruction, or whether they simply reflect the extent of joint inflammation. In this report, we studied the net proteolytic activity in synovial fluids (SF) in 25 patients with OA and 69 patients with various forms of inflammatory arthritis, such as RA, spondylarthropathies, chronic juvenile arthritis and microcrystalline arthropathies. First, we found that SF of patients with inflammatory arthritis had significantly higher levels of proteolytic activity than of SF of patients with OA, providing the first evidence that joints of patients contain enzymes that are proteolytically active despite the secretion of endogenous inhibitors. The activity correlated positively with the number of infiltrated leukocytes in SF and the serum level of CRP. No such correlations were found in patients with OA. Interestingly, while treatment with the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors significantly reduced the number of leukocytes in SF, the proteolytic activity remained relatively stable. Finally, using selective inhibitors, we found that MMP contributed significantly to the proteolytic activity found in SF of arthritic patients. However, we found in SF of RA patients that the contribution of MMPs significantly dropped when the concentration of TIMP-1 augmented. Surprisingly, the TIMP-1 level correlated positively with the proteolytic activity and with the number of leukocytes, emphasizing the contribution of other classes of proteases to the proteolytic cascade that underlies the degenerative process of arthritis.

INTRODUCTION

Arthritis is associated with severe tissue destruction and bone resorption. Although different classes of proteases are believed to take part in the degradation of articular cartilage, current data point to a major contribution from the matrix metalloproteinase (MMPs) family. MMPs are Zn^{+2} -dependent extracellular enzymes that play a key role in normal and pathological remodelling of connective tissues (1). Members of the MMP family, known to cleave all matrix components, are now increasingly believed to also participate in the initiation and dampening of inflammation by their action on various cytokines and chemokines (2). Extensive analysis of MMP levels in synovial fluids of patients with arthritis has shown that abnormally high amounts of major MMP subclasses are found in patients with OA or RA (3-8). This abnormal secretion has been attributed not only to resident cells of articular joint tissues, such as synovial fibroblasts, chondrocytes, endothelial cells and macrophages, but also to infiltrating leukocytes, such as monocytes and neutrophils (7, 10). In RA, activation of resident cells is linked to a massive infiltration of inflammatory cells into the joint capsule, whereas in degenerative diseases, such as OA, inflammation is not thought to be part of disease triggering etiology. Rather it is thought to evolve secondarily, involving pro-inflammatory cytokines which activate MMP gene expression (11). This in turn contributes to disease progression and cartilage degradation (12-14).

Although elevated levels of MMPs have been found in synovial fluids of arthritic patients, with expression levels often correlating with disease activity and radiographic damage of joints, the net contribution of MMPs in the overall proteolytic cascade underlying the arthritic condition remains unknown. The reason is that conventional assays used to monitor their presence, such as ELISA and zymography, do not provide a direct measurement of their activity in SF. In fact, the activity of proteases in a given microenvironment, such as the synovial fluid, depends on the activation status of the enzyme (conversion of proMMPs into active MMPs) and on the balance between active proteases and endogenous protease inhibitors (15). MMP activities are precisely controlled by endogenous inhibitors, such as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Thus, although MMP levels in SF of arthritic patients are abnormally high, this

increase of MMP is concomitant to an elevated level of TIMPs (8). This is so because both MMP and TIMP genes are activated through common signalling pathways, most notably exposure of cells to inflammatory cytokines (16). Hence, it is the equilibrium between active proteases and inhibitors that determines the level of contribution of a specific MMP to cartilage degradation, and not simply its level of expression. For instance, while MMP3 levels in SF of patients with RA are extremely high compared with those of other MMPs (7, 17), depletion of MMP3 does not prevent cleavage of aggrecan, nor does it prevent or reduce cartilage destruction associated with arthritis (18, 19). In fact, recent studies have shown that MMPs may be indirectly implicated in inflammatory arthritis, since MMP-derived epitopes have been identified as arthritogenic self-peptides for the activation of B and T cells during the arthritic process (20). Thus, the question remains whether elevated levels of proteases, notably MMPs, relate directly to the proteolytic activity responsible for cartilage destruction, or whether they simply reflect the extent of joint inflammation (21). In the present work, using a bank of SF from arthritic patients with well-defined criteria and a flow cytometric-based assay that directly measures the proteolytic activity in SF, we provide new insights into the net contribution of MMPs as mediator of proteolytic activity in arthritic joints.

PATIENTS AND METHODS

Reagents. Gelatin and fluorescein isothiocyanate (FITC) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Polystyrene microspheres were purchased from Polysciences, (Warrington, PA). The blocking antibody specific for human MMP9 was obtained from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) and the recombinant MMPs and their inhibitors from Calbiochem (San Diego, CA). The human TIMP-1 ELISA kit was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Sampling of synovial fluids (SF) and sera. Patients evaluated by rheumatologists from the Rheumatology Division of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS) were asked to participate in this study. Criteria for admission to the study were the clinical indication for a therapeutic and/or diagnostic arthrocentesis of one or several articulations and willingness to participate in the study. No exclusions were made on any basis other than an inability to give informed consent. Diagnoses were based on established clinical criteria. We studied a total of 95 SF samples obtained during therapeutic arthrocentesis from the joint(s) of 15 patients with established RA defined according to the 1987 American College of Rheumatology (ACR) criteria (22), 14 patients with undifferentiated or recent-onset polyarthritis (UPA), 25 patients with OA, 13 patients with crystal-induced arthritis, and 18 patients with other non-infectious inflammatory arthritis, such as ankylosing spondylitis and reactive arthritis. A patient with features of more than one rheumatic disease was classified as having the disease which clinically predominated. Infectious arthritis was excluded by appropriate microbiologic studies. After informed consent had been obtained, serum samples and SF were collected in excess of the 2 mL needed for clinical evaluation (i.e. bacterial culture and synovial analysis). Venous blood and SF aliquots were sent to the appropriate clinical laboratories; a differential blood cell count was performed on the blood samples, and a differential nucleated cell count and crystal identification were performed on the SF samples. All of the sera were stored at -80°C until used. The SF samples were clarified by centrifugation at 1500g for 15 min. and stored in aliquots at -80°C for subsequent analysis. This study was conducted with the approval of the ethic review board of the CHUS.

Detection of MMPs by Zymography. Gelatinase activity of SF samples was determined as previously described (23). Briefly, 10 μL samples of unreduced SF (diluted 1:10) were subjected to electrophoresis on a 7.5% SDS-PAGE containing 1mg/mL denatured collagen. After electrophoresis, gels were washed to remove SDS and incubated for 18h at 37°C in a re-naturing buffer (50 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 0,02% NaN_3 , and 1% Triton X-100). Subsequently, gels were stained with Coomassie brilliant blue G-250 and de-stained in 30% methanol/10% acetic acid (v/v). Gelatinase activity was measured in arbitrary units by quantitative analysis of negatively stained band using computerized image analysis (Image Quant 5.0).

Measure of the Net Proteolytic Activity in SF from Arthritic Patients. The net proteolytic activity of SF was measured by fluorescent activated substrate conversion (FASC) (24) with the following modifications:

Fluorescent Labelling of Substrates. Denatured collagen was dissolved at a final concentration of 2 mg/mL in carbonate buffer (pH 9.2). FITC (dissolved in DMSO at 5 mg/mL) was added to the substrate (20 $\mu\text{L}/\text{mg}$). Labelling was carried out for 2 h at room temperature. Free FITC molecules were removed by chromatography on PD-10 columns (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) as the eluent buffer.

Microsphere Coating. Polystyrene microspheres, 4.5 μm in diameter, were incubated overnight at room temperature with the FITC-conjugated substrate (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS, pH 7.4) to allow non-covalent adsorption. The microspheres were then washed three times in PBS pH 7.4 containing 0.05% sodium azide. Microspheres were kept at 4°C in PBS in the dark and resuspended by gentle vortexing before use.

FASC assay and flow cytometric analysis. The enzymatic reactions were performed at 37°C for 18h in a final volume of 50 μL digestion buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM Ca^{2+} , 0,05 % NaN_3) pH 7.4. The samples contained 10 μL SF at various dilutions and 5×10^4 (5 μL) FITC-labelled substrate-coated microspheres. The volume was completed to 50 μL with digestion buffer. The reaction was stopped by

adding 300 μ L reading buffer pH 9.5. To titrate the proteolytic activity of the SF, serial dilutions ranging from 1:50 to 1:6250 (v/v) were prepared. Trypsin was used as a positive control for enzymatic activity. Samples were analysed on a Coulter XL-MCL flow cytometer (Hialeah, FL) using standard optics for detection of FITC fluorescence. For each sample 2000 positive events were analysed.

Statistical Analyses. The correlations of the FASC assays and other markers were analyzed using Spearman rank order correlations. The differences between different groups of patients were calculated using the two-sided Student *t* test.

RESULTS

Evidence of net proteolytic activity (NPA) in SF of patients with inflammatory arthritis (IA). Zymography is commonly used to assess the expression of (pro)MMPs, most notably MMP2 and MMP9, in SF or serum of patients with arthritis. However, since most MMP inhibitors are dissociated from active proteases following electrophoresis, this approach could not be used to determine whether the balance between the endogenous protease inhibitors and the activated form of the enzymes results in net proteolytic activity (NPA). To measure the net proteolytic activity in SF, that reflects the actual end status of the proteolytic cascade, we used the fluorescent activated substrate conversion (FASC) assay (24). In this assay, fluorescent-labelled substrates are immobilized on polystyrene microspheres and incubated with serial dilutions of SF. Quantitative measures of the NPA in SF can then be obtained from the decrease of fluorescence in flow cytometry (Fig. 1A). This approach was used with immobilized denatured collagen as a substrate, to measure the contribution of each of the four classes of proteases, including serine, cysteine, and aspartic peptidases.

We first compared NPA found in SF of 25 patients with OA with that in 69 patients with various forms of inflammatory arthritis, such as RA, spondylarthropathies, chronic juvenile arthritis and microcrystalline arthropathies. Quantitative measure of NPA was obtained using serial dilutions ranging from 1:50 to 1:6250 and FASC analysis was carried out using fluorescein-labelled denatured collagen (gelatin) immobilized on polystyrene microspheres. No significant activity was found in SF obtained from healthy controls (<10 units/ml; Y. St-Pierre, *unpublished observations*). Similarly, no enzymatic activity was found in the serum obtained from healthy subjects or in those of patients with any forms of arthropathies. This was likely due to the high concentration of endogenous proteases found in serum. We found, however, that SF of patients with IA had elevated levels of proteolytic activity (2 589 units/ml \pm 994). This level of activity was significantly ($p < 0.001$) higher than that of SF of patients with OA (1 097 units/ml \pm 810) (Fig. 1B). This provides the first evidence that joints of patients contain enzymes that are proteolytically active despite the secretion of endogenous inhibitors.

Proteolytic activity in SF of IA patients correlates with the inflammatory state of the disease. Extracellular proteases are secreted in SF by infiltrating inflammatory cells and/or by stromal cells stimulated by inflammatory cytokines (25, 26). To further assess the contribution of inflammation in the proteolytic cascade in arthritic joints, we compared the NPA with the number of infiltrating leukocytes in SF collected from both IA and OA patients. Our results showed that NPA correlated positively ($r_s = 0.710$, $p < 0.001$) with the number of infiltrated leukocytes in SF of IA patients (Fig. 2A). No such correlation was observed in SF of patients with OA, which contain a very low number of infiltrating leukocytes (Fig. 2C). In IA, the correlation was more pronounced between NPA and the number of infiltrated neutrophils ($r_s = 0.696$, $p < 0.001$) (Fig. 2B). Weaker but significant correlations were also observed with the number of monocytes ($r_s = 0.422$, $p < 0.001$) and lymphocytes ($r_s = 0.405$, $p = 0.001$) (Data not shown). In addition, we found that the level of CRP, a well known inflammatory marker (27), correlates positively ($r_s = 0.405$, $p = 0.009$) with the NPA in patients with IA (Fig. 3A). The association between CRP and the NPA was more striking ($r_s = 0.899$, $p < 0.001$) in patients with undifferentiated polyarthritis (Fig.3B). In contrast, no correlation was observed between the CRP level and the SF NPA in OA patients (Fig. 3C).

Effects of treatments on SF NPA and leukocyte count in arthritic patients. Having established that the NPA is related to the SF leukocytes counts in IA, it was of interest to see whether anti-inflammatory drugs used for the treatment of arthritic conditions had an effect on the NPA. When the entire study cohort was evaluated, we found no differences in terms of leukocyte numbers and the NPA between in SF of patients without treatment or under different forms of therapeutic regimens (data not shown). In the RA group of patients however, we found that while patients receiving selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors (Rofecoxib or celecoxib) or methotrexate showed a decreased number of leukocytes in their SF, the NPA remained relatively stable (Fig.4).

The expression level of MMP9 is not indicative of the net proteolytic activity found in SF. Several reports have shown that SF of patients with diverse inflammatory diseases contains high levels of MMP9 (3-8). To determine whether the level of MMP9 correlated with NPA, SF from patients with various forms of arthropathy were analysed for the presence of gelatinases by gelatine zymography and the results compared with the amount of proteolytic activity. As expected, we found that SF contained high levels of MMP9 (Fig. 5A). However, semi-quantitative zymography analysis showed that the levels of MMP9 gelatinolytic activity did not correlate with the levels of NPA (Fig. 5B).

Implication of MMP in proteolytic reactivity found in SF of RA patients. To further explore the contribution of MMPs in the proteolytic activity found in SF of arthritic patients, two hydroxamic acid-based broad-spectrum MMP inhibitors (inhibitor II and III) were tested for their ability to block NPA in SF. These inhibitors have been shown to be selective for specific MMPs; whereas MMP inhibitor II inhibits MMP1, MMP3, MMP7 and MMP9, the MMP inhibitor III blocks MMP1, MMP2, MMP3, MMP7 and MMP13 (28). Using recombinant purified human MMP2 and MMP-9, we confirmed the ability of these agents to efficiently block the enzymatic activity of MMPs (Fig. 6A). When we tested these inhibitors for their ability to block the proteolytic activity in SF, we found that while the percentage of inhibition of NPA in SF in presence of inhibitor III rarely exceeded 10-15 percent, the level of inhibition obtained using the inhibitor II ranged from 25 and 60 percent (Fig. 6B). This indicates that MMPs significantly contribute to the proteolytic activity found in SF of arthritic patients. Interestingly, we found that the percentage of inhibition by the MMP inhibitor was inversely correlated ($r_s = -0.521$, $p = 0.046$) with the total NPA. A similar tendency was observed with the number of leukocytes recruited in SF ($r_s = -0.499$, $p = 0.58$) (*Data not shown*).

Role of TIMP-1 in net proteolytic activity. To determine whether this decrease contribution of MMPs to the proteolytic cascade was due to a lower MMP secretion despite a higher leukocyte infiltration, or to a possible higher concentrations of natural

protease inhibitor, we next measure the levels of TIMP-1, an endogenous inhibitor of MMPs. Indeed, we found in SF of RA patients that the contribution of MMPs to the proteolytic activity significantly dropped when the concentration of TIMP-1 declined ($r = -0.817$; $p = 0.004$). In fact, the TIMP-1 level correlated weakly with the proteolytic activity ($r = 0.592$; $p = 0.07$) and the number of leukocytes ($r = 0.910$; $p = < 0.001$), including PMN ($r = 0.878$; $p = 0.001$). No such correlation between TIMP-1 and the proteolytic activity was found in patients with OA ($r = 0.880$; $p = 0.55$).

DISCUSSION

In the present work, we showed that SF of patients with various forms of inflammatory arthritis contains significant proteolytic activity. This indicates that the balance between elevated levels of extracellular proteases and that of endogenous inhibitors is shifted toward an active proteolytic cascade. Moreover, our results using MMP inhibitors show that MMPs significantly contribute to this proteolytic cascade. We also found that inflammatory conditions favour an increased proteolytic activity. Reducing the number of inflammatory cells in the SF, however, is insufficient to reduce significantly this proteolytic activity. Taken together, our data support the hypothesis that proteolytic degradation by specific MMPs is likely to contribute to the progression of the disease, but emphasize the importance of identifying the repertoire of proteolytically active proteases in each of them.

To the best of our knowledge, this is the first study assessing net proteolytic activity in different forms of arthritis. Levels of active MMPs in the joint are frequently quantified using immunological methods that do not discriminate between MMPs that are active, in latent forms, and MMPs complexed with their endogenous inhibitors. The overall contribution of individual proteases is thus difficult to assess since most assays cannot distinguish between the inactive and active forms of the enzymes. Our findings showing that NPA is higher in RA than in OA are consistent with those reported in a recent study showing that MMP levels are higher in RA than in OA (8). The same author also reported that the MMP:TIMP-1 ratio was higher in RA than in OA, implying a possible disequilibrium within the proteolytic system in favour of the MMPs. Our work now provides direct evidence that such an imbalance does in fact exist, and that it is much more pronounced in RA than OA. Our results also demonstrate that although the levels of MMP inhibitors are up to five-fold higher in RA than in OA (7), there is a significant imbalance toward the net proteolytic activity in RA patients.

Our results further strengthen the hypothesis that inflammation plays an important role in controlling the protease/inhibitor ratio. Indeed we found that the net proteolytic

activity correlates positively with the number of infiltrating leukocytes in SF, and with blood CRP levels. Interestingly, we also found that the contribution of MMPs inversely correlated with the number of leukocytes, suggesting that leukocytes are most likely promoting, either directly or indirectly, the secretion of other MMPs or proteases that are insensitive to the inhibitors we used. At the same time, the MMPs are likely to be neutralized by increasing concentrations of endogenous inhibitors, as we found a positive correlation between TIMP-1 levels and leukocyte/neutrophil counts in SF of RA patients. In fact, our results showing that elevated levels of TIMP-1 were found among the SF with the highest levels of proteolytic activity emphasize the need to measure the net proteolytic activity resulting from the (dis) equilibrium between active proteases and their inhibitors. The strong correlation between TIMP-1 and leukocytes may in fact explain why we found that although patients taking COX-2 inhibitors or MTX treatment showed a decreased number of leukocytes in their SF, their NPA remained relatively unchanged. Indeed, we and others have shown that leukocytes can express a relatively large repertoire of TIMP-1 (27-29). These observations are also consistent with those showing that other cell types, such as fibroblast-like synoviocytes, express a relatively large repertoire of extracellular proteases (30).

Our results with MMP inhibitors have several significant implications. First, they show that blockage of the proteolytic cascade can be efficiently obtained using specific inhibitors. Interestingly, although both the drugs used are potent inhibitors of MMP1 and MMP3, only inhibitor II significantly blocked NPA. Thus, while MMP1 and MMP3 could be used as markers to monitor disease progression, we conclude that both MMPs are not part of the repertoire of active proteases in SF. Whether this is because both MMPs are found in their proform, or because they are preferentially inhibited by increased levels of endogenous protease inhibitors remains to be tested. Our data are thus consistent with those obtained recently in mouse models of arthritis showing that MMP-3 may not be as critical in the initiation and progression of arthritic lesions as previously thought (18, 19). Although the major difference between the two inhibitors focuses on their ability to inhibit MMP9, our results with gelatin zymography showing that the proteolytic activity does not correlate with the amount of MMP9 in SF, suggest

that the better performance of inhibitor II might rather be related to its ability to inhibit other, yet unidentified MMPs. This would be consistent with the results showing that although MMP9 is abnormally high in RA, it is present mostly in the latent form, and that some of its inhibitors, such as TIMP-1 and TIMP-2, are also elevated in SF (29). The limited ability of antibodies specific for MMP9 to block the proteolytic activity in SF (*data not shown*) and the mild inhibition of experimental antibody-induced arthritis in the presence of MMP9-deficiency (33) support this idea.

From a clinical point of view, the use of the FASC assay represents an ideal approach for testing the potential of new protease inhibitors aimed at inhibiting disease progression. A more complete understanding of the joint destructive process and the identity of the relevant responsible proteases are the key to the future development of protease inhibitors in rheumatic diseases (34). Recent analysis of the rat degradome has revealed that the genome likely contains at least 626 proteases and homologs, including 160 cystein-, 193 metallo-, and 221 serine-proteases (35). A similar distribution is expected in humans since genomic analysis of protease inhibitors indicates that the genome of rodents and humans contains between 156 and 199 protease inhibitors. Further studies of the spatiotemporal expression patterns and regulatory elements that mediate their abnormal expression in pathological conditions is thus crucial to better control the net proteolytic activity in specific tissues and to develop new therapeutic strategies for the increasing number of disorders responsible for uncontrolled proteolysis, such as arthritis. However, while protease inhibitors might represent a valuable alternative for currently used therapies in RA, it is likely that large spectra inhibitors or combinations of inhibitors will be more efficient to achieve significant inhibition of proteolysis in the joint space.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank Marcel Desrosiers for excellent technical support, Ms Marie Désy for statistical analysis, and Dr Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Nagase, H., J. F. Woessner. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274:21491.
2. McCawley, L. J., Matrisian, L. M. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:534.
3. Ahrens, D., A. E. Koch, R. M. Pope, M. Stein-Picarella, M. J. Niedbala. 1996. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39:1576.
4. Shlopov, B. V., Lie, W. R., Mainardi, C. L., Cole, A. A., Chubinskaya, S., Hasty, K. A. 1997. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 40:2065.
5. Yamanaka, H., K. Makino, M. Takizawa, H. Nakamura, N. Fujimoto, H. Moriya, R. Nemori, H. Sato, M. Seiki, Y. Okada. 2000. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid synovium. *Lab. Invest.* 80:677
6. Kontinen, Y. T., Ainola, M., Valleala, H., Ma, J., Ida, H., Mandelin, J., Kinne, R. W., Santavirta, S., Sorsa, T., Lopez-Otin, C., Takagi, M. 1999. 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.
7. Yoshihara, Y., H. Nakamura, K. Obata, H. Yamada, T. Hayakawa, K. Fujikawa, Y. Okada. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59:455.
8. Tchvetverikov, I., Ronday, H. K., Van El, B., Kiers, G. H., Verzijl, N., TeKoppele, J. M., Huizinga, T. W., DeGroot, J., Hanemaaijer R. 2004. MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 63:881.

9. Jovanovic, D.V., J. Martel-Pelletier, J. A. Di Battista, F. Mineau, F. C. Jolicœur, M. Bendoric, J. P. Pelletier. 2000. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:1134.
10. Perlman, H., Bradley, K., Liu, H., Cole, S., Shamiyeh, E., Smith, R. C., Walsh, K., Fiore, S., Koch, A. E., Firestein, G. S., Haines, G. K. 3rd, Pope, R. M. 2003. IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J. Immunol.* 170:838.
11. Fernandes, J. C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P. 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology.* 39:237.
12. Tetlow, L. C., Adlam, D. J., Woolley, D. E. 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44:585.
13. Hedbom, E., Häuselmann, H. J. 2002. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:45.
14. Masuhara, K., Nakai, T., Yamaguchi, K., Yamasaki, S., Sasaguri, Y. 2002. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 46:2625.
15. Vu, T. H., Werb, Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14:2123.
16. St-Pierre, Y. and C. Van Themsche. 2004. Matrix metalloproteinases in the inflammation of the lung. In *Proteases in Tissue Remodelling of Lung and Hearts*, U. Lendeckel ed. Kluwer Academic Publishing, New York. pp 35-56.
17. Ishiguro, N., Ito, T., Oguchi, T., Kojima, T., Iwata, H., Ionescu, M., Poole, A. R. 2001. Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to

cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44:2503.

18. Mudgett, J. S., Hutchinson, N. I., Chartrain, N. A., Forsyth, A. J., McDonnell, J., Singer, I. I., Bayne, E. K., Flanagan, J., Kawka, D., Shen, C. F., Stevens, K., Chen, H., Trumbauer, M., Visco, D. M. 1998. Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum.* 41:110.
19. Clements, K. M., Price, J. S., Chambers, M. G., Visco, D. M., Poole, A. R., Mason, R. M. 2003. Gene deletion of either interleukin-1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. *Arthritis Rheum.* 48:3452.
20. van Bilsen, J. H., Wagenaar-Hilbers, J. P., Grosfeld-Stulemeijer, M. C., van der Cammen, M. J., van Dijk, M. E., van Eden, W., Wauben, M. H. 2004. Matrix metalloproteinases as targets for the immune system during experimental arthritis. *J. Immunol.* 172:5063.
21. Ribbens, C., Andre, B., Kaye, O., Kaiser, M. J., Bonnet, V., Jaspar, J. M., de Groote, D., Franchimont, N., Malaise, M. G. 2000. Synovial fluid matrix metalloproteinase-3 levels are increased in inflammatory arthritides whether erosive or not. *Rheumatology* 39:1357.
22. Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315.
23. Esteve, P. O., Chicoine, E., Robledo, O., Aoudjit, F., Descoteaux, A., Potworowski, E. F., St-Pierre, Y. 2002. Protein kinase C-zeta regulates

- transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 277:35150.
24. St-Pierre, Y., Desrosiers, M., Tremblay, P., Esteve, P. O., Opdenakker, G. 1996. Flow cytometric analysis of gelatinase B (MMP-9) activity using immobilized fluorescent substrate on microspheres. *Cytometry.* 25:374.
 25. Fuchs, S., Skwara, A., Bloch, M., Dankbar, B. 2004. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 12:409.
 26. Koshy, P. J., Henderson, N., Logan, C., Life, P. F., Cawston, T. E., Rowan, A. D. 2002. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis.* 61:704.
 27. Saren, P., Welgus, H. G., Kovanen, P. T. 1996. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol.* 157:4159.
 28. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., St-Pierre, Y. 1998. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol.* 160:2967.
 29. Zhang, Y., McCluskey, K., Fujii, K., Wahl, L. M. 1998. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 161:3071.
 30. Kelley, W. N., Harris, E. D., Ruddy, S., Sledge, C.B. Textbook of Rheumatology, 5th Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997, pp 699-705.

31. Pikul, S., McDow Dunham, K. L., Almstead, N. G., De, B., Natchus, M. G., Anastasio, M. V., McPhail, S. J., Snider, C. E., Taiwo, Y. O., Rydel, T., Dunaway, C. M., Gu, F., Mieling, G. E. 1998. Discovery of potent, achiral matrix metalloproteinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 41:3568.
32. Giannelli, G., Erriquez, R., Iannone, F., Marinosci, F., Lapadula, G., Antonaci, S. 2004. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22:335.
33. Itoh, T., Matsuda, H., Tanioka, M., Kuwabara, K., Itohara, S., Suzuki, R. 2002. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* 169:2643.
34. Close, D. R. 2001. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 60:62.
35. Puente, X. S., Lopez-Otin, C. 2004. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res.* 14:609.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Proteolytic activity in SF of patients with osteoarthritis (OA) and inflammatory arthropathies (IA). In **A**, we report a typical two-parameter histogram (*on the left*) with the forward-angle-light scatter (FS) and side scatter (SS) on the y and x axes, respectively, used to position the window on microspheres (shown in one parameter histogram in the *middle*) and to minimize the interference with debris. To determine the proteolytic activity in SF, FITC-labeled denatured collagen (gelatin) are coated on polystyrene microspheres (filled in red) and incubated with serial dilution of SF. The mean fluorescent intensity (MFI) shown on the top of each peak is then measured on 1000-5000 events on a single parameter histogram by using a log scale (*right histogram*). In **B**, we have compared the level of proteolytic activity found in synovial fluids obtained from patients with inflammatory arthritis (IA) and OA. The results are representative of at least two independent experiments. Square and error bars represent mean \pm s.d. of each group of patients.

FIGURE 2: Correlation between the level of proteolytic activity found in SF and the number of infiltrating leukocytes. The net proteolytic activity (NPA) was measured in patients with inflammatory forms of arthritis (**A** and **B**), where they correlated with the number of infiltrating leukocytes or neutrophils, respectively or in patients with OA (**C**). Please note the difference in the y axis between **A** and **C** reflecting the difference in leukocyte infiltration in RA *versus* OA. The results are representative of at least two independent experiments.

FIGURE 3: Correlation between the level of proteolytic activity found in SF and CRP. The net proteolytic activity (NPA) was measured in patients with inflammatory forms of arthritis (**A**), undifferentiated polyarthritis (**B**), or in patients with OA (**C**) and correlated with CRP levels. Again, please note the difference in the y axis between **A** and **C** reflecting the difference in the inflammation state between RA and OA. The results are representative of at least two independent experiments.

FIGURE 4: Net proteolytic activity in RA patients undergoing therapy. Histograms A and C compare the NPA in RA patients undergoing a treatment containing COX-2 inhibitors (rofecoxib; 25 mg bid or celecoxib 200 mg bid) or with methotrexate (MTX; 10-25 mg once a week). Leukocyte counts (B and D) were also measured to determine whether decrease of leukocyte infiltration was sufficient to down-regulate the proteolytic activity in SF. The results are representative of two independent experiments. Square and error bars represent mean \pm s.d. of each group of patients.

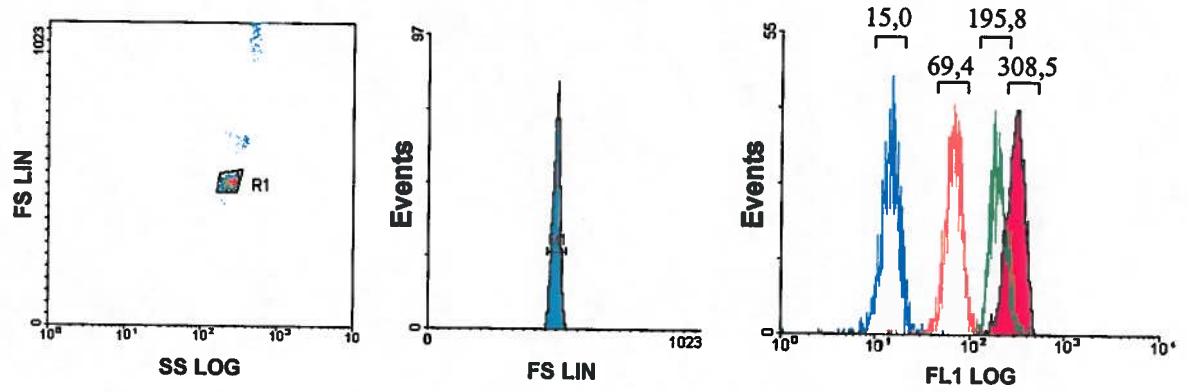
FIGURE 5: Zymographic analysis of MMP2 and MMP9 levels in SF of patients with various arthropathies. Secretion of MMP2 and MMP9 was assessed by gelatin zymography using standard procedures (A). Semi-quantitative measures of the MMP9 level was carried out by densitometric analysis (scored as arbitrary units) and compared to NPA found in the same SF (B). In most cases, MMP9 was detected only in the latent form. HT1080 cell supernatant which contains both MMP2 and MMP9 gelatinases was used as positive control. The results were obtained using duplicates and are representative of two independent experiments.

FIGURE 6: Effect of hydroxamate-based inhibitors on proteolytic activity found in SF. The ability of two hydroxamate inhibitors (Inhibitor II and III) was first confirmed using recombinant human MMP2 and MMP9 (A) and then tested on SF from RA patients (B). The results were obtained using duplicates and are representative of two independent experiments.

FIGURE 7: Levels of TIMP-1 in SF of RA patients. Concentrations (pg/ml) of TIMP-1 were measured by commercial ELISA in SF collected from 10 patients with RA. The proteolytic activity was measured gelatin-coated microspheres. The contribution of MMPs to the proteolytic activity was carried out using the hydroxamate inhibitor II.

Figure 1

A



B

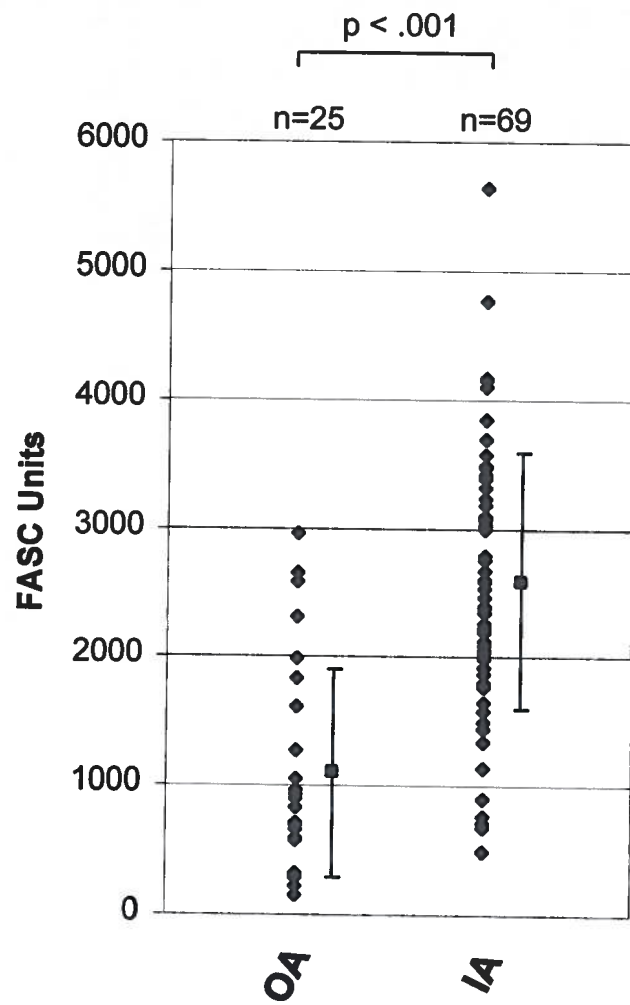
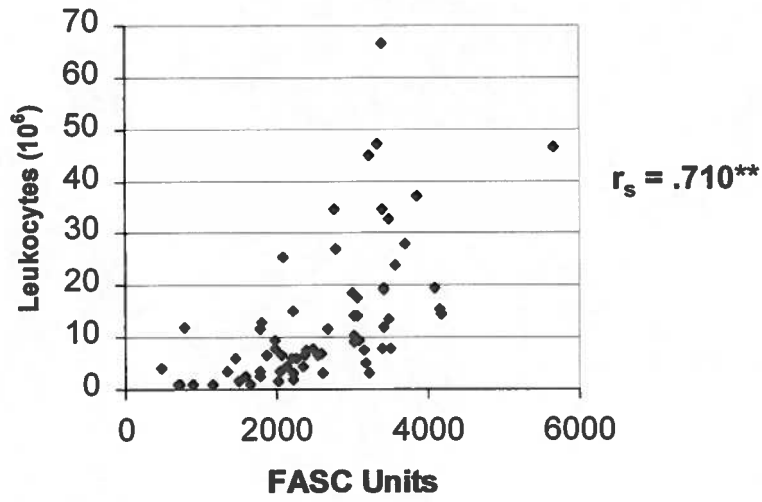
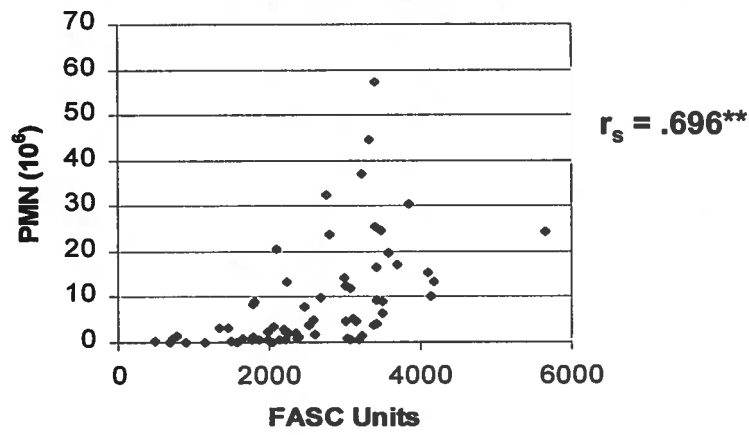


Figure 2

A.



B.



C.

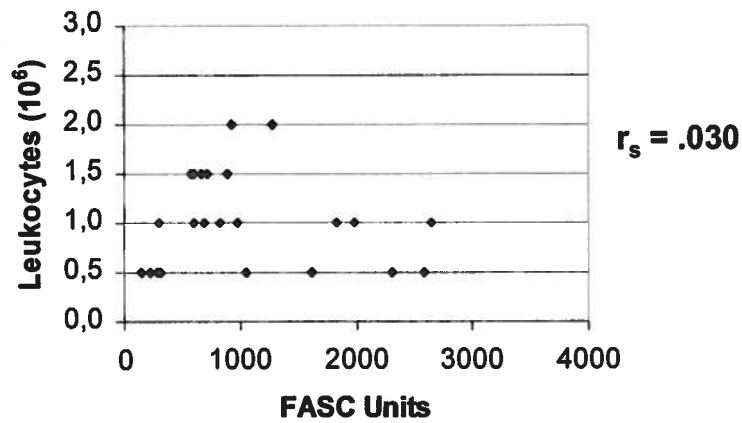
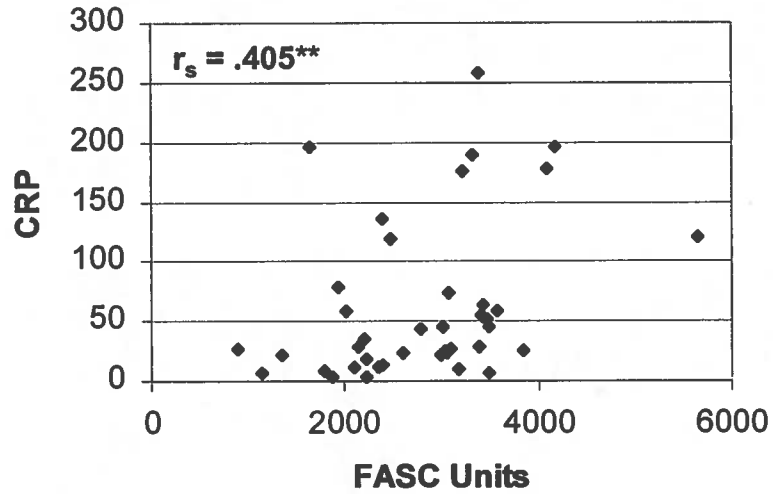
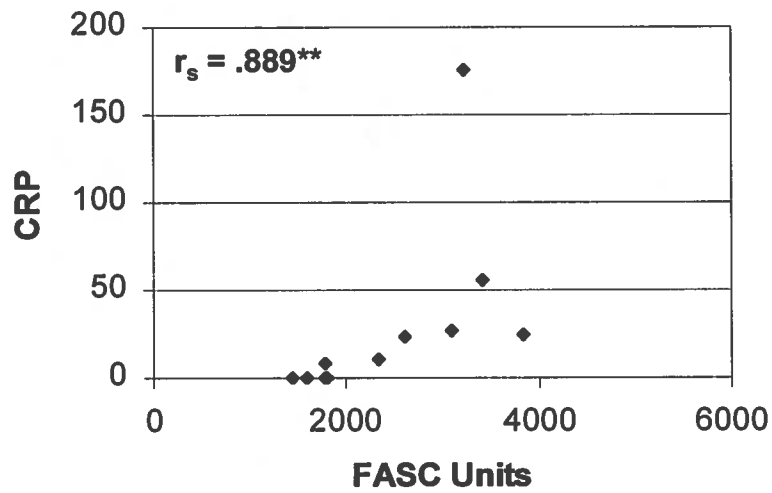


Figure 3

A.



B.



C.

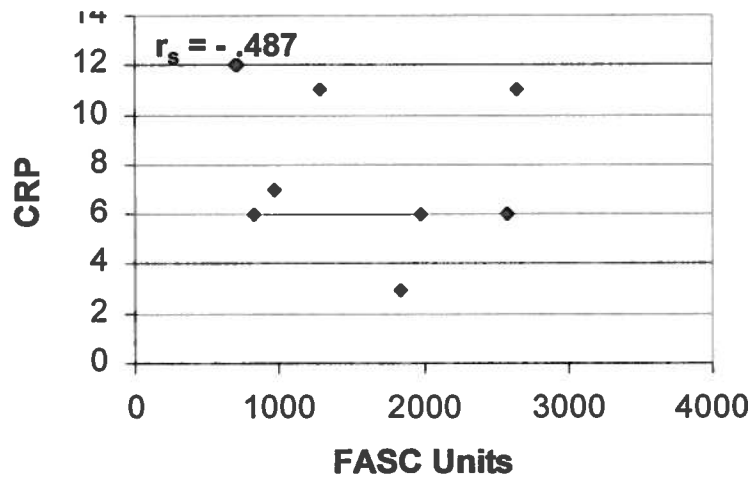


Figure 4

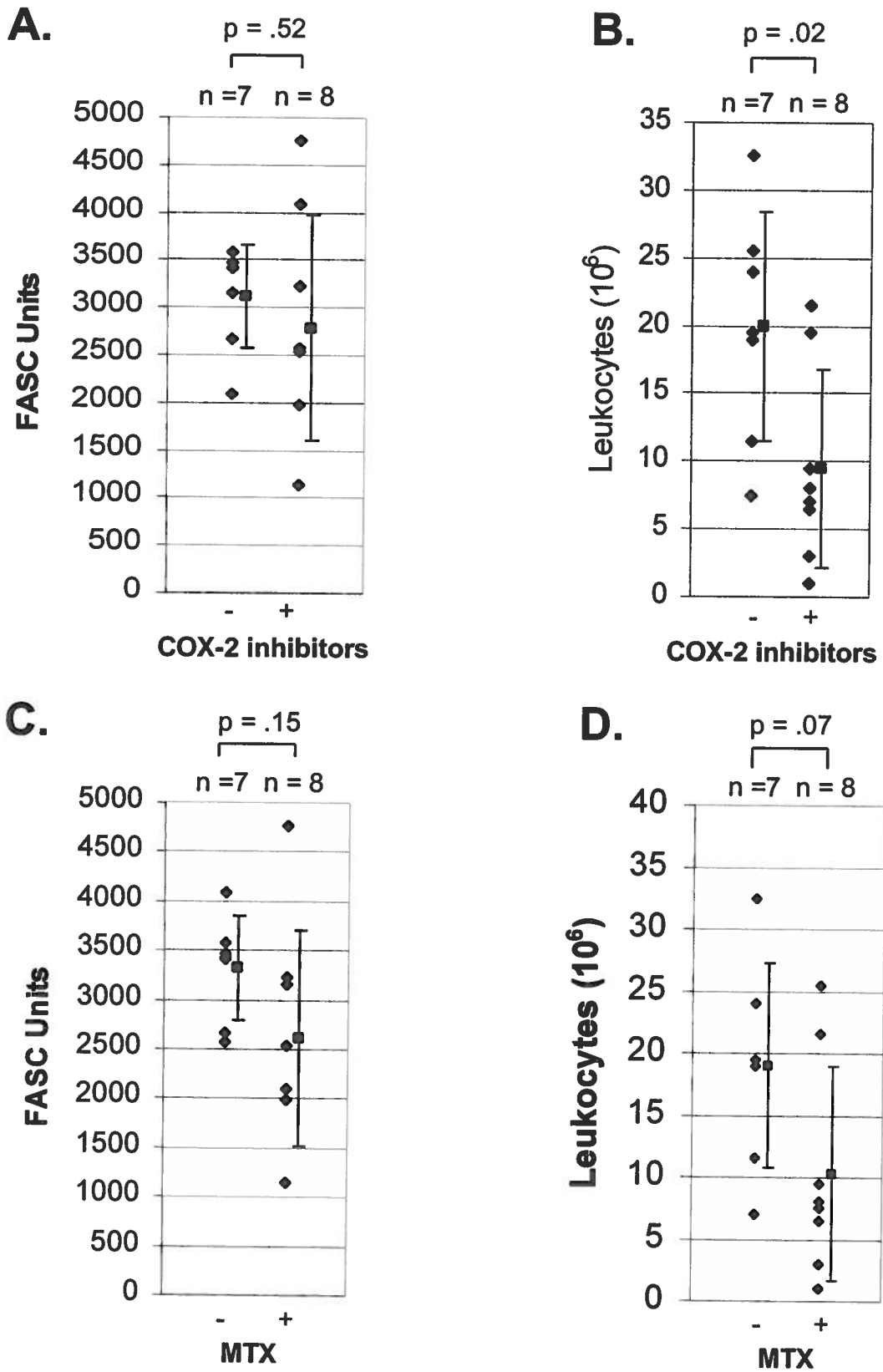


Figure 5

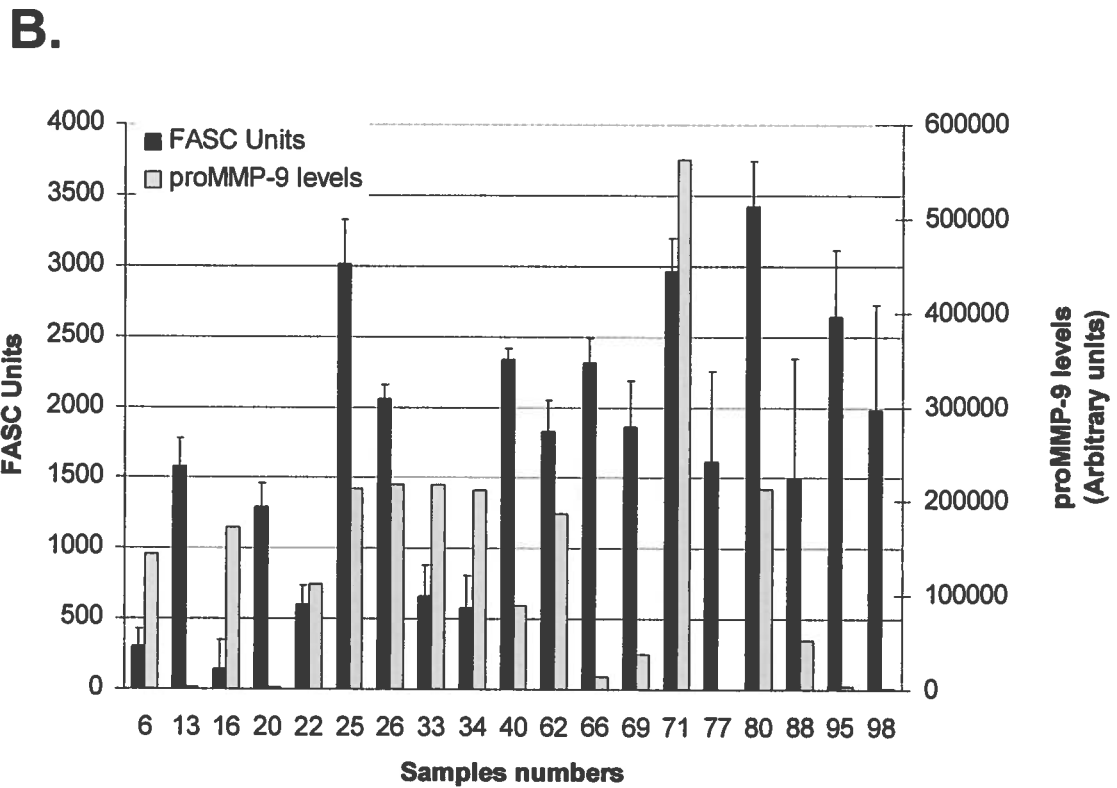
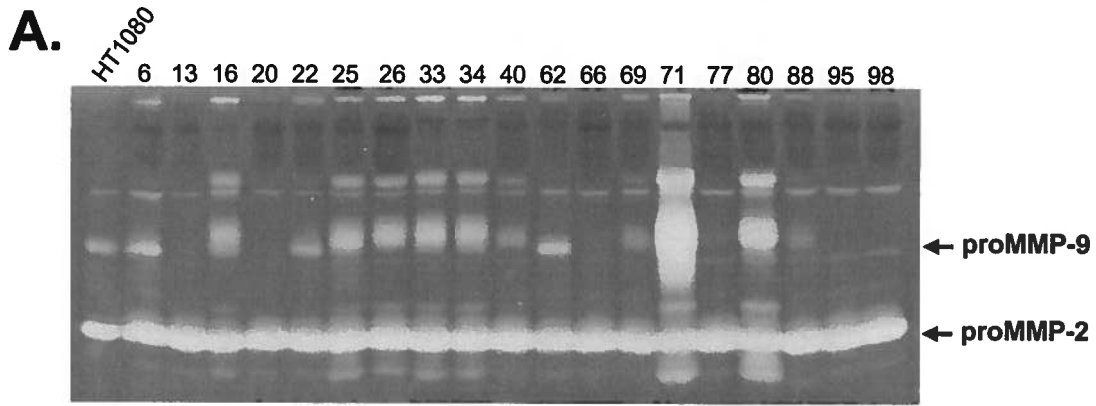
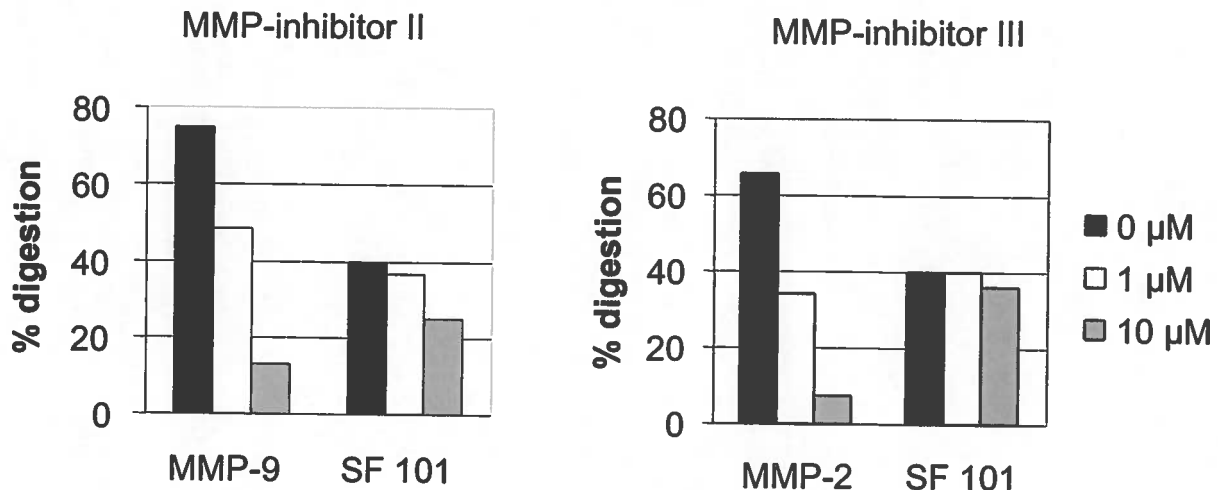


Figure 6

A.



B.

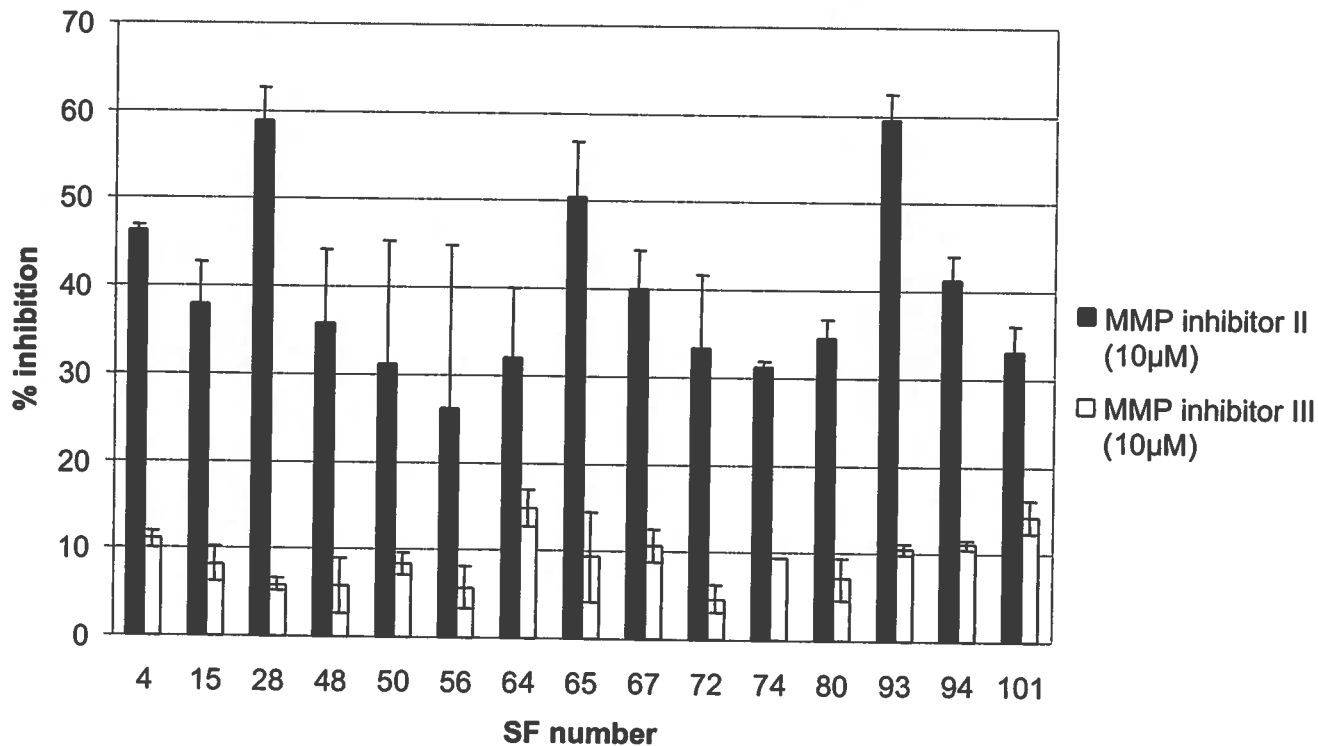
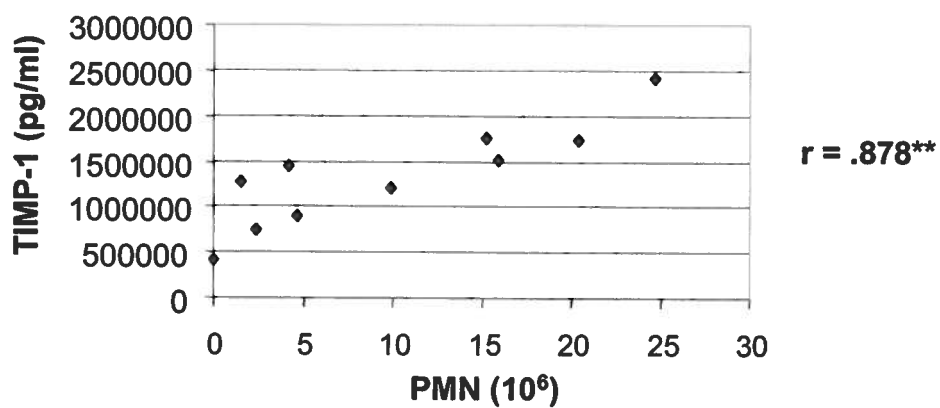
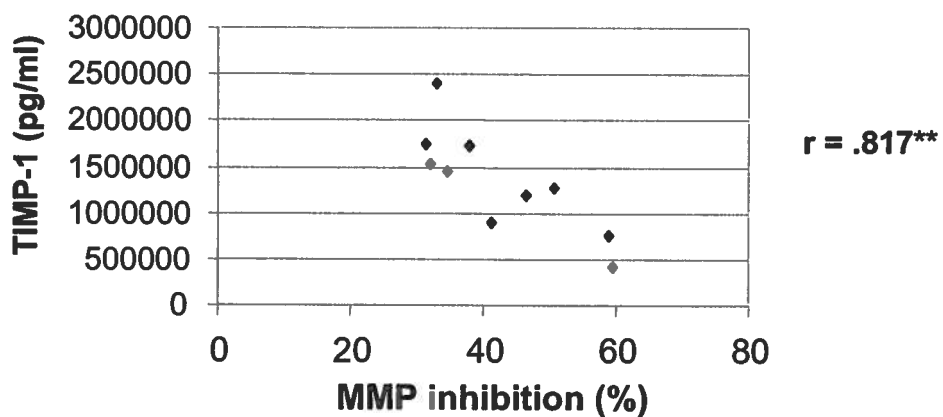
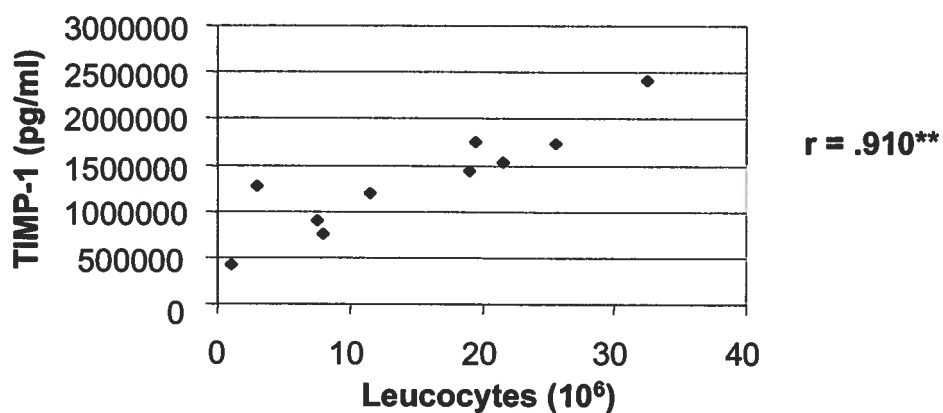
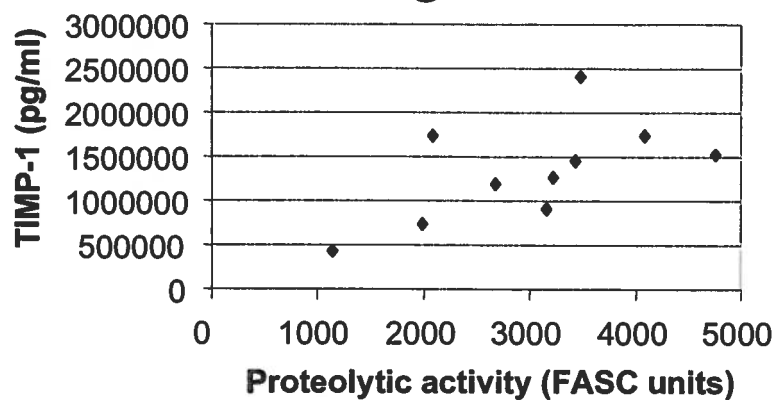


Figure 7



DISCUSSION GÉNÉRALE

La plupart des méthodes conventionnelles employées pour évaluer la contribution des protéases dans le processus de dégénérescence du cartilage chez les patients arthritiques sont basées sur des principes qui ne permettent pas de faire la distinction entre les formes d'enzymes actives et les formes inactives. Dans ce travail, nous avons utilisé une approche relativement simple et efficace pour mesurer l'activité protéolytique nette (APN) présente dans les liquides synoviaux de patients arthritiques. Cette méthode nous a de plus permis de déterminer la contribution des MMP dans le processus de dégradation du cartilage. Nous avons démontré que l'APN présente dans les liquides synoviaux provenant de patients souffrant d'une forme inflammatoire d'arthrite était significativement plus élevée que celle mesurée dans les liquides synoviaux provenant des patients atteints d'ostéoarthrite. Cette différence indique l'existence d'un déséquilibre marqué entre l'activité des protéases et l'action d'inhibiteurs de protéases dans les liquides synoviaux chez les gens atteints d'une forme inflammatoire d'arthrite. Ces résultats sont consistants avec le fait que plusieurs types de protéases, dont les collagénases, ont une activité 2 à 3 fois plus élevée dans les liquides synoviaux de patients atteints de PR en comparaison aux patients atteints d'OA (Mantle *et al.* 1999). Il est possible que cette écart d'activité résulte d'une différence dans le niveau d'expression des protéases. En effet, on note une synthèse plus élevée de MMP chez les patients atteints d'une forme inflammatoire d'arthrite, notamment la polyarthrite rhumatoïde (Tchetverikov *et al.* 2004) et la goutte (Hsieh *et al.* 2003), comparativement aux personnes souffrant d'OA. Les MMP présentant une plus forte augmentation sont les proMMP1, 3, 8 et 9, la proMMP3 étant celle retrouvée en plus grande quantité (Tchetverikov *et al.* 2004).

Des indices de la participation des MMP dans la dégradation des protéines de la matrice formant le cartilage proviennent de la présence accrue, dans le liquide synovial, du néoépitope C2C généré suite au clivage du collagène de type II par les collagénases (Fraser *et al.* 2003). Il a été montré que la quantité de C2C corrèle avec le niveau de MMP1 (Fraser *et al.* 2003). De plus, MMP1, tout comme MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP13 et MT1-MMP (MMP14) peuvent cliver l'aggrécan, le principal protéoglycan du cartilage (Mercuri *et al.* 2000). Cependant, aucun fragment d'aggrécan

généralisé suite au clivage par ces MMP n'est retrouvé dans les liquides synoviaux des patients arthritiques. Les fragments d'aggrécane détectés semblent plutôt provenir du clivage par les aggrécacanases (Malfait *et al.* 2002) (Sandy *et al.* 1992).

Nos résultats obtenus avec les inhibiteurs de MMP supportent l'hypothèse que certains membres appartenant à cette famille de protéases contribuent à l'évolution des symptômes associés à l'arthrite. MMP1 et MMP3 sont deux protéases traditionnellement considérées comme des cibles clés dans la pathogénie de l'arthrite. Il a été suggéré que MMP3 est nécessaire à l'activation de la collagénase MMP1 (Unemori *et al.* 1991). Ainsi, en dépit de ne pas pouvoir dégrader le collagène de type II, la MMP3 pourrait agir comme régulateur positif dans ce processus (Unemori *et al.* 1991). Néanmoins, nos résultats obtenus avec l'inhibiteur III des MMP suggèrent que ces deux enzymes ne font pas partie du répertoire de protéases actives. Ces observations corroborent le fait que la dégradation du collagène de type II dans les cultures de cartilage est inhibée par un inhibiteur synthétique sélectif pour les collagénases MMP8 et MMP13, qui épargne la MMP1 (Dahlberg *et al.* 2000). Nos résultats sont aussi consistants avec ceux obtenus suite à des études menées sur des souris déficientes en MMP3. En effet, la délétion du gène de la MMP3 ne semble pas influencer la destruction du cartilage dans un modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA; *collagen-induced arthritis*) (Mudgett *et al.* 1998). De même, en exploitant un modèle animal différent, Clement *et al.* ont montré que la MMP3 était importante pour le maintien de l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme du cartilage et que la suppression de cette enzyme favorisait l'accélération de la dégénérescence du cartilage (Clements *et al.* 2003). Donc, bien que la mesure des niveaux de MMP3 puisse être une option envisageable comme marqueur pour l'évaluation de la progression de la maladie, les résultats dans les modèles expérimentaux de même que nos résultats laissent entrevoir que cette MMP ne joue sans doute pas un rôle prépondérant dans la cascade protéolytique. Néanmoins, des études utilisant des anticorps bloquant spécifiques devront être réalisées pour adresser définitivement cette question. En fait, il est impératif que la détermination du répertoire de MMP actives dans les différentes formes d'arthrite soit déterminée avec l'aide de tels outils. Alors que seul un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre MMP9 humain existait il y a quelques années, on assiste depuis un an ou deux au développement de plusieurs de ces anticorps,

notamment contre MMP1, MMP2, MMP8, etc. Nous pouvons donc espérer, dans un avenir plus ou moins rapproché, obtenir une idée assez précise du répertoire de protéases actives résultant de la cascade protéolytique localisée dans les articulations de patients arthritiques et être en mesure d'en évaluer la modulation.

La contribution nette des MMP déterminée avec l'inhibiteur II est en corrélation inverse avec l'APN et le nombre de leucocytes recrutés dans le liquide synovial. Ce résultat semble à première vue contradictoire à ceux rapportés par d'autres études. Cependant, il faut noter que celles-ci ont plutôt analysé l'association entre les niveaux d'expression des MMP et l'érosion du cartilage. Dans ces études, l'activité des MMP est en corrélation positive avec la dégradation du collagène de type II dans les cultures de cartilage bovin (Kozaci *et al.* 1997). De plus, ces études démontrent que l'expression de MMP1, MMP2 et MMP9 est liée au développement d'érosion au niveau du cartilage chez les patients atteints de PR (Goldbach-Mansky *et al.* 2000) (Cunnane *et al.* 2001). Cependant, nos résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'on observe un accroissement de la production de TIMP-1 avec l'augmentation du nombre de leucocytes, comme l'indiquent nos résultats par ELISA. Ainsi, nos données suggèrent d'une part que les leucocytes induisent, directement ou indirectement, la production de TIMP-1. Par exemple, les monocytes et les macrophages peuvent sécréter TIMP-1 suite à la stimulation par l'IL-17 (Jovanovic *et al.* 2001), une cytokine produite en grande quantité chez les patients atteints de PR (Chabaud *et al.* 1999) et à un niveau moindre chez certains patients atteints d'OA (Chabaud *et al.* 1999) (Fernandes *et al.* 2002). De même, l'oncostatine M produite par les lymphocytes T et les macrophages peut induire la production de TIMP-1 chez les fibroblastes via l'activation des protéines kinases Erk1/2 et p38 (Tong *et al.* 2004). D'autres cytokines telles que l'IL-6, le LIF (*leukemia inhibitory factor*) et l'IL-1 α peuvent également induire l'expression de TIMP-1 chez les fibroblastes (Richards *et al.* 1993). Le fait que, d'une part, la concentration de TIMP-1 corrèle bien avec les quantités de leucocytes et de neutrophiles (figure 7), et d'autre part, que la réduction du nombre de leucocytes dans les liquides synoviaux ne soit pas nécessairement accompagnée d'une baisse de l'APN (figure 4), suggère que les neutrophiles ont peut-être une certaine activité protectrice dans l'arthrite, via la sécrétion

de TIMP-1 (Price *et al.* 2000). La corrélation positive entre le niveau d'expression de TIMP-1 et l'APN est consistante avec des études qui montrent que l'effet de la surexpression de TIMP-1 varie selon le modèle expérimental d'arthrite utilisé. Chez les souris, dont l'arthrite résulte de la surexpression de TNF- α , la surproduction de TIMP-1 résultant de l'injection intraveineuse d'un vecteur adénoviral AdTIMP-1 réduit l'érosion des os ainsi que les signes d'inflammation (Schett *et al.* 2001). En revanche, aucun effet bénéfique lié à la surproduction de TIMP-1 n'a été observé chez les souris avec la CIA. En effet, dans ce modèle expérimental, la surexpression de TIMP-1 aggrave le degré d'inflammation et la dégradation du cartilage (Apparailly *et al.* 2001).

D'autre part, l'association entre le nombre de leucocytes recrutés et l'APN indique que ces cellules sont également responsables de la production ou de l'induction de l'expression d'autres protéases, dont certaines MMP, qui seraient insensibles aux inhibiteurs que nous avons utilisés. En effet, bien que la différence majeure entre les deux inhibiteurs utilisés se situe principalement dans leur capacité à inhiber MMP9, il est probable que la meilleure performance de l'inhibiteur II soit liée à sa capacité à inhiber d'autres MMP contre lesquelles ces inhibiteurs n'ont pas été testés. Cette hypothèse est basée en partie sur nos résultats obtenus par zymographie sur gélatine. Ceux-ci indiquent qu'il n'existe aucune corrélation entre les niveaux d'expression de MMP9 et l'APN. De plus, l'incubation des liquides synoviaux avec un anticorps bloquant le site catalytique de la MMP9 active est insuffisant pour diminuer leur activité protéolytique (Annexe 1). Le fait qu'une déficience en MMP9 entraîne seulement une inhibition partielle du développement de l'arthrite chez les souris supporte cette hypothèse (Itoh *et al.* 2002).

Parmi les protéases potentiellement intéressantes à étudier, celles sécrétées par les neutrophiles représentent un intérêt certain puisque l'APN semble associée plus étroitement avec ce type cellulaire, qui, en plus, est abondamment retrouvé dans les liquides synoviaux des patients arthritiques. Des études antérieures ont démontré que le niveau d'expression de la collagénase des neutrophiles (MMP8) est plus élevé dans les liquides synoviaux des patients atteints d'OA et de PR que chez les personnes en santé (Tchetverikov *et al.* 2004). Les neutrophiles ne constitueraient probablement pas la seule

source de MMP8 car l'IL-1 est capable d'induire l'expression de cette MMP chez les fibroblastes isolés à partir de la membrane synoviale de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (Hanemaaijer *et al.* 1997). L'élastase est une autre protéase retrouvée en grande quantité dans les granules des neutrophiles et susceptible de jouer un rôle dans la pathogénie de l'arthrite. Cette enzyme pourrait être impliquée dans le processus de dégradation du cartilage par son habileté à cliver les protéoglycans (Keiser *et al.* 1976). Les deux principales protéines liant l'élastase sont l'alpha-1 antitrypsine (α_1 -AT) et l'alpha-2 macroglobuline (α_2 M), deux inhibiteurs non spécifiques de protéases. Cependant, il a été démontré que l'élastase complexée avec l' α_2 M conserve une activité suffisante pour dégrader les protéoglycans de cartilage humain *in vitro* (Moore *et al.* 1999). Les raisons de ce phénomène demeurent inconnues, mais pourraient s'expliquer par une immobilisation inadéquate des grosses protéases ou, comme il semble être le cas pour l'élastase, par une liberté de mouvement due à la formation d'un lien non covalent entre une certaine quantité d'élastase et l' α_2 M (Enghild *et al.* 1989) (Salvesen et Barrett 1980).

Nous avons établi que l'APN des liquides synoviaux de patients atteints d'une forme inflammatoire d'arthrite était associée au stade inflammatoire de la maladie, et ce peu importe le diagnostic. En effet, en plus d'observer une relation entre l'APN et le nombre de leucocytes recrutés dans les liquides synoviaux, nous avons trouvé que l'APN était en corrélation avec les niveaux de CRP sériques. Cependant, bien que le nombre de leucocytes présents dans les liquides synoviaux soit associé avec l'APN, ces cellules ne semblent pas essentielles pour maintenir une activité protéolytique élevée. En effet, bien qu'on observe une diminution du nombre de leucocytes dans les liquides synoviaux de patients souffrant de PR traités avec des inhibiteurs de la COX-2 ou avec du méthotrexate (MTX), l'APN demeure relativement inchangée. Ces observations sont consistantes avec le fait que les protéases sécrétées par d'autres types de cellules peuvent jouer un rôle important dans l'érosion du cartilage (Tsokos 2000). La cathepsine K produite par les fibroblastes constitue un exemple. Cette protéase pourrait être impliquée dans le clivage de l'aggrécan. L'expression de la cathepsine K est particulièrement élevée

dans les fibroblastes situés près des sites de dégradation du cartilage et des os et semble associée avec la sévérité de la maladie (Hou *et al.* 2001). Toutefois, nous ne pouvons exclure la possibilité que la prise d'autres médicaments par les patients ait influencé nos résultats.

D'un point de vue clinique, le FASC représente une approche idéale pour identifier de nouvelles cibles thérapeutique. Outre l'usage d'inhibiteurs, qui parfois s'avère limitée en raison de structure interférant avec l'émission de fluorescence, l'utilisation de microsphères enrobées d'autres substrats que la gélatine peut aider à sélectionner un ensemble plus restreint d'enzymes. Des tests de FASC effectués avec des microsphères enrobées de caséine, un substrat clivé entre autre par les stromélysines (MMP3 et MMP10), ont révélé qu'une faible proportion de liquides synoviaux possèdent une activité caséinolytique. Nous avons également déterminé que les liquides présentant une telle activité correspondent généralement à ceux possédant une forte APN (Annexe 2). L'emploi de microsphères de diverses tailles, chacune enrobées d'un substrat différent, pourraient accélérer l'identification du répertoire de protéases actives de cette manière. Le test de FASC peut aussi s'avérer utile pour évaluer l'efficacité d'un traitement et suivre la progression de la maladie. En effectuant des tests sur des liquides synoviaux prélevés le même jour dans deux articulations différentes d'un même patient, nous avons observé que dans la plupart des cas l'activité protéolytique est symétrique (Annexe 3). Il serait maintenant intéressant de mesurer si cette activité varie dans le temps selon les traitements reçus. Outre son utilité pour le suivie des patients arthritiques, le FASC représente aussi une approche potentielle pour l'évaluation de l'activité des protéases dans d'autres maladies, comme certaines maladies neurodégénératives. Par exemple, en mesurant l'activité présente dans les liquides céphalorachidiens, il serait possible de déterminer la contribution des MMP dans le développement de la sclérose en plaque (SP). Des niveaux anormalement élevés de MMPs ont été retrouvés dans les liquides céphalorachidiens de patients atteints de SP (Leppert *et al.* 1998). En fait, dans plusieurs types de maladies neuro-inflammatoires, la production de MMPs dans le système nerveux central représente un mécanisme important contribuant à la fois à la destruction de la barrière hémato-encéphalique et à la gaine de myéline (St-Pierre et Potworowski 2000). Plusieurs études ont ainsi démontré que les effets bénéfiques de

l'interféron bêta semblent en fait associés à sa capacité à diminuer les niveaux de MMP dans les liquides céphalorachidiens (Leppert *et al.* 1996).

D'autres études sur le répertoire de protéases présent dans les liquides synoviaux permettront de déterminer les meilleures cibles thérapeutiques pour empêcher la progression de l'arthrite. À cet égard, l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre devrait permettre de mieux cibler la classe à laquelle appartient la majorité des protéases actives. L'identification spécifique de ces dernières s'effectuant à l'aide d'anticorps monoclonaux. Il serait également intéressant de déterminer le temps de demi-vie des protéases dans les liquides synoviaux, celui-ci étant déterminé, entre autre, par la stabilité des enzymes face aux conditions dénaturantes locales, incluant leur sensibilité à la dégradation protéolytique. La mise sur pied d'une banque de liquides synoviaux de patients avant et après le début d'un traitement devrait permettre d'évaluer si un traitement avec des inhibiteurs spécifiques pour les protéases actives identifiées peut fonctionner en clinique. Cependant, étant donné la diversité des protéases présentes dans les liquides synoviaux, il est probable que la combinaison de plusieurs inhibiteurs ou l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre sera plus efficace pour ralentir ou empêcher l'érosion du cartilage.

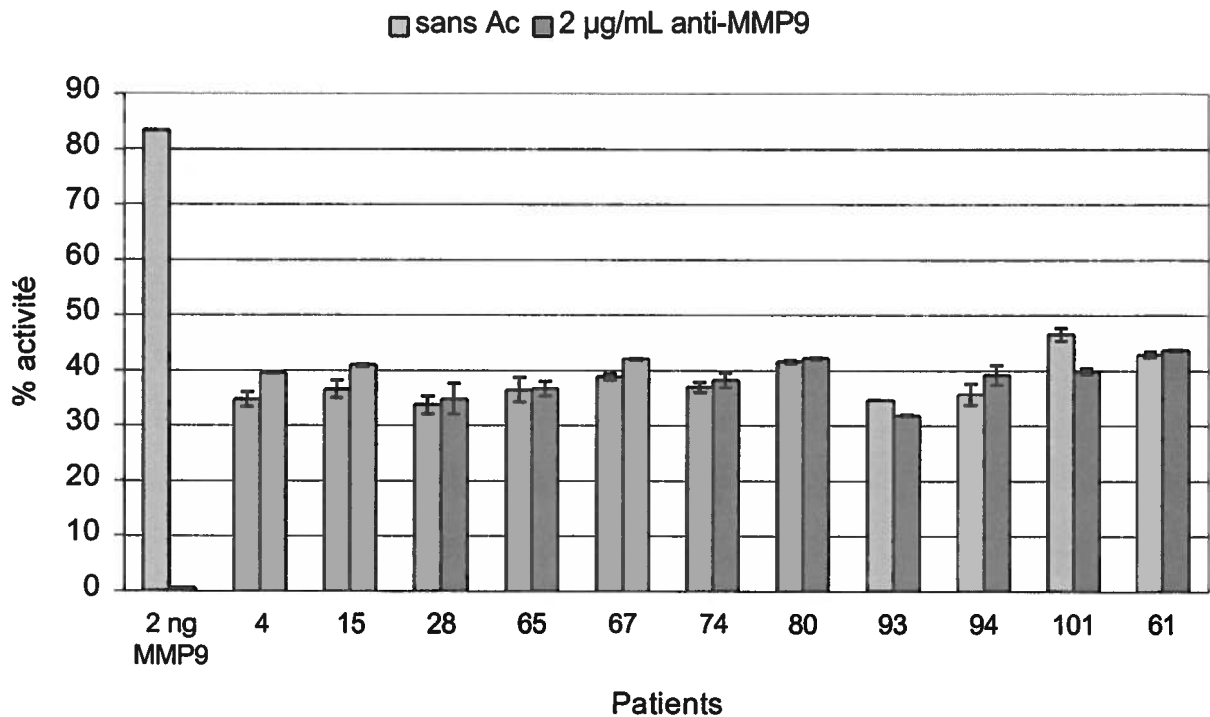
CONCLUSION

Nous avons démontré la présence d'une activité protéolytique significative dans les liquides synoviaux de patients atteints de diverses arthropathies. Ces résultats indiquent qu'il y a un déséquilibre entre les niveaux de protéases actives et d'inhibiteurs résultant en une activité protéolytique excessive. Cette activité est plus prononcée chez les patients atteints d'arthrite inflammatoire comparativement aux patients souffrant d'OA. D'ailleurs, la corrélation entre les niveaux d'activités retrouvés chez ces patients et les différents marqueurs inflammatoires confirment que les médiateurs inflammatoires jouent un rôle prépondérant dans cette cascade protéolytique. En effet, les patients dont les liquides synoviaux renferment une activité protéolytique plus élevée ont généralement un nombre élevé de leucocytes recrutés au niveau des articulations affectés par la maladie et des taux de CRP supérieurs. Néanmoins, la présence des leucocytes dans l'articulation ne semble pas nécessaire pour maintenir un niveau d'activité élevé.

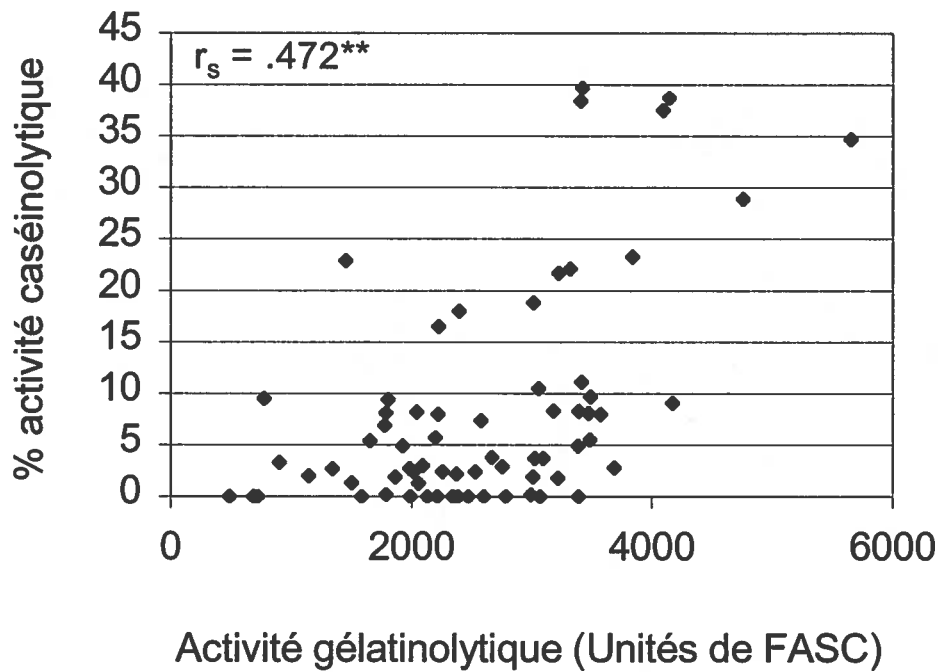
Nous avons également démontré que les MMP participent à la progression de la maladie chez les patients atteints de PR. Toutefois, plus l'activité retrouvée dans les liquides synoviaux est élevée, plus la contribution relative des MMP semble diminuer. Nos résultats démontrent clairement que cette diminution est associée avec l'augmentation de la concentration de TIMP-1 et d'une infiltration accrue de leucocytes. Cela suggère que les leucocytes recrutés au niveaux de l'articulation peuvent influencer le répertoire de protéases actives en induisant, directement ou indirectement, la production d'inhibiteurs de MMP ou d'autres MMP, de même que d'autres protéases insensibles aux inhibiteurs que nous avons utilisés.

En résumé, l'ensemble de ces résultats nous permet d'obtenir, pour la première fois, une image précise de l'activité protéolytique nette résultant de la cascade enzymatique impliquant les différentes classes de protéases en relation avec leurs inhibiteurs naturels lors des différentes formes d'arthrites. L'approche utilisée nous permettra à partir de maintenant de mieux définir le répertoire de protéases actives afin de développer des inhibiteurs spécifiques mieux adaptés aux différentes formes d'arthrites.

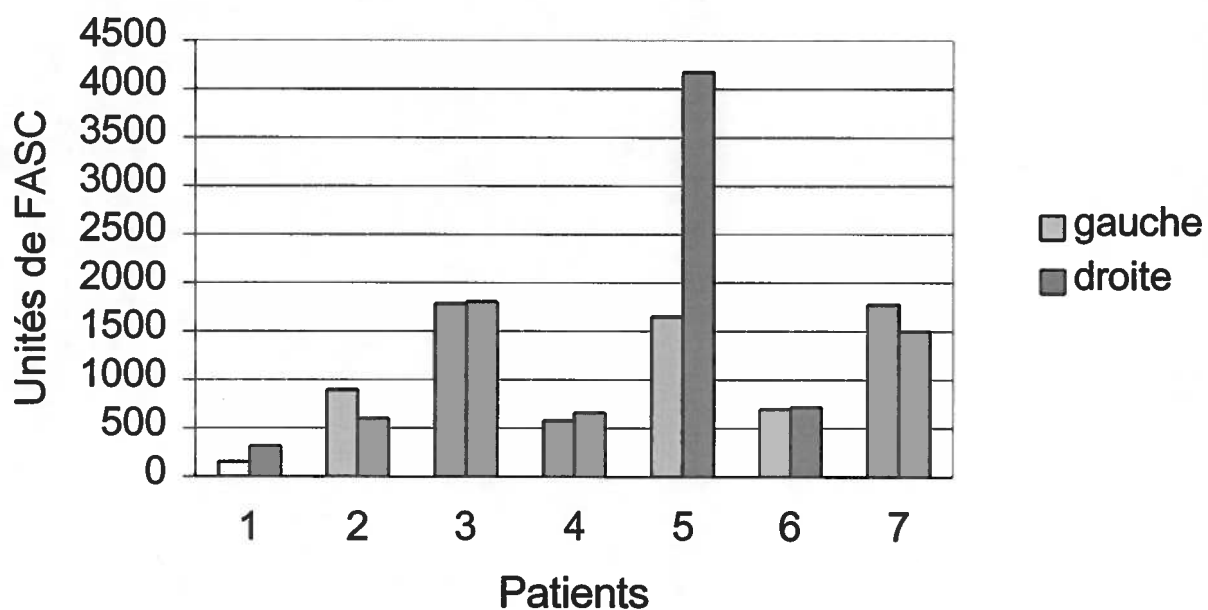
ANNEXES



ANNEXE 1 : Effet d'un anticorps monoclonal anti-MMP9 sur l'activité protéolytique présente dans les liquides synoviaux. L'habileté d'un anticorps à inhiber l'activité de MMP9 a été testée dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. La MMP9 humaine recombinante a été utilisée comme témoin positif. Les résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée en duplicata.



ANNEXE 2 : Corrélation entre les niveaux d'activité protéolytique nette en utilisant la caséine comme substrat. L'activité protéolytique nette (APN; normalement mesurée en utilisant la gélatine) a été comparée à l'activité protéolytique nette obtenue en utilisant la caséine (que l'on désigne couramment sous le terme d'activité caséinolytique nette) dans les liquides synoviaux de patients atteints d'une forme inflammatoire d'arthrite. La corrélation entre les deux activités a été mesurée. Les résultats sont représentatifs d'une expérience menée en duplicata.



ANNEXE 3 : Activité protéolytique nette présente dans les liquides synoviaux provenant de différentes articulations d'un même patient. Les niveaux d'activités protéolytiques nettes (APN) contenus dans les liquides synoviaux prélevés de deux articulations d'un même patient le même jour ont été mesurés et comparés. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes, chacune effectuées en duplicata.

RÉFÉRENCES

Akin, E., G. L. McHugh, R. A. Flavell, E. Fikrig and A. C. Steere (1999). The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild and brief arthritis. *Infect Immun* 67(1): 173-81.

Albani, S. and D. A. Carson (1996). A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 17(10): 466.

Aoudjit, F., E. F. Potworowski and Y. St-Pierre (1998). Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol* 160(6): 2967-73.

Apparailly, F., D. Noel, V. Millet, A. H. Baker, G. Lisignoli, C. Jacquet, M. J. Kaiser, J. Sany and C. Jorgensen (2001). Paradoxical effects of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 gene transfer in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 44(6): 1444-54.

Belcher, C., F. Fawthrop, R. Bunning and M. Doherty (1996). Plasminogen activators and their inhibitors in synovial fluids from normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis knees. *Ann Rheum Dis* 55(4): 230-6.

Bigg, H. F. and A. D. Rowan (2001). The inhibition of metalloproteinases as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Curr Opin Pharmacol* 1(3): 314-20.

Blain, E. J., S. J. Gilbert, R. J. Wardale, S. J. Capper, D. J. Mason and V. C. Duance (2001). Up-regulation of matrix metalloproteinase expression and activation following cyclical compressive loading of articular cartilage in vitro. *Arch Biochem Biophys* 396(1): 49-55.

Brauchle, M., D. Gluck, F. Di Padova, J. Han and H. Gram (2000). Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the upregulation of matrix metalloproteinase-1. *Exp Cell Res* 258(1): 135-44.

Brennan, F. M., K. A. Browne, P. A. Green, J. M. Jaspar, R. N. Maini and M. Feldmann (1997). Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy. *Br J Rheumatol* 36(6): 643-50.

Brommer, E. J., G. Dooijewaard, B. A. Dijkmans and F. C. Breedveld (1992). Plasminogen activators in synovial fluid and plasma from patients with arthritis. *Ann Rheum Dis* 51(8): 965-8.

Brown, C. R., V. A. Blaho and C. M. Loiacono (2003). Susceptibility to experimental Lyme arthritis correlates with KC and monocyte chemoattractant protein-1 production in joints and requires neutrophil recruitment via CXCR2. *J Immunol* 171(2): 893-901.

Brown, C. R., V. A. Blaho and C. M. Loiacono (2004). Treatment of Mice with the Neutrophil-Depleting Antibody RB6-8C5 Results in Early Development of Experimental Lyme Arthritis via the Recruitment of Gr-1- Polymorphonuclear Leukocyte-Like Cells. *Infect Immun* 72(9): 4956-65.

Bunning, R. A., A. Crawford, H. J. Richardson, G. Opendakker, J. Van Damme and R. G. Russell (1987). Interleukin 1 preferentially stimulates the production of tissue-type plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 924(3): 473-82.

Chabaud, M., J. M. Durand, N. Buchs, F. Fossiez, G. Page, L. Frappart and P. Miossec (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42(5): 963-70.

Chicoine, E., P. O. Esteve, O. Robledo, C. Van Themsche, E. F. Potworowski and Y. St-Pierre (2002). Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 297(4): 765-72.

Churg, A., R. D. Wang, H. Tai, X. Wang, C. Xie, J. Dai, S. D. Shapiro and J. L. Wright (2003). Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med* 167(8): 1083-9.

Clements, K. M., J. S. Price, M. G. Chambers, D. M. Visco, A. R. Poole and R. M. Mason (2003). Gene deletion of either interleukin-1 beta, interleukin-1 beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. *Arthritis Rheum* 48(12): 3452-63.

Close, D. R. (2001). Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3: iii62-7.

Crofford, L. J., R. L. Wilder, A. P. Ristimaki, H. Sano, E. F. Remmers, H. R. Epps and T. Hla (1994). Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 93(3): 1095-101.

Cunnane, G., O. Fitzgerald, C. Beeton, T. E. Cawston and B. Bresnihan (2001). Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 44: 2263-74.

Dahlberg, L., R. C. Billingham, P. Manner, F. Nelson, G. Webb, M. Ionescu, A. Reiner, M. Tanzer, D. Zukor, J. Chen, H. E. van Wart and A. R. Poole (2000). Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum* 43(3): 673-82.

- DeClerck, Y. A., T. D. Yean, Y. Lee, J. M. Tomich and K. E. Langley (1993). Characterization of the functional domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochem J* 289 (Pt 1): 65-9.
- Drummond, A. H., P. Beckett, P. D. Brown, E. A. Bone, A. H. Davidson, W. A. Galloway, A. J. Gearing, P. Huxley, D. Laber, M. McCourt, M. Whittaker, L. M. Wood and A. Wright (1999). Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 878: 228-35.
- Eeckhout, Y. and G. Vaes (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* 166(1): 21-31.
- Elliott, M. J., R. N. Maini, M. Feldmann, A. Long-Fox, P. Charles, P. Katsikis, F. M. Brennan, J. Walker, H. Bijl, J. Ghayeb and et al. (1993). Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 36(12): 1681-90.
- Engchild, J. J., G. Salvesen, I. B. Thogersen and S. V. Pizzo (1989). Proteinase binding and inhibition by the monomeric alpha-macroglobulin rat alpha 1-inhibitor-3. *J Biol Chem* 264(19): 11428-35.
- Faires, J. S. and D. J. McCarty (1962). Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. *Lancet* 2: 682-685.
- Feng, S., E. Hodzic and S. W. Barthold (2000). Lyme arthritis resolution with antiserum to a 37-kilodalton *Borrelia burgdorferi* protein. *Infect Immun* 68(7): 4169-73.
- Fernandes, J. C., J. Martel-Pelletier and J. P. Pelletier (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39(1-2): 237-46.

- FitzGerald, G. A. and C. Patrono (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 345(6): 433-42.
- Fraser, A., U. Fearon, R. C. Billingham, M. Ionescu, R. Reece, T. Barwick, P. Emery, A. R. Poole and V. D. J. (2003). Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage at the onset of inflammatory arthritis in humans. *Arthritis & Rheumatism* 48(11): 3085-3095.
- Fridman, R., M. Toth, D. Pena and S. Mobashery (1995). Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 55(12): 2548-55.
- Fuchs, S., A. Skwara, M. Bloch and B. Dankbar (2004). Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 12(5): 409-18.
- Goldbach-Mansky, R., J. M. Lee, J. M. Hoxworth, D. Smith II, P. Duray, H. R. Schumacher Jr, C. H. Yarboro, J. Klippel, D. Kleiner and H. S. El-Gabalawy (2000). Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis. *Arthritis Res* 2: 145-153.
- Goldberg, G. I., B. L. Marmer, G. A. Grant, A. Z. Eisen, S. Wilhelm and C. S. He (1989). Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(21): 8207-11.
- Goldring, S. R. and E. M. Gravallese (2000). Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 12(3): 195-9.
- Grassi, F., S. Cristino, S. Toneguzzi, A. Piacentini, A. Facchini and G. Lisignoli (2004). CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol* 199(2): 244-51.

Halliday, D. A., G. Clemente, D. A. Rathjen and A. Ferrante (2000). Rapid degradation of articular cartilage proteoglycan by neutrophils: comparison with macrophages and synovial fibroblasts. *Inflamm Res* 49(9): 441-4.

Hanemaaijer, R., T. Sorsa, Y. T. Konttinen, Y. Ding, M. Sutinen, H. Visser, V. W. van Hinsbergh, T. Helaakoski, T. Kainulainen, H. Ronka, H. Tschesche and T. Salo (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(50): 31504-9.

Harjacek, M., S. Diaz-Cano, B. A. Alman, J. Coburn, R. Ruthazer, H. Wolfe and A. C. Steere (2000). Prominent expression of mRNA for proinflammatory cytokines in synovium in patients with juvenile rheumatoid arthritis or chronic Lyme arthritis. *J Rheumatol* 27(2): 497-503.

Haro, H., H. C. Crawford, B. Fingleton, K. Shinomiya, D. M. Spengler and L. M. Matrisian (2000). Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* 105(2): 143-50.

Hashimoto, Y., H. Kakegawa, Y. Narita, Y. Hachiya, T. Hayakawa, J. Kos, V. Turk and N. Katunuma (2001). Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 283(2): 334-9.

Hasty, K. A., J. J. Jeffrey, M. S. Hibbs and H. G. Welgus (1987). The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 262(21): 10048-52.

Hinz, B. and K. Brune (2002). Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300(2): 367-75.

Homandberg (1999). Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments. *Front Biosci* 15(4): D713-D730.

Hou, W. S., Z. Li, R. E. Gordon, K. Chan, M. J. Klein, R. Levy, M. Keysser, G. Keyszer and D. Bromme (2001). Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol* 159(6): 2167-77.

Hsieh, M. S., H. C. Ho, D. T. Chou, S. Pan, Y. C. Liang, T. Y. Hsieh, J. L. Lan and S. H. Tsai (2003). Expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) in gouty arthritis and stimulation of MMP-9 by urate crystals in macrophages. *J Cell Biochem* 89(4): 791-9.

Hu, L. T., M. A. Eskildsen, C. Masgala, A. C. Steere, E. C. Arner, M. A. Pratta, A. J. Grodzinsky, A. Loening and G. Perides (2001). Host metalloproteinases in Lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 44(6): 1401-10.

Ito, A., A. Mukaiyama, Y. Itoh, H. Nagase, I. B. Thogersen, J. J. Enghild, Y. Sasaguri and Y. Mori (1996). Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 271(25): 14657-60.

Itoh, T., H. Matsuda, M. Tanioka, K. Kuwabara, S. Itohara and R. Suzuki (2002). The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169(5): 2643-7.

Itoh, Y. and H. Nagase (1995). Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J Biol Chem* 270(28): 16518-21.

Janusz, M. J. and N. S. Doherty (1991). Degradation of cartilage matrix proteoglycan by human neutrophils involves both elastase and cathepsin G. *J Immunol* 146(11): 3922-8.

Janusz, M. J. and S. L. Durham (1997). Inhibition of cartilage degradation in rat collagen-induced arthritis but not adjuvant arthritis by the neutrophil elastase inhibitor MDL 101,146. *Inflamm Res* 46(12): 503-8.

Ji, H., A. Pettit, K. Ohmura, A. Ortiz-Lopez, V. Duchatelle, C. Degott, E. Gravallesse, D. Mathis and C. Benoist (2002). Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* 196(1): 77-85.

Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, P. Reboul, Y. He, F. C. Jolicoeur and J. P. Pelletier (2001). Modulation of TIMP-1 synthesis by antiinflammatory cytokines and prostaglandin E2 in interleukin 17 stimulated human monocytes/macrophages. *J Rheumatol* 28(4): 712-8.

Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis and G. Kollias (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 10(13): 4025-31.

Keiser, H., R. A. Greenwald, G. Feinstein and A. Janoff (1976). Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases--a model of joint injury. II. Degradation of isolated bovine nasal cartilage proteoglycan. *J Clin Invest* 57(3): 625-32.

Knauper, V., C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight and G. Murphy (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271(3): 1544-50.

Knauper, V., H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembry and G. Murphy (1996). 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(29): 17124-31.

Kojima, F., H. Naraba, Y. Sasaki, R. Okamoto, T. Koshino and S. Kawai (2002). Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 29(9): 1836-42.

Kostoulas, G., A. Lang, H. Nagase and A. Baici (1999). Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* 455(3): 286-90.

Kozaci, L. D., D. J. Buttle and A. P. Hollander (1997). Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis & Rheumatism* 40(1): 164-174.

Lack, C. H. and H. J. Rogers (1958). Action of plasmin on cartilage. *Nature* 182(4640): 948-9.

Landis, R. C., D. R. Yagnik, O. Florey, P. Philippidis, V. Emons, J. C. Mason and D. O. Haskard (2002). Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. *Arthritis Rheum* 46(11): 3026-33.

Lazzerini, P. E., P. L. Capecchi, F. Nerucci, A. Fioravanti, F. Chellini, M. Piccini, S. Bisogno, R. Marcolongo and F. Laghi Pasini (2004). Simvastatin reduces MMP-3 level in interleukin 1 beta stimulated human chondrocyte culture. *Ann Rheum Dis* 63(7): 867-9.

Leppert, D., J. Ford, G. Stabler, C. Grygar, C. Lienert, S. Huber, K. M. Miller, S. L. Hauser and L. Kappos (1998). Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 121 (Pt 12): 2327-34.

Leppert, D., E. Waubant, M. R. Burk, J. R. Oksenberg and S. L. Hauser (1996). Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40(6): 846-52.

Li, Q., P. W. Park, C. L. Wilson and W. C. Parks (2002). Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 111(5): 635-46.

Li, W. Q., F. Dehnade and M. Zafarullah (2001). Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol* 166(5): 3491-8.

Lin, B., J. M. Kidder, R. Noring, A. C. Steere, M. S. Klempner and L. T. Hu (2001). Differences in synovial fluid levels of matrix metalloproteinases suggest separate mechanisms of pathogenesis in Lyme arthritis before and after antibiotic treatment. *J Infect Dis* 184(2): 174-80.

MacNaul, K. L., N. Chartrain, M. Lark, M. J. Tocci and N. I. Hutchinson (1990). Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 265(28): 17238-45.

Malfait, A. M., R. Q. Liu, K. Ijiri, S. Komiya and M. D. Tortorella (2002). Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 277(25): 22201-8.

Malik, N., B. W. Greenfield, A. F. Wahl and P. A. Kiener (1996). Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol* 156(10): 3952-60.

Mantle, D., G. Falkous and D. Walker (1999). Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. *Clin Chim Acta* 284(1): 45-58.

Martel-Pelletier, J., D. J. Welsch and J. P. Pelletier (2001). Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15(5): 805-29.

McCawley, L. J. and L. M. Matrisian (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 534-40.

McQuibban, G. A., G. S. Butler, J. H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis and C. M. Overall (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276(47): 43503-8.

McQuibban, G. A., J. H. Gong, E. M. Tam, C. A. McCulloch, I. Clark-Lewis and C. M. Overall (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289(5482): 1202-6.

McQuibban, G. A., J. H. Gong, J. P. Wong, J. L. Wallace, I. Clark-Lewis and C. M. Overall (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100(4): 1160-7.

Mercuri, F. A., R. A. Maciewicz, J. Tart, K. Last and A. J. Fosang (2000). Mutations in the interglobular domain of aggrecan alter matrix metalloproteinase and aggrecanase cleavage patterns. Evidence that matrix metalloproteinase cleavage interferes with aggrecanase activity. *J Biol Chem* 275(42): 33038-45.

Mochan, E., J. Uhl and R. Newton (1986). Interleukin 1 stimulation of synovial cell plasminogen activator production. *J Rheumatol* 13(1): 15-9.

Mohan, M. J., T. Seaton, J. Mitchell, A. Howe, K. Blackburn, W. Burkhart, M. Moyer, I. Patel, G. M. Waitt, J. D. Becherer, M. L. Moss and M. E. Milla (2002). The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* 41(30): 9462-9.

Moore, A. R., A. Appelboom, K. Kawabata, J. A. Da Silva, D. D'Cruz, G. Gowland and D. A. Willoughby (1999). Destruction of articular cartilage by alpha 2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58(2): 109-13.

Mort, J. S., M. C. Magny and E. R. Lee (1998). Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neoepitope. *Biochem J* 335 (Pt 3): 491-4.

Mudgett, J. S., N. I. Hutchinson, N. A. Chartrain, A. J. Forsyth, J. McDonnell, Singer, II, E. K. Bayne, J. Flanagan, D. Kawka, C. F. Shen, K. Stevens, H. Chen, M. Trumbauer and D. M. Visco (1998). Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 41(1): 110-21.

Murphy, G., A. Houbrechts, M. I. Cockett, R. A. Williamson, M. O'Shea and A. J. Docherty (1991). The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30(33): 8097-102.

Murphy, G., R. Ward, R. M. Hembry, J. J. Reynolds, K. Kuhn and K. Tryggvason (1989). Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem J* 258(2): 463-72.

Nagase, H. and K. Brew (2002). Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S51-61.

Nakada, M. T., S. H. Tam, D. S. Woulfe, K. A. Casper, R. A. Swerlick and J. Ghrayeb (1998). Neutralization of TNF by the antibody cA2 reveals differential regulation of adhesion molecule expression on TNF-activated endothelial cells. *Cell Adhes Commun* 5(6): 491-503.

Nepom, T. G. (2000). HLA and Rheumatoid Arthritis. HLA in health and disease second edition. L. Warrens. London, Academic Press: 181-185.

Okada, Y. (2000). Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction. *Mod Rheumatol* 10: 121-128.

Pei, D. and S. J. Weiss (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375(6528): 244-7.

Poole, A. R. and G. Webb (2000). Osteoarthritis. Principles of molecular rheumatology. Tsokos. Totowa, Humana Press: 401-411.

Pope, R. M. and H. Perlman (2000). Rheumatoid arthritis. Principles of molecular rheumatology. Tsokos. Totowa, Humana Press: 325-361.

Price, B., C. Dennison, H. Tschesche and E. Elliott (2000). Neutrophil tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 occurs in novel vesicles that do not fuse with the phagosome. *J Biol Chem* 275(36): 28308-15.

Richards, C. D., M. Shoyab, T. J. Brown and J. Gauldie (1993). Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J Immunol* 150(12): 5596-603.

Richardson, D. W. and G. R. Dodge (2003). Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflamm Res* 52(1): 39-49.

Rifas, L. and S. Arackal (2003). T cells regulate the expression of matrix metalloproteinase in human osteoblasts via a dual mitogen-activated protein kinase mechanism. *Arthritis Rheum* 48(4): 993-1001.

Saito, S., M. Katoh, M. Masumoto, S. Matsumoto and Y. Masuho (1999). Dexamethasone inhibits collagen degradation induced by the combination of interleukin-1 and plasminogen in cartilage explant culture. *Biol Pharm Bull* 22(7): 727-30.

Sakai, T., F. Kambe, H. Mitsuyama, N. Ishiguro, K. Kurokouchi, M. Takigawa, H. Iwata and H. Seo (2001). Tumor necrosis factor alpha induces expression of genes for matrix degradation in human chondrocyte-like HCS-2/8 cells through activation of NF-kappaB:

abrogation of the tumor necrosis factor alpha effect by proteasome inhibitors. *J Bone Miner Res* 16(7): 1272-80.

Salvesen, G. S. and A. J. Barrett (1980). Covalent binding of proteinases in their reaction with alpha 2-macroglobulin. *Biochem J* 187(3): 695-701.

Sandy, J. D., C. R. Flannery, P. J. Neame and L. S. Lohmander (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(5): 1512-1516.

Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto and M. Seiki (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370(6484): 61-5.

Sato, N., N. Maehara, G. H. Su and M. Goggins (2003). Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst* 95(4): 327-30.

Schett, G., S. Hayer, M. Tohidast-Akrad, B. J. Schmid, S. Lang, B. Turk, F. Kainberger, S. Haralambous, G. Kollias, A. C. Newby, Q. Xu, G. Steiner and J. Smolen (2001). Adenovirus-based overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 reduces tissue damage in the joints of tumor necrosis factor alpha transgenic mice. *Arthritis Rheum* 44(12): 2888-98.

Schonbeck, U., F. Mach and P. Libby (1998). Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 161(7): 3340-6.

Sharif, M., E. George and P. A. Dieppe (1995). Correlation between synovial fluid markers of cartilage and bone turnover and scintigraphic scan abnormalities in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 38(1): 78-81.

Shealy, D. J., P. H. Wooley, E. Emmell, A. Volk, A. Rosenberg, G. Treacy, C. L. Wagner, L. Mayton, D. E. Griswold and X. Y. Song (2002). Anti-TNF-alpha antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res* 4(5): R7.

Shlopov, B. V., G. N. Smith, Jr., A. A. Cole and K. A. Hasty (1999). Differential patterns of response to doxycycline and transforming growth factor beta1 in the down-regulation of collagenases in osteoarthritic and normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 42(4): 719-27.

Silver, I. A., R. J. Murrills and D. J. Etherington (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175(2): 266-76.

Silverstein, F. E., G. Faich, J. L. Goldstein, L. S. Simon, T. Pincus, A. Whelton, R. Makuch, G. Eisen, N. M. Agrawal, W. F. Stenson, A. M. Burr, W. W. Zhao, J. D. Kent, J. B. Lefkowitz, K. M. Verburg and G. S. Geis (2000). Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* 284(10): 1247-55.

Springman, E. B., E. L. Angleton, H. Birkedal-Hansen and H. E. Van Wart (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1): 364-8.

Staebe, B. (2004). *Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques*. Ottawa, Association des pharmaciens du Canada.

Stetler-Stevenson, W. G., R. Hewitt and M. Corcoran (1996). Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Semin Cancer Biol* 7(3): 147-54.

St-Pierre, Y. and E. F. Potworowski (2000). T cell control of extracellular matrix degradation. *Dev Immunol* 7(2-4): 171-7.

St-Pierre, Y. and C. Van Themsche (2003). Matrix metalloproteinases in inflammation of the lung. Proteases in Tissue Remodelling of Lung and Heart. U. Lendeckel. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 35-56.

St-Pierre, Y., C. Van Themsche and P. O. Esteve (2003). Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2(3): 206-15.

Strand, V. and M. C. Hochberg (2002). The risk of cardiovascular thrombotic events with selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 47(4): 349-55.

Talkington, J. and S. P. Nickell (2001). Role of Fc gamma receptors in triggering host cell activation and cytokines release by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 69(1): 413-419.

Tchetverikov, I., H. K. Runday, B. Van El, G. H. Kiers, N. Verzijl, J. M. TeKoppele, T. W. Huizinga, J. DeGroot and R. Hanemaaijer (2004). MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63(7): 881-3.

ter Steege, J., M. Vianen, J. van Bilsen, J. Bijlsma, F. Lafeber and M. Wauben (2003). Identification of self-epitopes recognized by T cells in rheumatoid arthritis demonstrates matrix metalloproteinases as a novel T cell target. *J Rheumatol* 30(6): 1147-56.

Tong, L., D. Smyth, C. Kerr, J. Catterall and C. D. Richards (2004). Mitogen-activated protein kinases Erk1/2 and p38 are required for maximal regulation of TIMP-1 by oncostatin M in murine fibroblasts. *Cell Signal* 16(10): 1123-32.

Tsokos, C. G. (2000). Principles of molecular rheumatology. Totowa, Humana Press: 346-347.

Unemori, E. N., M. J. Bair, E. A. Bauer and E. P. Amento (1991). Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. *J Biol Chem* 266(34): 23477-82.

van Bilsen, J. H., J. P. Wagenaar-Hilbers, M. C. Grosfeld-Stulemeijer, M. J. van der Cammen, M. E. van Dijk, W. van Eden and M. H. Wauben (2004). Matrix metalloproteinases as targets for the immune system during experimental arthritis. *J Immunol* 172(8): 5063-8.

Van den Steen, P. E., P. Proost, A. Wuyts, J. Van Damme and G. Opdenakker (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96(8): 2673-81.

Van Themsche, C., E. F. Potworowski and Y. St-Pierre (2004). Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 315(4): 884-91.

Verhoef, C. M., J. A. van Roon, M. E. Vianen, F. P. Lafeber and J. W. Bijlsma (1999). The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. *Ann Rheum Dis* 58(1): 49-54.

Vincenti, M. P., C. I. Coon and C. E. Brinckerhoff (1998). Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1 beta-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 41(11): 1987-94.

Vitti, G. and J. A. Hamilton (1988). Modulation of urokinase-type plasminogen activator messenger RNA levels in human synovial fibroblasts by interleukin-1, retinoic acid, and a glucocorticoid. *Arthritis Rheum* 31(8): 1046-51.

Welgus, H. G., J. J. Jeffrey and A. Z. Eisen (1981). The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *J Biol Chem* 256(18): 9511-5.

Werb, Z., P. M. Tremble, O. Behrendtsen, E. Crowley and C. H. Damsky (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol* 109(2): 877-889.

Williamson, R. A., F. A. Marston, S. Angal, P. Koklitis, M. Panico, H. R. Morris, A. F. Carne, B. J. Smith, T. J. Harris and R. B. Freedman (1990). Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J* 268(2): 267-74.

Woessner, J. F. and H. Nagase (2000). *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford, Oxford University Press.

Wooten, R. M., Y. Ma, R. A. Yoder, J. P. Brown, J. H. Weis, J. F. Zachary, C. J. Kirschning and J. J. Weis (2002). Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 168(1): 348-55.

Yagnik, D. R., B. J. Evans, O. Florey, J. C. Mason, R. C. Landis and D. O. Haskard (2004). Macrophage release of transforming growth factor beta1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 50(7): 2273-80.

Yagnik, D. R., P. Hillyer, D. Marshall, C. D. Smythe, T. Krausz, D. O. Haskard and R. C. Landis (2000). Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages. Implications for the control of joint inflammation in gout. *Arthritis Rheum* 43(8): 1779-89.

Yoshihara, Y., H. Nakamura, K. Obata, H. Yamada, T. Hayakawa, K. Fujikawa and Y. Okada (2000). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 59(6): 455-61.

Yu, C. L., M. H. Huang, Y. Y. Kung, C. Y. Tsai, Y. Y. Tsai, S. T. Tsai, D. F. Huang, K. H. Sun, S. H. Han and H. S. Yu (1998). Interleukin-13 increases prostaglandin E2 (PGE2) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. *Inflamm Res* 47(4): 167-73.

Zigrino, P., C. Drescher and C. Mauch (2001). Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of alpha2beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* 80(1): 68-77.

