

Université de Nantes

Faculté de Médecine

Ecole Doctorale Biologie Santé

Année 2015-2016

**Rôle et expression de l'Interleukine- 34 dans la
Polyarthrite Rhumatoïde
Interaction avec les molécules de la famille du TGF- β**

THESE DE DOCTORAT

Discipline Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement le 29 janvier 2016

Par Marguerite CHEMEL-MARY

Devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Madame Dominique Farge -Bancel	Professeur des Universités –Praticien Hospitalier	Hôpital Saint Louis, Paris
Monsieur Olivier Peyruchaud	Directeur de Recherche	Laboratoire INSERM U1033 Lyon

Examineurs :

Monsieur Pascal Guggenbuhl	Professeur des Universités –Praticien Hospitalier	CHU de Rennes
Monsieur Franck Verrecchia	Directeur de Recherche	Laboratoire INSERM U957 Nantes

Directeur de Thèse :

Monsieur Yves Maugars	Professeur des Universités –Praticien Hospitalier	CHU de Nantes
-----------------------	---	---------------

Co-directeur de Thèse

Monsieur Benoit Legoff	Maitre de conférences des Universités –Praticien Hospitalier	CHU de Nantes
------------------------	--	---------------

Invités

Monsieur Dominique Heymann	Professeur des Universités –Praticien Hospitalier	CHU de Nantes
Monsieur François Guoin	Professeur des Universités –Praticien Hospitalier	CHU de Nantes

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire INSERM U 957 de l'université de Nantes.

Je tiens à remercier :

Le Pr Dominique Heymann de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et ainsi formée à la recherche scientifique, pour son enthousiasme et ses encouragements.

Le Pr Maugars en tant que directeur de thèse de m'avoir soutenue au long de ces années dans ce projet de thèse de science.

Le Dr Benoit Legoff en tant que co-directeur de thèse pour son aide précieuse et très concrète dans mes recherches et pour son positivisme communicatif.

Franck Verrechia pour son encadrement au quotidien dans les manipulations et la rédaction de cette thèse, pour son expertise sur le deuxième volet de ce travail relatif au TGF- β .

Le Pr Dominique Farge et le Dr Olivier Peyruchaud pour l'honneur qu'ils me font d'être rapporteurs de ce travail.

Les Pr Pascal Guggenbuhl et François Gouin pour leur aide en tant que membres de mon Comité de thèse puis de ce jury, et pour leur présence aujourd'hui.

Regis Brion pour son accompagnement dans les manipulations depuis mon arrivée au laboratoire jusqu'à la dernière ligne droite !

Toute l'équipe du laboratoire INSERM U957 pour leur aide au fil des manipulations, leurs conseils précieux : Céline Charrier, Bénédicte Brulin, Jérôme Amiaud , Aude Segaliny , Marie –Astrid Boutet, Audrey Lamora.

Sommaire

Introduction générale

I La polyarthrite rhumatoïde

- A. Polyarthrite rhumatoïde : généralités
- B. Inflammation et pertes osseuses focales et systémiques
- C. Physiopathologie de la perte osseuse au cours de la polyarthrite rhumatoïde
 - 1. Généralités sur le remodelage osseux
 - 2. Perte osseuse locale dans la polyarthrite rhumatoïde
 - 3. Perte osseuse systémique
- D. Le synoviocyte : cellule-clé de la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde
 - 1. Capacité des synoviocytes à induire la prolifération de la membrane synoviale
 - 2. Capacité des synoviocytes à soutenir l'ostéogénèse, rôle du RANKL et MCSF

II Objectifs de la thèse

Partie I : Expression de l'Interleukine-34 dans la polyarthrite rhumatoïde

I. Introduction Partie I : l'interleukine 34

- A. Découverte
- B. Rôle dans l'ostéoclastogénèse
- C. Rôle dans la réponse inflammatoire

II. Article 1

III. Complément de discussion partie I

- A. Description de la présence d'une nouvelle cytokine surexprimée dans une synovite inflammatoire
- B. Confirmation et précisions apportées à nos résultats
- C. Pertinence de ces résultats in vivo et suite de nos travaux

Partie II :Régulation de l'Il-34 par la BMP-2 et le TGF-β

I Introduction

A Transforming Growth Factor-beta (TGF-β)

- 1.Super-famille du TGF-β
- 2.Voies de signalisation
- 3.Rôle profibrosant du TGF-β1
4. TGF-β et cartilage : rôle dans l'arthrose ?
5. TGF-β et os
6. Tgf-β et polyarthrite

B : Bone Morphogenic Protein

- 1.Description
- 2.BMP, os et cartilage .
- 3.BMP et polyarthrite

II ARTICLE 2

III. Complément de Discussion article 2

A.II-34 / BMP2 et TGF-β, boucle de régulation négative

B. Balance TNF-α versus BMP2 et TGF-β

C .Interaction TGF-β /Il-34 : Régulation de la prolifération synoviale ?

D. Régulations cytokiniques et destructions ostéo- articulaires.

Conclusion – perspectives

I. Interleukine-34 : quel avenir en tant que cible thérapeutique?

II. Macrophages et polarisation M1/M2

III. Compréhension des mécanismes de régulation cytokiniques : quelles perspectives ?

Bibliographie

Introduction générale

I La polyarthrite rhumatoïde

A .Polyarthrite rhumatoïde : généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire le plus fréquent avec, en France, une prévalence estimée à 0,5 -1 % (Saraux et al., 2003). Il s'agit d'une maladie auto-immune, comme en témoigne la présence de facteurs rhumatoïdes mais aussi et surtout d'anticorps anti Peptides- Citrullinés (ACPA). 50 à 80% des patients ont des ACPA, un facteur rhumatoïde ou les deux anticorps (Scott et al 2010). Ainsi on distingue les patients dits séro-positifs (porteurs d'auto-anticorps), des patients séro-négatifs et ACPA positifs ou négatifs, distinction importante tant sur le plan physiopathologique que sur le plan clinique avec des profils évolutifs différents.

Elle est caractérisée par une inflammation chronique des articulations pouvant conduire, à terme, à des destructions ostéo-articulaires irréversibles, source de raideur et de déformation et d'handicap important pour les patients. La cause de cette pathologie n'est pas encore complètement identifiée, probablement multifactorielle. Il existe un terrain génétique, sans qu'une mutation précise ait été identifiée. Des polymorphismes des allèles du Human Leucocyte antigen : HLA-DRB1, PADI4, PTPN22, TNFAIP3, STAT4, et CCR6, ont été décrits (Kochi et al., 2014). Cependant la concordance phénotypique chez des jumeaux monozygotes n'est que de 50%, mettant en exergue le rôle de l'environnement ou épigénétique (Picascia et al., 2015) comme la méthylation de l'ADN, la modification des histones des ARN non codant et le remodelage des nucléosomes (Zhang and Zhang, 2015). Parmi ces phénomènes post traductionnels, le rôle de la citrullination de certains peptides est maintenant bien identifié, dans la PR mais également dans beaucoup d'autres pathologies auto immunes comme la sclérose en plaque (Koch et al., 2013). Dans le cas de la PR elle serait favorisée en partie par le tabac et les parodontopathies chroniques (Pruijn, 2015). Il y aurait alors formation, en fonction de la susceptibilité génétique, de l'inflammation chronique pulmonaire et de la cavité buccale du patient, d'anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA), parfois bien avant les premières manifestations cliniques rhumatologiques. Le déclenchement de la maladie inflammatoire se ferait selon un deuxième évènement non identifié qui stimulerait la cascade de réactions inflammatoires aboutissant aux arthrites.



Fig 1 : Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde (d'après Pruijn, 2015)

B .Inflammation et perte osseuse focale et systémique

La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une inflammation locale et systémique, dont le tissu osseux est une des cibles avec une perte osseuse généralisée (ostéoporose) et locale : destructions otéo-articulaires ou érosions et chondrolyses. Ces érosions typiques de la maladie siègent sur les radiographies standard à la jonction de l'os et de la zone de réflexion synoviale.



Fig 2 :Radiographie de main de face : Erosions typiques des têtes de métacarpes dans une polyarthrite rhumatoïde

Ces destructions locales font tout l'enjeu du traitement de cette pathologie, car il a été montré que cette évolution radiographique était associée au handicap et à la diminution de la force de préhension en particulier par l'atteinte des mains qui est quasi constante dans cette pathologie

(Odegard et al 2006). Cette progression structurale est plus rapide dans les premières années et impose un contrôle précoce de la maladie (Sharp et al 1991).

L'ostéoporose est également une complication fréquente de la polyarthrite rhumatoïde caractérisée par une fragilité osseuse avec diminution de la densité minérale osseuse, trouble de la microarchitecture et un risque accru de fracture. Des études se sont attachées à quantifier ce risque et il a été démontré que les patients porteurs de polyarthrite avaient une augmentation de risque de fracture par rapport à une population contrôle plus marquée à la hanche (RR=2) et au rachis (RR=2.4), qu'aux autres sites. (van staa et al 2006). Ce risque est associé à l'ancienneté de la maladie (PR évoluant depuis plus de 10 ans), une faible Indice de Masse Corporelle et à l'utilisation de corticoïdes, ces deux derniers paramètres faisant partie des facteurs de risque d'ostéoporose établis et indépendants de la polyarthrite. Ce risque de fracture est tout à fait important à prendre en compte chez les patients du fait des conséquences fonctionnelles bien établies :

- Les fractures de l'extrémité supérieure du fémur (FESF), survenant souvent suite à une chute de sa hauteur, sont les plus graves, responsables d'une hospitalisation de 21 jours en moyenne. La mortalité dans l'année qui suit la fracture serait de 10 à 20%, probablement majorée par les comorbidités prévalentes à la fracture (Cummings and Melton, 2002), on note également une nette surmortalité masculine. Les patients survivants à leur fracture sont souvent victimes d'une perte d'autonomie (15 à 20% d'entrée en institution) (Cummings et al., 1985).

- Les fractures vertébrales surviennent souvent pour des traumatismes mineurs. A partir d'une vaste enquête européenne comprenant des radiographies systématiques des participants avec lecture centralisée, il apparaît qu'environ 12% des femmes et une proportion équivalente d'hommes dans la tranche d'âge 50-79 ans présentaient au moins une fracture vertébrale radiologique. La prévalence augmentait avec l'âge dans les deux sexes mais l'augmentation était plus marquée chez les femmes (European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) Group et al., 2002). Ces fractures sont moins responsables d'un excès de mortalité, elles sont d'avantage sources de handicap : lombalgies aiguës et chroniques et peuvent avoir un retentissement social et sur la qualité de vie (Hall et al.,

1999). Le risque de fractures vertébrales est considérablement augmenté par la prise conjointe de corticothérapie, risque établi pour une prise de plus de 7,5 mg par jour pendant une durée de plus de trois mois (GRIO recommandation HAS 2014).

Cependant la polyarthrite, à elle seule, constitue bien un risque d'ostéoporose et justifie une surveillance des patients sur le plan osseux.

Le tissu osseux est donc une des cibles privilégiées de l'inflammation au cours de la PR. Les conséquences en sont très importantes tant sur le plan local ostéoarticulaire du fait de la raideur, des déformations qu'elle entraîne, que sur le plan systémique avec l'ostéoporose et le risque de fractures. Une meilleure compréhension de la physiopathologie des pertes osseuses est nécessaire pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et développer de nouvelles thérapies.

C. Physiopathologie de la perte osseuse au cours de la polyarthrite rhumatoïde

1. Généralités sur le remodelage osseux :

Rappelons donc ici brièvement les éléments clefs du remodelage osseux.

Le tissu osseux est en remodelage constant du fait de l'activité des cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes) qui le constituent et de leurs interactions avec les cellules souches dont elles sont issues. La séquence de remodelage/résorption/formation se produit à la surface osseuse au sein d'unité de remodelage faisant intervenir une activité couplée entre ostéoclastes et ostéoblastes. Cette succession synchrone signe l'intervention de facteurs régulateurs et de la différenciation cellulaire dont le but est de renouveler la matrice osseuse extracellulaire. (Cohen-Solal et al., 2000)

- Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la formation osseuse. Ils sont issus des cellules souches mésenchymateuses sous l'effet de facteurs de transcription tels que Runx 2 et Osterix. Différents facteurs (œstrogènes, Sonic Hedgehog, BMP-2, TGF- β) favorisent la différenciation de la cellule souche mésenchymateuse en ostéoblaste au dépend des autres voies de différenciation, adipogénèse et chondrogénèse. (Harada and Rodan, 2003)

Des découvertes importantes concernant les voies de signalisations induites au sein des ostéoblastes ont mis en évidence le rôle prépondérant de plusieurs molécules impliquées dans la voie wnt/béta caténine. Ainsi LRP5 a été identifiée grâce à des mutations activatrices observées dans des formes de densités osseuses élevées (van Buchen, ostéosclérose autosomique dominante), avec à l'inverse des cas de mutations inactivatrices décrits aboutissant à des tableaux d'ostéoporose. LRP5 interagit avec des membres de la famille WNT pour former un complexe avec Frizzled, récepteur pour WNT entraînant une activation de la voie canonique de WNT (Harada and Rodan, 2003). A l'inverse LRP5 peut également interagir avec Dkk1 ou SOST inhibiteurs de WNT, régulant négativement l'activation des ostéoblastes.(Baron and Kneissel, 2013)

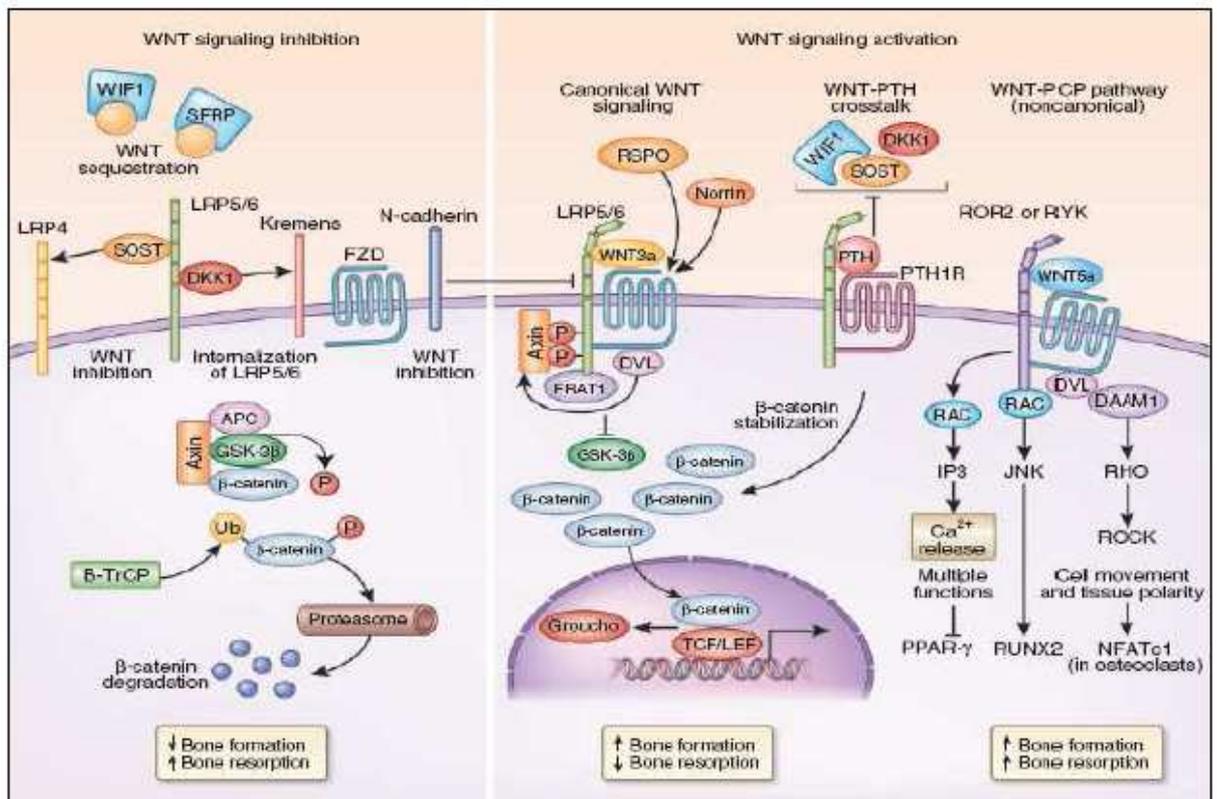


Fig 3 :Inhibition /Activation de la voie WNT/β-caténine et les voies de signalisation d'après Baron et al, Nature Medicine 2013

La sclerostine est quant à elle sécrétée par les ostéocytes et limite l'engagement des cellules immatures vers la lignée ostéoblastique. Le gène de la sclerostine (SOST) a été identifié dans le

cadre d'une pathologie autosomique récessive avec mutation inactivatrice et masse osseuse élevée : la sclerostose.

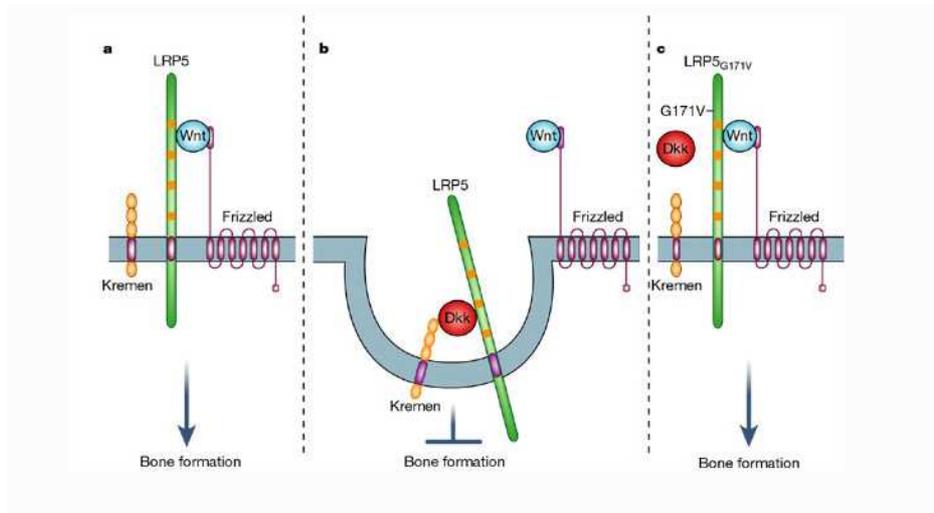


Figure 4 : Rôle essentiel de la voie WNT /beta caténine dans le contrôle de la formation osseuse (d'après Harada 2003)

La fonction essentielle de l'ostéoblaste mature est la synthèse de la matrice osseuse et sa minéralisation au cours de la croissance du squelette, le renouvellement de la matrice osseuse chez l'adulte et la réparation osseuse. L'ostéoblaste mature synthétise du collagène I , qui forme la majorité de la substance organique osseuse. Il synthétise également de nombreuses protéines « non collagéniques » (fibronectine, ostéopontine, ostéonectine, sialoprotéine, ostéocalcine) ainsi que des protéoglycanes. Il contribue à la minéralisation de la matrice osseuse, ce qui nécessite des apports suffisants en minéraux (calcium , phosphate)

- L'ostéoclaste est une volumineuse cellule multinucléée issue des précurseurs hématopoïétiques le CFU-M ou CFU-GM qui se différencie sous l'influence de cytokines sécrétées par les ostéoblastes et leurs précurseurs telles que le Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF) , le TNF- α , l'Il-6 et l' Il-1 et des molécules régulatrices telles que le Receptor activator au NFkB Ligand (RANKL) et Ostéoprotégérine.(Marie and Halbout, 2008).

En effet RANK-L sécrété par les ostéoblastes se fixe sur son récepteur RANK, exprimé à la surface des ostéoclastes et de leurs précurseurs induisant leur différenciation et promouvant leur survie .

Le M-CSF est également un acteur important de la différenciation ostéoclastique. Sa fixation sur son récepteur le M-CSFR est capable de promouvoir l'adhérence cellulaire, la différenciation, la fusion mais également la capacité de résorption des ostéoclastes (Hodge et al, 2007). L'ostéoclastogenèse induite par RANKL et M-CSF est appelée **voie canonique**. Toutefois, à la différence du RANKL qui est absolument nécessaire à la différenciation ostéoclastique *in vitro* le MCSF est substituable (en présence de RANKL) par différentes cytokines (FLT3ligand, VEGF) identifiant ainsi l'existence d'une **voie d'ostéoclastogenèse non canonique** (Knowles HJ et al, 2009).(Baud'huin et al., 2007)

Deux modèles d'ostéopétrose sont, en outre, intéressants. Les souris déficientes en M-CSFR présentent un phénotype plus marqué que les souris déficientes en M-CSF (en particulier une ostéopétrose, un déficit en monocyte, macrophage et en cellules de Langherans ainsi qu'une absence complète de microglie). Ceci fait évoquer l'existence d'une possible autre cytokine activant le même récepteur.

Les ostéoclastes sont donc capables de dégrader la matrice osseuse minéralisée par un mécanisme extracellulaire, en adhérant à la matrice via des intégrines, en formant un compartiment de résorption dans lequel vont être libérés les ions H⁺ permettant l'acidification de la chambre de résorption et une dissolution du minéral. Les lysosomes vont ensuite libérer des enzymes protéolytiques telles que la cathepsine K, la MMP9 et la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) permettant la digestion de phase organique de la matrice extracellulaire. Plusieurs canaux ont été décrits responsables directement de la résorption osseuse ou de la régulation du pH des ostéoclastes dont un canal chlore (HCO₃⁻/Cl⁻) en association avec l'anhydrase carbonique de type II.(Fig 5) (Rousselle and Heymann, 2002)

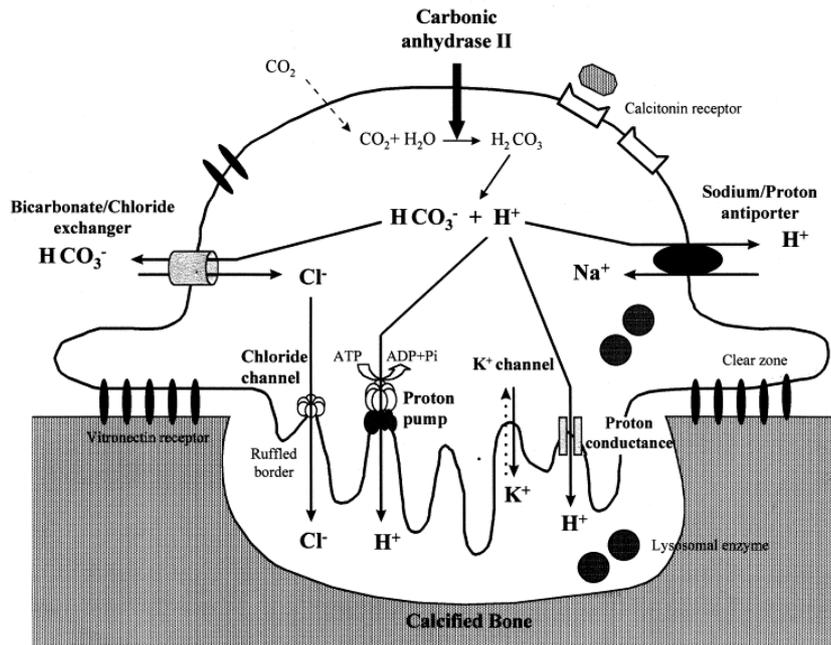


Fig. 5 : Mécanismes d'acidification pour la résorption osseuse,(Rousselle and Heymann, 2002)

Plusieurs facteurs locaux et facteurs de croissance régulent l'activité de résorption. Les cytokines produites par les cellules stromales ou les ostéoblastes telles que IL-1 , TNF- α ou MCSF vont induire un engagement vers la différenciation ostéoclastique . Lorsque l'ostéoclaste aura fini de résorber , la libération de TGF- β et FGF dans le compartiment extra cellulaire stimulera la différenciation ostéoblastique à son tour. Notons le rôle majeur de RANKL pour soutenir l'ostéoclastogénèse. Cette cytokine sécrétée par les ostéoblastes se fixe à la surface des ostéoclastes sur son récepteur RANK. Les souris déficientes en RANK-L présentent une ostéopétrose associée à une absence complète d'ostéoclastes matures mettant en exergue le rôle clé de cette cytokine dans le remodelage osseux (Kong et al, 1999). Dans ce système l'OPG est un antagoniste de RANKL. L'OPG est une molécule de la famille du TNF , il s'agit d'un récepteur soluble qui va se fixer sur le RANKL empêchant sa fixation sur son récepteur RANK et inhibant la différenciation ostéoclastique et la résorption. Il existe une balance OPG/RANKL régulée par les facteurs systémiques et les facteurs locaux. Ainsi une augmentation de PTH de 1-25OH D, d'IL-1 ou de TNF- α va augmenter la sécrétion de RANKL et augmenter l'activité des ostéoclastes.(Theoleyre et al., 2004)

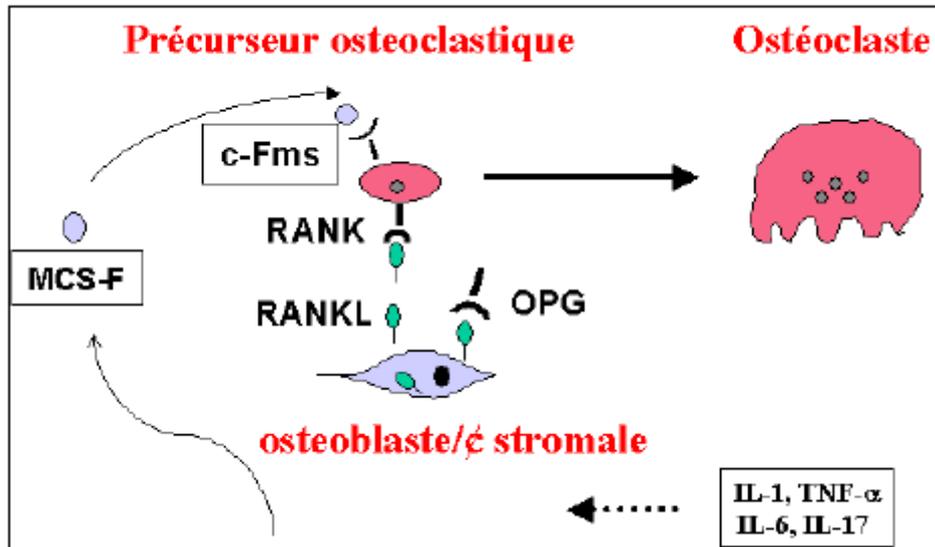


Fig. 6: Facteurs de différenciation ostéoclastique (*Theoleyre et al Growth factor rev 2004*)

Il faut également préciser le rôle longtemps sous-évalué des ostéocytes, qui bien qu'enmurés dans la matrice extra-cellulaire, sont les cellules majoritaires du tissu osseux, organisés en réseau dense très connectés entre eux. Ils coordonnent l'activité des cellules osseuses vis-à-vis notamment des contraintes mécaniques. Ils produisent des facteurs spécifiques tels que DMP-1 (dentin matrix protein) ou le FGF-23 qui inhibent fortement la minéralisation (Dallas et al., 2013). Ils seraient également la source de RANKL (Xiong et al., 2015). Ainsi sous l'effet des contraintes mécaniques, les ostéocytes sécrètent du RANKL et de la sclérostine qui contrôlent respectivement la différenciation des précurseurs en ostéoclastes et des ostéoblastes.(Xiong et al., 2011)

2.Perte osseuse locale dans la polyarthrite rhumatoïde

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde il existe une augmentation de la résorption osseuse locale ostéoarticulaire et systémique. L'élément fondamental de la physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde repose sur la notion de pannus synovial (du latin *panus* fil ou étoffe): il s'agit d'un infiltrat du tissu synovial par les cellules de l'immunité. La membrane synoviale normale est constituée d'une couche dite de cellules bordantes composées de macrophages et de fibroblastes synoviaux soutenus par un tissu conjonctif. Le rôle principal de ces fibroblastes synoviaux, encore appelés synoviocytes est la sécrétion de substance nécessaire à la lubrification de l'articulation afin

d'assurer sa bonne mobilité ainsi que la nutrition du cartilage. Le pannus est constitué de cellules dites résidentes telles que les synoviocytes et du réseau vasculaire. Ces cellules sont stimulées sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) et interagissent étroitement avec les autres cellules présentes dans le tissu osseux et l'articulation tels que les ostéoclastes, les chondrocytes et les ostéoblastes.

L'analyse histologique de l'infiltrat inflammatoire a montré la présence de macrophages et de lymphocytes T (30 à 50%) et à un moindre degré de lymphocytes B, cellules dendritiques, de plasmocytes et de mastocytes.

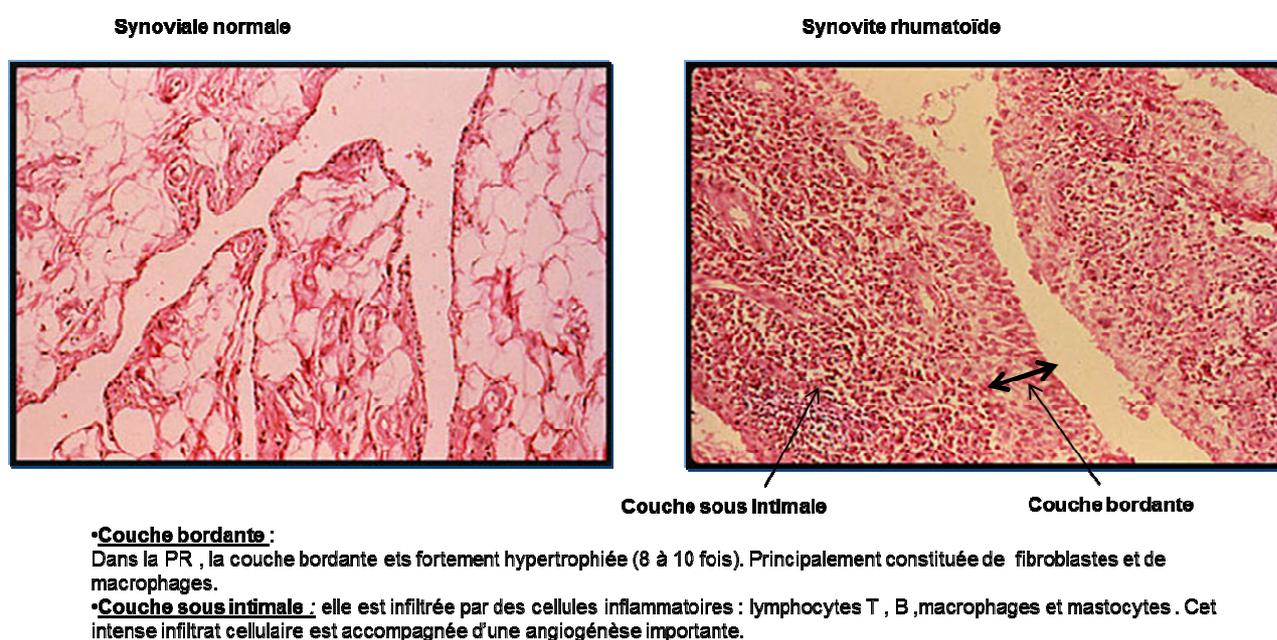


Fig 7. Pannus synovial : histologie (coupe de membranes synoviales , coloration HES, microscopie optique x 20)

Les cellules de l'immunité qui infiltrent la synoviale dans ce contexte inflammatoire sont la source de nombreuses cytokines ayant un effet direct sur le cartilage et le tissu osseux. Ainsi il a été démontré qu'il existait une corrélation entre inflammation articulaire et destruction radiologique au niveau de cette même articulation (Klarenbeek et al 2010). A l'opposé, la guérison s'observe de manière préférentielle au niveau des articulations indemnes d'inflammation (Lukas et al 2010). Le pannus et l'inflammation entraînent une dégradation de toutes les composantes de l'articulation :

os, cartilage, tendons,, capsule articulaire. Cependant les mécanismes impliqués dans ces différentes destructions sont distincts et ne mettent pas en jeu les mêmes types cellulaires.

Ainsi les destructions osseuses sont médiées par les ostéoclastes. Bomley et Wooley ont été les premiers à mettre en évidence les ostéoclastes au sein de l'articulation des patients porteurs de polyarthrite. Ils décrivaient ces cellules comme des cellules géantes multinucléées, possédant une membrane plissée, positives pour des enzymes particulières TRAP et ATPase (Bromley et al 1984). Gravalles et Goldring identifièrent formellement ces cellules comme des ostéoclastes en 1998 en montrant leur expression de facteurs tels que TRAP, Cathepsine K et la calcitonine (Gravalles et al 1998). Par la suite des expérimentations animales ont confirmé l'implication de l'ostéoclaste dans la genèse des érosions osseuses de la PR. Ainsi l'induction d'un modèle de polyarthrite chez des souris déficientes pour une des cytokines indispensables à la différenciation ostéoclastiques, le Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) entraîne une inflammation mais pas d'érosion osseuse (Petit et al 2011). Toujours *in vivo*, un traitement par l'osteoprotégérine prévient les érosions osseuses dans un modèle d'arthrite induite au collagène (Romas et al . 2002).

Le cartilage est la seconde cible des destructions ostéo-articulaires dans la polyarthrite. Il est constitué d'une matrice extracellulaire constituée à 80% d'eau de collagène de type II et de protéoglycanes et de cellules appelées chondrocytes. Même si les ostéoclastes sont capables de résorber le cartilage minéralisé, les principales cellules impliquées dans la destruction cartilagineuse sont les fibroblastes synoviaux. Ces cellules envahissent le cartilage et sécrètent des molécules telles que les metalloprotéases capables de dégrader la matrice extra-cellulaire (Pap et al 2001). Le rôle des fibroblastes synoviaux a été confirmé par la mise en évidence du rôle de cadherin-11, une molécule d'adhésion inter-cellulaire, jouant un rôle majeur dans la connexion entre les fibroblastes. Les souris déficientes pour Cadherin-11 ont un défaut de développement de la membrane synoviale et l'induction d'une arthrite chez ces souris entraîne une inflammation et des érosions osseuses mais pas de destruction cartilagineuse (Lee et al 2007). Enfin, les structures capsulaires et tendineuses sont également détruites par l'inflammation entraînant des conséquences fonctionnelles parfois majeures. Certains tendons sont entourés d'une membrane synoviale permettant un glissement optimal sur les reliefs osseux. Au cours de la PR, ces tendons peuvent être le siège d'une synovite ou ténosynovite qui a la capacité d'envahir les tendons et de

provoquer leur rupture. Ces ténosynovites ont les mêmes caractéristiques histologiques que la synovite retrouvée au niveau articulaire, avec une hypertrophie de la couche bordante et une infiltration cellulaire faite en majorité de lymphocytes T CD4⁺ et de macrophages CD68⁺ (Kaibara et al 2008). Les fibroblastes synoviaux isolés du tissu ténosynovial sont sources de métalloprotéases (MMP-1 , MMP-13, MT1-MMP et MMP-8) qui vont être capables de dégrader les fibres de collagène de type I composant les tendons (Jain et al 2001). Le traitement de ténosynoviocytes par un inhibiteur du TNF- α ou de l'IL-1 diminue l'expression de ces métalloprotéases (Jain et al . 2002). Ceci confirme donc le rôle majeur des synoviocytes et des MMPs dans les destructions tendineuses associées à la PR.

3.Perte osseuse systémique

La perte osseuse systémique (ou ostéoporose) observée dans la polyarthrite est soutenue par une hyper activité des ostéoclastes . En effet les cytokines pro inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 , IL-17) sont capables de stimuler la différenciation ostéoclastiques de manière directe ou indirecte. Ces cytokines favorisent l'expression de RANKL par les cellules stromales et les ostéoblastes. Il a ainsi été décrit une augmentation du rapport RANKL/OPG dans le sérum des patients (van Tuyl et al 2010). Ces cytokines inflammatoires stimulent également une molécule clef nécessaire à la différenciation ostéoclastiques, le Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF). Ainsi le TNF- α et l'IL -1 stimulent l'expression d'IL-17 par les cellules stromales qui en retour stimulent l'expression de MCSF et RANKL par les lymphocytes T activés (Weizmann et al 2000). L'inhibition du TNF- α et de l'IL-1 dans les modèles animaux d'ovariectomie ou d'arthrite inflammatoire prévient la perte osseuse (Kimble et al 1995, Saldenber-Kermanac'h et al 2004) . Enfin les thérapeutiques chez l'homme qui reposent sur l'utilisation d'anticorps anti IL-6 ou anti TNF- α diminuent les marqueurs de résorption osseuse et améliorent la densité osseuse des patients atteints de PR (Marotte et al 2007 , Confavreux et al 2011).

D.Le synoviocytes : cellule-clef de la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

Les ostéoclastes participent donc activement au phénomène de destruction osseuse tant au niveau local articulaire que systémique dans la physiopathologie de la PR. Il n'en reste pas moins que les synoviocytes jouent un rôle central au sein de la membrane synoviale dans cette physiopathologie : rôle carrefour entre les cellules de l'immunité et leurs signaux pro-inflammatoires et les ostéoclastes, rôle également très important dans la formation du pannus synovial. Ils constituent en effet le principal composant cellulaire de la couche bordante de la membrane synoviale avec deux types de synoviocytes: les macrophages et les synoviocytes fibroblastiques. Les premiers appartiennent comme les cellules dendritiques à la lignée monocytaire tandis que les seconds ont une origine mésenchymateuse. Même s'ils n'expriment pas de marqueurs spécifiques, l'expression du CD 55 (complement decay-accelerating factor) ou cadherin-11 peut être recherchée par immunohistochimie pour les caractériser. Les macrophages se distinguent des synoviocytes fibroblastiques par l'expression de marqueurs de différenciation tels que CD68 et CD14, des molécules HLA de classe II et des récepteurs Fc des immunoglobulines.

Le rôle du synoviocytes fibroblastes est de sécréter du liquide synovial et d'assurer la nutrition du cartilage, ils produisent également une matrice extra cellulaire qui relie entre elle les cellules de la couche bordante. Ces fibroblastes synoviaux sont stimulés par les produits de dégradation du cartilage. La destruction des tissus entraîne un relargage de fragments et de composants de ce cartilage (fibronectine, vitronectine) qui entraînent eux –mêmes une activation des fibroblastes synoviaux, via des récepteurs présents à leur surface appelés intégrines qui une fois activés par leurs ligands induisent l'expression de Metalloprotéases (MMPs) et de cytokines pro-inflammatoires (Sarkissian et al 1999). Les tissus dégradés sont également sources de facteurs de croissance (FGF, TGF- β) qui ont un effet sur la prolifération des fibroblastes synoviaux. Les macrophages synoviaux servent quant à eux à éliminer d'éventuelles particules présentes dans le liquide synovial, et agissent en « sentinelle » contre les infections bactériennes.

Dans la polyarthrite rhumatoïde, les synoviocytes activés par les lymphocytes T seraient les véritables moteurs de la réaction inflammatoire en produisant deux types de médiateurs : des médiateurs « primaires » ne nécessitant pas de synthèse protéiques tels que les prostaglandines,

les leucotriènes, les radicaux libres et les enzymes contenus dans les granules et qui participent de façon importante à la destruction tissulaire ; des médiateurs secondaires requérant une synthèse protéique constituée principalement par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- α mais également IL-6 et IL-17 . Ces cytokines jouent un rôle clef dans le développement de la réaction inflammatoire locale et systémique. Elles induisent en effet la synthèse de médiateurs primaires de l'inflammation (PGE2, NO, radicaux libres) par une action autocrine mais aussi par une action paracrine sur les cellules avoisinantes comme les chondrocytes, les cellules endothéliales, et les synoviocytes. Ces derniers stimulés par les cytokines pro-inflammatoires produisent des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires.

Les synoviocytes macrophagiques sont situés dans la couche bordante et la sous intima, ils sont la principale source de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β . Le degré d'infiltrat macrophagique de la couche bordante est corrélé à la gravité de la destruction ostéoarticulaire et cet infiltrat diminue après utilisation de DMARDS comme le montrent des coupes histologiques de membranes synoviales de patients avant ou après traitement (Gierut et al., 2010).

1. Capacité des synoviocytes à induire la prolifération de la membrane synoviale

Les fibroblastes synoviaux, une fois activés acquièrent des capacités d'invasion, de prolifération et de résistance à l'apoptose, qui font se rapprocher le pannus synovial d'un tissu pseudo-tumoral. Cette prolifération passerait d'ailleurs d'avantage par un défaut d'apoptose des fibroblastes que par une augmentation de leur prolifération, au vu du faible nombre de cellules en mitoses (ou positives pour des marqueurs du cycle cellulaire comme de Ki67) (Bartok et al 2010). Ils sont ainsi résistants à l'apoptose via plusieurs mécanismes : augmentation des facteurs anti-apoptoses tels que FLICE-inhibitory protein (FLIP), Bcl-2 (Batok et al 2010). Ils sont résistants à l'apoptose induite par Fas-ligand, TRAIL ou TNF- α (pundt et al 2009). De plus des mutations génétiques ont été mises évidence au sein des populations de fibroblastes synoviaux : par exemple d'un puissant facteur de transcription inducteur d'apoptose comme p-53 (Firestein et al .1997). Enfin leurs capacités d'invasion sont également démontrées comme dans un modèle de souris SCID, les fibroblastes synoviaux de patients atteints de PR étant capables de migrer à distance de leur site d'implantation via la circulation sanguine (Lefevre et al 2009).

2.Capacité des synoviocytes à soutenir l'ostéogenèse, rôle du RANKL et MCSF

Il a été démontré un lien direct entre inflammation synoviale et destruction ostéo-articulaire. En effet, l'ostéoclaste, seule cellule de l'organisme capable de résorber le tissu osseux, est la principale cellule responsable de ces destructions (Schett et al,2009). L'activation de ces ostéoclastes se fait au sein de l'articulation, sous l'influence de cytokines sécrétées par les cellules de l'inflammation et les fibroblastes synoviaux. Elle est même corrélée à la gravité de l'état inflammatoire de la membrane synoviale (Takayanagi H Nat Rev 2007). Même si des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL1 sont capables d'activer localement l'ostéoclastogenèse, RANK-L (Receptor Activator of NF-kappa B Ligand) et le M-CSF (Macrophages Colony Stimulating Factor) restent les 2 cytokines majeures contrôlant cette différenciation.

Dans le cas de la synovite rhumatoïde , la production de RANKL par les synoviocytes hyperplasiques et les Lymphocytes T activés est augmentée (Huber et al., 2006) .

Le rôle du M-CSF dans cette pathologie a été étudié *in vivo*, montrant une action pro-inflammatoire de cette cytokine pouvant aggraver chez le rat l'arthrite induite au collagène (Cook AD et al, 2001). En outre, le taux plasmatique en M-CSF a même été proposé comme possible biomarqueur d'activité de la maladie chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde (Rioja et al., 2008). De plus les souris déficientes en le M-CSF semblent être protégées contre l'arthrite induite au collagène (Campbell et al., 2000). Enfin, un anticorps monoclonal anti MCSF- R (AFS98) a prouvé sur un modèle murin de polyarthrite (d'arthrite induite au collagène) sa capacité à réduire les érosions osseuses , la chondrolyse et l'inflammation synoviale (Toh et al., 2014).

II Objectifs de la thèse

Ainsi l'objectif de ce travail sera de préciser davantage les mécanismes impliqués dans la résorption osseuse locale et systémique dans la polyarthrite rhumatoïde. En effet ce phénomène de destruction ostéo-articulaire reste l'enjeu majeur de la compréhension de cette pathologie puisque sa prévention constitue l'objectif de tous les traitements ciblant cette pathologie. La recherche de nouveaux paramètres impliqués dans cette cascade inflammatoire aboutissant à la destruction osseuse reste toujours d'actualité, malgré les nouveaux traitements ciblés visant les principales cytokine inflammatoires tels que les anti TNF- α , puisque certains patients échappent encore aux thérapeutiques actuelles et continuent de progresser sur le plan structural. De nouvelles cibles thérapeutiques sont donc toujours à explorer.

Les objectifs de cette thèse ont été de :

- Caractériser la présence et le rôle potentiel dans la synovite rhumatoïde d'une nouvelle cytokine l'IL-34 récemment décrite comme impliquée dans la survie des monocytes et l'ostéoclastogenèse.
- Etudier l'expression de cette cytokine au sein de la synovite rhumatoïde grâce à une bio-collection réalisée au sein de notre laboratoire constituées de prélèvements de membranes synoviales de patient atteints de polyarthrite rhumatoïde opérés de synovectomie ou d'arthroplastie dans le cadre de la prise en charge de leur pathologie dans le service de chirurgie de chirurgie orthopédique du CHU et également de liquides synoviaux de patients récoltés sur le surplus de ponction articulaire dans le service de rhumatologie .
- d'analyser les différentes voies de signalisation impliquées dans sa stimulation sur les synoviocytes dans un contexte inflammatoire.
- de mieux comprendre les boucles de régulation existant entre cette nouvelle cytokine (l'IL-34) et les molécules de la famille du TGF- β également impliquées dans la régulation des destructions ostéo-articulaires. Nos travaux se sont focalisés sur deux membres de cette famille que sont le TGF- β et BMP-2.

PARTIE I

Expression de l'Interleukine-34 dans de la polyarthrite rhumatoïde

I Introduction Partie I :L'interleukine 34

A. Découverte

L'interleukine 34 (IL-34) est une cytokine récemment identifiée (Lin et al. 2008) par screening du protéome extracellulaire, par sa capacité à fixer le même récepteur que le MCSF : le MCSF-R, exprimé en particulier à la surface des monocytes. MCSF-R, MCSF et IL-34 présentent un fort niveau de conservation phylogénétique (Garceau et al., 2010).

L'IL-34 est présente dans de nombreux tissus principalement dans la rate, mais aussi la peau ou le cerveau. Les activités principales de l'IL-34 paraissent superposables à celui du M-CSF, à savoir stimuler la différenciation, la prolifération et la survie des monocytes, macrophages et ostéoclastes. Elle oriente également les cellules souches hématopoïétiques vers une différenciation CFU-GM et CFU-M et stimule l'expression de marqueurs myéloïdes à leurs surfaces. Elle se distingue néanmoins du M-CSF par des différences concernant leurs sites de liaison sur le M-CSFR, les cascades de phosphorylations induites par chacune de ces cytokines,(Fig.8) et leur affinité respective (caractérisée par un coefficient de dissociation de 1pM pour l'IL-34 contre 34pM pour le M-CSF) (Chihara et al., 2010). IL a également été montré que l'expression des gènes induits avec l'une ou l'autre des cytokines par les monocytes était pour 32% différente (Barve et al., 2013)

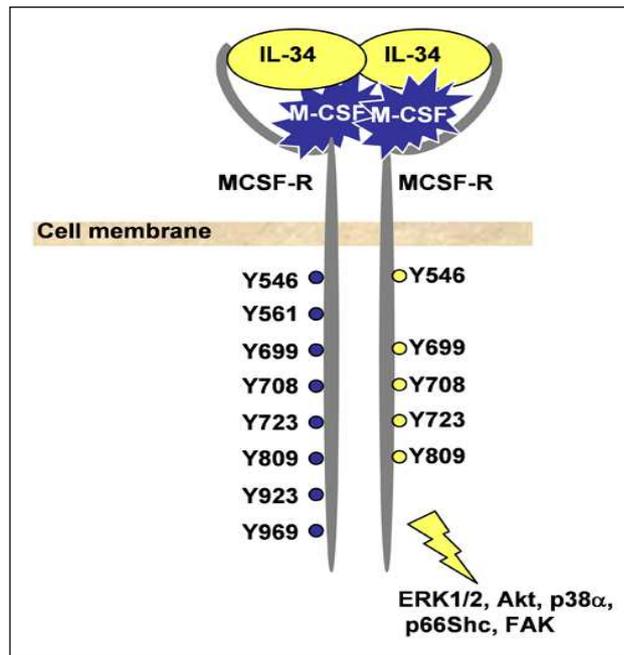


Fig 8. Fixation de IL-34 et M-CSF sur le récepteur au MCSF d'après Heymann D , 2012

Enfin au cours du développement, l'IL-34 a montré une expression spatiotemporelle distincte de celle du M-CSF (Lin et al., 2008) en particulier dans la peau et le cerveau.

MCSF et IL-34 régulent donc la différenciation et la prolifération des cellules issues de la lignée monocytaire qui sont donc constituées des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans et des ostéoclastes. Leurs expressions, localisations et rôles au cours du développement et à l'âge adulte ont été précisés par de nombreux modèles génétiques, comme les souris déficientes totales et conditionnelles (restreints à certaines cellules). Ces cellules sont présentes dans la rate, le foie, la moelle osseuse et les ganglions mais également le cerveau. Elles s'appellent cellules de la microglie dans le cerveau, de Küpfer dans le foie, et de Langerhans dans l'épiderme. Ainsi la délétion de MCSF ou de MCSF-R conduit à une forte réduction des monocytes, macrophages et ostéoclastes. La comparaison des trois modèles de souris déficientes, MCSF^{-/-}, MCSF-R^{-/-} et IL-34^{-/-} est très instructive. Les souris MCSF-R^{-/-} ont le phénotype le plus sévère avec une mortalité augmentée, une forte ostéopétrose (liée au manque d'ostéoclaste), une déplétion totale en monocytes, macrophages, cellules microgliales et cellules de Langerhans. Les MCSF^{-/-} présentent globalement le même phénotype, sous une forme un peu moins sévère avec

une délétion incomplète dans chacun de ces types cellulaires.(Nakamichi et al., 2013). On note d'ailleurs de façon intéressante une restauration partielle du phénotype avec le temps, expliquée plus tard par d'autres études par une augmentation du taux d'IL-34 (Nakamichi et al., 2013). Enfin les souris IL-34^{-/-} présentent, sans que les monocytes ni les macrophages ne soient atteints, uniquement une forte réduction du nombre de cellules micro-gliales et des cellules de Langherans. Pour la microglie, IL-34 agirait dans la maintenance et non dans l'embryogénèse comme en témoigne la présence normale de microglie au sein des fœtus murins IL-34^{-/-} et son absence chez ces mêmes souris IL-34^{-/-} à l'âge adulte; contrairement aux cellules de Langherans dont l'embryogénèse est atteinte chez les fœtus IL-34^{-/-} (Greter et al., 2012). Ainsi le rôle de l'IL-34 dans la peau et le cerveau a été particulièrement étudié. Mizuno et ses collaborateurs se sont intéressés à son potentiel rôle cérébral dans la genèse de certaines démences. Ils ont en effet démontré que les neurones produisaient de l'IL-34, que la microglie exprimait le MCSF-R, et qu'IL-34 promouvait la prolifération de la microglie et augmentait la clairance d'une substance β -amyloïde dont l'accumulation entrainerait certaines démences. IL-34 aurait donc un rôle protecteur dans ces pathologies (Mizuno et al., 2011).

Pour la peau, il a été montré une surexpression d'IL-34 par les kératinocytes, cette expression étant par ailleurs supérieure à celle du MCSF (Ginhoux and Merad, 2010). De plus au sein de l'épiderme IL-34 apparaît comme le seul ligand du MCSF-R, contrairement au derme dans lequel IL-34 et MCSF sont exprimés (Greter et al , 2012). IL-34 présente donc de fortes homologues avec le MCSF mais de nombreux éléments notamment à travers ces modèles de souris déficientes ont permis de mettre en évidence de nettes différences.

Parmi ces différences, un autre récepteur propre à l'IL-34 a été identifié appelé protéine-tyrosine-phosphatase ζ (PTP- ζ), exprimé sur les cellules progénitrices neurales et les cellules gliales en particulier dans les glioblastomes humains (Nandi et al., 2013).Notre équipe a par ailleurs récemment décrit le syndecan 1 comme un nouveau récepteur d'IL-34 sur les cellules myéloïdes (Segaliny et al., 2015)

B. Rôle dans l'ostéoclastogenèse

L'IL-34 a démontré sa capacité à se substituer au MCSF *in vitro* dans des modèles murins et humains de différenciation ostéoclastique induite par RANKL, étayant l'existence de voies d'ostéoclastogenèse non canoniques. La différenciation ostéoclastique était attestée par la détection en qPCR de marqueurs spécifiques (TRAP, NFATc1 et cathepsin K) et d'un point de vue fonctionnel par la capacité des ostéoclastes à résorber une matrice minéralisée. Il est intéressant de remarquer que la différence d'affinité de ces cytokines : IL-34 et MCSF pour leur récepteur semble se confirmer ici. Ainsi, des concentrations plus fortes d'IL-34 sont nécessaires pour induire une même ostéoclastogenèse.

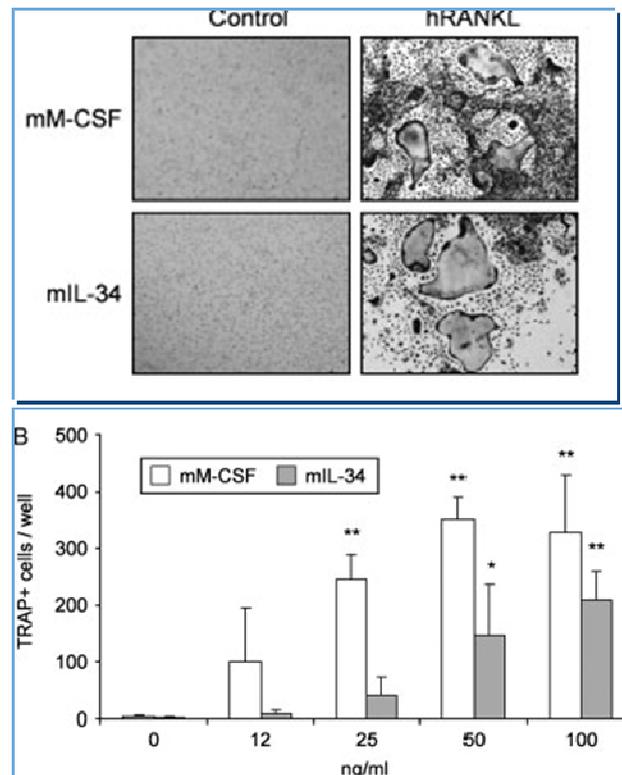


Fig.9. Ostéoclastogenèse induite en présence d'IL-34 et de RANKL sans MCSF
(Baudhuin et al 2010)

En immunohistochimie, la présence d'IL-34 au sein des ostéoclastes a été montrée initialement sur des coupes de patients porteurs de tumeurs osseuses à cellules géantes avec une forte activité résorptive osseuse (Baud'huin et al., 2010a)

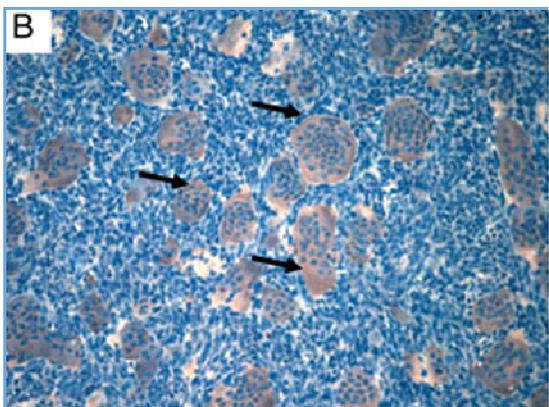


Fig. 10 : Immunomarquage IL-34+ au sein d'ostéoclastes sur des coupes de tumeurs à cellules géantes (Baud'huin et al 2010)

Le rôle de l'IL-34 sur l'ostéoclastogénèse a été confirmé *in vivo* à travers une diminution du volume osseux (mesuré par microscanner) chez des souris traitées par de l'IL-34 recombinante pendant une à deux semaines, avec de façon concomitante une augmentation de la proportion de cellules CD11b⁺ (ostéoclastes murins) dans l'os trabéculaire (Chen et al., 2011). De plus, l'administration d'IL-34 permet de totalement reverser le phénotype d'ostéopétrose des souris déficientes en MCSF (Wei et al., 2010). Enfin chez ces mêmes souris déficientes pour le MCSF on observe, avec l'âge, une augmentation du taux d'IL-34 osseux et splénique, associée à une restauration partielle du phénotype ostéopétrotique et à une reprise de l'ostéoclastogénèse (Nakamichi et al., 2012).

C. Rôle dans la réponse inflammatoire

L'IL-34 est aussi impliquée dans la réponse inflammatoire. Ainsi des macrophages, induits en présence de M-CSF ou d'IL-34, présentent un phénotype et une capacité de phagocytose similaire. Ils se distinguent, cependant, par leur capacité de sécrétion des chémokines MCP-1 et eotaxin-2 et par des différences dans la réponse anti-virale (avec par exemple des taux de réplication différente du virus HIV-1 dans les 2 types de macrophages) (Chihara et al., 2010). L'IL-34 a également démontré une capacité d'induction de la migration cellulaire plus faible que celle du M-

CSF sur la lignée macrophagique J774A.1. L'IL-34 et le M-CSF ont la capacité d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α mais également des chémokines IP-10, interleukine-8 (IL-8) et MCP-1 (Eda et al., 2010) par les cellules du sang totale humain. On observe également une sécrétion d'IL-34 par les ostéoblastes stimulée par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α .(Eda et al., 2010). Cette induction est, pour l'IL-34, dépendante des voies de signalisation JNK et ERK1/2 mais pas de p38 MAPK. Dans le cas du M-CSF, aucune de ces voies n'est impliquée, soulignant de nouveau les implications distinctes de ces deux cytokines.

L'interleukine 34 semble donc jouer **deux rôles clefs**, l'un dans la différenciation ostéoclastique et la dégradation osseuse et l'autre dans l'inflammation ; raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à décrire son expression au sein de la synovite rhumatoïde, et à tenter de comprendre son potentiel rôle au sein de cette pathologie.

II Article 1

CONCISE REPORT

Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients

M Chemel,¹⁻³ B Le Goff,¹⁻³ R Brion,¹⁻³ C Cozic,¹⁻³ M Berreur,^{1,2} J Amiaud,^{1,2} G Bougras,^{1,2} S Touchais,³ F Blanchard,^{1,2} M F Heymann,^{1,2} J M Berthelot,¹⁻³ F Verrecchia,^{1,2} D Heymann¹⁻³

► Additional supplementary data (tables and figures) are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://ard.bmj.com/content/71/1.toc>).

¹INSERM, UMR 957, France
²Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France
³Pôle Ostéoarticulaire, CHU de Nantes, Nantes, France

Correspondence to

Professor Dominique Heymann, INSERM UMR-S 957, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France; dominique.heyman@univ-nantes.fr

MC and BLG contributed equally to this work.

Received 20 April 2011
 Accepted 20 September 2011
 Published Online First
 28 October 2011

ABSTRACT

Objectives Interleukin (IL) 34 is a new cytokine implicated in macrophage differentiation and osteoclastogenesis. This study assessed IL-34 expression in the tissue of patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods Immunohistochemistry was performed in synovial biopsies from patients with RA (n=20), osteoarthritis (n=3) or other inflammatory arthritis (n=4). IL-34 was detected in the synovial fluid by ELISA and its messenger RNA expression was studied by quantitative PCR in rheumatoid synovial fibroblasts after stimulation by tumour necrosis factor α (TNF α) and IL-1 β . Wild-type, *jnk1*^{-/-}-*jnk2*^{-/-} and *nemo*^{-/-} murine fibroblasts and pharmacological inhibition were used to determine the involvement of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and JNK in that effect.

Results IL-34 was expressed in 24/27 biopsies, with three samples from RA patients being negative. A significant association was found between IL-34 expression and synovitis severity. Levels of IL-34 and the total leucocyte count in synovial fluid were correlated. TNF α and IL-1 β stimulated IL-34 expression by synovial fibroblasts in a dose/time-dependent manner through the NF- κ B and JNK pathway.

Conclusion This work for the first time identifies IL-34 expression in the synovial tissue of patients with arthritis. This cytokine, as a downstream effector of TNF α and IL-1 β , may contribute to inflammation and bone erosions in RA.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterised by chronic inflammation of the synovial tissue that leads to progressive joint destruction. Among the cells located in the inflamed joint, synovial fibroblasts are important players driving inflammation and bone erosion.¹ They are recognised as a source of cytokines such as interleukin (IL) 6 or RANKL, which activate immune response and osteoclastogenesis. There is evidence that colony-stimulating factors play a major role in inflammation and bone destruction in RA.² Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) is the primary regulator of the biology of mononuclear phagocytes and is also essential for osteoclastogenesis.³ In the synovial tissue of RA patients, it is expressed by macrophages but also by synovial fibroblasts and is upregulated by inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor alpha (TNF α).²⁻⁴ Furthermore, M-CSF knockout mice are protected against collagen-induced arthritis, and M-CSF administration exacerbates inflammation and joint

destruction.^{2,5} In this context, therapeutic targeting of M-CSF is currently being developed.²

IL-34 is a newly discovered cytokine that plays a role in macrophage differentiation and proliferation.⁶ IL-34 is expressed in various tissues and it is most abundant in the spleen. This cytokine shares numerous common features with M-CSF, especially its receptor, partly explaining their functional overlap. However, their interaction with M-CSF receptor, the signalling pathway activated and their expression patterns differ during embryonic development underlining their probable specific biological function.⁷ We have recently shown that IL-34 could be substituted for M-CSF to promote osteoclastogenesis in vitro.⁸ Its role in inflammation is also likely, as IL-34 increases IL-6 and chemokine levels in human whole blood.⁹ Although numerous studies have underlined the role of M-CSF in arthritis, no data are currently available on the expression of IL-34 in RA.

In this study, we hypothesised that IL-34 could be expressed by the synovial fibroblasts of RA patients and this expression could be modulated by TNF α and IL-1 β .

METHODS**Synovial fluid and biopsies**

Synovial biopsies were obtained surgically at the time of arthroplasty and are summarised in supplementary table S1 (available online only). All patients enrolled have given their formal consent. The study was approved by the local ethics committee and by the French Research Ministry (no 2008-402). The mean (\pm SD) duration of RA was 11 \pm 5 years and the mean synovitis score was 4.4 \pm 1.9 (range 2-8). The mean scores of synovial hyperplasia, stroma activation and inflammatory infiltrates were 1.3 \pm 1.2, 1.5 \pm 0.6 and 1.6 \pm 0.5, respectively (supplementary table S1, available online only). IL-34 expression was detected by immunohistochemistry performed as previously described.⁸ The histopathological severity of synovitis was graded as described by Krenn *et al.*¹⁰ IL-34 levels were measured in synovial fluids by ELISA assay (antibodies-online-GmbH, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Cell cultures

Synovial fibroblasts, obtained from the synovial tissue of RA patients, human fibroblasts (WI-26) and murine wild-type, *jnk1*^{-/-}-*jnk2*^{-/-} and *nemo*^{-/-} fibroblast cell lines were cultured as previously described.¹¹⁻¹⁴

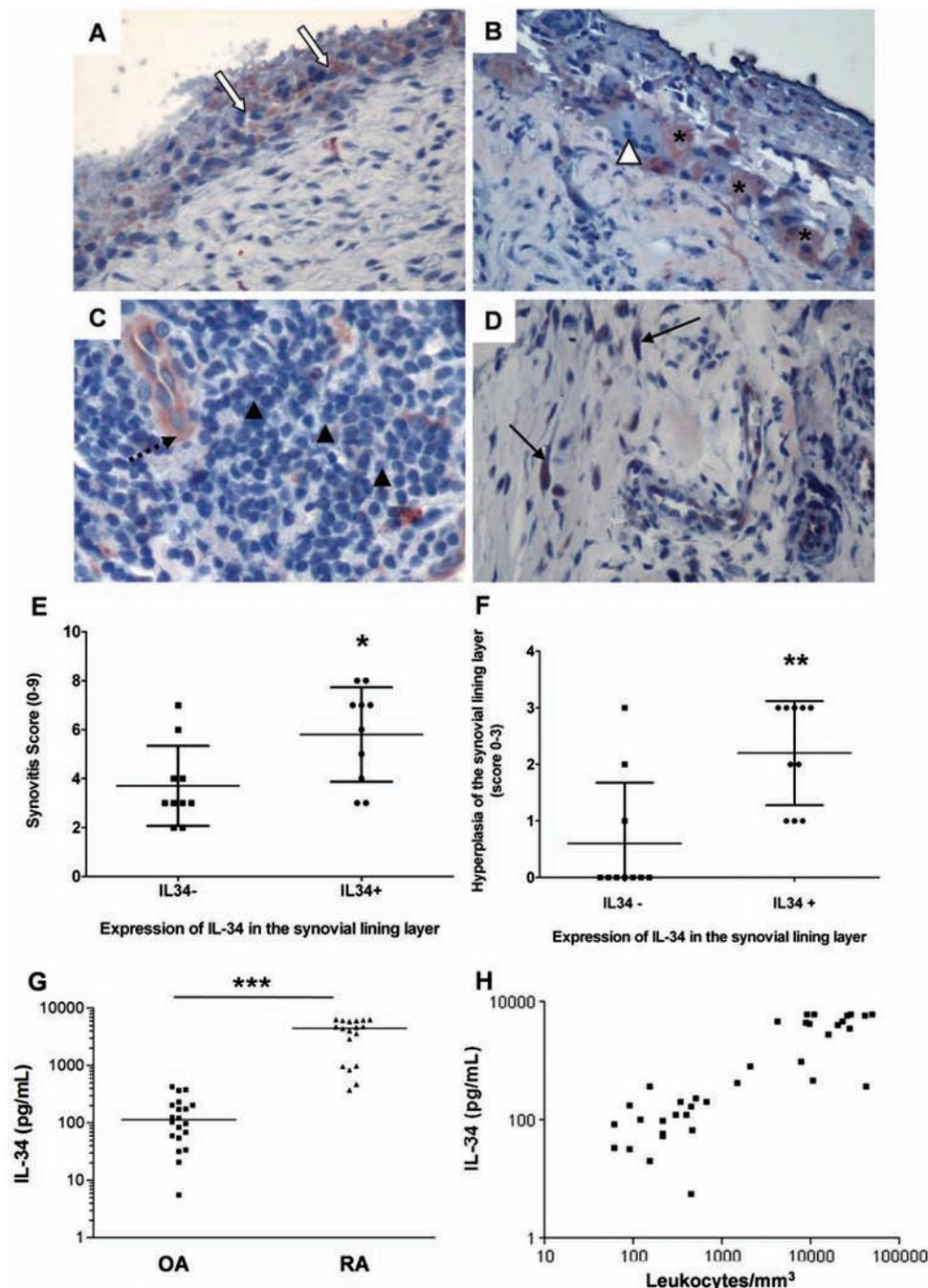


Figure 1 IL-34 is expressed in the synovial tissue of patients with osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA). Representative immunohistochemical staining for IL-34 (red staining) (ab75723, Abcam, France) in synovial biopsy samples from patients with RA. (A–D) IL-34 was expressed in the synovial lining layer by synoviocytes (open arrow) (A), multinucleated giant cells (open triangle) and macrophages (asterisk) (B). In the sublining layer, endothelial cells (dotted arrow), inflammatory cells (triangle) and fibroblasts (arrow) were also positive for IL-34 (C, D). Comparison of the mean synovitis score (from 0, slight synovitis to 9, strong synovitis) (E) and mean hyperplasia of the lining layer score (from 0, no hyperplasia to 3, major hyperplasia) (F) according to the expression of IL-34 in the synovial lining layer; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared with the IL-34⁻ group. (G) Comparative levels of IL-34 measured by ELISA (ref ABIN455583) in synovial fluids in osteoarthritis and RA patients, each plot being an individual sample, *** $p < 0.001$. (H) Correlation between IL-34 levels and total leucocyte counts in the synovial fluids of patients with RA and osteoarthritis, $r = 0.82$, $p < 0.0001$.

Reverse transcription PCR analysis

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and 1 μ g total RNA was used for first strand complementary DNA synthesis using the ThermoScript kit (Invitrogen, Paris, France).⁸ Real-time PCR was performed using SYBRGreen Supermix (Biorad, Marnes-La-Coquette, France) and primers described in supplementary table S2 (available online only).

Statistical analysis

The Mann–Whitney test was used to look for an association between IL-34 expression and histological characteristics. Correlation between the level of IL-34 and the leucocyte count in synovial fluid was measured using the non-parametric Spearman rank order test. Student's t-test was used to assess the change in gene expression; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

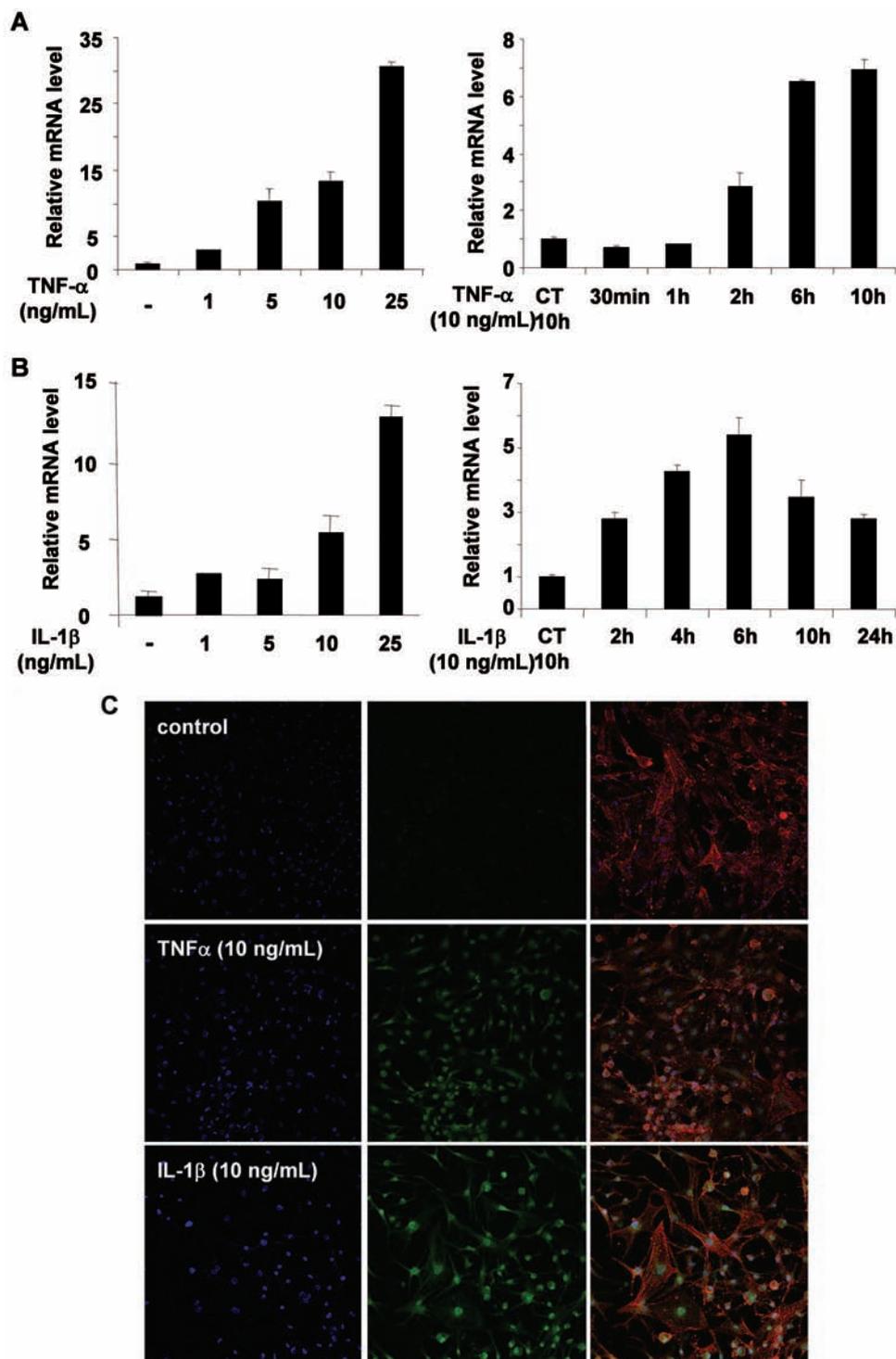


Figure 2 Tumour necrosis factor alpha (TNF α) and IL-1 β induce IL-34 mRNA expression in rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblasts. Synovial fibroblasts from RA patients (n=3) were stimulated with (A) increased dose of TNF α (1–50 ng/ml) for 6 h or with TNF α 10 ng/ml for 2 h, 6 h, 10 h and 24 h, and (B) increased dose of IL-1 β (1–25 ng/ml) for 6 h or with IL-1 β 10 ng/ml for 2 h, 6 h, 10 h and 24 h. After incubation, IL-34 mRNA levels were determined by real time reverse transcription PCR, normalised to GAPDH. (C) Synovial fibroblasts cultured on labtek chamber slides (Millipore, France) were treated or not with TNF α (10 ng/ml) or IL-1 β (10 ng/ml) for 24 h. IL-34 expression (green), actin filaments detected by alexa fluor 546-conjugated phalloidin (red), and nuclei stained by DAPI (blue) were observed by confocal microscopy. A representative experiment is shown.

RESULTS

IL-34 is expressed in the synovial tissue of RA and osteoarthritis patients

We first assessed the expression of IL-34 in synovial tissue in synovial biopsies from patients with RA (n=20), osteoarthritis (n=3) or other inflammatory arthritis (n=4) (see supplementary

table S1, available online only). According to the grading system of all the biopsies, 11 had slight synovitis, nine had moderate synovitis and seven had strong synovitis. IL-34 was detected in 24 of the 27 biopsies, with three samples from RA patients being negative. In the synovial tissue, IL-34 was expressed in the synovial lining layer by synoviocytes and macrophages (figure 1A,B)

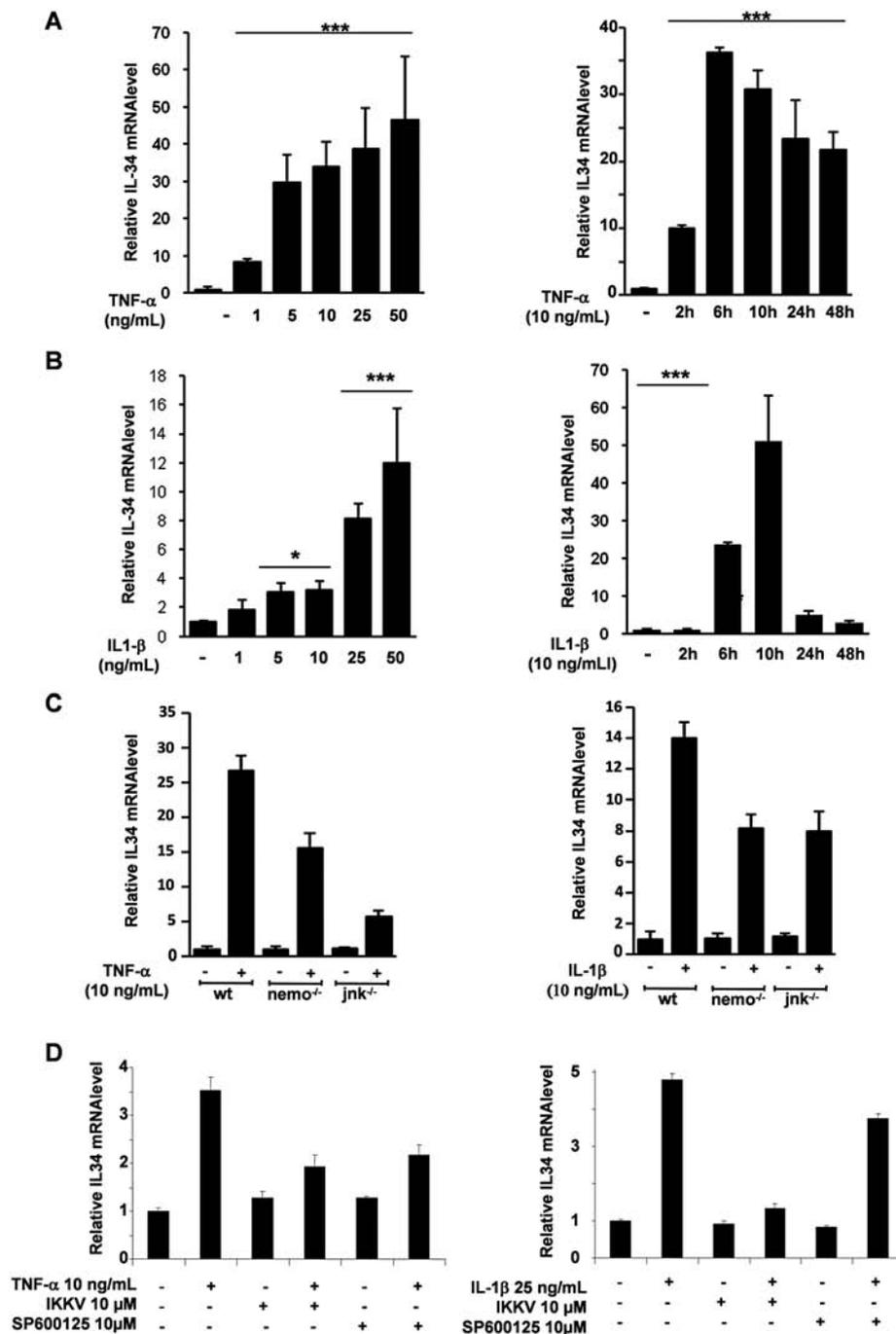


Figure 3 JNK and nuclear factor kappa B (NF-κB) activities are required for tumour necrosis factor alpha (TNFα) and IL-1β to stimulate IL-34 mRNA levels in fibroblasts and synoviocytes. WI-26 fibroblast cells were treated either with 10 ng/ml TNFα (A) or 10 ng/ml IL-1β (B) for 2 h, 6 h, 10 h, 24 h and 48 h (right panels) or with various concentrations of TNFα or IL-1β (1, 5, 10, 25 and 50 ng/ml) for 24 h, as indicated. After incubation, IL-34 mRNA steady-state levels were determined by real time reverse transcription (RT)-PCR. The expression of the housekeeping gene GAPDH was used as control. (C) Wild-type *nemo*^{-/-} and *jnk*^{-/-} fibroblasts were cultured in the presence or the absence of 10 μM JNK inhibitor (JNK II) or 10 μM IKKβ inhibitor V (IKKV). One hour later 10 ng/ml TNFα or IL-1β were added for 6 h. IL-34 mRNA steady-state levels were then determined by real time RT-PCR. Bars indicate mean±SD of two independent experiments performed, each with duplicate samples. *p<0.05; ***p<0.001 compared with the control. (D) Human synovial fibroblasts were treated with with or without 10 μM JNK inhibitor or IKKβ inhibitor V. One hour later 10 ng/ml TNFα or IL-1β were added for 6 h. After incubation, IL-34 mRNA steady-state levels were determined by real time RT-PCR. A representative experiment is shown.

as confirmed by the double immunostaining for IL-34 and CD68 (see supplementary figure S1, available online only) and in the sublining layer by endothelial cells and fibroblasts (figure 1C,D). In RA patients, a significant association was found between IL-34 expression in the synovial lining layer and the histological severity of synovitis, with a mean score of synovitis of 5.8±1.9 and 3.7±1.6 in IL-34-positive and negative biopsies,

respectively (p=0.022; figure 1E). IL-34 expression within the synovial lining layer is also associated with synovial hyperplasia/enlargement: the mean score of hyperplasia was 2.2±0.9 and 0.6±1 in biopsies with and without IL-34-positive cells, respectively (p=0.004; figure 1F). No significant association was found between IL-34 expression and the diagnosis. Interestingly, IL-34 levels were significantly higher in synovial fluids of RA patients

compared with osteoarthritis patients ($p < 0.05$; figure 1G), and were associated with inflammation intensity measured by the leucocyte counts ($r = 0.82$, $p < 0.001$; figure 1H).

TNF α and IL-1 β increase IL-34 gene expression in rheumatoid synovial fibroblasts

We next assessed the expression of IL-34 by synovial fibroblasts in vitro and its regulation by TNF α and IL-1 β . IL-34 messenger RNA was detectable in non-stimulated cells. Stimulation with TNF α resulted in a significant dose-dependent induction of IL-34 mRNA, with a plateau from 25 ng/ml and a maximum of induction after 6 h with 10 ng/ml (figure 2A). The time course study using 10 ng/ml TNF α shows that this effect remained stable until 24 h (data not shown). Similarly, IL-1 β also dose-dependently increased IL-34 mRNA expression, with a peak reached at 6 h then decreasing quickly thereafter (figure 2B). Confocal microscopy (figure 2C) and flow cytometry (see supplementary figure S2, available online only) analyses confirmed that TNF α and IL-1 β upregulated the expression by synovial fibroblasts of IL-34 at the protein level compared with untreated cells.

JNK and NF- κ B activities are required for TNF α and IL-1 β to stimulate IL-34 mRNA levels in fibroblasts and synoviocytes

TNF α and IL-1 β treatment of WI-26 fibroblasts led to a time and dose-dependent increase in IL-34 mRNA levels (figure 3A,B). Rapid and persistent induction of IL-34 mRNA levels was observed in response to TNF α (10 ng/ml; figure 3A) and IL-1 β (10 ng/ml; figure 3B) peaking at 6 h and 10 h, respectively, and remaining at levels significantly higher than their basal expression state up to 24 h and 48 h. To understand the mechanisms by which TNF α and IL-1 β are able to stimulate IL-34 mRNA levels, the role played by the JNK and nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathways was examined, respectively, in immortalised *jnk*^{-/-} and *nemo*^{-/-} fibroblasts (figure 3B,C) and in synoviocytes (figure 3D), with or without specific inhibitors of the JNK and NF- κ B pathways. Results shown in figure 3C (left panel) indicate that the effects of TNF α on IL-34 gene expression was significantly inhibited both in *nemo*^{-/-} and *jnk*^{-/-} cells after 6 h. Finally, treatment of synoviocyte cultures with the specific IKK β inhibitor or JNK inhibitor significantly inhibited (approximately 88% in the presence of 10 μ M IKK β and 28% in the presence of 10 μ M SP600125) the effect of 10 ng/ml TNF α (figure 3D) after treatment of the cells with 10 ng/ml TNF α (figure 3C) or IL-1 β (data not shown). Confocal microscopy analyses confirmed the effects of signalling pathway inhibitors at the protein level (see supplementary figure S3, available online only).

DISCUSSION

Pro-inflammatory cytokines, promoting inflammation and osteoclastogenesis in the arthritic joint, are fundamental to RA pathophysiology.¹⁵ In this study we demonstrated that a newly discovered cytokine, IL-34, is expressed by synovial fibroblasts and that TNF α and IL-1 β stimulate its expression. The present report shows for the first time that IL-34 is expressed in the synovial tissue of patients with arthritis, mainly by the cells of the synovial lining layer and to a lesser extent by fibroblasts and endothelial cells in the sublining layer. Our data support synovial fibroblasts being a source of this cytokine as revealed by IL-34 mRNA and protein expression in vitro. Importantly, our data showed that the expression of IL-34 in the synovial lining layer was associated with the severity of synovitis. IL-34 may have a pro-inflammatory effect, promoting macrophage differentiation and proliferation in synovial tissue. On the other hand, we have shown that pro-inflammatory cytokines are able to increase IL-34 expression by synovial fibroblasts, explaining this association.

Pro-inflammatory cytokines are known to induce the expression of a large range of cytokines, chemokines or metalloproteinases in synovial fibroblasts.¹ We have shown that TNF α and IL-1 β are able to enhance IL-34 expression in RA synovial fibroblasts. These results were confirmed in a human lung fibroblast cell line (WI-26), showing that the expression of IL-34 may extend to other fibroblastic cells. We have shown that JNK and NF- κ B activities, the two main signalling pathways activated by TNF α and IL-1 β ,^{16 17} are required for these cytokines to stimulate IL-34 mRNA levels in fibroblasts and synoviocytes. IL-34 could thus be a downstream effector of IL-1 β and TNF α , mediating their effect on inflammation and osteoclastogenesis.

In view of the role of IL-34 in osteoclastogenesis and inflammation, this cytokine is likely to play a role in the pathogenesis of RA and therefore could constitute a new therapeutic target. Further explorations are needed to delineate the exact role of IL-34 in the inflammatory process associated with RA.

Acknowledgements The authors would like to thank the MicroPICell platform (Nantes University, IFR26) for confocal microscopy and Philippe Hulin for his technical assistance.

Funding This work was supported by the ARTHRITIS Fondation Courtin (to JMB).

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval The experimental procedures followed were carried out in accordance with the ethical standards of the responsible institutional committee on human experimentation and the Helsinki Declaration. The study was approved by the institutional ethics committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;**233**:233–55.
- Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:533–44.
- Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;**18**:39–48.
- Leizer T, Cebon J, Layton JE, et al. Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* 1990;**76**:1989–96.
- Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, et al. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol* 2000;**68**:144–50.
- Lin H, Lee E, Hestir K, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 2008;**320**:807–11.
- Heymann D. Interleukin-34: an enigmatic cytokine. *IBMS BoneKey* 2010;**7**:406–13.
- Baud'huin M, Renault R, Charrier C, et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Pathol* 2010;**221**:77–86.
- Eda H, Zhang J, Keith RH, et al. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine* 2010;**52**:215–20.
- Krenn V, Morawietz L, Häupl T, et al. Grading of chronic synovitis – a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract* 2002;**198**:317–25.
- Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, et al. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 1999;**89**:115–24.
- Schmidt-Suppran M, Bloch W, Courtois G, et al. NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 2000;**5**:981–92.
- Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, et al. A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression. *J Biol Chem* 2003;**278**:1585–93.
- Ciosek CP Jr, Ortel RW, Thanassi NM, et al. Indomethacin potentiates PGE1 stimulated cyclic AMP accumulation in human synoviocytes. *Nature* 1974;**251**:148–50.
- Smolen JS, Redlich K, Zwerina J, et al. Pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: pathogenetic and therapeutic aspects. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;**28**:239–48.
- Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;**107**:7–11.
- Båge T, Lindberg J, Lundeberg J, et al. Signal pathways JNK and NF-kappaB, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNFalpha-induced mPGES-1 and COX-2 expression in gingival fibroblasts. *BMC Genomics* 2010;**11**:241.



Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients

M Chemel, B Le Goff, R Brion, C Cozic, M Berreur, J Amiaud, G Bougras, S Touchais, F Blanchard, M F Heymann, J M Berthelot, F Verrecchia and D Heymann

Ann Rheum Dis 2012 71: 150-154 originally published online October 28, 2011

doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200096

Updated information and services can be found at:
<http://ard.bmj.com/content/71/1/150>

These include:

Supplementary Material

Supplementary material can be found at:
<http://ard.bmj.com/content/suppl/2011/10/28/annrheumdis-2011-200096.DC1.html>

References

This article cites 17 articles, 4 of which you can access for free at:
<http://ard.bmj.com/content/71/1/150#BIBL>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Degenerative joint disease](#) (4298)
[Musculoskeletal syndromes](#) (4594)
[Connective tissue disease](#) (3951)
[Immunology \(including allergy\)](#) (4739)
[Rheumatoid arthritis](#) (3014)
[Pathology](#) (417)
[Clinical diagnostic tests](#) (1202)
[Radiology](#) (1047)
[Surgical diagnostic tests](#) (404)
[Osteoarthritis](#) (878)
[Inflammation](#) (1115)

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

III. Complément de discussion partie I

A . Description de la présence d'une nouvelle cytokine surexprimée dans une synovite inflammatoire

Nous avons donc décrit pour la première et c'est ce qui fait l'originalité de ce travail, l'expression d'IL-34 au sein de la synovite rhumatoïde. Nous avons également pu identifier grâce au co-marquage CD68+/IL-34 les fibroblastes synoviaux comme la source d'IL-34. Nous avons, par différentes approches, pu démontrer que cette expression était accrue dans un contexte inflammatoire de synovite rhumatoïde. Ainsi l'intensité du marquage au sein des coupes de synovites rhumatoïdes était d'autant plus importante que la synovite était sévère, utilisant pour cela le score de Krenn qui prenait en compte l'hyperplasie, l'infiltrat cellulaire et l'activité des cellules résidentes (Krenn et al., 2002). Les dosages biologiques d'IL-34 au sein des liquides synoviaux des patients confirmaient également ce phénomène avec un taux d'IL-34 plus important dans les liquides les plus inflammatoires. Enfin le traitement par TNF- α et IL-1 β des synoviocytes de patients mis en culture augmentait significativement l'expression d'IL-34 au sein de ces cellules (expression d'ARN messager avec un effet dose dépendant et en expression protéique observée en immunocytologie et en cytométrie en flux).

Ces résultats permettent donc de constater une surexpression de cette cytokine dans un contexte de synovite inflammatoire chez des patients atteints de PR. Nous pouvons également noter que cette expression n'est pas complètement spécifique à la PR, puisque l'on retrouvait également la présence d'IL-34, que ce soit en immunohistochimie sur les coupes de membrane synoviale ou dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrose mais son niveau d'expression était plus faible. De la même façon on pouvait stimuler l'expression d'IL-34 par du TNF- α ou de l'IL1 β sur des synoviocytes issus de prélèvements d'arthrose mais cette stimulation était également moins importante.

Il est néanmoins certain que cette démonstration de surexpression cytokinique dans un contexte d'inflammation synoviale ne permet en aucun cas de préciser le rôle exacte de cette molécule dans la cascade de l'inflammation observée dans la PR : s'agit-il d'une molécule régulatrice stimulée en réponse à la « décharge » cytokinique pro-inflammatoire ou au contraire d'une molécule pro-

inflammatoire transmettant un signal d'activation à ces cellules cibles que sont probablement les macrophages ? La question finale étant bien entendue celle de la pertinence clinique à utiliser cette molécule comme cible thérapeutique dans la PR.

La suite des travaux réalisés par notre équipe et par différents auteurs ayant publié leurs résultats à la suite des nôtres, ont tenté de répondre à cette question.

B. Confirmation et précisions apportées à nos résultats

Tout d'abord nos résultats concernant la surexpression de l'IL-34 dans la polyarthrite rhumatoïde ont rapidement été confirmés par d'autres auteurs (Moon et al., 2013) et (Hwang et al., 2012a) que ce soit concernant son taux augmenté au sein des liquides synoviaux de patients, que sa surexpression sur les membranes synoviales ou encore la stimulation obtenue sur des fibroblastes de patients en culture après stimulation par le $TNF\alpha$.

Quant à la fonction de cette cytokine dans la PR, ces derniers auteurs ont, en particulier, étayé son potentiel rôle dans les destructions locales ostéo-articulaires, en constatant une corrélation positive entre le taux d'IL-34 dans les liquides synoviaux de patients porteurs de polyarthrite rhumatoïde et celui d'IL-6 et de RANKL (Hwang et al., 2012a). Ces dernières étant, en effet, impliquées dans la dégradation du cartilage et dans de l'activité ostéoclastique aboutissant à la destruction de l'os sous-chondrale. Par ailleurs, ces auteurs ont confirmé nos résultats obtenus *in vitro* sur des synoviocytes de patients, montrant également le caractère fonctionnel de l'IL-34 ainsi produite (Hwang et al., 2012a). En effet les surnageants de culture de ces synoviocytes stimulés, permettaient d'obtenir une différenciation ostéoclastique à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) humaines en culture, en présence de RANKL. Cet effet était réversible après utilisation d'un anticorps anti-IL-34 (Hwang et al., 2012b). Cet effet pouvant être direct ou indirect via l'intermédiaire des lymphocytes. En effet l'utilisation de PBMC contenant des monocytes et des lymphocytes peut laisser imaginer un effet indirect de l'IL-34 agissant sur la différenciation ostéoclastique des monocytes, via la stimulation des lymphocytes et la sécrétion par ces derniers de facteurs pro-résorptifs tels que l'IL-17.

Par la suite, à partir de ces résultats, *in vitro*, certains ont cherché à vérifier la pertinence clinique de cette nouvelle cytokine à l'activité pro-ostéoclastique. Il apparaissait alors que le taux sérique d'IL-34 mesuré chez 100 patients atteints de PR était significativement corrélé à la variation du score de SHARP à un an. Ces auteurs concluaient donc à un potentiel rôle prédictif de cette cytokine dans la progression structurale dans la PR. Les taux d'IL-34 étaient par ailleurs associés à la positivité du facteur rhumatoïde, au tabagisme et aux marqueurs du syndrome inflammatoire biologique : vitesse de sédimentation et CRP (Chang et al., 2015). D'autres ont confirmé ces résultats avec une étude mesurant le taux sérique d'IL-34 dans un groupe de 83 patients avant et à 4 et 12 semaines d'un traitement par anti TNF- α (etanercept). Les taux de la cytokine diminuaient sous traitement, tout comme l'activité de la maladie (variation du DAS 28) et le taux des cytokines inflammatoires (IL8, MMP-3 et IL-6). Concernant l'évolution structurale, les taux d'IL-34 étaient plus élevés chez les patients présentant des scores de destructions radiographiques élevés (Zhang et al., 2015).

Enfin certains auteurs se sont posé la question d'un impact du taux d'IL-34 sérique en pratique clinique sur la prédiction de la réponse ultérieure aux anti TNF- α . En mesurant différentes cytokines avant traitement et en corrélant ces taux à la réponse clinique aux anti TNF- α observée ultérieurement à 1 et 3 mois de traitement, ils constataient que des taux d'IL-34 sérique bas apparaissaient comme un facteur de bon pronostic de bonne réponse thérapeutique à 3 mois, tout comme une vitesse de sédimentation basse <60 mm/h. Cependant cette étude n'a pas tiré de conclusion sur la réponse structurale, les résultats en terme de variation du score d'évaluation structurale (score de SHARP) n'étant pas significatifs, très probablement du fait du faible temps de suivi (3 mois) (Ding et al., 2015).

L'utilisation de l'IL-34 comme cible thérapeutique dans la PR n'a pas encore été envisagée.

En revanche des études ciblant le MCSF dans la PR ont été menées mais limitées par la tolérance. Un essai clinique a été réalisé sur animal puis volontaires sains avec un anticorps monoclonal IgG2 entièrement humain anti M-CSF (PD-0360324) arrêté pour toxicité (cytolyse hépatique et élévation des CPK) (Sadis S, et al, ACR 2009)

Le blocage du récepteur CSFR-1 semble plus prometteur, comme le montre cette étude, utilisant des prélèvements de membrane synoviale de patients cultivés *ex vivo*. Ce système permet le

maintien de l'architecture synoviale et les contacts inter cellulaires, avec en particulier la persistance de sécrétion par les cellules de cytokines et chémokines sous l'influence de stimuli extérieurs. Un traitement par anti CSFR1 sur ces prélèvements permettait une diminution du taux d'IL-6 comparativement à un traitement par placebo, évoquant donc un possible effet anti inflammatoire de cette thérapeutique (Greter et al 2012). Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours chez l'homme (Hume and MacDonald, 2012) ciblant la fonctionnalité du récepteur via différentes stratégies : blocage des voies de signalisation par anti tyrosine kinase , anticorps bloquant la dimérisation du récepteur , blocage du site de liaison des cytokines

C .Pertinence de ces résultats in vivo et suite de nos travaux

Suite à ces observations, nous avons cherché à préciser le rôle de l'IL-34 dans des modèles de PR *in vivo*.

Nous avons ainsi cherché à déterminer la régulation de l'IL-34 ainsi que des autres cytokines pro inflammatoires : TNF- α , IL-1 , et IL-6 au cours d'un modèle murin d'arthrite induite au collagène . Nous avons ainsi quantifié par qPCR les taux d'ARNm de ces différentes cytokines au sein de la membrane synoviale.

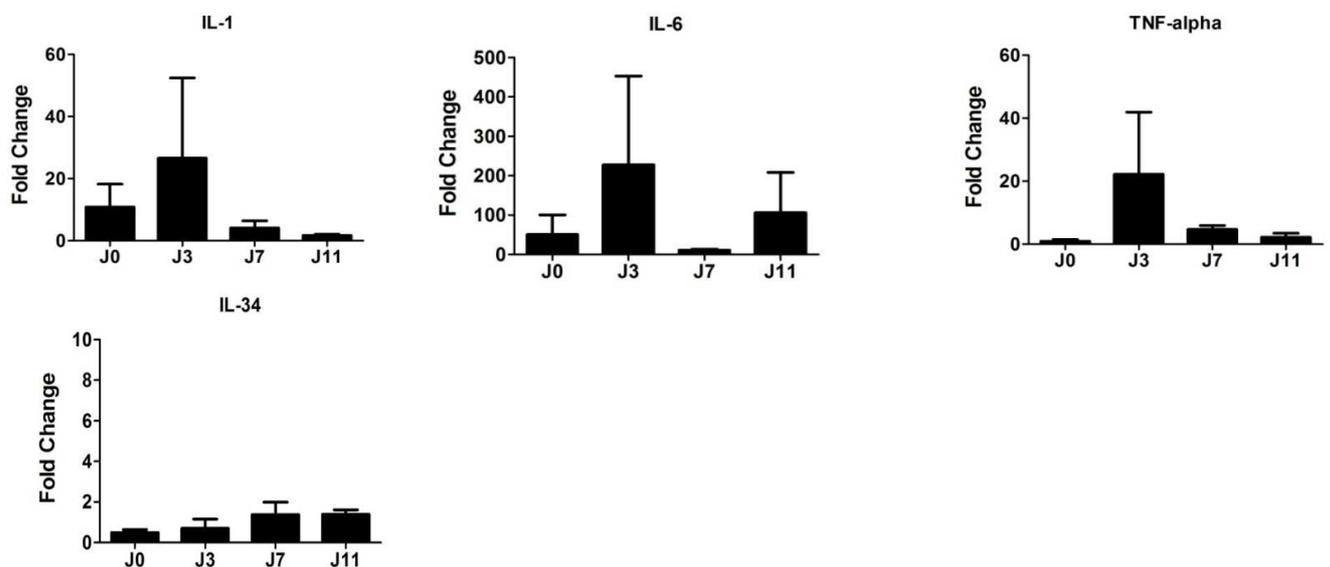


Figure 11 : Absence de régulation du taux d'IL-34 articulaire dans un modèle de CIA

Variations (Fold Change) du niveau d'expression d'ARN messager des cytokines : IL-1, IL-6 , TNF- α et IL-34 au sein de la membrane synoviale au cours un modèle de CIA (J0,J3 ,J7 et J11).

Nous avons donc obtenu la régulation attendue des molécules pro inflammatoires en phase aigüe d'arthrite (avec un pic à J3) validant notre modèle ; en revanche nous n'avons pas observé de régulation significative de l'expression d'IL-34.

Enfin nous avons cherché à voir l'influence de l'administration d'IL-34 en intra articulaire sur un modèle de d'arthrite du genou chez la souris (Antigen Induced Arthritis). Nous n'avons pas constaté de variation significative de l'inflammation locale (score clinique et histologique de synovite) ni de la destruction osseuse locale (taux d'ostéoclastes et scores d'érosions).

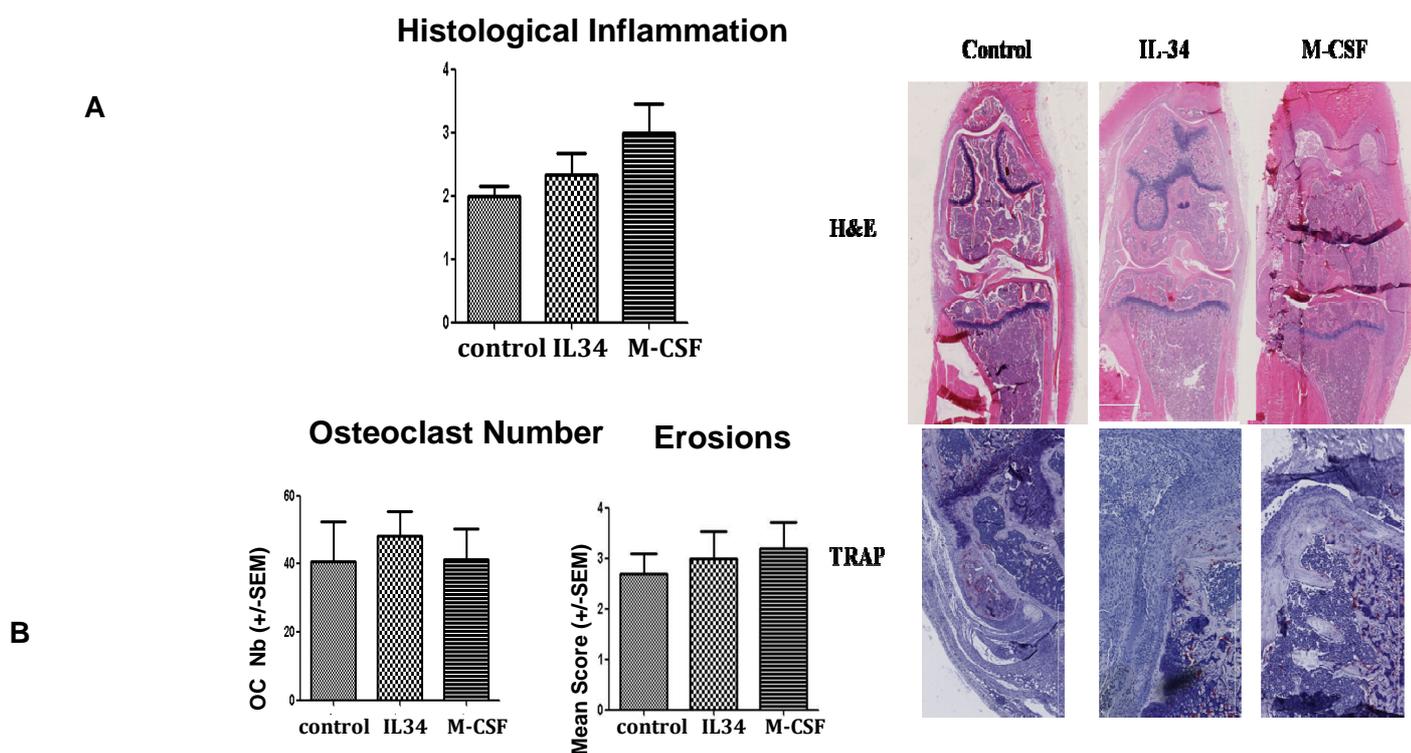


Figure 12 : Absence d'influence de l'administration d'IL-34 en intra-articulaire dans un modèle d'AIA

A . Evaluation de l'inflammation synoviale dans un modèle d'AIA (score de KRENN)

B. Evaluation de la destruction osseuse au cours d'un modèle d'AIA (compte du taux d'ostéoclastes/puits en coloration TRAP et scores d'érosions)

Même si l'on connaît les limites des modèles murins *in vivo* de PR et les limites de ces expériences préliminaires avec un faible nombre d'animaux sacrifiés à chaque temps (n=3) il apparaît alors peu probable que cette cytokine ait un impact direct et à elle seule, sur l'inflammation synoviale et les destructions ostéoarticulaires. Nous avons donc par la suite ciblé nos travaux sur la compréhension de la place de cette cytokine dans les diverses régulations cytokiniques dont le synoviocyte est le centre. Pour cela nous avons réalisé de nouveaux dosages cytokiniques au sein des liquides synoviaux de patients et de nouvelles stimulations *in vitro* toujours sur des synoviocytes de patients mais également sur des cellules souches mésenchymateuses de différentes espèces : humaine, souris et rats. Nous avons en effet pu nous procurer via une collaboration (projet européen Reborne, Dr P. Layrolle, Inserm UMR957) des cellules souches humaines mésenchymateuses (CSM), issues de prélèvements de moelle osseuse de patients, ainsi qu'une lignée de cellules souches commerciales de souris (Gibco), enfin nous avons obtenu par culture primaire des CSM médullaires de rats. Nous avons ainsi traité ces cellules dans le but de tester l'effet de différentes cytokines sur la régulation d'IL-34 et d'ainsi mieux décrire les boucles de régulation pouvant faire interagir entre elles les principaux acteurs de la synovite rhumatoïde et de la destruction ostéoarticulaire (balance ostéoblastes/ostéoclastes). Les trois traitements avec lesquels on observait une régulation significative des taux d'expression d'IL34 produite par ces différents types cellulaires étaient : **la vitamine D3, la BMP-2 et le TGF- β** . Les autres paramètres testés étant d'autres facteurs connus pour leur influence dans l'ostéoblastogénèse : PTH, estradiol, testostérone, ceux-ci ne régulaient pas l'expression d'IL-34.,

Les résultats obtenus avec les ostéoblastes en présence de vitamine D3 confirmaient les données de la littérature avec un effet positif *in vitro* d'un traitement par vitamine D3 sur la synthèse d'IL-34 (Nakamichi et al., 2012). Ces auteurs concluaient à un à un effet pro-ostéoclastogène de la vitamine D3 via IL-34. Ils observaient en effet chez la souris, après traitement par de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de façon parallèle à une augmentation de l'activité d'ostéo-résorption, du nombre d'ostéoclastes et d'une hypercalcémie, une surexpression d'IL-34 dans la rate où se situent les pré-ostéoclastes. (Les pré-ostéoclastes pouvant migrer de la rate vers l'os sous l'influence de stimuli dont la vitamine D3) mais également en site osseux par les ostéoblastes. La rate pouvant ainsi se comporter comme un réservoir de pré-ostéoclastes sensibles à la vitamine D3, et à la

surexpression d'IL-34 qui en découle. La surexpression d'IL-34 dans la rate étant d'ailleurs connue depuis sa description initiale en 2008 (Lin et al., 2008)

Nous avons pu également démontrer une répression de l'expression d'IL-34 par la BMP-2 et le TGF- β et ce sur tous les types de CSM et d'ostéoblastes testés, ce qui n'était jamais été décrit au préalable. Nous avons donc par la suite cherché à caractériser les possibles interactions entre ces différentes cytokines et c'est l'objet de notre seconde publication.

Partie II : Régulation de l'Il-34 par BMP-2

et TGF- β

I Introduction :

A.Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)

1.Super-famille du TGF- β

La super-famille du TGF- β regroupe un grand nombre de cytokines structurellement très conservées, constituées en particulier des TGF- β , des activines, des inhibines, des BMPs (Bone Morphogenic Proteins), des GDFs (Growth Différenciation Factors), et des GDNFs (Glial-Derived Neurotrophic Factors). Ces polypeptides sont généralement regroupés en deux grandes sous-familles : les BMPs et les TGF β /activine. Ces cytokines, produites par de nombreux types de cellules , régulent de multiples fonctions cellulaires comme la migration, l'adhésion, la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Massagué and Wotton, 2000). Chez les mammifères, la famille du TGF- β présente 3 isoformes, les TGF- β 1, β 2 et β 3. Le TGF- β 1 régule de nombreuses fonctions physiologiques et une dérégulation de la réponse au TGF- β 1 est observée dans de nombreuses pathologies comme les cancers ou la fibrose.

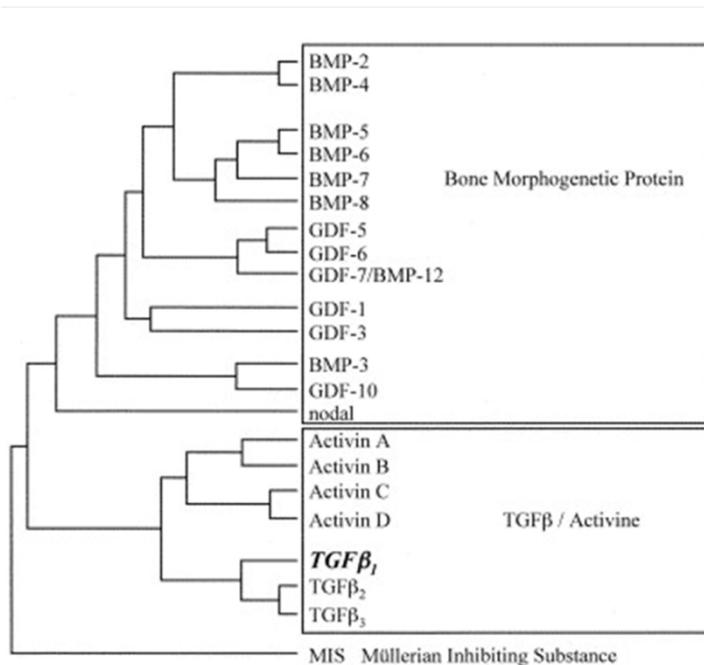


Figure 13 : Membres de la super famille du TGF-β (d'après Dennler et al., 2006)

2.Voies de signalisation

Contrairement aux BMPs, les TGF-βs sont sécrétés sous forme de complexes biologiquement inactifs stockés, en partie, dans la matrice extracellulaire. L'activation des TGF-βs nécessite soit l'action de protéases, telles que la plasmine ou la thrombine, soit des changements conformationnels par interaction avec la thrombospondine-1 par exemple (Annes et al., 2003). L'activation des voies de signalisation des TGF-βs ou des BMPs est initiée par la fixation du ligand à des récepteurs membranaires. Ces récepteurs sont divisés en deux types, les récepteurs de types I et de type II. Cinq récepteurs de type I et sept récepteurs de type II ont été identifiés chez les vertébrés (ten Dijke P Trends Biochem Sci 2004). Ils ont tous en commun la présence de kinases sérines/thréonines transmembranaires. Les récepteurs de type I ont d'avantage d'homologies de séquences que les type II, en particulier pour le domaine kinase. En l'absence de ligand ces récepteurs sont présents à l'état d'homodimères dans la membrane plasmique.

Suivant le moment de leur description les récepteurs de type I ont reçu successivement plusieurs noms : la convention a été d'utiliser la nomenclature ALK (pour activin receptor-like kinase), puis d'adopter une nomenclature plus descriptive quand chaque ligand a été décrit. Le récepteur de type I au TGF-β, connu sous le nom de ALKV, est appelé TβRI.

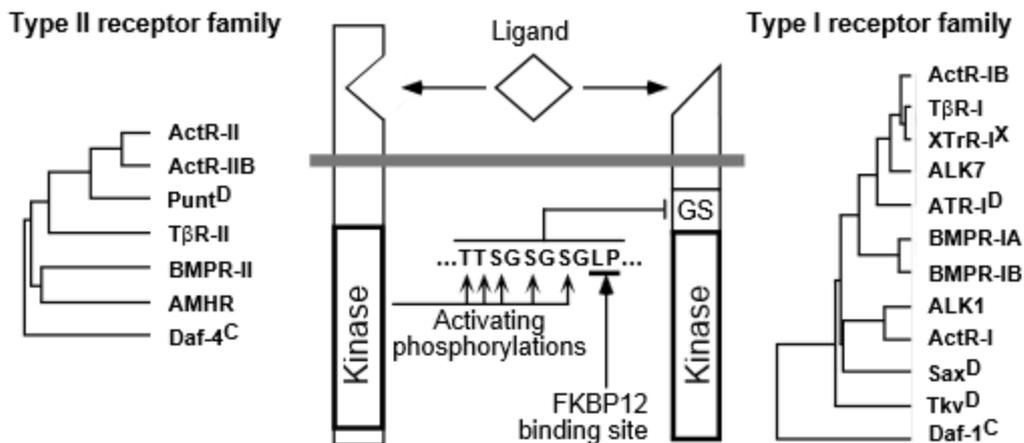


Figure 14 : Récepteurs au TGF (d'après Massagué et al 2000)

La fixation du ligand sur son récepteur permet l'assemblage des 2 types de récepteurs (TβRI et TβRII) en un hétéro-complexe (TβRI/TβRII) qui permet l'activation de TβRI qui va alors stimuler un médiateur intracellulaire appartenant à la famille des protéines Smads. A ce jour, huit protéines Smads différentes divisées en trois classes fonctionnelles ont été décrites:

- les R-Smads (Smad 1, 2, 3, 5 et 8) ou « receptor-regulated Smad », directement phosphorylées et activées par le récepteur de type I. Les protéines Smad2 et Smad3 sont spécifiques de la voie des TGF-βs et sont activées par les récepteurs TβRI. Les protéines Smad1, Smad5 et Smad8 sont spécifiques de la voie des BMPs et sont activées par les récepteurs BMPRI.
- le Co-Smad (Smad 4) ou « co-mediator Smad » commun aux voies activées par les TGF-βs ou les BMPs
- les I-Smad (Smad 6 et 7) ou « inhibitory Smad » régulant négativement les voies de signalisation. Smad7 est capable d'inhiber la phosphorylation du R-Smad en entrant en compétition avec ce dernier pour la liaison au récepteur. Smad7 est également capable de recruter des E3-ubiquitine-ligases, connues sous le nom de Smad ubiquitination regulatory factor 1 et 2 (Smurf1 et 2) qui stimulent la dégradation des récepteurs par le protéasome.

Smad6 inhibe préférentiellement la voie des BMPs et partiellement celle des TGF- β (Imamura T. Nature 1997) alors que Smad7 inhibe les deux voies de signalisation (TGF- β et BMP) (Nakao A. Nature 1997).

Sur le plan structurel, les R-Smads et Co-Smad comprennent 500 acides aminés et contiennent deux domaines structurellement conservés, le domaine N-terminal MH1 et le domaine C-terminal MH2. Le domaine MH1 contient une séquence de liaison spécifique à l'ADN. La séquence N-terminale des I-Smads contient des homologies au domaine MH1 des R-Smads mais n'est pas capable de lier l'ADN. Le domaine MH2 est quant à lui très conservé entre toutes les protéines Smad et est responsable de l'interaction avec les récepteurs, de la formation de complexes Smads et du contact avec le pore nucléaire pour la navette nucléocytoplasmique. Les domaines MH1 et MH2 interagissent avec un grand nombre de protéines du noyau de manière à réguler la transcription. Les R-Smad contiennent un motif de deux résidus sérine SXS caractéristique dans leur domaine MH2 C-terminal sur lequel a lieu la phosphorylation responsable de l'activation des R-Smads.

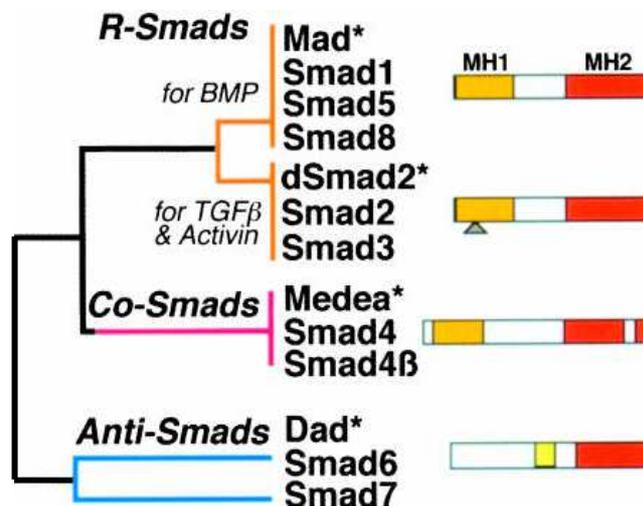


Figure 15 : Famille des smad (d'après Massagué et al , 2000)

La phosphorylation des R-Smad par les récepteurs de type I provoque leur dissociation des protéines d'ancrage (qui les maintenaient à proximité des récepteurs) et permet leur association avec le Co-Smad. L'hétérocomplexe ainsi formé (R-Smad/Co-Smad) va alors être transloqué dans

le noyau où il va pouvoir agir comme facteur de transcription soit seul soit en association avec d'autres facteurs comme p300 par exemple.

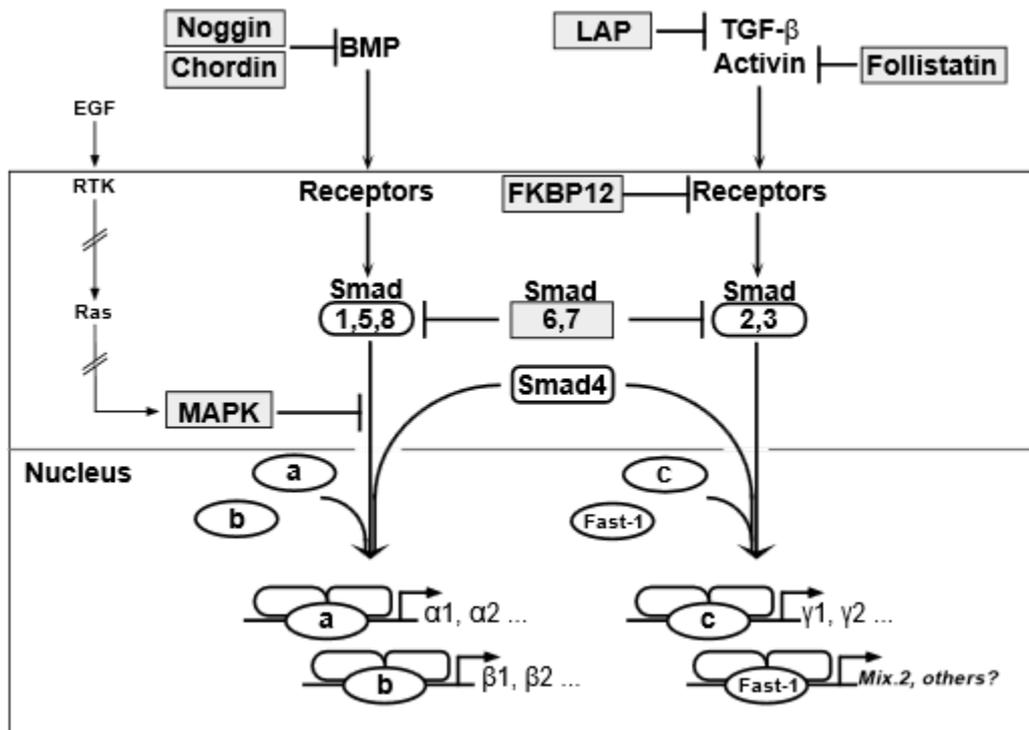


Figure 16 : Voies de signalisation SMAD ,et leurs interactions (d'après Massagué, 1998)

3. Rôle profibrosant du TGF-β1

LE TGF-β est un puissant agent de différenciation, jouant un rôle majeur dans l'organogénèse des mammifères, qui à partir des cellules souches mésenchymateuses induit la différenciation en cellules fibroblastiques, au dépend de l'adipogénèse et de l'ostéoblastogénèse.

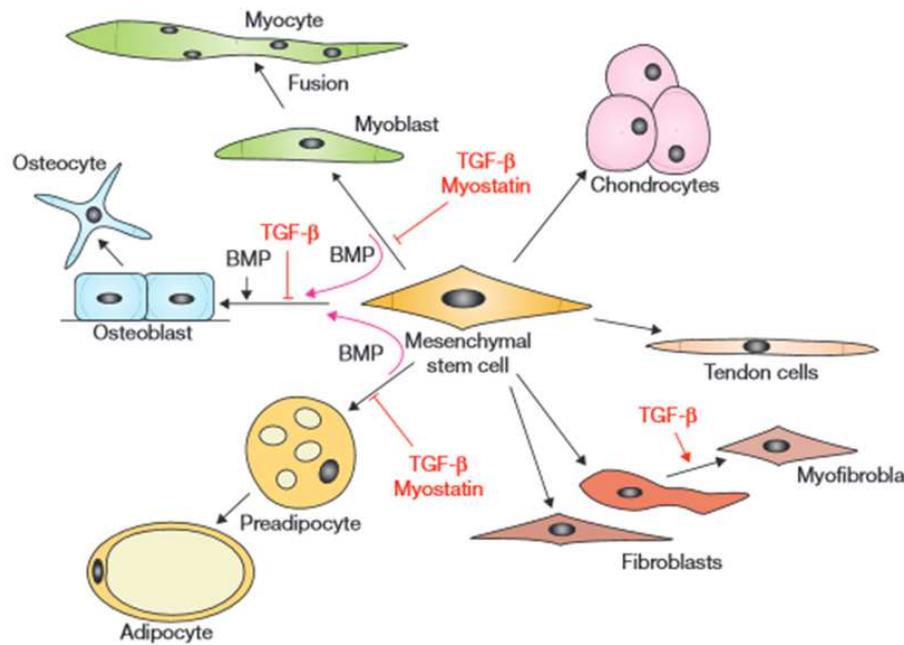


Figure 17 : Cellule souche mésenchymateuse et différentes voies de différenciations induites, rôle du TGF- β (D'après Rick Derynck Nat Cell Biol 2007)

Il est également capable de trans-différenciation, c'est-à-dire de réorienter une cellule différenciée en cellule endothéliale en cellule mésenchymateuse. Ce phénomène encore appelé EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) est crucial au cours du développement embryonnaire, conduisant par exemple, durant le développement du cœur à la formation des valves cardiaques sous l'influence de facteurs de croissance sécrétés par les cellules du myocarde atrio-ventriculaire.

Des modèles *in vivo* sur des souris déficientes en TGF- β ont montré le rôle essentiel de celui-ci dans cette trans-différenciation (Mercado-Pimentel et al., 2007). A l'âge adulte, ce phénomène d'EMT existe en pathologie responsable d'un emballement dans la production de fibroblastes appelé fibrose impliquée dans de nombreuses maladie : fibrose pulmonaire primitive , sclérodermie systémique, néphrite tubulo-interstitielle (Derynck and Akhurst, 2007)... Ce phénomène est également impliqué dans la physiopathologie des métastases de cancers d'origine épithéliale avec un potentiel d'invasion favorisé par ce phénomène d'EMT. Récemment des travaux *in vivo* sur un modèle de tumeur allogreffée chez la souris , ont montré un effet bénéfique de l'administration d'anti TGF- β de façon simultanée à un traitement anti cancéreux par nano particule (Kano et al., 2007).

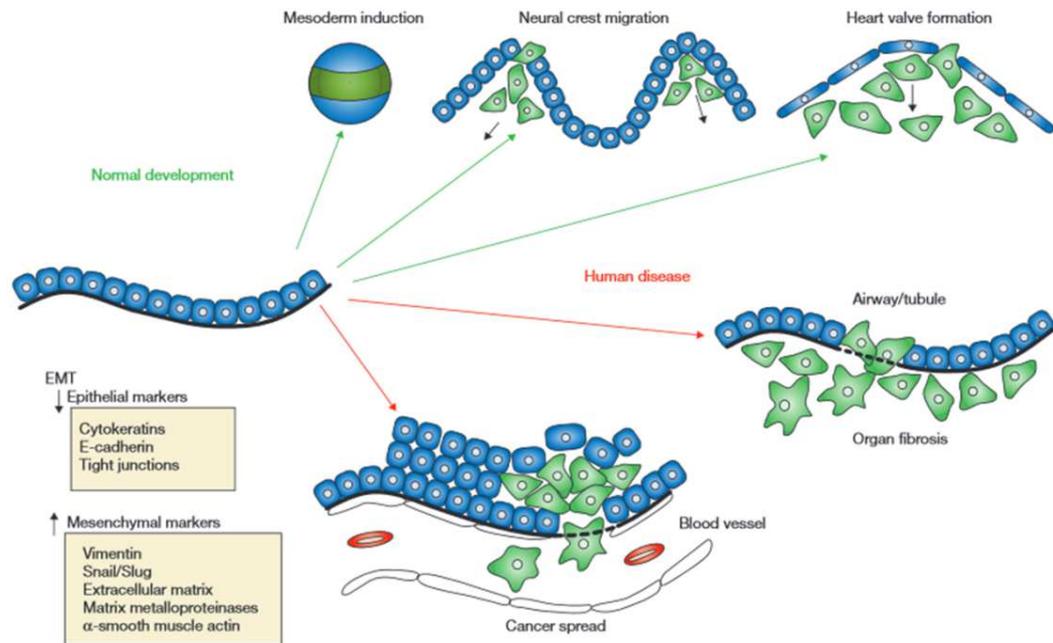


Figure 18 : Epithelial Mesenchymal Transition (EMT), (Transition d'après Kano et al 2007)

La fibrose est donc un phénomène pouvant toucher de nombreux organes (peau, rein, cœur, foie), il s'agit d'un statut irréversible souvent post-inflammatoire sans phénomène de réparation tissulaire possible, au cours duquel s'effectue une activation chronique des fibroblastes qui entraîne une accumulation massive de matrice extra-cellulaire, en particulier de collagène fibrillaire, au sein des tissus concernés. Parmi les principales fibres de collagène impliquées dans le phénomène de fibrose tissulaire, on distingue le collagène de type I. Ces fibres de collagène de type I résultent de l'assemblage de trois sous-unités : deux chaînes codées par le même gène, le gène de collagène $\alpha 1(I)$, et une chaîne codée par un autre gène, le gène de collagène $\alpha 2(I)$. De nombreuses études ont démontré que le dépôt excessif des fibres de collagène de type I lors du développement de fibrose tissulaire, était essentiellement dû à des dérégulations de la modulation transcriptionnelle de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I (respectivement COL1A1 et COL1A2) (Verrecchia et Mauviel, 2004; Ghosh, 2004), conduisant à une augmentation de l'expression et de la synthèse du collagène. Cette accumulation de collagène peut également résulter d'une diminution de sa dégradation, par diminution de l'activité des collagénases (Verrecchia et al., 2002, 2007).

De nombreux facteurs de croissance comme différentes cytokines, sécrétées par plusieurs types cellulaires tels que des cellules endothéliales activées, des cellules inflammatoires (monocytes ou

macrophages), des lymphocytes, des mastocytes ou des polynucléaires éosinophiles régulent la synthèse et la dégradation des fibres de collagène. Parmi ces cytokines, Le TGF- β 1 semble y jouer un rôle majeur en stimulant en particulier la synthèse des composants de la matrice extracellulaire, par les fibroblastes. Schématiquement, le TGF- β 1 favorise la synthèse des collagènes fibrillaires et de la fibronectine et provoque l'inhibition des enzymes qui dégradent la MEC (comme les MMPs), soit en inhibant leur synthèse, soit en augmentant la synthèse des inhibiteurs de ces enzymes comme les TIMPs. Le rôle crucial du complexe Smad3/Smad4 dans ce mécanisme de fibrose induite par le TGF- β a été mis en évidence à travers de nombreux travaux in vitro et in vivo.

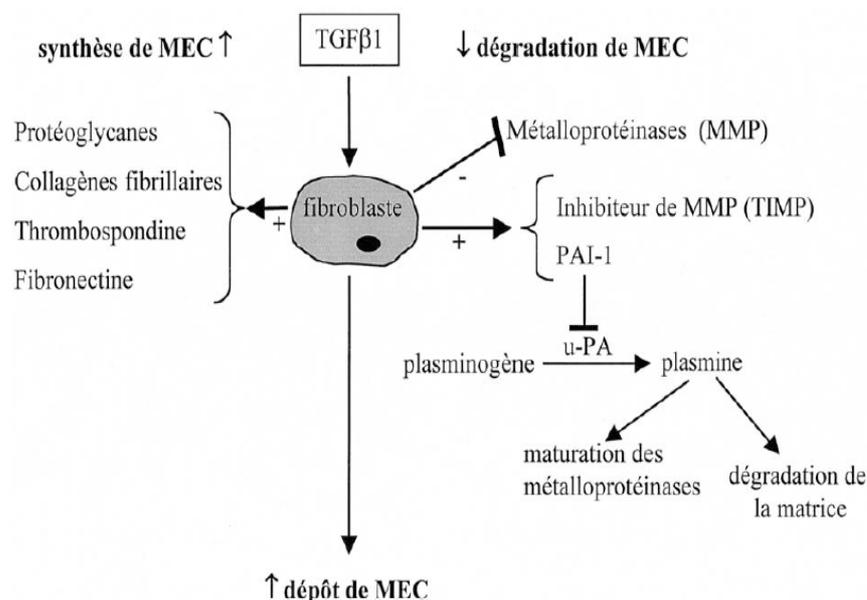


Figure 19 : Effet du TGF- β sur la production de la matrice extra-cellulaire (d'après Dennler et al., 2006)

- In vitro:

Ce complexe joue un rôle majeur dans la transcription induite par le TGF β 1 des gènes des collagènes fibrillaires comme les chaîne α 1 et α 2 du collagène de type I, la chaîne α 1 du collagène de type III et la chaîne α 2 du collagène de type V (Verrecchia et al., 2001, Cutraneo, 2003). De manière comparable, les effets du TGF β 1 sur la dégradation de la MEC et plus précisément sur la synthèse des inhibiteurs des enzymes de dégradation de la MEC impliquent le complexe

Smad3/Smad4. Par exemple, l'activation de la plasmine qui dégrade la MEC et participe à la maturation des métalloprotéinases est inhibée par la protéine PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) dont l'activation transcriptionnelle par le TGF- β 1 dépend du complexe Smad3/Smad4 (Dennler et al., 1998). Le TGF β 1 favorise également l'expression de TIMP-1 et TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase) par un mécanisme Smad3/Smad4-dépendant (Verrecchia et al., 2001). Toutefois, la régulation de l'expression de certains composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine par le TGF- β 1 est indépendant des protéines Smads (Hocevar, 1999).

- In vivo

Le rôle crucial de Smad3 dans ce mécanisme de fibrose induite par le TGF- β 1 a été mis en évidence à travers de nombreux travaux utilisant des modèles de souris déficientes en Smad3. Ainsi, ces souris sont protégées de la formation d'une fibrose pulmonaire dans un modèle d'induction à la bléomycine (Nakao A. J Clin Invest 1999). Elles semblent également présenter une réaction cutanée fibrosante post radique moins importante que les souris *wild type* après irradiation gamma de 30 à 50 Gy. Les biopsies cutanées montrent un moindre infiltrat épidermique et dermique fait de mastocytes, macrophages et neutrophiles et une moindre expression cutanée de TGF- β 1. (Flanders et al., 2002)

La sclérodémie systémique est une des pathologies fibrosantes dans lequel le rôle du TGF- β (et de la voie smad3) a été particulièrement étudié : avec une augmentation de l'expression des formes phosphorylées de smad 2 et 3 sur des fibroblastes de patients en culture (Mori et al., 2003) ;avec également une corrélation entre niveau de phosphorylation de smad 3 sur les biopsies cutanées de patients et le score d'activité clinique de leur maladie dermatologique (score de Rodnan modifié) (Verrecchia et al., 2007). Par ailleurs il semble également y avoir dans cette pathologie une diminution de la voie de rétrocontrôle négatif du TGF- β , à savoir Smad7 , comme le décrivent ces auteurs avec un taux plus faible de smad 7 dans les fibroblastes provenant de zones sclerodermiformes de patients versus des fibroblastes issus de zones de peau saine (Dong et al., 2002). D'un point de vue thérapeutique l'induction de smad 7 (capable d'inhiber la voie smad du

TGF- β) a été essayée, par stimulation avec IFN-gamma, un essai a également été proposé avec de l'halofuginone dans un modèle de fibrose cutanée post-radique (Pines M Biol Blood Marrow Transplant 2003). Une autre piste serait l'activation de la MAP Kinase JNK, soit par une cytokine pro inflammatoire telle que le TNF- α ou par des molécules pharmacologiques telles que le 5FU, permettant un blocage de la voie de signalisation smad du TGF- β , par induction de la phosphorylation de cJun, qui interfère directement avec la phosphorylation de smad 3 (Verrechia F et al J Biol Chem 2000).

4.TGF- β et cartilage : rôle dans l'arthrose ?

Cette cytokine est désormais connue comme une des principales molécules impliquées dans la réparation et l'homéostasie du cartilage, avec des données *in vivo* montrant qu'une inhibition du TGF- β provoquait des défauts de réparation du cartilage (Scharstuhl et al., 2002). De la même façon les souris déficientes pour la voie de signalisation smad 3 du TGF- β présentent des lésions cartilagineuses très proches de celles de l'arthrose (Yang et al., 1999). En revanche un traitement par TGF- β dans des articulations arthrosiques de rat a un effet délétère chondrolytique (Itayem et al., 1999). Il semble qu'il existe une « balance » entre les voies de signalisation ALK I et ALK V impliquées dans l'homéostasie cartilagineuse avec une voie TGF- β /ALK V /p smad2/3 aboutissant à la synthèse de collagène de type II, et de fibronectines, et à l'inverse une voie TGF- β /ALK I /p smad 1-5 s'opposant à la formation du cartilage (Finsson et al., 2008). Certains auteurs décrivent dans un modèle murin d'arthrose liée à l'âge, une diminution de la forme TGF- β 1 au profit des isoformes TGF- β 2 et 3, expliquant cette perte des capacités de réparation cartilagineuse par cette « carence » en TGF- β 1 (Blaney Davidson et al., 2005).

5.TGF- β et os

TGF- β 1 est connue donc depuis sa description comme un agent pro-ostéoblastique (Gehron – Robey et al 1987) avec de façon conjointe une activité anti-ostéoclastique (Bonewald and Mundy, 1989). En effet TGF- β 1 joue un rôle important dans l'ossification endochondrale et intra membraneuse, comme le montre le modèle de souris déficientes en TGF- β 1 , qui présentent un

retard de croissance et de minéralisation osseuse (Hummel et al., 2005). En pathologie humaine, une mutation activatrice sur le gène du TGF- β 1 (sur le chromosome 19q13.1-q13.3) est responsable du syndrome de Camurati –Engelmann, qui consiste en une ostéosclérose des os longs (Campos-Xavier et al., 2001).

6.TGF- β et polyarthrite

Le rôle de cette cytokine dans la polyarthrite rhumatoïde a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Le TGF- β 1 ainsi que son récepteur (TGF β RI ou ALKV) sont exprimés au sein de la membrane synoviale principalement exprimés par les fibroblastes, les chondrocytes et les cellules endothéliales de la couche bordante de la membrane synoviale (Marinova-Mutafchieva et al., 2006). Il est également détecté dans le liquide synovial et le sérum des patients avec un taux significativement plus élevé dans la PR comparativement à l'arthrose (Gonzalo-Gil and Galindo-Izquierdo, 2014). .A travers un travail de screening des gènes surexprimés dans la PR ,il apparait clairement que les gènes impliqués dans la voie du TGF- β sont régulés positivement (Pohlers et al., 2007). En effet il est très probable que son effet soit différent en fonction de la phase aigüe ou chronique de développement de la maladie.

Tout d'abord concernant l'inflammation et la prolifération de la membrane synoviale, de nombreux de travaux ont effectué un parallèle entre le phénomène de fibrose observé dans d'autres pathologies auto immunes et la prolifération synoviale dans la polyarthrite rhumatoïde, avec une augmentation du nombre de synoviocytes dotés d'une capacité accrue de prolifération et d'invasion (Lefèvre et al., 2009). Le TGF- β 1 apparait impliqué dans cette prolifération du pannus synovial avec un effet pro-prolifératif sur les synoviocytes de patient à 48 h de traitement (TGF- β 1 10 ng/ml) *in vitro* (Lories et al., 2003). Cet effet pro-prolifération *in vitro* du TGF- β sur des synoviocytes de PR a été confirmé par l'équipe japonaise en 2007 (Sakuma et al., 2007). Cet effet impliquait ALK V et était dépendant du facteur de croissance synoviocytaire PDGF (Platelet Derived Growth Factor)..Un traitement par inhibiteur chimique du TGF β RI diminuait cet effet prolifératif *in vitro* et ces résultats étaient confirmés *in vivo* sur un modèle d'arthrite chez la souris avec une diminution de l'infiltrat cellulaire et de l'hyperplasie de la synovite. Le traitement par TGF-

β augmentait également dans cette étude *in vitro* la sécrétion par les synoviocytes de VEGF et d'IL-6 et cette sécrétion était diminuée après utilisation de l'inhibiteur chimique du TGF β RI. Dans la même idée, il a été montré que le TGF- β favorise l'angiogénèse avec une augmentation des cellules endothéliales au sein de l'os sous chondrale de souris atteintes de d'arthrite dans un modèle d'arthrite induite au collagène (Xu et al., 2015). Ces auteurs se sont intéressés à rechercher si le même phénomène d'EMT observé dans la fibrose pouvait entrer en jeu dans la PR et expliquer la formation du pannus synovial. Ainsi, en comparant des prélèvements de membrane synoviale d'arthrose versus PR, ils observaient autant de cellules endothéliales dans les deux groupes, en revanche l'immunomarquage des myofibroblastes (actine musculaire lisse) était significativement plus élevé dans la PR. De plus un traitement par TGF- β de ces synoviocytes stimulait la production des marqueurs de fibrose (collagène de type I) et un traitement par BMP-7 inhibait la production de collagène I. On constate donc un phénomène probablement sous influence du TGF- β de trans-différenciation en faveur de la prolifération fibroblastique s'apparentant au phénomène d'EMT observé dans la fibrose reversé par BMP7 (Steenvoorden et al., 2006). Enfin une étude récente décrit en aval du signal TGF- β , le rôle d'une protéine tyrosine phosphatase et de son récepteur (PTPRK) stimulés par le taux élevé de TGF- β 1 au sein de la synovite rhumatoïde, qui favoriseraient les capacités de prolifération et d'invasion des synoviocytes avec une augmentation des molécules d'invasion CXCL10, VCAM 1, MMP8 et MMP13 (Stanford et al., 2014).

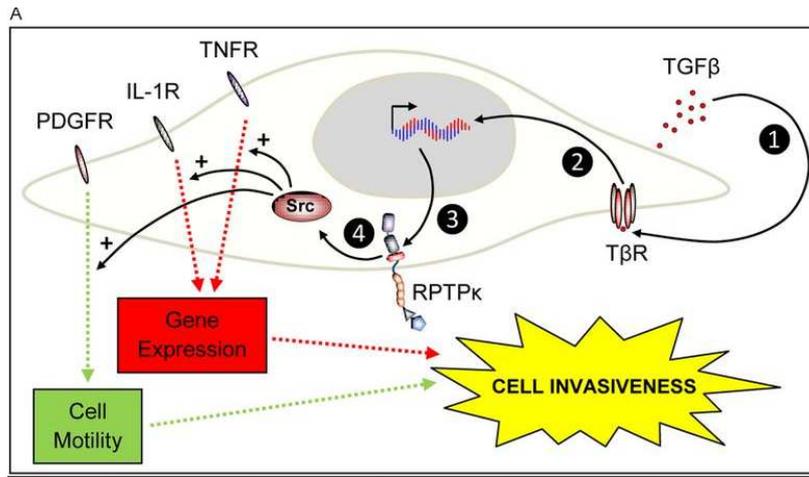


Figure 20 : Le TGF-β autocrine se fixe sur le récepteur au TGF-β (1) induisant l'activation des SMAD (2), la transcription de PTPK(3) . RPTK active SRC(4) qui promeut un signal d'invasion via PDGFR et les récepteurs de TNF-α et d'IL-1 (D'après Stanford et al 2014).

Quant à son rôle **pro ou anti inflammatoire**, les données sont assez contradictoires : comme le laisse entendre la revue espagnole publiée en 2014 (Gonzalo-Gil and Galindo-Izquierdo, 2014). Il est possible que cette molécule ait une action pro inflammatoire, même un rôle très en amont à l'origine du recrutement des cellules inflammatoires. *In vitro* le TGF-β est un puissant agent chémo-attractant pour les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T (Wahl et al., 1987). Il facilite la migration des monocytes à travers les tissus en augmentant l'expression d'intégrines et la production d'enzyme de dégradation de la matrice (Wahl, 1992). De plus le TGF-β induit l'expression du Fcγ RIII à la surface des monocytes stimulant la production de cytokines pro inflammatoires d'IL-1, IL-6, TNF-β impliquées dans la réponse inflammatoire précoce. En revanche certains auteurs décrivent que cet effet pro-inflammatoire initial par recrutement des monocytes serait uniquement précoce avec ensuite une perte de la sensibilité de ces mêmes cellules pour une même stimulation de TGF-β, ce phénomène passerait entre autres mécanismes par une diminution de l'expression du récepteur au TGF-β sur ces cellules (Brandes et al., 1991). Ainsi dans le modèle d'arthrite induite au collagène on observe une aggravation de la réponse inflammatoire chez les souris *Smad3^{-/-}* versus *wild type* et effet anti inflammatoire de l'administration de TGF-β en intra articulaire. (Marinova et al clin exp immunol 2006)

De plus il a été observé, une augmentation du taux de TGF- β 1 et 2 intra-articulaire en phase de rémission d'arthrite induite au collagène chez la souris (marinova clin exp immunol 2006) , contrairement au TNF- α et à l'Il-6 qui sont surexprimées à la phase aigüe de l'arthrite.

Concernant l'effet structural sur les érosions osseuses et la chondrolyse, le TGF- β semble avoir un rôle délétère sur l'évolution structurale dans la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi dans un premier temps des travaux *in vitro*, ont montré qu'en traitant avec du TGF- β 1 des synoviocytes de patients, la production de molécules de dégradation du cartilage (telles que la MMP11) était augmentée et ce, de façon corrélée au taux de CRP des patients (Pohlers et al., 2007). Un article récent s' est particulièrement intéressé au rôle du TGF- β au sein l' os sous-chondral (Xu et al., 2015), siège de la genèse du phénomène précoce inflammatoire (bien visibles à l'IRM sous formes d'oedème osseux sous chondraux). Il existe en effet, au sein de l'os sous chondral de PR, de façon concomitante à l'hyperactivité ostéoclastique , de l' augmentation de l'angiogénèse et de la chondrolyse , une « activité TGF- β » avec une expression élevée de phospho smad 2/3 conduisant à l'accumulation de cellules souches mésenchymateuses pré ostéoblastiques sans augmentation pour autant de l'activité d'ostéof ormation. (Xu et al., 2015)

Ces phénomènes sont inversés après utilisation d'un inhibiteur du TGF- β 1R ou du TGF- β mettant bien en exergue le rôle du TGF- β , en particulier dans le recrutement de ces cellules souches pré ostéoblastiques aberrantes incapables d'une activité d'ostéo-formation. Il existe donc un découplage ostéo-formation / ostéo-résorption, responsable initialement d'une perte osseuse locale (érosions) puis à un stade plus tardif de la formation d'un os scléreux. L'ensemble de ces résultats confirme donc une implication du TGF- β dans la PR, avec un rôle complexe dans l'inflammation, probablement un rôle « starter », impliqué dans la genèse de l'inflammation précoce et un rôle de réparation post inflammatoire « exagéré » aboutissant à un phénomène de fibrose , impliqué dans la prolifération synoviale , enfin un rôle délétère sur le plan structural favorisant les érosions et la chondrolyse.

B : Bone Morphogenic Protein

1. Description

Les Bone Morphogenic Protein (BMP) appartiennent donc à la super-famille du TGF- β , ce sont des cytokines extracellulaires, isolées à partir d'extraits osseux et capables d'induire une chondrogénèse ou une ostéogénèse ectopique (J.M . Wozney Science vol 242). Plus de 20 BMP ont été identifiées, parmi lesquelles BMP-2, 4,7,9 et 13 ont été étudiées pour leur rôle dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) avec un rôle majeur dans l'embryogénèse puis la croissance . Elles produisent leur effet via l'interaction de deux récepteurs de type serine-thréonine kinase : BMPR I et II. BMPR II initie le signal en se fixant au ligand BMP, ce qui induit le recrutement, la phosphorylation et l'activation de BMPR I .On compte plusieurs types de BMPR I, seuls BMPRIA et B sont impliqués dans la différenciation des CSM. Il existe plusieurs voies de signalisation : Smad 1/5/8, MAP Kinase dont C-Jun N-Terminal Kinase (JNK), qui sont phosphorylées puis activées (A .Nohe « Signal transduction of Bone Morphogenic protein receptors » cellular signaling vol 16 2004). Nous nous intéresserons particulièrement à la voie des smad, qui est la plus impliquée dans la différenciation des CSM, en particulier en ce qui concerne l'adipogénèse ou de l'ostéogénèse. BMP-2 a été notre cible privilégiée en raison de son rôle bien établi dans l'ostéoblastogénèse.

2. BMP, os et cartilage

Ainsi BMP-2 a été initialement décrite comme un puissant régulateur du développement embryonnaire et la croissance du squelette pendant l'enfance au dépens de la différenciation musculaire (Issack and DiCesare, 2003) (Aoyama et al., 2011). Elle est également impliquée dans l'homéostasie des tissus osseux et cartilagineux à l'âge adulte. Elle est en effet capable de synthétiser des protéoglycanes et de promouvoir une ostéogénèse endochondrale. Ainsi l'administration de BMP-2 exogène par exemple au sein d'un tissu musculaire provoque la formation d'un os ectopique (Katagiri et al., 1994). Ainsi le polymorphisme de BMP2 pourrait être impliqué dans le développement de certains ostéosarcomes lié à un emballement de la voie ostéoblastique selon ce récent article chinois (Cong et al., 2015). En pathologie également, la

fibrodysplasie osseuse progressive, qui conduit donc à des ossifications ectopiques est liée à une mutation sur le gène du récepteur au BMP avec donc un excès de formation osseuse. Des mutations inactivatrices de BMPR1B récemment publiées sont, quant à elles, responsables d'un syndrome d'hypoplasie ou d'aplasie de phalange des doigts. Ainsi dans les modèles animaux : des souris KO pour smad 1 présentent un phénotype ostéoporotique avec une diminution du signal de BMP (Wang et al., 2011). Il a par ailleurs été démontré une surexpression locale et transitoire de BMP-4 en phase de constitution du cal osseux, après une fracture par des précurseurs ostéoblastiques, avec un potentiel rôle réparateur osseux de cette BMP (Nakase et al., 1994).

Ces propriétés anaboliques osseuses ont déjà trouvé des applications pratiques thérapeutiques en particulier dans le développement des techniques d'ingénierie tissulaire comme dans le traitement des pseudarthroses ou des fractures compliquées, utilisant par exemple des matrices de collagène bovines mélangées à de la BMP-2 (El-Amin et al., 2010). Elle a également un effet anabolique sur les chondrocytes (De Luca F et al., 2001) avec la capacité *in vitro* de favoriser l'expansion de chondrocytes humains capable de former *in vivo* du cartilage stable résistant à l'invasion vasculaire et à la formation osseuse endochondrale. Afin d'étayer ce rôle réparateur prometteur du cartilage des auteurs ont récemment montré une augmentation du taux de BMP-2 dans le liquide articulaire et le serum de patients porteurs d'une gonarthrose avancée versus des patients sains ainsi qu'une corrélation entre ces taux et la progression radiographique. Ce phénomène pourrait correspondre à un mécanisme de réparation tissulaire en réponse à la chondrolyse (Liu et al., 2015). Des travaux ultérieurs sont nécessaires pour approfondir ces connaissances.

Le champ de développement de la recherche en matière d'ingénierie tissulaire à visée de réparation cartilagineuse est également très vaste (même si nous n'en voyons pas encore les fruits en rhumatologie courante dans l'arthrose) avec diverses approches à partir de matériaux variés : polymères, matériaux carbohydratés ...et des cellules souches mésenchymateuses de diverses sources (tissu adipeux, liquide amniotique, cordon ombilical, moelle osseuse etc..) conditionnées par un milieu à potentiel chondrogénique utilisant entre autre de la BMP-2 (également TGF- β 1, BMP/7 ...). Cependant le potentiel carcinogène de l'utilisation de ces molécules anaboliques n'est peut-être pas nul même s'il n'existe pas à l'heure actuelle dans la littérature de preuve robuste de celle-ci (Pountos et al., 2014).

3. BMP et polyarthrite

Par analogie à l'arthrose plusieurs auteurs se sont intéressés au potentiel rôle des BMP et en particulier de BMP-2 dans la Polyarthrite Rhumatoïde, l'enjeu étant toujours dans cette pathologie en décryptant d'avantage la physiopathologie de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Il a ainsi été démontré que BMP-2 était exprimée dans la synovite de PR (au sein des macrophages et fibroblastes) alors que l'on ne la retrouvait pas sur les prélèvements contrôle d'arthrose (Lories et al., 2003). Son récepteur BMPR est également exprimé toujours de façon spécifique dans la synovite rhumatoïde avec précisément un fort marquage sur le front invasif du pannus et les érosions du cartilage (Marinova-Mutafchieva et al., 2006). BMP- 2 est également dosable (par ELISA) dans les liquides articulaires ainsi que dans le serum de patients atteints de PR, avec un taux significativement plus élevé dans le serum de patients PR versus contrôle (Park et al., 2008). *In vitro* il apparaît que BMP-2 est sécrétée par les synoviocytes de patient atteints de PR après stimulation par les cytokines pro inflammatoires : TNF- α et Il-1 β (Lories et al., 2003). Ce signal était diminué sur les biopsies de patients traités par corticoïde, methotrexate ou biothérapie . (Verschueren et al., 2009).

Sur le plan fonctionnel, il existe une « activité BMP » au sein de la synovite rhumatoïde comme le montre cette étude de biopsies synoviales de patients atteints de PR avec la présence d'un signal phospho smad 1-5 au sein des synoviocytes (CD90+) et également des cellules des zones périvasculaires (CD105+) de la sous intima. Cette activité BMP au sein des cellules vasculaires est particulièrement intéressante. Les cellules vasculaires sont en effet connues pour leur sensibilité aux BMP et au TGF- β (Carmeliet, 2003), comme le montre le rôle crucial du système BMP-BMPRIb dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Dans le cas du développement de la profération synoviale de la PR , la voie BMP – Phospho smad 1-5 favoriserait le développement de l'angiogénèse (Valdimarsdottir et al., 2002) ; alors que le TGF- β est connu pour induire à partir de cellules souches mésenchymateuses une différenciation en péricytes et cellules musculaires lisses, au dépend de l'angiogénèse. Ceci faisant évoquer une balance TGF β /BMP impliquée dans la régulation de l'angiogénèse. Par ailleurs concernant la prolifération synoviale, BMP2 aurait un rôle régulateur diminuant la prolifération synoviale comme en témoigne les travaux de Lories (Lories et al., 2003) attestant d'une augmentation de l'apoptose des

synoviocytes après traitement par BMP-2. Ainsi à travers cette deuxième partie de nos travaux, nous avons cherché à caractériser les interactions potentielles entre l'Il-34 dont nous avons montré la surexpression dans le PR et TGF- β et BMP-2 .

II .ARTICLE II

BMP-2 and TGF- β inhibit IL-34 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

Chemel M^{1,2,3}, Brion R^{1,2}, Segaliny AI^{1,2}, Lamora A^{1,2}, Charrier C^{1,2}, Brulin B^{1,2}, Maugars Y³, Le Goff B^{1,2,3} Heymann D^{1,2,3,*} and Verrecchia F^{1,2,*}

¹INSERM, UMR 957, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer 2012, Nantes, France; ²Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France; ³CHU Hôtel Dieu, Nantes

Running title: IL-34 and rheumatoid arthritis

Keywords: Rheumatoid arthritis, IL-34, TGF- β 1, BMP-2

***Address correspondence to:** Dominique Heymann and Franck Verrecchia, INSERM UMR957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France, Phone: +33 240412895, Fax: +33 240412860, E-mail: dominique.heyman@univ-nantes.fr and franck.verrecchia@inserm.fr

Potential conflicts of interest: NO

Word count : 1476

Abstract

Objectives

Interleukin-34 (IL-34) is a pro-inflammatory cytokine implicated in rheumatoid arthritis (RA). The present study aimed to assess the IL-34 expression in response to two members of the TGF- β family, TGF- β 1 and BMP-2, in synovial fibroblasts from RA patients.

Methods

IL-34, TGF- β 1 and BMP-2 productions were measured in patient synovial fluids by ELISA. IL-34 mRNA levels were quantified by qPCR in human synovial fibroblasts and murine mesenchymal stem cells (mMSCs). Pharmacological inhibitions were used to determine the involvement of ALK1 and ALK5 downstream TGF- β 1 and BMP-2.

Results

IL-34, TGF- β 1 and BMP-2 were expressed in synovial fluids from RA patients. We found a significant correlation between IL-34 and TGF- β 1 expressions. Levels of both IL-34 and TGF- β 1 were thus correlated with the total leukocyte counts in the synovial fluids. TGF- β 1 and BMP-2 decreased IL-34 expression in the synovial fibroblasts or in mMSC in a dose- and time-dependent manner through respectively ALK5 and ALK1 pathways. In addition, TGF- β 1 antagonized TNF α -induced IL-34 gene expression.

Conclusions

This work identifies TGF- β 1 and BMP-2 as potent inhibitors of IL-34 expression in RA synovial fibroblasts. These cytokines, as upstream inhibitors of IL-34, may thus contribute to antagonize inflammation and bone erosions in RA.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterised by a chronic inflammation of the synovial tissue that leads to progressive joint destruction [1]. Among the cells located in the inflamed joint, synovial fibroblasts are crucial players driving inflammation and bone erosion [2].

IL-34 [3], basically described as promoting monocyte proliferation and survival, and osteoclast differentiation [4], is expressed by synovial fibroblasts of RA patients. Its expression, correlated with inflammation, the number of leucocytes and the severity of the synovitis, is upregulated by $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ [5].

TGF- β s and BMPs, are proteins involved in control of many biological processes such as cell proliferation and differentiation. The importance of TGF- β for the pathogenesis of arthritis is emphasized by several observations made in patients and in animal models [6]. TGF- β 1 and its receptors T β RII were detected at high levels in the synovial fibroblasts of RA patients [7] and in RA synovial fluids [8,9]. In this context, numerous studies have demonstrated the beneficial effects of TGF- β in RA [6]. TGF- β 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental models, and a strong increase of TGF- β 1 expression was measured in the remission state of disease [10]. Much less data exist regarding the role of BMP during the pathogenesis of RA. However, increasing evidences suggest that BMPs, known to play a crucial role in skeletal development, could be a promising therapeutic target in RA to restore function of synovial joints [11]. In this study, we hypothesised that IL-34 expression could be modulated by TGF- β 1 and BMP-2.

Methods

Synovial fluid

Synovial fluids were obtained in the Rheumatologist Unit of Nantes University Hospital. The clinical characteristics of patients are summarized in Supplementary data 1. The study was approved by the local ethic committee and by the French Research Ministry (n° 2008-402). IL-34, BMP-2 and TGF- β levels were measured in synovial fluids by ELISA assay (antibodies-online-GmbH, USA).

Cell cultures

Synovial fibroblasts, obtained as previously described [12] and mouse C3H10T1/2 mesenchymal stem cells (MSCs), purchased from the ATCC (CCL-226), were cultured in alpha-MEM (Invitrogen). TGF- β and BMP-2 were purchased from R&D System. ALK1 inhibitor (LDN 212854) and ALK5 inhibitor (SB431542) were purchased from Sigma.

Reverse transcription PCR analysis

RNA was extracted using the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel). cDNA synthesis was performed using the ThermoScript kit (Invitrogen). qPCR was performed using SYBRGreen Supermix (Biorad) and primers described in Supplementary data 1.

Western blot

Western Blot analyses were performed as previously described [4] with anti phospho-Smad3 (Millipore), phospho-Smad1/5 (Cell Signaling), Smad3 (Millipore) and Smad1/5 (Cell Signaling) antibodies.

Confocal microscopy experiments

Cell cultures, treated with TNF- α (10 ng/mL), and TGF- β 1 (10 ng/mL) for 24h, were fixed and stained with the primary antibody against IL-34 (Diaclone, INSERM UMR 957) as previously described [13].

Statistical analysis

The Mann–Whitney test was used to look for a correlation between IL-34 expression and the diagnosis. Student's t-test was used to assess the change in gene expression.

Results

Increased production of IL-34 and TGF- β 1 in RA synovial fluids

The expression of *IL-34*, *TGF- β 1* and *BMP-2* was detected in synovial fluids of RA patients (n=44, Fig. 1A and Supplementary data 2). IL-34 and TGF- β 1 levels were associated with the inflammation intensity measured by the leukocyte counts (Fig. 1B). A positive correlation between IL-34 and TGF- β levels in synovial fluids was found (Fig. 1C). No significant association was found between BMP-2 expression and the diagnosis (Fig. 1C).

TGF- β 1 and BMP-2 decrease IL-34 expression in human RA synovial fibroblasts and mMSCs

The regulation of IL-34 expression by TGF- β 1 and BMP-2 was next investigated. Both TGF- β 1 and BMP-2 significantly decreased IL-34 mRNA steady state levels in synovial fibroblasts from three different RA patients and in other mesenchymal cells such as mMSC (Fig. 2A). The decrease of IL-34 expression in the presence of TGF- β 1 or BMP-2 resulted in a time- and dose-dependent inhibition of IL-34 mRNA (Supplementary data 3). Only TGF- β 1 down regulated MCSF in human synovitis cells (Supplementary Data 4).

ALK5 and ALK1 receptors are involved in the inhibition of IL-34 expression driven by TGF β 1 or BMP-2

Since BMP-2 and TGF- β 1 preferentially signal from the membrane to the nucleus via respectively ALK1 and ALK5 receptors, we used validated chemical inhibitors of ALK1 (LDN 212854) and ALK5 (SB431542). We first demonstrated that BMP-2 and TGF- β 1 stimulate respectively the ALK1/Smad1-5 and the ALK5/Smad2-3 signaling pathways (Fig. 2B). Secondly, we observed that ALK1 and ALK5 inhibitors affect the response to respectively BMP-2 and TGF- β 1 in mMSC (Fig. 2C). Similarly, in fibroblasts of RA patients, we observed that the ALK5 inhibitor reverses the effect of TGF- β 1 on IL-34 gene expression and that the ALK1 inhibitor partially reverses the effect of BMP-2 (Fig. 2D). Interestingly, TGF- β 1 stimulates BMP-2 mRNA steady state level in RA synovial fibroblasts (Supplementary Data 5).

TGF- β 1 inhibits IL-34 expression in inflammatory conditions

Since we previously demonstrated that TNF- α induces IL-34 expression [5], we studied the effect of TGF- β 1 after the treatment of cells with TNF- α . Interestingly, TGF- β 1 significantly antagonized the TNF- α effect on IL-34 gene expression in synovial cells (Fig. 3A). Confocal microscopy analyses confirmed that IL-34 production paralleled the modulation of IL-34 mRNA (Fig. 3B). Specifically, TNF- α treatment resulted in an increase of IL-34 production and TGF- β 1 blocked TNF- α -induced IL-34 production.

Figures :

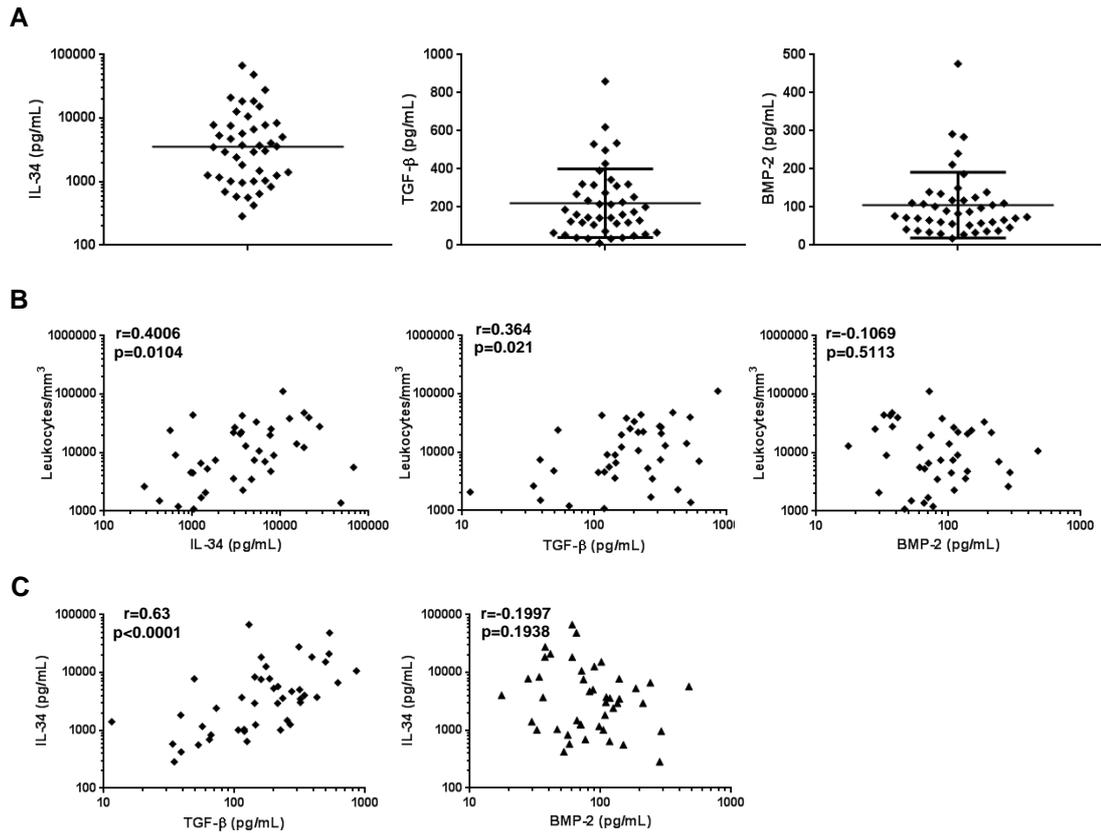


Figure 1. IL-34, TGF- β 1 and BMP-2 production in synovial fluid.

Synovial fluid samples (n=44) of RA patients were collected.

(A) Detection of IL-34, TGF- β 1 and BMP-2 in synovial fluids. Each plot represents an individual sample.

(B) Correlation between levels of IL-34, TGF- β 1, BMP-2 and total leukocyte count. (mean \pm SD, each plot represents an individual sample).

(C) Correlation between levels of IL-34 and TGF- β 1, and of IL-34 and BMP-2. Each plot represents an individual sample.

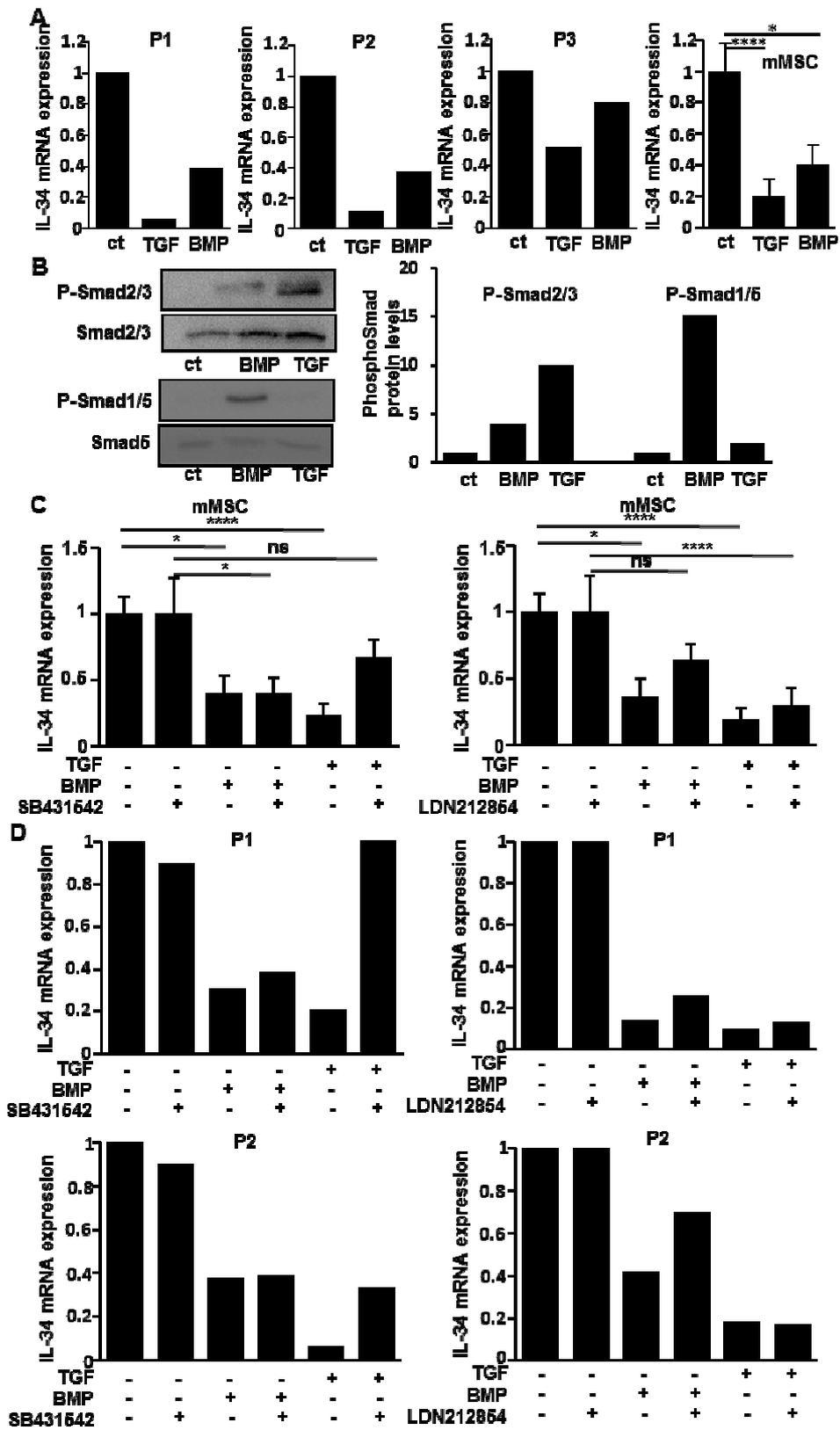


Figure 2

Figure 2. BMP-2 and TGF-β1 repress IL-34 mRNA expression.

(A) Synovial fibroblasts from three patients (P1, P2, P3) and mMSC (means ± S.D., n=3, *p<0.05, ****p<0.0001) were stimulated with BMP-2 (100 ng/mL) or TGF-β1 (10 ng/mL) for 8h. IL-34 mRNA levels were determined by RT-qPCR.

(B) mMSC were treated 1h with BMP-2 (100 ng/mL) or TGF-β1 (10 ng/mL). Phospho-Smad levels were detected by Western Blot. Histogramms represent the ratio of the phosphoSmad to the total Smad protein levels.

(C,D) mMSC (C) or synovial fibroblasts from two patients (P1 and P2) (D) were incubated with SB431542 (10 μM) or LDN212854 (10 nM). 1h after, BMP-2 (100 ng/mL) or TGF-β1 (10 ng/mL) was added for 8h. IL-34 mRNA levels were determined by RT-qPCR. (D) (means ± S.D., n=3, *p<0.05, ****p<0.0001)

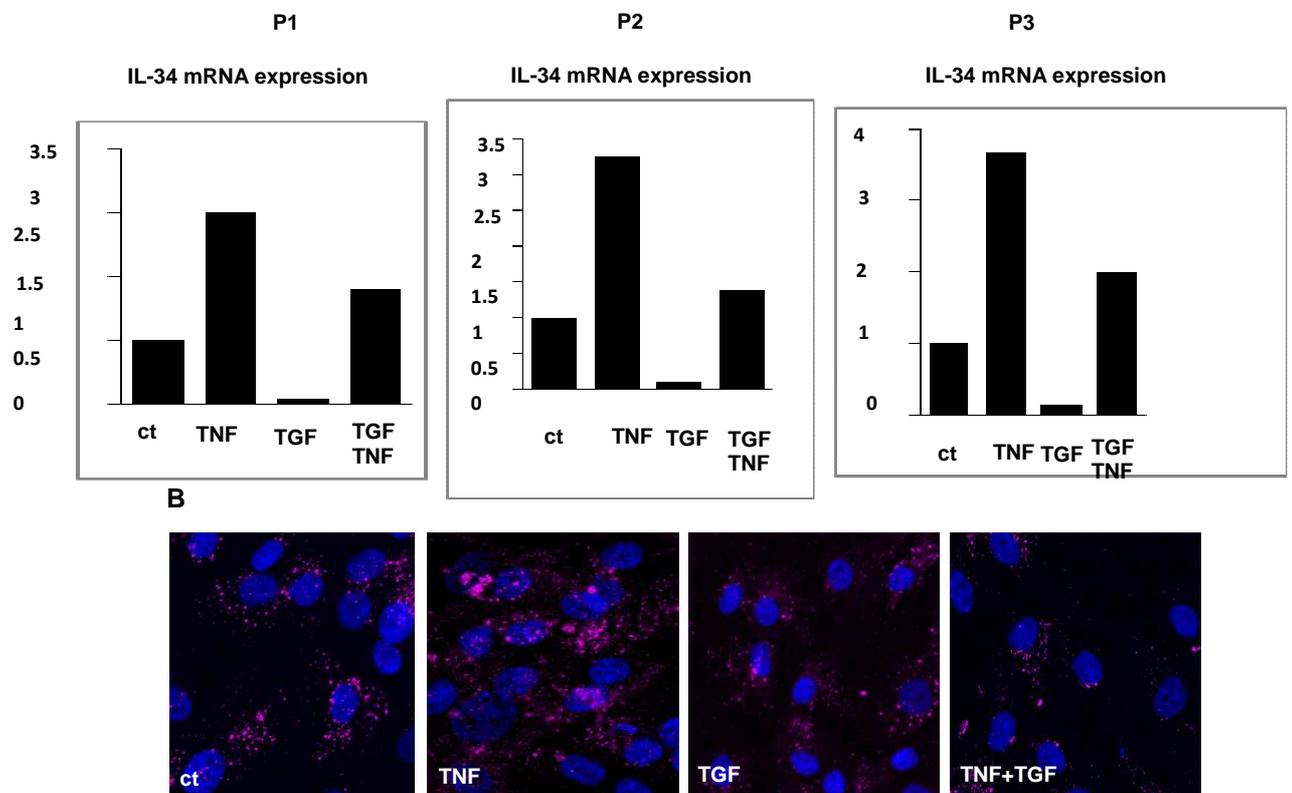


Figure 3

Figure 3. TGF-β1 antagonizes TNF-α-induced IL-34.

(A) Synovial fibroblasts from three patients (P1 to P3) were stimulated with TNF-α (10 ng/mL) together with TGF-β1 (10 ng/mL) for 8h. IL-34 mRNA levels were determined by RT-qPCR.

(B) Synovial fibroblasts cultured on labtek chamber slides were treated with TNFα (10 ng/mL), and TGF-β1 (10 ng/mL) for 24 h. IL-34 expression (pink), and nuclei stained by Hoechst reagent (blue) were observed by confocal microscopy. A representative experiment (X40) is shown.

Discussion

Scientific studies have focused on the complex role of cytokines in the development and progression of RA. It has been demonstrated that TNF- α or IL-1 β play a crucial role in the RA pathophysiology by promoting inflammation and osteoclastogenesis in the arthritic joint leading to the destruction of cartilage and bone [14].

Recently, we demonstrated that IL-34 is involved in the pathogenesis of RA and therefore could constitute a new therapeutic target [5]. We demonstrated here that TGF- β 1 and BMP-2 inhibit IL-34 expression in synovial fibroblasts and in mMSC via respectively the ALK1 and ALK5 receptors. The fact that BMP-2, known to stimulate bone formation, is able to inhibit the expression of IL-34, known to stimulate osteoclastogenesis [4] suggests that BMP-2 could prevent the degradation of bone in RA by both stimulating bone formation and inhibiting bone resorption.

The role of TGF- β is identified as a pro-fibrotic agent in many tissues [15], remains unclear in RA. It appears that this cytokine, involved in the pannus development [9], could act as a pro-fibrotic agent in RA. In this context, some authors demonstrated the beneficial effects of TGF- β in RA [6]. Indeed, systemic administration of TGF- β 1 antagonized the development of polyarthritis in susceptible rats [16]. In addition, the inhibition of TGF- β signaling increased the clinical severity of arthritis in CIA model [10]. Interestingly, the role of IL-34 in fibrosis has been described in the liver during HCV infection [17].

To resume, we describe for the first time, a high regulation of IL-34 expression by BMP-2 and TGF- β in the context of inflammatory stimulation. Such control loops appear to play a key role in the control of inflammation and bone resorption in RA (Supplementary data 6). Future pre-clinical investigations are necessary to assess the potential clinical application of targeting IL-34 in RA in association with a BMP2 or TGF- β .

Aknowledgments and affiliations

Al Segaliny received a PhD fellowship from the Region des Pays de la Loire (CIMATH II Research Program) and A Lamora from the Ecole de l'INSERM and Fondation Bettencourt Schueller.

References

1. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. [Rheumatoid arthritis](#). Lancet. 2009;373:659-72.
2. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. Immunol Rev. 2010;233:233–255.
3. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, et al. [Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome](#). Science. 2008;320:807-11.
4. Baud'huin M, Renault R, Charrier C, et al. [Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis](#). J Pathol. 2010;221:77-86.
5. Chemel M, Le Goff B, Brion R, et al. [Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients](#). Ann Rheum Dis. 2012;71:150-4.
6. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, et al. TGF- β and fibrosis in different organs. Molecular pathway imprints. Biochim Biophys Acta. 2009;1792:746-56.
7. [Pohlers D, Beyer A, Koczan D](#), et al. Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. [Arthritis Res Ther](#). 2007;9:R59.
8. Cho ML, Min SY, Chang SH, [Transforming growth factor beta1 down-regulates TNFalpha-induced RANTES production in rheumatoid synovial fibroblasts through NF-kappaB-mediated transcriptional repression](#). Immunol Lett. 2006;105:159-66.
9. Müssener A, Funa K, Kleinau S, Klareskog L. [Dynamic expression of transforming growth factor-betas \(TGF-beta\) and their type I and type II receptors in the synovial tissue of arthritic rats](#). Clin Exp Immunol. 1997;107:112-9.
10. Schramm C, Kriegsmann J, Protschka M, et al. [Susceptibility to collagen-induced arthritis is modulated by TGFbeta responsiveness of T cells](#). Arthritis Res Ther. 2004;6:R114-9.
11. Lories RJ, Luyten FP. [Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease](#). Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16:287-98.
12. [Ciosek CP, Ortel RW, Thanassi NM, Newcombe DS](#). Indomethacin potentiates PGE1 stimulated cyclic AMP accumulation in human synoviocytes. [Nature](#). 1974;251:148-50.

13. [Segaliny AI](#), [Mohamadi A](#), [Dizier B](#), et al. Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. [Int J Cancer](#). 2015;137:73-85.
14. Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. [Int J Mol Sci](#). 2014;16:887-906.
15. Verrecchia F, Mauviel A, Farge D. [Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis](#). [Autoimmun Rev](#). 2006;5:563-9.
16. Brandes ME1, Allen JB, Ogawa Y, Wahl SM. Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. [J Clin Invest](#). 1991;87:1108-13.
17. Preisser L, Miot C, Le Guillou-Guillemette H, et al. IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. [Hepatology](#). 2014;60:1879-90.

Supplementary data:

• human IL34 sens	cttacgagggggtggtcaga
• human IL34 antisens	accaagaccacagataccg
• mouse IL34 sens	ggacacacttctggggaca
• mouse IL34 antisens	ccaaagccacgtcaagtagg
•	
• human GAPDH sens	tgggtgtgaacctgagaagtatg
• human GAPDH antisens	ggtgcaggaggcattgct
• mouse HPRT sens	tctcctcagaccgctttt
• mouse HPRT antisens	cctggtcatcatcgtaatc

Supplementary Data 1.

Sequence of Primers

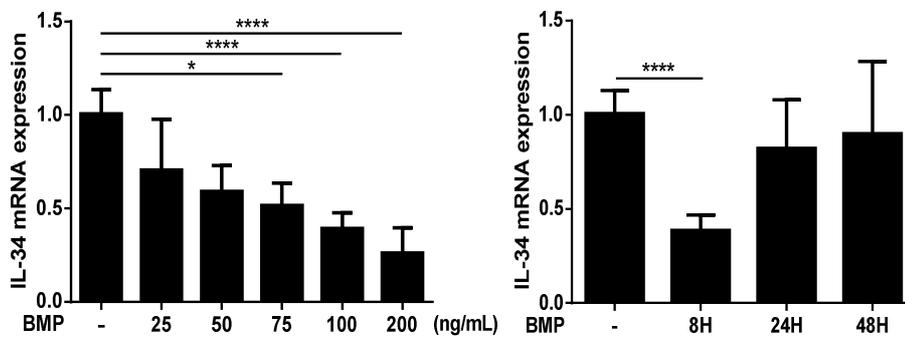
N°	Sexe	Age	Antibody status		Cortico-steroid	DMARD's/ Biotherapy	Duration of the disease	Leukocyte number/mm ³	CRP
			RF	ACPA					
1	F	81	+	+	-	-	120	28000	33
2	F	48	+	+	+	-	144	9000	ND
3	H	77	+	+	-	-	36	39900	64
4	F	73	+	+	+	MTX	204	ND	ND
5	F	71	-	ND	+	-	456	48000	ND
6	F	59	+	+	+	Abatacept	360	27000	ND
7	M	42	+	-	+	Leflunomid	96	25320	39.8
8	F	66	+	+	+	Tocilizumab	216	10710	30
9	F	43	8	-	-	MTX/Adalimumab	192	2070	10
10	M	59	-	+	+	Tocilizumab	408	22500	45
11	F	55	-	+	+	Rituximab	228	19920	ND
12	F	61	+	+	+	MTX/Tocilizumab	240	ND	ND
13	F	44	-	+	+	Tocilizumab	108	5600	104
14	F	52	+	-	+	Methotrexate	20	7440	ND
15	M	60	+	+	ND	MTX/Infliximab	96	1080	ND
16	M	64	+	+	+	Adalimumab	300	6600	7.9
17	H	48	+	+	-	MTX	36	ND	15
18	H	52	+	+	+	-	108	22080	59
19	H	51	+	+	+	MTX/Adalimumab	132	1700	<3
20	F	68	-	-	-	-	140	1200	29.8
21	H	71	-	-	+	MTX/ Tocilizumab	36	30900	<5
22	F	73	+	+	+	-	9	4800	30
23	F	66	ND	ND	+	MTX	ND	13000	ND
24	H	50	+	+	-	MTX/Infliximab	160	5280	4
25	F	51	+	+	+	MTX/Infliximab	84	3600	58
26	F	76	ND	+	+	MTX	ND	3500	ND
27	M	40	-	+	+	MTX	10	44100	109
28	F	45	+	+	+	-	120	1380	182
29	F	45	+	+	+	-	120	2640	182
30	F	84	+	+	+	Abatacept	8	14200	95
31	F	55	ND	ND	ND	ND	ND	1500	ND
32	F	66	-	-	+	Tocilizumab	48	9120	31
33	F	64	+	=	+	MTX/Hydroxychloroquine	1	111600	47
34	F	83	+	+	+	MTX	36	7420	24,7
35	M	53	ND	+	+	MTX/Adalimumab	144	17000	62
36	F	74	-	-	-	-	72	38300	23
37	M	71	-	-	-	-	4	4590	87,7
38	F	74	-	-	-	-	84	43080	nd
39	M	53	+	+	-	Tocilizumab	132	33600	<5
40	M	65	+	+	+	MTX/Tocilizumab	3	21 000	217
41	F	37	-	-	+	MTX	nd	4500	nd
42	M	46	+	+	-	-	1	9120	35
43	F	59	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
44	F	72	+	+	+	MTX/Abatacept	>200	2280	6

MTX: Methotrexate;RF: Rheumatoid Factor, ACPA: Anti-citrullinated Protein Antibody

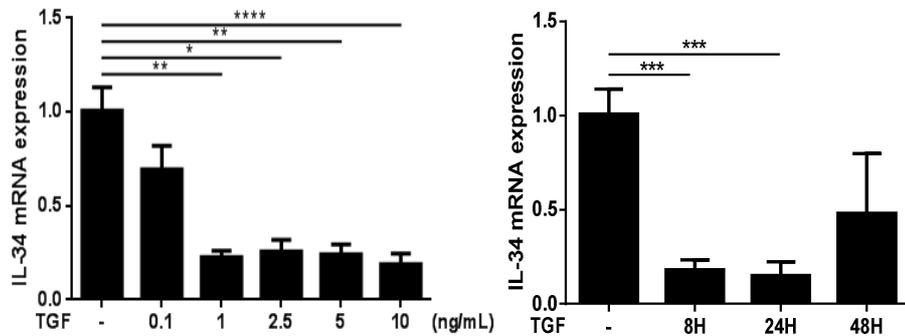
Supplementary Data 2.

Characteristic of patients included in the study

A



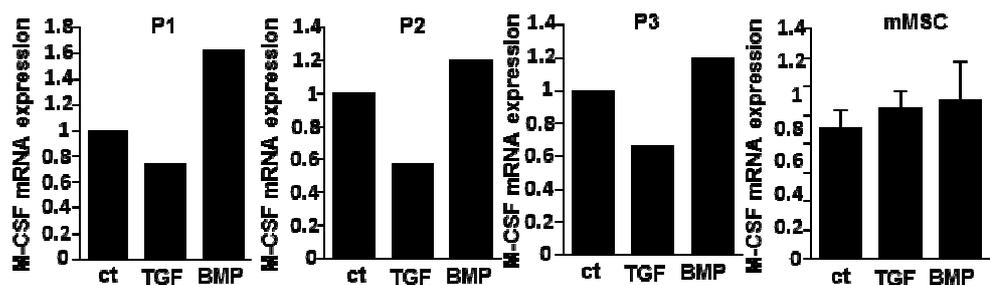
B



Supplementary Data 3. BMP-2 and TGF-β1 repress IL-34 mRNA expression

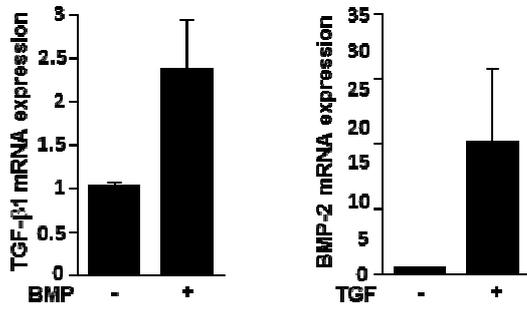
(A) mMSC (means ± S.D., n=3, *p<0.05, ****p<0.0001) were stimulated with BMP-2 (0, 25, 50, 75, 100 or 200 ng/mL) for 8h (left panel), or with 100 ng/mL BMP-2 for either 8, 24 or 48h (right panel). IL-34 mRNA levels were determined by qRT-PCR.

(B) mMSC (means ± S.D., n=3 *p<0.05, **p<0.01X, ***p<0.001, ****p<0.0001) were stimulated with TGF-β1 (0, 0.1, 1, 2.5, 5, or 10 ng/mL) for 8h (left panel), or with 10 ng/mL TGF-β1 for either 8, 24 or 48h (right panel). IL-34 mRNA levels were determined by qRT-PCR.



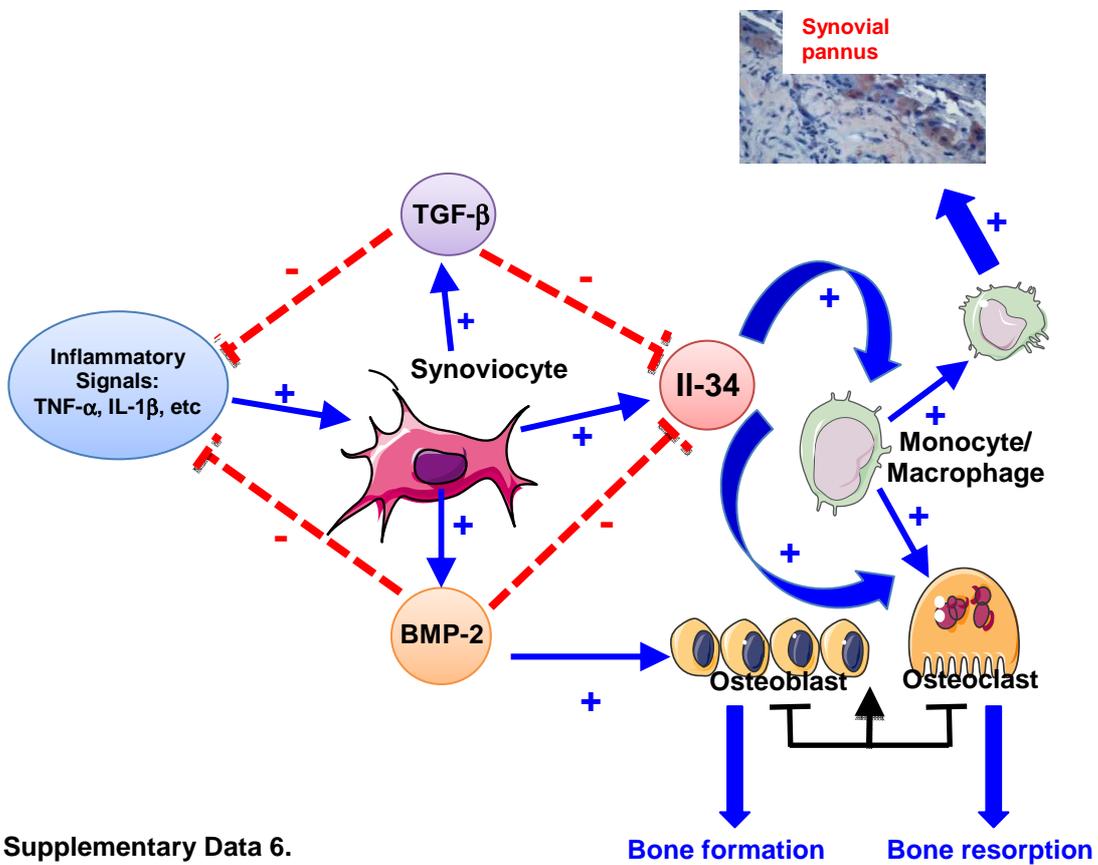
Supplementary Data 4. BMP-2 and TGF-β1 effect on M-CSF mRNA expression

Synovial fibroblasts (P1 , P2 , P3) and mMSC (means ± S.D., n=3) were stimulated with BMP-2 (100 ng/mL) or TGF-β1 (10 ng/mL) for 8h. M-CSF mRNA levels were determined by qRT-PCR.



Supplementary Data 5. TGF-β1 induces BMP-2 mRNA in RA synovial fibroblasts

RA synovial fibroblasts were incubated with BMP-2 (100 ng/mL) or TGF-β1 (10 ng/mL) for 8h. TGF-β1 or BMP-2 mRNA levels were determined by qRT-PCR.



Supplementary Data 6.

Regulation of IL-34 expression cytokine in RA

III.Complément de Discussion article 2

L'article 2 récemment soumis fait suite au premier travail publié en 2012. Nous nous sommes attachés à décrire d'avantage les boucles de régulations pouvant faire interagir les différents protagonistes cellulaires de la synovite rhumatoïde à savoir les synoviocytes, les monocytes et les acteurs des destructions ostéoarticulaires : avec la balance ostéoblaste /ostéoclaste.

A.II-34 / BMP2 et TGF- β , boucle de régulation négative

Le premier point de départ de ce nouveau travail était le résultat majeur de l'article 1 : à savoir la surexpression d'IL -34 au sein de la synovite rhumatoïde et ce de façon corrélée au degré d'inflammation :avec d'une part, sur les membranes synoviales de patients, une association positive entre la présence d'IL-34, l'inflammation et la sévérité de la synovite rhumatoïde et d'autre part , au sein des liquides synoviaux de patients avec une corrélation entre le taux de la cytokine et le caractère inflammatoire de ceux-ci. Nous sommes donc repartis de liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite : dosant en plus de l'IL-34 comme précédemment, de nouveaux facteurs de croissance. Nous avons détecté comme cela l'avait déjà été décrit la présence de TGF- β (connu pour être surexprimé dans les liquides synoviaux de PR(Cho et al., 2006) et de BMP2. La concentration d'IL-34 était donc corrélée à l'inflammation des liquides ($r=0.4006$, $p=0.0104$) tout comme celle du TGF- β ($r=0.364$, $p=0.021$), en revanche cela n'était pas vérifié pour BMP2. De façon intéressante nous avons constaté une corrélation positive et statistiquement significative entre IL-34 et TGF- β ,($r=0.63$, $p<0.0001$) nous faisant évoquer une interaction entre ces deux cytokines. Il serait pertinent dans le futur, de confirmer ces résultats par des travaux de co-marquages d'immunohistochimie. La question étant celle du niveau d'expression et de la localisation de ces différentes cytokines au sein de la synovite rhumatoïde. En effet nous avons précédemment montré que l'IL-34 était exprimée sur la couche intimale et sur la couche sous intimale par les synoviocytes macrophagiques (CD68+) et les synoviocytes fibroblastiques(CD68-). BMP2 a été décrite également exprimée au sein des deux types de synoviocytes (Lories et al., 2003) et des cellules souches mésenchymateuses et de façon intéressante son récepteur était exprimé principalement sur le front invasif du panus et proche des érosions (Marinova-Mutafchieva et al., 2006). Ce récepteur n'était d'ailleurs présent que sur les prélèvements de synovite rhumatoïde et absents sur les prélèvements d'arthrose. Le TGF- β est quant à lui, exprimé par les

cellules endothéliales de la couche bordante, les chondrocytes et les fibroblastes (Marinova-Mutafchieva et al., 2006). Il serait en effet intéressant, et ceci pourra faire l'objet de travaux ultérieurs, de réaliser un co-marquage de ces trois cytokines pour en comparer les types cellulaires marqués.

Nous avons par la suite, confronté ces résultats obtenus sur les liquides de patients à la reprise de travaux *in vitro* centrés sur des synoviocytes de patients, véritable « carrefour cytokinique » au sein de la synovite rhumatoïde : sensibles à la stimulation de diverses cytokines pro inflammatoires et capables de sécréter l'IL-34. En revanche nous avons constaté que ces cellules n'étaient pas capables d'en être la cible (car n'exprimant pas le récepteur au MCSF). Nous avons également enrichi nos travaux *in vitro* avec des expérimentations sur cellules souches mésenchymateuses humains et de souris. Ces cellules étant également capables de sécréter l'IL-34 et de réagir aux divers stimuli inflammatoires. En outre le rôle de ces cellules souches paraît au vu d'études récentes, très important dans la genèse de l'inflammation au cours de la PR (Binks et al., 2015). Ainsi il apparaît que les cellules souches mésenchymateuses, qui sont à l'origine des différenciations ostéoblastiques, fibroblastiques ou adipocytaires, sont présentes au sein de la synovite rhumatoïde. (El-Jawhari et al., 2014)

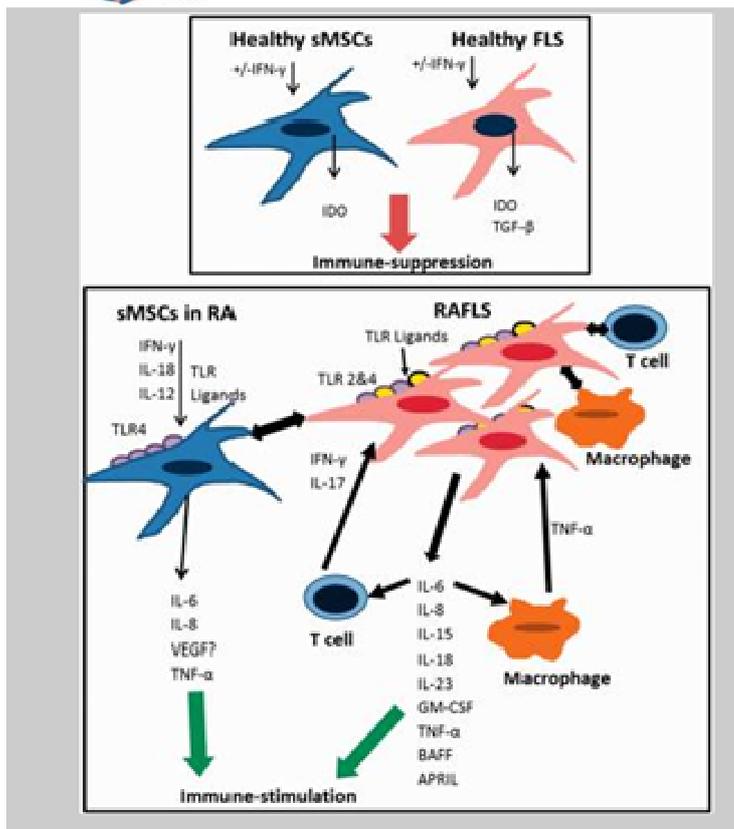
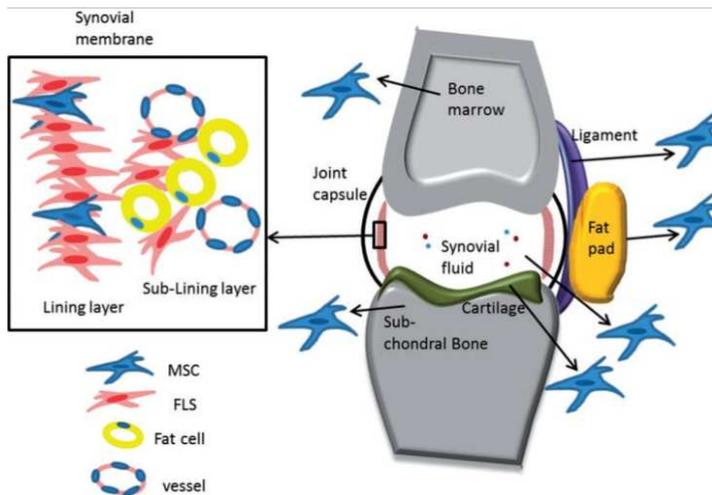


Figure 21 : Rôle des cellules souches mésenchymateuses au sein de la synovite rhumatoïde

D'après *El-Jawhari JJ QJM. 2014 Jul Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis.*

Leur rôle paraît mieux perçu depuis quelques années, avec au sein de la membrane synoviale saine un rôle d'homéostasie, et dans les conditions pathologiques de polyarthrite, une interaction forte avec les synoviocytes avec un phénomène d'emballement de la réponse immune : ces

cellules étant une source importante de sécrétion de cytokines pro inflammatoires : IL-6, IL-8 et TNF- α .

Nous avons donc étudié de façon parallèle l'effet de cytokines de la famille du TGF- β : TGF- β 1 et BMP-2 sur les synoviocytes de patients et sur des cellules souches mésenchymateuses. TGF- β 1 et BMP-2 réprimaient l'expression d'IL-34 sur les synoviocytes de patients et les cellules souches mésenchymateuses et ce de façon dose et temps dépendant (figure supplémentaire n°3). Il est également intéressant de noter que nous n'observons pas la même régulation du MCSF sous l'influence de BMP-2 et TGF- β : en effet sur les cellules souches mésenchymateuses MCSF n'était pas régulé que ce soit par BMP2 ou TGF- β , et sur les synoviocytes de patients, nous n'observons qu'une faible diminution d'expression du MCSF sous l'influence du TGF- β et aucun effet de BMP-2 (Figure supplémentaire n°4) ; Ces résultats confirment de nouveau l'absence de redondance de MCSF et IL-34 avec un rôle spécifique d'IL-34 dans la polyarthrite rhumatoïde .

B. Balance TNF- α versus BMP2 et TGF- β

Dans le deuxième volet de ce travail nous avons donc par la suite confronté ces nouveaux résultats au deuxième point clef du premier travail, à savoir la régulation positive de l'IL-34 par les cytokines pro inflammatoires TNF- α et IL-1 β sur les synoviocytes de patients. Le rôle du TNF- α est en effet bien connu dans la polyarthrite rhumatoïde avec deux rôles clefs : inflammation et destructions ostéo-articulaires (Smolen et al., 2005). Les souris transgéniques pour le TNF- α présentent des arthrites spontanées et une ostéoporose (Li et al 2003). Le TNF- α est capable de stimuler l'ostéolyse via une augmentation de l'expression de RANKL, de MCSF par les ostéoblastes, les cellules stromales et les lymphocytes T et via un effet direct sur les ostéoclastes avec une augmentation des précurseurs ostéoclastiques (Yao et 2006) (Feldmann et al., 1996). Nous connaissons en ce sens depuis plus de 15 ans maintenant, l'efficacité majeure des anti TNF- α en termes de réduction de l'activité inflammatoire locale et systémique et de diminution des destructions ostéoarticulaires. Nous avons donc par la suite décrit que le TNF- α induisait également l'expression d'IL-34 par les synoviocytes que l'on sait capables d'induire l'ostéoclastogénèse (Hwang et al., 2012a).

Dans notre deuxième travail nous avons démontré que le TGF- β est capable de réprimer cette stimulation. Un effet opposé du TNF- α et du TGF- β sur les synoviocytes en termes de production d'Il-34 signifie donc un effet fort anti inflammatoire s'opposant au puissant stimulus de l'inflammation que représente le TNF- α . De façon intéressante il apparait que BMP-2 et TGF- β peuvent être, tout comme le TNF- α , sécrétées par les synoviocytes (tout comme le montre la détection en qPCR de l'ARNm de ces cytokines) mais également cibler le synoviocytes, avec l'expression de leurs récepteurs à leur surface. Ces deux molécules peuvent donc se situer en agent régulateur négatif dans cette boucle de cytokines inflammatoires dont le synoviocyte est le centre.

Il est intéressant de noter qu'un traitement par TGF- β ou BMP-2 de façon isolée sur des synoviocytes induit en réponse une régulation positive de l'autre cytokine. Ceci est particulièrement vrai pour TGF- β qui stimule fortement (x15) la production de BMP-2 par les synoviocytes (supplementary data 5) ceci faisant émettre l'hypothèse d'un effet d'emballlement de ces 2 cytokines. Ceci est par ailleurs confirmé par un effet additif de la somme de TGF- β et BMP-2 avec une répression plus forte de l'expression d'Il-34 que lors d'un traitement par chacune des cytokines prises individuellement (données non montrées).

Nous avons par la suite cherché à en caractériser les voies de signalisation en utilisant des inhibiteurs chimiques afin d'attester du caractère fonctionnel de cette régulation. Nous confirmons donc le recrutement des voies de signalisation dites « canoniques » de BMP2 et TGF- β avec un effet de BMP-2 dépendant d'ALK I et de la phosphorylation de smad1/5 et un effet de TGF- β dépendant d'ALK V et de la phosphorylation de smad 2/3. Ces voies de signalisation étant en effet déjà décrites dans cette pathologie avec en particulier la présence de BMP-2 avec une phosphorylation de smad 1/5 (que ce soit sur un modèle murin de PR que chez les patients (Daans et al., 2008) (Verschueren et al., 2009) et la présence de TGF- β avec une phosphorylation de smad2/3 (Gonzalo-Gil et al., 2013). Les autres voies de signalisation de type MAP Kinases pouvant être induites notamment par le TGF- β ne semblent pas être impliquées dans cette pathologie ; nous avons d'ailleurs confirmé ces résultats avec des Western blot qui ne détectaient pas en intra cellulaire au sein des synoviocytes et des cellules souches mésenchymateuses de

présence de formes phosphorylées de ces MAP Kinases (ERK , AKT et JNK) (données non montrées).

C .Interaction TGF- β /Il-34 : Régulation de la prolifération synoviale ?

Concernant le TGF- β comme nous l'avons précisé en introduction de cette thèse, il s'agit d'une molécule principalement connue pour son effet pro-fibrosant. Dans la PR certains décrivent par analogie au phénomène de fibrose pulmonaire ou rénale un effet du TGF- β « pro-pannus» favorisant la prolifération de la membrane synoviale en tout cas de réparation tissulaire exagérée (Lories et al., 2003). Ainsi l'administration intra- articulaire de TGF- β chez des rats sains provoque une hyperplasie synoviale (Allen JB J exp Med 1990) rapide dans les 12 et 24 h, cette hyperplasie s'accompagnait d'un recrutement de cellules inflammatoires au sein de la membrane synoviale , en particulier de monocytes. Le TGF- β est impliqué dans la réparation tissulaire, inhibant la production de collagenase et induisant celle de d'inhibiteur de métalloprotéases (TIMP), il contribue également à la production de collagène de type I et IX. Son rôle anti-inflammatoire et pro-fibrosant n'est donc pas si contractoire : TGF- β active les processus de réparation tissulaire, mais cependant dans ce climat d'inflammation chronique la production exagérée de TGF- β pourrait induire la prolifération synoviale par le recrutement de macrophages et fibroblastes et par sa capacité à induire localement l'angiogenèse. (Feldmann et al., 1996). Ce phénomène d'inflammation chronique responsable de fibrose par « hyperstimulation « des mécanismes de réparation tissulaire n'est d'ailleurs pas propre à la PR , il est clairement établi dans la fibrose pulmonaire ou la sclérodémie systémique. De façon intéressante, l'Il-34 qui a donc été étudiée dans de nombreuses autres pathologies que la PR, semble avoir un rôle pro-fibrosant dans la fibrose hépatique post hépatite C (Preisser et al., 2014). Ainsi il apparait que dans l'hépatite C, les fibroses hépatiques les plus importantes sont associées à des taux sériques et des expressions hépatiques plus élevées de MCSF et d'IL-34. Ces deux molécules étant par ailleurs connues pour induire sur les macrophages la production de collagène de type I responsable de la fibrose. IL-34 pourrait donc avoir un rôle pro-fibrosant dans le cas de l'inflammation hépatique post hépatite C. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour vérifier si ce même phénomène est observé

dans d'autres pathologies pro-fibrosantes telles que la sclérodémie ou la fibrose pulmonaire idiopathique.

L'IL-34 est capable d'induire (et ceci de façon indépendante du MCSF) une différenciation macrophagique en macrophages de type II, de type immunosuppresseur (Foucher et al., 2013), cellules dont on connaît le rôle pro-fibrosant dans de nombreuses pathologies telles que la fibrose pulmonaire idiopathique. Ces macrophages, d'ailleurs sous l'influence de plusieurs facteurs dont TGF- β , induisent la sécrétion de collagène et par là la fibrose (Vidal et al., 2008). IL-34 et TGF- β auraient possiblement un rôle conjoint pro-fibrosant avec un effet direct du TGF- β sur la prolifération synoviale et un effet médié de l'IL-34 via la différenciation en macrophages de type II. Il nous paraissait donc pertinent de décrire une possible boucle de régulation entre ces deux molécules possiblement pro-fibrosantes.

Cependant il est intéressant de noter que de façon conjointe à un effet pro-fibrosant bien établi, le TGF- β aurait un rôle réparateur dans la synovite rhumatoïde comme en témoignent ces travaux de modèles murins de PR avec un effet anti-inflammatoire des injections intra-articulaires de TGF- β et cette augmentation du taux de TGF- β au sein des articulations atteintes en phase de résolution de la synovite (Marinova-Mutafchieva et al., 2006). Le TGF- β pourrait en cela s'opposer à l'effet pro-inflammatoire de l'IL-34.

D. Régulation cytokinique et destructions ostéo-articulaires.

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction de cette thèse, il est assez clair dans la physiopathologie de la PR que les destructions osseuses ou érosions sont en lien avec une hyperactivité ostéoclastique. Le rôle des synoviocytes dans le soutien de cette ostéoclastogénèse apparaît comme central. En effet RANKL est exprimé au sein de la membrane synoviale de patients atteints de PR, contrairement à la synoviale « saine » de patients contrôles. (Gravallese et al., 2000). Cette expression de RANKL augmente à la zone de jonction os/pannus avec une augmentation locale de la balance RANKL/OPG (Pettit et al., 2006). Enfin *in vitro* il a été montré que les fibroblastes synoviaux étaient bien la source de la sécrétion de RANKL (à l'état d'ARN messager et protéine) et cette cytokine était bien fonctionnelle capable d'induire la formation

d'ostéoclastes à partir de monocytes (Shigeyama et al., 2000). L'IL-34 est connue pour sa capacité à promouvoir l'ostéoclastogenèse en l'absence de MCSF en présence de RANKL (Baud'huin et al., 2010b). Ceci a été initialement décrit dans notre laboratoire dans un contexte de tumeur osseuse lytique (tumeurs à cellules géantes) puis d'autres auteurs ont confirmé cela sur l'IL-34 sécrétée *in vitro* dans par les synoviocytes de patients atteints de PR (Hwang et al., 2012a). L'effet d'IL-34 inducteur de destruction ostéo-articulaire passerait donc par l'intermédiaire de son influence sur la différenciation monocyttaire en faveur de l'ostéoclastogenèse. La BMP-2 est également fortement impliquée dans cette balance ostéoclaste /ostéoblaste, avec clairement, un effet pro-ostéoblastique.(Chen et al 2004). En effet les souris déficientes en BMP-2 présentent un déficit marqué en ostéoformation avec des fractures spontanées qui ne consolident pas (Tsuji et al., 2006). Cet effet de régulation négative de BMP2 sur l'IL-34 trouve effectivement sa pertinence dans cet effet antagoniste sur le plan osseux avec un effet inverse sur la balance ostéoclaste /ostéoblaste. Ces résultats nous permettent donc de proposer ce schéma de régulation cytokiniques faisant interagir ces trois cytokines avec le synoviocytes au centre de la scène avec une opposition entre un effet pro inflammatoire de l'IL-34 réversé par le TGF- β et un effet pro-ostéolyse de l'IL-34 réversé par la BMP2.

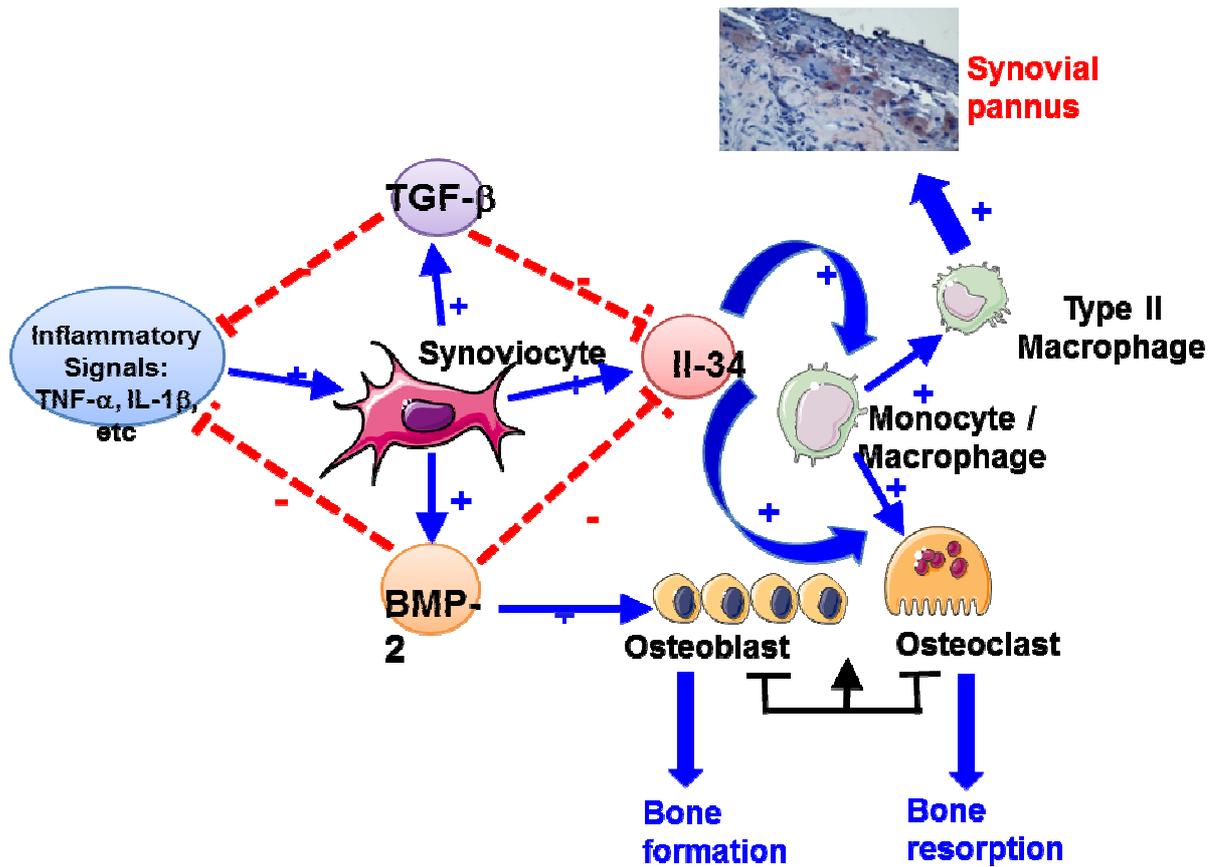


Figure 22 : Interactions cytokiniques autour du synoviocyte dans la PR

Ce schéma n'est évidemment pas exhaustif ne prétendant pas représenter l'ensemble des mécanismes de régulations faisant interagir les synoviocytes dans la PR mais a comme intérêt de se focaliser sur l'implication et les interactions potentielles de ces trois molécules, peu décrites dans cette pathologie.

Conclusion – perspectives

-I Interleukine-34 : quel avenir en tant que cible thérapeutique?

La première partie de ce travail a donc permis d'identifier une potentielle nouvelle cible thérapeutique dans la polyarthrite rhumatoïde en tant que facteurs favorisant la survie et la prolifération des macrophages. Le rôle important des macrophages dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde est bien établi avec une corrélation nette entre l'infiltrat macrophagique dans la synovite et les destructions ostéo-articulaires (Mulherin et al., 1996), ce taux pouvant même être considéré comme un marqueur précoce d'activité de la maladie (Tak et al., 1997) avec une corrélation étroite entre cet infiltrat et le score d'activité clinique de la maladie (DAS 28) (van der Heijde et al., 1990) et la réponse au traitement que ce soit les corticoïdes, DMARDS ou biothérapie (Wijbrandts et al., 2007). En effet dans les suites de nos travaux, IL-34 a été montrée comme étant surexprimée dans plusieurs autres pathologies dans lesquelles le macrophage a un rôle central telles que le syndrome de Goujerot Sjögren avec une surexpression de cette cytokine au sein des glandes salivaires des patients (Ciccia et al., 2013) dans lesquelles on trouve également un taux de macrophages élevés. Le niveau d'expression d'IL-34 étant associé à une élévation des taux de TNF- α , d'IL-1 β et d'interleukine 17. Cette cytokine a également été retrouvée dans les reins de plusieurs modèles de néphropathies lupiques (Bethunaickan et al., 2013), dans lesquels l'inflammation est due à des dépôts de complexes immuns qui stimulent l'activité des macrophages et les dégâts tissulaires associés à la néphrite .

La question est donc celle de la pertinence de cibler l'IL-34 dans ces pathologies, en particulier dans le cas qui nous intéresse de la polyarthrite rhumatoïde. Une première façon de répondre à cette question est de soulever celle de l'intérêt de cibler le macrophage dans cette pathologie. Il apparaît en effet que la plupart des traitements validés dans la prise en charge de cette maladie ont une action sur le macrophage à commencer par la corticothérapie qui en plus de la diminution locale et générale de la production de cytokines pro-inflammatoires diminue l'infiltrat de macrophages et de neutrophiles dans la synovite rhumatoïde(Gerlag et al., 2004). Le

méthotrexate diminue également cet infiltrat (Dolhain et al., 1998) réprimant le recrutement de monocytes inflammatoires (Kraan et al., 2000). Enfin l'effet anti inflammatoire et structural puissant des anti TNF- α passerait également en partie par un effet anti macrophage avec une accélération de leur apoptose. En effet le TNF- α promeut la survie des monocytes/macrophages *in vitro* (Taylor et al., 2000). Les anti TNF- α pourraient avoir un effet direct sur la diminution de leur survie ou un effet indirect sur les macrophages via la diminution des cytokines pro inflammatoires. Le constat de ces observations est donc que les différents traitements utilisés en routine dans la PR ciblent le macrophage. Quel serait l'intérêt d'une thérapeutique ciblée sur le MCSF, l'IL-34 ou leur récepteur commun CSFR ?

Concernant le MCSF, il est clair que le climat pro inflammatoire (TNF- α ou IL-1 β) est capable de stimuler son expression par le synoviocytes et que celle-ci favorise la prolifération et la survie des monocytes /macrophages .La surexpression ou la déplétion de cette cytokine ont ainsi in vivo dans les modèles de polyarthrite PR pour conséquence de grandes variations dans l'activité de la maladie.(Hamilton, 2008)

Dans le but de cibler spécifiquement cette cytokine plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours :

Pfizer a testé dans des études pré cliniques chez le primate l'effet d'un anticorps anti MCSF, il en résulte une diminution du taux de monocytes circulants CD16+ et une diminution des cellules de Kupffer. Plusieurs antagonistes du recepteur MCSFR sont également en cours d'études dans la PR et le cancer, résumés dans le tableau ci-dessous.

Essais cliniques ciblant le MCSF ou son récepteur					
Cible	Molécule	Type	Laboratoire pharmaceutique	Indication	Phase
MCSF	MCS 110	Anticorps	Novartis	Cancer	I/II
				Synovite villo nodulaire	II
MCSF	PD0360324	Anticorps	Pfizer	Polyarthrite Rhumatoïde	I
				Lupus	I
				Sarcoidose	I
MCSF-R	AMG820	Anticorps	Amgen	Cancer	I
MCSF-R	ARRY382	petite molécule	Array	Cancer	I
MCSF-R	FPA008	Anticorps	Five Prime	Polyarthrite Rhumatoïde	I
MCSF-R	IMCCS4	Anticorps	ImClone/EI Lilly	Cancer	I
MCSF-R	JNJ40346527	petite molécule	Johson&Johson	Polyarthrite Rhumatoïde	I
				Cancer	I
MCSF-R	PLX5622	petite molécule	Plexxikon/Daiichi Sankyo	Polyarthrite Rhumatoïde	I
MCSF-R	RG7155	Anticorps	Roche	Cancer	I
				Synovite villo nodulaire	I
MCSF-R/KIT/FLT3	PLX3397	petite molécule	Plexxikon/Daiichi Sankyo	Cancer	I/II
				Synovite villo nodulaire	I

Figure 22 : Molécules en cours de développement ciblant le MCSF ou son récepteur D'après Targeting IL-34 in chronic inflammation (Masteller and Wong, 2014)

Les résultats les plus prometteurs semblent ainsi être obtenus avec les anticorps anti MCSF–R , ce qui paraît assez logique du fait de l'existence de 2 ligands (MCSF et IL-34) se fixant sur le même récepteur. L'alternative serait un blocage de deux ligands de façon simultanée. Pour l'instant aucune molécule n'a été développée en ce sens.

-II. Macrophages et polarisation M1/M2

Une autre question est celle de l'influence de l'IL-34 ou du MCSF sur la polarisation des macrophages : Plusieurs auteurs ont démontré une polarisation en macrophages immunosuppresseurs de type 2 avec l'IL-34 comme MCSF (Foucher et al., 2013). Ceci a également été vérifié dans le cas de l'ostéosarcome avec un rôle décrit de l'IL-34 dans l'extravasation des monocytes et une polarisation de ceux-ci en macrophages de type M2 et un effet pro- angiogénique de l'IL-34 favorisant l'angiogenèse et la dissémination métastatique de la tumeur (Ségally et al., 2015). Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, la polarisation des macrophages n'a pas encore été caractérisée. Le seul paramètre objectif étant une surexpression de TNF- α et d'IL-1 β associée à une présence forte de macrophages de type M1 et une activité IL-10

caractérisant les macrophages de type M2 diminuée (Kennedy et al., 2011). Qu'en est-il de l'influence de l'IL-34 sur cette polarisation, en fonction de la cinétique de l'arthrite ? La question reste ouverte pouvant faire l'objet de nouveaux travaux au sein du laboratoire.

-III.Compréhension des mécanismes de régulation cytokiniques : quelles perspectives ?

Quant à la deuxième partie de nos travaux, il serait intéressant de valider ces résultats chez les patients sur des prélèvements de membrane synoviale avec un co-marquage d'immunohistochimie permettant de préciser quels acteurs cellulaires (monocytes, synoviocytes, ostéoblastes et ostéoclastes) expriment chacune de ces cytokines. Ceci devrait être très prochainement réalisé dans notre laboratoire. Les mêmes travaux d'immunohistochimie dans un modèle murin de polyarthrite avec des différents temps de sacrifices pourraient également être intéressants. Le TGF- β apparaît donc ici, contrairement à d'autres pathologies comme un agent régulateur « protecteur » s'opposant à l'IL-34 et en particulier à la surexpression de cette dernière dans un climat inflammatoire. Mais l'IL-34 intervient elle-même en aval des signaux pro inflammatoires que sont le TNF- α et l'IL-1 β . La question reste toujours celle du décryptage de l'ordre des événements dans cette cascade cytokinique et par conséquent de la pertinence du choix de telle ou telle cible thérapeutique. Il s'agit là de travaux préliminaires permettant néanmoins de réaffirmer la présence des molécules de la famille du TGF- β , en particulier TGF- β 1 et BMP-2 dans la synovite rhumatoïde et de démontrer une interaction entre celles-ci et l'IL-34 plus récemment décrite dans cette pathologie.

Bibliographie

Aoyama, K., Yamane, A., Suga, T., Suzuki, E., Fukui, T., and Nakamura, Y. (2011). Bone morphogenetic protein-2 functions as a negative regulator in the differentiation of myoblasts, but not as an inducer for the formations of cartilage and bone in mouse embryonic tongue. *BMC Dev. Biol.* *11*, 44.

Baud'huin, M., Lamoureux, F., Duplomb, L., Rédini, F., and Heymann, D. (2007). RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *64*, 2334–2350.

Baud'huin, M., Renault, R., Charrier, C., Riet, A., Moreau, A., Brion, R., Gouin, F., Duplomb, L., and Heymann, D. (2010a). Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol.* *221*, 77–86.

Baud'huin, M., Renault, R., Charrier, C., Riet, A., Moreau, A., Brion, R., Gouin, F., Duplomb, L., and Heymann, D. (2010b). Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol.* *221*, 77–86.

Bethunaickan, R., Berthier, C.C., Zhang, W., Kretzler, M., and Davidson, A. (2013). Comparative transcriptional profiling of 3 murine models of SLE nephritis reveals both unique and shared regulatory networks. *PLoS One* *8*, e77489.

Binks, D.A., Gravallesse, E.M., Bergin, D., Hodgson, R.J., Tan, A.L., Matzelle, M.M., McGonagle, D., and Radjenovic, A. (2015). Role of vascular channels as a novel mechanism for subchondral bone damage at cruciate ligament entheses in osteoarthritis and inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 196–203.

Blaney Davidson, E.N., Scharstuhl, A., Vitters, E.L., van der Kraan, P.M., and van den Berg, W.B. (2005). Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res. Ther.* *7*, R1338–R1347.

Bonewald, L.F., and Mundy, G.R. (1989). Role of transforming growth factor beta in bone remodeling: a review. *Connect. Tissue Res.* *23*, 201–208.

Brandes, M.E., Wakefield, L.M., and Wahl, S.M. (1991). Modulation of monocyte type I transforming growth factor-beta receptors by inflammatory stimuli. *J. Biol. Chem.* *266*, 19697–19703.

Campos-Xavier, B., Saraiva, J.M., Savarirayan, R., Verloes, A., Feingold, J., Faivre, L., Munnich, A., Le Merrer, M., and Cormier-Daire, V. (2001). Phenotypic variability at the TGF-beta1 locus in Camurati-Engelmann disease. *Hum. Genet.* *109*, 653–658.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* *9*, 653–660.

Chen, Z., Buki, K., Vääräniemi, J., Gu, G., and Väänänen, H.K. (2011). The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One* *6*, e18689.

- Chihara, T., Suzu, S., Hassan, R., Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Motoyoshi, K., Kimura, F., and Okada, S. (2010). IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* *17*, 1917–1927.
- Cho, M.-L., Min, S.-Y., Chang, S.-H., Kim, K.-W., Heo, S.-B., Lee, S.-H., Park, S.-H., Cho, C.-S., and Kim, H.-Y. (2006). Transforming growth factor beta 1(TGF-beta1) down-regulates TNFalpha-induced RANTES production in rheumatoid synovial fibroblasts through NF-kappaB-mediated transcriptional repression. *Immunol. Lett.* *105*, 159–166.
- Ciccia, F., Alessandro, R., Rodolico, V., Guggino, G., Raimondo, S., Guarnotta, C., Giardina, A., Sireci, G., Campisi, G., De Leo, G., et al. (2013). IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14(bright)CD16+ monocytes. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *52*, 1009–1017.
- Cohen-Solal, M., Marie, P., and De Vernejoul, M.C. (2000). [Pathophysiology and genetics of osteoporosis]. *Ann. Médecine Interne* *151*, 373–379.
- Cong, Y., Li, C.-J., Zhao, J.-N., Liu, X.-Z., and Shi, X. (2015). Associations of polymorphisms in the bone morphogenetic protein-2 gene with risk and prognosis of osteosarcoma in a Chinese population. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 2059–2064.
- Cummings, S.R., and Melton, L.J. (2002). Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* *359*, 1761–1767.
- Daans, M., Lories, R.J.U., and Luyten, F.P. (2008). Dynamic activation of bone morphogenetic protein signaling in collagen-induced arthritis supports their role in joint homeostasis and disease. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R115.
- Dallas, S.L., Prideaux, M., and Bonewald, L.F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr. Rev.* *34*, 658–690.
- De Luca F, null, Barnes, K.M., Uyeda, J.A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V., and Baron, J. (2001). Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* *142*, 430–436.
- Dennler, S., Laboureaud, J., Farge, D., Mauviel, A., and Verrecchia, F. (2006). [Involvement of TGFbeta1 in fibrotic diseases: role of its effectors, the Smad proteins]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Francaise Médecine Interne* *27*, 46–49.
- Derynck, R., and Akhurst, R.J. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1000–1004.
- Ding, R., Li, P., Song, D., Zhang, X., and Bi, L. (2015). Predictors of response to TNF- α antagonist therapy in Chinese rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* *34*, 1203–1210.
- Dolhain, R.J., Tak, P.P., Dijkmans, B.A., De Kuiper, P., Breedveld, F.C., and Miltenburg, A.M. (1998). Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* *37*, 502–508.
- Dong, C., Zhu, S., Wang, T., Yoon, W., Li, Z., Alvarez, R.J., ten Dijke, P., White, B., Wigley, F.M., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2002). Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3908–3913.

- Eda, H., Zhang, J., Keith, R.H., Michener, M., Beidler, D.R., and Monahan, J.B. (2010). Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine* 52, 215–220.
- El-Amin, S.F., Hogan, M.V., Allen, A.A., Hinds, J., and Laurencin, C.T. (2010). The indications and use of bone morphogenetic proteins in foot, ankle, and tibia surgery. *Foot Ankle Clin.* 15, 543–551.
- European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) Group, Felsenberg, D., Silman, A.J., Lunt, M., Armbrecht, G., Ismail, A.A., Finn, J.D., Cockerill, W.C., Banzer, D., Benevolenskaya, L.I., et al. (2002). Incidence of vertebral fracture in europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 17, 716–724.
- Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 397–440.
- Finsson, K.W., Parker, W.L., ten Dijke, P., Thorikay, M., and Philip, A. (2008). ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 23, 896–906.
- Flanders, K.C., Sullivan, C.D., Fujii, M., Sowers, A., Anzano, M.A., Arabshahi, A., Major, C., Deng, C., Russo, A., Mitchell, J.B., et al. (2002). Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am. J. Pathol.* 160, 1057–1068.
- Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrah, N., Guardiola, P., Delneste, Y., and Jeannin, P. (2013). IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PloS One* 8, e56045.
- Gierut, A., Perlman, H., and Pope, R.M. (2010). Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 36, 271–296.
- Ginhoux, F., and Merad, M. (2010). Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol. Cell Biol.* 88, 387–392.
- Gonzalo-Gil, E., and Galindo-Izquierdo, M. (2014). Role of transforming growth factor-beta (TGF) beta in the physiopathology of rheumatoid arthritis. *Reumatol. Clin.* 10, 174–179.
- Gonzalo-Gil, E., Criado, G., Santiago, B., Dotor, J., Pablos, J.L., and Galindo, M. (2013). Transforming growth factor (TGF)- β signalling is increased in rheumatoid synovium but TGF- β blockade does not modify experimental arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 174, 245–255.
- Gravallese, E.M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E., and Goldring, S.R. (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* 43, 250–258.
- Hall, S.E., Criddle, R.A., Comito, T.L., and Prince, R.L. (1999). A case-control study of quality of life and functional impairment in women with long-standing vertebral osteoporotic fracture. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 9, 508–515.
- Harada, S., and Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349–355.

van der Heijde, D.M., van 't Hof, M.A., van Riel, P.L., Theunisse, L.A., Lubberts, E.W., van Leeuwen, M.A., van Rijswijk, M.H., and van de Putte, L.B. (1990). Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann. Rheum. Dis.* *49*, 916–920.

Huber, L.C., Distler, O., Tarner, I., Gay, R.E., Gay, S., and Pap, T. (2006). Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *45*, 669–675.

Hume, D.A., and MacDonald, K.P.A. (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* *119*, 1810–1820.

Hummel, C.W., Geiser, A.G., Bryant, H.U., Cohen, I.R., Dally, R.D., Fong, K.C., Frank, S.A., Hinklin, R., Jones, S.A., Lewis, G., et al. (2005). A selective estrogen receptor modulator designed for the treatment of uterine leiomyoma with unique tissue specificity for uterus and ovaries in rats. *J. Med. Chem.* *48*, 6772–6775.

Hwang, S.-J., Choi, B., Kang, S.-S., Chang, J.-H., Kim, Y.-G., Chung, Y.-H., Sohn, D.H., So, M.W., Lee, C.-K., Robinson, W.H., et al. (2012a). Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R14.

Hwang, S.-J., Choi, B., Kang, S.-S., Chang, J.-H., Kim, Y.-G., Chung, Y.-H., Sohn, D.H., So, M.W., Lee, C.-K., Robinson, W.H., et al. (2012b). Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R14.

Issack, P.S., and DiCesare, P.E. (2003). Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am. J. Orthop. Belle Mead NJ* *32*, 429–436.

Itayem, R., Mengarelli-Widholm, S., and Reinholt, F.P. (1999). The long-term effect of a short course of transforming growth factor-beta1 on rat articular cartilage. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *107*, 183–192.

Kano, M.R., Bae, Y., Iwata, C., Morishita, Y., Yashiro, M., Oka, M., Fujii, T., Komuro, A., Kiyono, K., Kaminishi, M., et al. (2007). Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3460–3465.

Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* *127*, 1755–1766.

Kennedy, A., Fearon, U., Veale, D.J., and Godson, C. (2011). Macrophages in synovial inflammation. *Front. Immunol.* *2*, 52.

Koch, M.W., Metz, L.M., and Kovalchuk, O. (2013). Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* *9*, 35–43.

Kochi, Y., Suzuki, A., and Yamamoto, K. (2014). Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *452*, 254–262.

Kraan, M.C., de Koster, B.M., Elferink, J.G., Post, W.J., Breedveld, F.C., and Tak, P.P. (2000). Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or

methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind clinical trial in fifteen patients. *Arthritis Rheum.* *43*, 1488–1495.

Krenn, V., Morawietz, L., Häupl, T., Neidel, J., Petersen, I., and König, A. (2002). Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol. Res. Pract.* *198*, 317–325.

Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., et al. (2008). Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* *320*, 807–811.

Liu, Y., Hou, R., Yin, R., and Yin, W. (2015). Correlation of bone morphogenetic protein-2 levels in serum and synovial fluid with disease severity of knee osteoarthritis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *21*, 363–370.

Lories, R.J.U., Derese, I., Ceuppens, J.L., and Luyten, F.P. (2003). Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum.* *48*, 2807–2818.

Marie, P., and Halbout, P. (2008). [OPG/RANKL: role and therapeutic target in osteoporosis]. *Médecine Sci. MS* *24*, 105–110.

Marinova-Mutafchieva, L., Gabay, C., Funa, K., and Williams, R.O. (2006). Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor-beta expression in the joint. *Clin. Exp. Immunol.* *146*, 287–293.

Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 753–791.

Massagué, J., and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* *19*, 1745–1754.

Masteller, E.L., and Wong, B.R. (2014). Targeting IL-34 in chronic inflammation. *Drug Discov. Today* *19*, 1212–1216.

Mercado-Pimentel, M.E., Hubbard, A.D., and Runyan, R.B. (2007). Endoglin and Alk5 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Dev. Biol.* *304*, 420–432.

Mizuno, T., Doi, Y., Mizoguchi, H., Jin, S., Noda, M., Sonobe, Y., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2011). Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity. *Am. J. Pathol.* *179*, 2016–2027.

Moon, S.-J., Hong, Y.-S., Ju, J.H., Kwok, S.-K., Park, S.-H., and Min, J.-K. (2013). Increased levels of interleukin 34 in serum and synovial fluid are associated with rheumatoid factor and anticyclic citrullinated peptide antibody titers in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *40*, 1842–1849.

Mori, Y., Chen, S.-J., and Varga, J. (2003). Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *48*, 1964–1978.

Mulherin, D., Fitzgerald, O., and Bresnihan, B. (1996). Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *39*, 115–124.

Nakamichi, Y., Mizoguchi, T., Arai, A., Kobayashi, Y., Sato, M., Penninger, J.M., Yasuda, H., Kato, S., DeLuca, H.F., Suda, T., et al. (2012). Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 10006–10011.

Nakamichi, Y., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2013). IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J. Bone Miner. Metab.* *31*, 486–495.

Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K., and Takaoka, K. (1994). Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *9*, 651–659.

Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y.-G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A.W., Halenbeck, R., Cheng, H.-Y., Gokhan, S., et al. (2013). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* *288*, 21972–21986.

Park, M.-C., Park, Y.-B., and Lee, S.-K. (2008). Relationship of bone morphogenetic proteins to disease activity and radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis. *Scand. J. Rheumatol.* *37*, 200–204.

Pettit, A.R., Walsh, N.C., Manning, C., Goldring, S.R., and Gravallese, E.M. (2006). RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *45*, 1068–1076.

Picascia, A., Grimaldi, V., Pignalosa, O., De Pascale, M.R., Schiano, C., and Napoli, C. (2015). Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *157*, 1–15.

Pohlers, D., Beyer, A., Koczan, D., Wilhelm, T., Thiesen, H.-J., and Kinne, R.W. (2007). Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* *9*, R59.

Pountos, I., Panteli, M., Georgouli, T., and Giannoudis, P.V. (2014). Neoplasia following use of BMPs: is there an increased risk? *Expert Opin. Drug Saf.* *13*, 1525–1534.

Preisser, L., Miot, C., Le Guillou-Guillemette, H., Beaumont, E., Foucher, E.D., Garo, E., Blanchard, S., Frémaux, I., Croué, A., Fouchard, I., et al. (2014). IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology. Baltim. Md* *60*, 1879–1890.

Pruijn, G.J.M. (2015). Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* *6*, 192.

Rioja, I., Hughes, F.J., Sharp, C.H., Warnock, L.C., Montgomery, D.S., Akil, M., Wilson, A.G., Binks, M.H., and Dickson, M.C. (2008). Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor. *Arthritis Rheum.* *58*, 2257–2267.

Rousselle, A.-V., and Heymann, D. (2002). Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* *30*, 533–540.

- Sakuma, M., Hatsushika, K., Koyama, K., Katoh, R., Ando, T., Watanabe, Y., Wako, M., Kanzaki, M., Takano, S., Sugiyama, H., et al. (2007). TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. *Int. Immunol.* *19*, 117–126.
- Saraux, A., Berthelot, J.M., Devauchelle, V., Bendaoud, B., Chalès, G., Le Henaff, C., Thorel, J.B., Hoang, S., Jousse, S., Baron, D., et al. (2003). Value of antibodies to citrulline-containing peptides for diagnosing early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *30*, 2535–2539.
- Scharstuhl, A., Glansbeek, H.L., van Beuningen, H.M., Vitters, E.L., van der Kraan, P.M., and van den Berg, W.B. (2002). Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 507–514.
- Segaliny, A.I., Brion, R., Mortier, E., Maillason, M., Cherel, M., Jacques, Y., Le Goff, B., and Heymann, D. (2015). Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 1010–1021.
- Ségaly, A.I., Mohamadi, A., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Lanel, R., Amiaud, J., Charrier, C., Boisson-Vidal, C., and Heymann, D. (2015). Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *137*, 73–85.
- Shigeyama, Y., Pap, T., Kunzler, P., Simmen, B.R., Gay, R.E., and Gay, S. (2000). Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *43*, 2523–2530.
- Stanford, S.M., Aleman Muench, G.R., Bartok, B., Sacchetti, C., Kiosses, W.B., Sharma, J., Maestre, M.F., Bottini, M., Mustelin, T., Boyle, D.L., et al. (2014). TGFβ responsive tyrosine phosphatase promotes rheumatoid synovial fibroblast invasiveness. *Ann. Rheum. Dis.*
- Taylor, P.C., Peters, A.M., Paleolog, E., Chapman, P.T., Elliott, M.J., McCloskey, R., Feldmann, M., and Maini, R.N. (2000). Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *43*, 38–47.
- Toh, M.-L., Bonnefoy, J.-Y., Accart, N., Cochin, S., Pohle, S., Haegel, H., De Meyer, M., Zemmour, C., Preville, X., Guillen, C., et al. (2014). Bone- and cartilage-protective effects of a monoclonal antibody against colony-stimulating factor 1 receptor in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *66*, 2989–3000.
- Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B.D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C.J., and Rosen, V. (2006). BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat. Genet.* *38*, 1424–1429.
- Valdimarsdottir, G., Goumans, M.-J., Rosendahl, A., Brugman, M., Itoh, S., Lebrin, F., Sideras, P., and ten Dijke, P. (2002). Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* *106*, 2263–2270.
- Verrecchia, F., Laboureaux, J., Verola, O., Roos, N., Porcher, R., Bruneval, P., Ertault, M., Tiev, K., Michel, L., Mauviel, A., et al. (2007). Skin involvement in scleroderma--where histological and clinical scores meet. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *46*, 833–841.

- Verschueren, P.C.P.M., Lories, R.J.U., Daans, M., Théate, I., Durez, P., Westhovens, R., and Luyten, F.P. (2009). Detection, identification and in vivo treatment responsiveness of bone morphogenetic protein (BMP)-activated cell populations in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 117–123.
- Vidal, B., Serrano, A.L., Tjwa, M., Suelves, M., Ardite, E., De Mori, R., Baeza-Raja, B., Martínez de Lagrán, M., Lafuste, P., Ruiz-Bonilla, V., et al. (2008). Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev.* *22*, 1747–1752.
- Wahl, S.M. (1992). Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J. Clin. Immunol.* *12*, 61–74.
- Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wakefield, L.M., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Roberts, A.B., and Sporn, M.B. (1987). Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 5788–5792.
- Wang, M., Jin, H., Tang, D., Huang, S., Zuscik, M.J., and Chen, D. (2011). Smad1 plays an essential role in bone development and postnatal bone formation. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *19*, 751–762.
- Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.-G., Yu, W., Huang, M., Williams, L.T., Lin, H., and Stanley, E.R. (2010). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 495–505.
- Wijbrandts, C.A., Vergunst, C.E., Haringman, J.J., Gerlag, D.M., Smeets, T.J.M., and Tak, P.P. (2007). Absence of changes in the number of synovial sublining macrophages after ineffective treatment for rheumatoid arthritis: Implications for use of synovial sublining macrophages as a biomarker. *Arthritis Rheum.* *56*, 3869–3871.
- Xiong, J., Onal, M., Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Manolagas, S.C., and O'Brien, C.A. (2011). Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat. Med.* *17*, 1235–1241.
- Xu, X., Zheng, L., Bian, Q., Xie, L., Liu, W., Zhen, G., Crane, J.L., Zhou, X., and Cao, X. (2015). Aberrant Activation of TGF- β in Subchondral Bone at the Onset of Rheumatoid Arthritis Joint Destruction. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*
- Yang, X., Letterio, J.J., Lechleider, R.J., Chen, L., Hayman, R., Gu, H., Roberts, A.B., and Deng, C. (1999). Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J.* *18*, 1280–1291.
- Zhang, F., Ding, R., Li, P., Ma, C., Song, D., Wang, X., Ma, T., and Bi, L. (2015). Interleukin-34 in rheumatoid arthritis: potential role in clinical therapy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *8*, 7809–7815.

Rôle et expression de l'Interleukine- 34 dans la Polyarthrite Rhumatoïde

Interaction avec les molécules de la famille du TGF- β

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation synoviale pouvant conduire à des destructions ostéo articulaires irréversibles. Les synoviocytes jouent un rôle central dans cette cascade de signaux inflammatoires.

Nombre de cytokines telles que: le Tumor Necrosis Factor - α (TNF- α), l' Interleukine 1 - β (IL-1- β) ou l'Interleukine 6 (IL-6), ont montré leur efficacité en tant que cibles thérapeutiques. Cependant certains patients sont toujours considérés comme de mauvais répondeurs, ce qui motive la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. L'interleukine-34 (IL-34) est une nouvelle cytokine impliquée dans la différenciation des macrophages et l'ostéoclastogenèse. Dans la première partie de ce travail, nous avons décrit que l'IL-34 était exprimée dans la synovite rhumatoïde et dans les liquides synoviaux de patients et ce de façon corrélée à l'inflammation synoviale. Dans la seconde partie de ce travail nous nous sommes intéressés aux interactions possibles entre cette nouvelle cytokine et les membres de la famille du Transforming Growth Factor- β (TGF- β) avec une description de l'expression l'IL-34, du TGF- β 1 et de la Bone Morphogenic Protein (BMP-2) au sein des liquides synoviaux de patients et un effet de répression de l'expression d'IL-34 sur les synoviocytes et les cellules souches mésenchymateuses par BMP-2 et TGF- β .Ce travail identifie donc l'IL-34 comme une nouvelle cytokine impliquée dans l'inflammation synoviale dans la PR avec deux inhibiteurs potentiels: TGF- β 1 et BMP-2.

MOTS CLES : Polyarthrite Rhumatoïde IL-34 TGF- β

Role and expression of interleukin-34 in rheumatoid arthritis

Interaction with the molecules of the family of TGF- β

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease characterized by synovial inflammation that may lead to irreversible joint bone destruction. Synoviocytes play a central role in this cascade of inflammatory signals. Numerous cytokines such as Tumor Necrosis Factor - α (TNF- α), Interleukin 1- β (β -IL-1) or interleukin 6 (IL-6), have proved their efficacy as targets Therapeutic. However some patients are still considered poor responders, which motivates the development of new therapeutic approaches. Interleukin-34 (IL-34) is a novel cytokine involved in macrophage differentiation and osteoclastogenesis. In the first part of this work, we described that IL-34 was expressed in rheumatoid synovitis and synovial fluids of patients and so correlated with synovial inflammation .In the second part of this work we were interested in the interaction between this new cytokine and members of the family of transforming growth factor- β (TGF- β) with the description of the expression of IL-34, TGF- β 1 and Bone morphogenic Protein (BMP-2) in the synovial fluids of patients and a repressive effect of BMP-2 and TGF- β on IL-34 expression on synovial cells and mesenchymal stem cells. This work identifies IL-34 as a new cytokine involved in synovial inflammation in RA with two potential inhibitors: TGF- β 1 and BMP-2.

KEYWORDS : Rheumatoid arthritis IL-34 TFG- β