



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention : « Sciences de la vie et de la Santé »

Le 17 Décembre 2015

par

Meriem TIBARI-KOUFANY

Etude de la contribution des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes en physiopathologie articulaire

Membres du Jury :

Dr. APPARAILLY Florence
Pr. BERENBAUM Francis

DR2 INSERM, U1183, Montpellier, Rapporteur
PU-PH INSERM UMR-S938, Paris, Rapporteur

Pr. JOUZEAU Jean-Yves
Examineur
Dr. MOULIN David
Examineur

PU-PH, Nancy, Directeur de thèse,
CR1 CNRS, Nancy, co-encadrant,

Pr. DESVERGNE Béatrice

PU-PH, Lausanne, Suisse,

Membre invité

*UMR 7365, IMoPA,
Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Biologie Santé, Vandoeuvre-Les-
Nancy*

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur Jean-Yves JOUZEAU pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je tiens particulièrement à le remercier, au delà de la thèse, de m'accorder beaucoup d'indépendance et d'autonomie dans la réalisation de mon travail, ce qui est énormément formateur. Je le remercie également pour ses conseils scientifiques et pour m'avoir fait partager ses connaissances à la hauteur de sa rigueur scientifique. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie le Docteur David MOULIN d'avoir co-encadré ma thèse et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, pour ses conseils scientifiques et son soutien durant la réalisation de ces travaux. Merci pour ton enthousiasme débordant et pour ta disponibilité au quotidien.

Je remercie le Docteur Florence APPARAILLY de l'honneur qu'elle me témoigne en acceptant d'être rapporteur de mon travail de thèse. Qu'elle soit assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie également le Professeur Francis BERENBAUM de me faire l'honneur d'accepter d'être rapporteur de mon travail de thèse. Je lui témoigne ma reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie également le Professeur Béatrice DESVERGNE de me faire l'honneur d'accepter mon invitation à participer au jury de ma thèse en faisant le déplacement depuis Lausanne. Je tiens également à la remercier d'avoir permis l'émergence de la collaboration entre nos deux équipes, sans laquelle une partie des travaux présentés dans cette thèse n'auraient pu être réalisés. Je remercie toute l'équipe, Federica, Mariano et Carine pour leur accueil et leur sympathie.

Je remercie le Docteur Pascal REBOUL, co-directeur de notre équipe, pour ses conseils scientifiques, son soutien et sa bonne humeur permanente. Merci également pour toutes

les discussions non-scientifiques, mais néanmoins très instructives, concernant les problématiques « sociétales et philosophiques ».

Je remercie le Docteur Arnaud BIANCHI pour son soutien et son aide scientifique et amicale.

Je remercie Cécile GUILLAUME pour son aide technique, son amitié et ses précieuses « retouches ».

Je tiens également à remercier les autres membres de l'équipe pour leur soutien, notamment Hervé Kempf pour tous les articles introuvables, Nathalie Presle pour ses conseils et Pascale Pottie pour son amitié constante.

Je remercie la Fondation Arthritisme et la Région Lorraine pour le soutien financier apporté à ce travail.

A la mémoire de mon père

A ma mère

A mes frères et sœurs

A Khalid, pour ton soutien permanent

A Inès, pour ton aide sur les « nouvelles
technologies »

A Yanis, pour ta bonne humeur

A Manel, pour le réconfort de tes câlins

A toute ma grande famille

A mes amies

Je dédie cette thèse

CHAPITRE 1	14
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	14
1. LES RÉCEPTEURS ACTIVÉS PAR LES PROLIFÉRATEURS DE PEROXYSOMES : PPARs	15
1.2 Historique de la découverte des PPARs	15
1.3 Isotypes et distribution tissulaire	15
1.4 Structure et fonction cellulaire des PPARs	17
1.5 Les ligands de PPAR	21
1.6 Role des PPARs	22
1.6.1 PPAR γ	22
1.6.1.1 Rôle de PPAR γ dans l'adipogénèse et l'homéostasie du glucose	22
1.6.1.2 Rôle de PPAR γ dans l'inflammation	25
1.6.1.3 Rôle de PPAR γ dans le métabolisme osseux	26
1.6.2 PPAR α	28
1.6.3 PPAR β/δ	28
2. LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE	29
2.1 La polyarthrite rhumatoïde : pathologie inflammatoire chronique	29
2.1.1 Données épidémiologiques	30
2.1.2 Facteurs étiologiques	31
2.2 Les cytokines dans la PR	32
2.2.1 Les cytokines pro-inflammatoires	32
2.2.1.1 Interactions du TNF α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans la PR	33
2.2.1.2 L'IL-17 : acteur majeur de l'arthrite	37
2.2.2 Les cytokines anti-inflammatoires	41
3. LES MASTOCYTES	49
3.1 Origine	49
3.2 Distribution tissulaire	49
3.3 Fonctions physiologiques	50
3.3.1 Mastocytes : cellules sentinelles	50
3.3.2 Rôle des mastocytes dans le maintien de l'homéostasie des tissus	51
3.3.3 Rôle des mastocytes dans l'immunomodulation	52
3.4 Fonctions pathologiques	52
3.4.1 Les mastocytes acteurs de nombreuses pathologies	52
3.4.2 La mastocytose	54
3.4.2.1 Mastocytose cutanée et systémique	54
3.4.2.2 Mastocytose et atteinte osseuse	55
3.4.3 Rôle des mastocytes dans les pathologies auto-immunes	56
3.4.3.1 Rôle des mastocytes dans la PR	56
3.4.3.2 Rôle des mastocytes dans d'autres pathologies auto-immunes	58
3.4.3.3 Apport des modèles animaux dans l'établissement du rôle des mastocytes	59
3.4.3.4 Article 1 : « A case of rheumatoid arthritis associated to systemic mastocytosis »	59
CHAPITRE 2	71
RÉSULTATS	71
1. COMPARAISON DES POTENTIALITÉS ANTI-ARTHRITIQUES D'AGONISTES SÉLECTIFS DES RÉCEPTEURS PPAR α ET PPAR γ	72
1.1 Objectif du travail	72
1.2 Résultats marquants	72
1.3 Conclusion	73
1.4 Article 2 : « Fenofibrate vs pioglitazone: Comparative study of the anti-arthritis potencies of PPAR-alpha and PPAR-gamma agonists in rat adjuvant-induced arthritis »	73
2. ETUDE DES POTENTIALITÉS ANTI-ARTHRITIQUES ET ANTI-RÉSORPTIVES D'UN AGONISTE SÉLECTIF DE PPAR γ	82
2.1 Objectif du travail	82
2.3 Résultats marquants	82
2.2 Article 3 : « The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist Pioglitazone Preserves Bone Microarchitecture in Experimental Arthritis by Reducing the Interleukin-17-Dependent Osteoclastogenic Pathway »	84

3. ETUDE DES CONSÉQUENCES DE LA DÉLÉTION TOTALE IN VIVO DE PPAR γ SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'ARTHRITE	97
3.1 <i>Objectif du travail</i>	97
3.2 <i>Résultats marquants</i>	97
3.3 <i>Article 4 : « PPAR gamma deficient mice develop spontaneous arthritis associated to synovial mastocytosis »</i>	97
CHAPITRE 3	123
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	123

Liste des abréviations

ACF	Adjuvant Complet de Freund
ACO	AcylCoA oxydase
AIA	Arthrite induite à l'adjuvant
AP-1	Activator protein-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
bFGF	basic Fibroblast growth factor
BMMC	Bone marrow-derived mast cell
C/EBPα	CCAAT/enhancer-binding protein α
CMC	Carboxyméthylcellulose
CMO	Contenu minéral osseux
COMP	Cartilage oligomeric Matrix Protein
COX	Cyclooxygénase
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DEXA	Dual energy X-ray absorptiometry
DMARD	Disease modifying anti-rheumatic drugs
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMO	Densité minérale osseuse
DR-1	Direct repeat-1
DTT	dithiotréitol
EDTA	Ethylènediaminetétraacétate
ELISA	Enzyme linked-immuno-sorbent assay
GAG	Glycosaminoglycane
HA	Acide hyaluronique
HDL	High density lipoprotein
HETE	Hydroxyeicosatétraénoïque
HLA	Human leucocyte antigen
HODE	Hydroxyoctadecadiénoic acid
ICE	IL-1 converting enzyme
IκBα	Inhibitor of NF- κ B alpha

IKK	I κ B
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-1Ra	Antagoniste du récepteur de l'IL-1
IL-1RacP	IL-1 Receptor accessory protein
IL-1RI	Récepteur à l'IL-1 de type I
IL-1RII	Récepteur à l'IL-1 de type II
iNOS	NO synthase inductible
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
JNK	c-jun N-terminal kinase
LB	Lymphocytes B
LOX	Lipoxygénases
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T
LTB4	Leucotriène B4
MAPK	Mitogen activating protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein 1 α
M-MLV	Murine moloney leukemia virus
MMP	Métalloprotéase matricielle
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Monoxyde d'azote
OPG	Ostéoprotégérine
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Protéoglycane
PGE2	Prostaglandine E2
PIO	Pioglitazone
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator response element
PR	Polyarthrite rhumatoïde

RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RT-PCR	Reverse transcription- polymerase chain reaction
RXR	Récepteur des rétinoïdes X
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TACE	TNF-alpha Converting Enzyme
TBE	Tris borate EDTA
TGFβ	Transforming growth factor beta
TIMP	Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases matricielles
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor type 1
TNFR2	Tumor necrosis factor receptor type 2
TZD	Thiazolidinedione
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
15d-PGJ₂	15 désoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J ₂

PREAMBULE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprend également ceux des hormones thyroïdiennes, stéroïdiennes et des glucocorticoïdes. Les PPARs contrôlent l'expression d'une grande variété de gènes impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques et interviennent principalement dans la régulation du métabolisme lipidique et de la tolérance au glucose (Kersten et al. 2000). Ces récepteurs peuvent être activés par des ligands naturels comme les acides gras et leurs métabolites lipidiques ou des ligands synthétiques comme les glitazones et les fibrates.

Trois sous types de ces récepteurs ont été décrits : PPAR α , PPAR γ et PPAR β/δ codés par des gènes différents, et qui s'expriment de façon différentielle dans les tissus. L'émergence des PPARs comme cibles des molécules utilisées dans le traitement des dyslipidémies, de la résistance à l'insuline et de l'inflammation, pathologies qui concourent au développement du diabète de type II et des accidents cardio-vasculaires, en a fait des facteurs d'intérêt croissant (om 2013). L'inflammation est le dénominateur commun entre les pathologies dans lesquelles les PPARs interviennent comme régulateurs majeurs, plaçant ces récepteurs à l'intersection entre les lipides, les désordres métaboliques et le système immunitaire.

Dans l'arthrite chronique expérimentale, l'activation de PPAR α et surtout PPAR γ a la capacité de réduire l'inflammation articulaire et systémique, la sévérité des lésions articulaires, la réponse immunitaire et la différenciation ostéoclastique (Giaginis et al. 2009). Alors que les traitements hypolipémiants agonistes de PPAR α sont généralement bien tolérés, l'utilisation de molécules insulinosensibilatrices agonistes de PPAR γ est associée à la prise de poids, à la rétention d'eau et au risque de fracture chez les patients atteints de diabète de type II (Rizos et al. 2009). L'effort fourni pour tenter d'améliorer l'efficacité des agonistes de ces récepteurs tout en réduisant leurs effets indésirables a permis de mieux comprendre les mécanismes complexes de régulation métabolique par les PPARs et de mieux en cerner leur potentiel thérapeutique.

Lors de travaux précédents (Koufany et al. 2008), nous avons démontré que deux agonistes de haute affinité pour PPAR γ , la pioglitazone et la rosiglitazone, utilisés dans le traitement du diabète de type II, avaient la capacité de réduire la sévérité d'une arthrite expérimentale en réduisant l'hyperplasie synoviale et l'expression articulaire de cytokines

pro-inflammatoires majeures de l'arthrite (TNF α et IL-1 β). Ces deux agonistes diminuaient également la perte osseuse inflammatoire mesurée sur corps entier par absorptiométrie biphotonique (Dual Energy X-Ray Absorpsiometry). Nous avons montré que la rosiglitazone et la pioglitazone activaient PPAR γ *in vivo* en confirmant l'augmentation d'expression de son gène cible, l'adiponectine, dans le tissu adipeux. Cependant, la pioglitazone induisait également l'expression d'un gène cible de PPAR α , l'acyl-CoA oxydase dans le foie, suggérant que ses effets anti-arthritiques pourraient résulter de l'activation conjointe de PPAR α et de PPAR γ .

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans la continuité de ces travaux antérieurs puisque nous nous sommes, dans un premier temps, attachés à comparer l'effet anti-arthritique et anti-résorptif de deux agonistes sélectifs de PPAR α et de PPAR γ dans un modèle d'arthrite expérimentale.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur les mécanismes par lesquels la pioglitazone réduisait la perte osseuse inflammatoire et notamment à ses effets sur la microarchitecture osseuse.

Enfin, au vu du rôle majeur joué par PPAR γ dans l'inflammation chronique, nous nous sommes intéressés aux conséquences de sa délétion totale sur le développement du processus arthritique. Notre postulat était que des souris déficientes pour PPAR γ pourraient être plus susceptibles à une arthrite induite et représenteraient un outil de grand intérêt permettant de discerner les effets d'agonistes dépendant ou non de PPAR γ . Dans ce cadre, nous avons initié au début de ma thèse une collaboration avec l'équipe du Prof. B Desvergne qui a développé pour la première fois des souris totalement déficientes pour le gène de PPARG. Nous nous sommes alors attachés à caractériser le phénotype articulaire de ces souris.

Je ferai tout d'abord un rappel bibliographique, dans le premier chapitre, sur les rôles physiologiques et pathologiques des PPARs. J'introduirai ensuite la polyarthrite rhumatoïde et les cellules immunitaires qui entrent en jeu dans cette affection en développant notamment l'implication des mastocytes. De façon plus générale, je présenterai les rôles des mastocytes dans l'homéostasie tissulaire ainsi que dans les pathologies qui leur sont associées.

Dans le deuxième chapitre seront présentés les résultats expérimentaux obtenus durant cette thèse. Je terminerai enfin par un troisième chapitre de discussion générale des résultats et présenterai les perspectives envisagées pour ce travail.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes : PPARs

1.2 Historique de la découverte des PPARs

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes ou Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) ont été découverts en 1990 (Issemann & Green 1990). Issemann et Green ont mis en évidence la présence d'un facteur de transcription dans les hépatocytes de rongeurs, dont l'activation par différents hépatocarcinogènes conduisait à une prolifération des peroxysomes dans le foie de ces animaux. Peu de temps après leur découverte, trois isotypes ont été identifiés chez le xénope, PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ , codés par des gènes différents (Michalik et al. 2006). Ils diffèrent par leur spectre d'activité mais jouent tous un rôle majeur dans le métabolisme énergétique. Les PPARs sont l'une des familles de récepteurs nucléaires les plus étudiées au cours des deux dernières décennies en raison de leur potentiel thérapeutique.

En 1992, il a été démontré que PPAR induisait l'expression de gènes après formation d'un hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes X (RXR). Les PPARs ont été classés dans la superfamille des récepteurs nucléaires (sous-famille 1) des hormones thyroïdiennes, de la vitamine D et de l'acide rétinoïque. Les PPARs peuvent être activés par des ligands naturels (acides gras et leurs métabolites lipidiques) ou synthétiques (glitazones ; fibrates) (Bishop-Bailey & Wray 2003). Ils contrôlent l'expression d'une grande variété de gènes et sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques, comme le développement, et interviennent dans de nombreuses pathologies (Desvergne & Wahli 1999).

1.3 Isotypes et distribution tissulaire

Comme précédemment décrit, la famille des PPARs comprend trois membres distincts, PPAR α (N1RC1), PPAR β (N1RC2) et PPAR γ (N1RC3) (Berger & Moller 2002).

Ces trois isotypes possèdent des domaines de liaison à l'ADN très conservés, ce qui n'est pas le cas de leurs domaines de liaison aux ligands (LBD). En effet, certains acides aminés critiques du LBD sont conservés mais d'autres formant une poche hydrophobe sont variables d'un isotype à l'autre, ce qui explique l'existence d'une très grande variété de ligands des différents isotypes de PPAR (Willson et al. 2000) (Kota et al. 2005). La

poche hydrophobe où se fixent les ligands est très vaste et le ligand n'y occupe que 30 à 40% de l'espace. De plus, les interactions des ligands avec les résidus formant la poche sont peu spécifiques : ces deux éléments font des PPARs des récepteurs pouvant fixer des ligands naturels nombreux avec une affinité relativement faible. On parle de « capteurs » moléculaires capables de renseigner la cellule sur son état métabolique général.

La distribution tissulaire des trois isotypes est différente (Escher & Wahli 2000) (Figure 1) : PPAR α est majoritairement exprimé dans le foie, et de façon moins abondante dans le muscle squelettique, le tissu adipeux brun, le cœur, les reins et les vaisseaux. PPAR α est également retrouvé dans les monocytes et les macrophages. Dans les cellules de l'articulation, l'expression de PPAR α a été démontrée dans les chondrocytes de rat et d'homme (Bordji et al. 2000) (Boyault et al. 2001) et dans les synoviocytes de rat (Simonin et al. 2002). PPAR β est retrouvé dans tous les tissus testés, suggérant une répartition ubiquitaire, avec néanmoins une prédominance dans le cerveau, le tissu adipeux blanc, le muscle squelettique et la peau (Braissant et al. 1996) (Auboeuf et al. 1997). Cet isotype a été retrouvé dans les synoviocytes (Moulin et al. 2005) et les chondrocytes (Poleni et al. 2007) de rat.

PPAR γ est exprimé principalement dans le tissu adipeux et le tractus gastro-intestinal. Il existe trois isoformes d'ARNm de PPAR γ issues de trois promoteurs différents et d'un épissage alternatif : PPAR γ 1, PPAR γ 2 et PPAR γ 3.

PPAR γ 1 est la forme majoritaire dans la rate et l'intestin, PPAR γ 2 est spécifique du tissu adipeux et PPAR γ 3 s'exprime de façon abondante dans le gros intestin, le tissu adipeux blanc et les macrophages. L'expression de PPAR γ a été caractérisée dans les synoviocytes et chondrocytes humains (Fahmi et al. 2001) (Bordji et al. 2000), les chondrocytes de rat (Boyault et al. 2001) (Simonin et al. 2002) et les chondrocytes de lapin (Francois et al. 2004). L'expression des PPARs a également été caractérisée dans les ostéoblastes (Maurin 2005) et les ostéoclastes (Chan 2007).

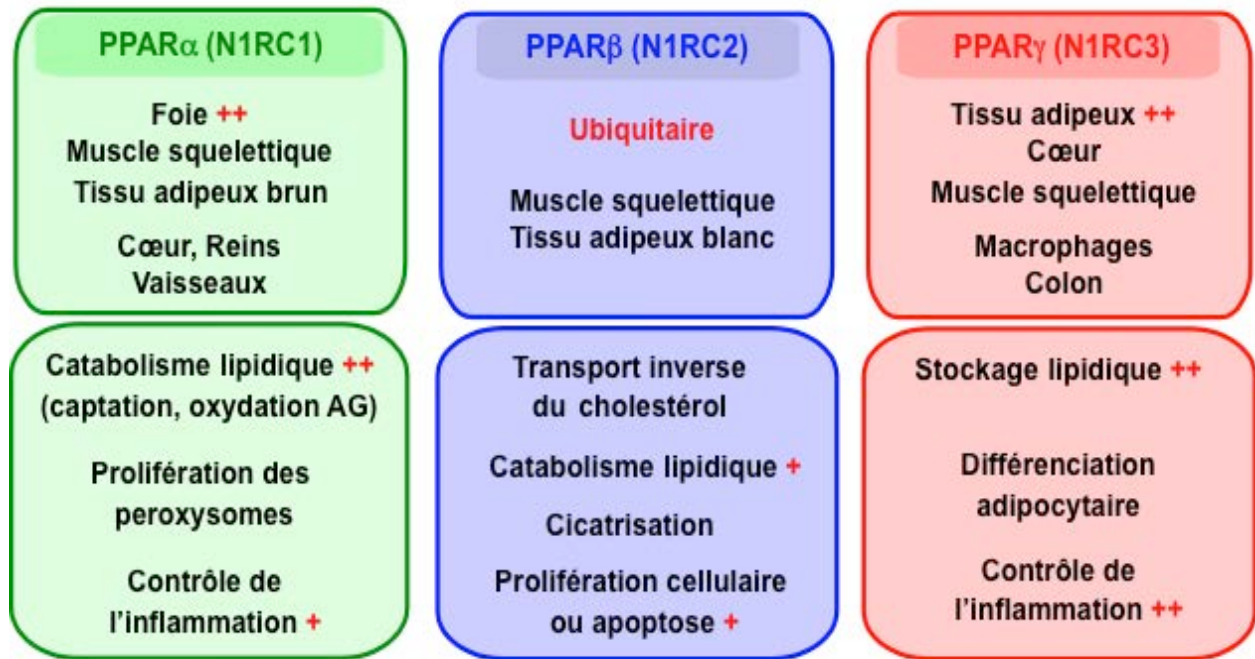


Figure 1 : Distribution tissulaire des trois isotypes de PPAR

1.4 Structure et fonction cellulaire des PPARS

Les récepteurs PPARs présentent une organisation structurale en 5 régions distinctes, communes à tous les récepteurs nucléaires (Figure 2).

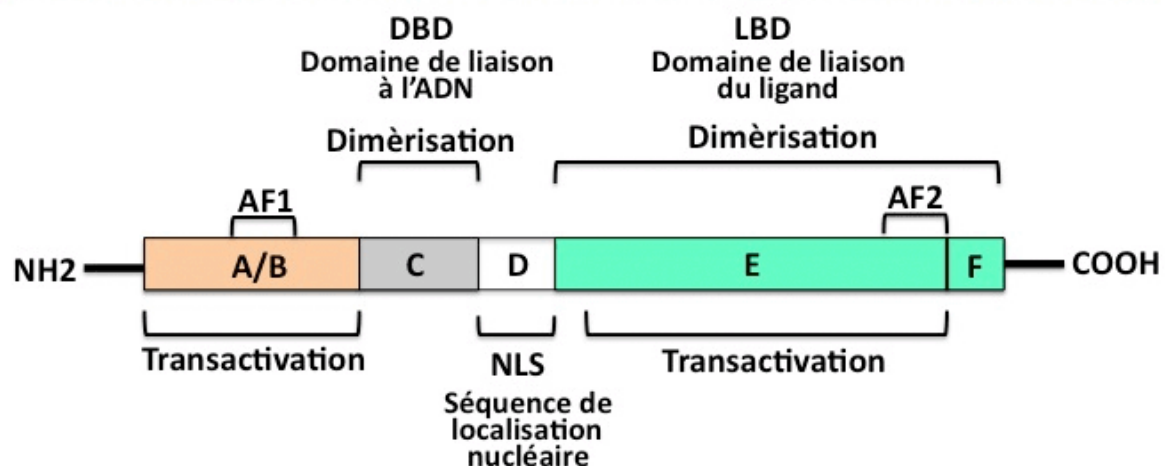
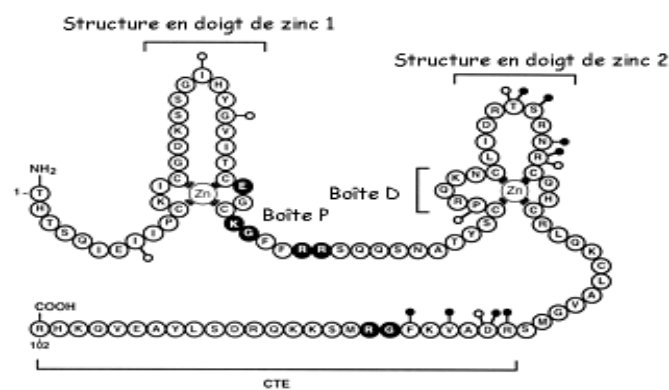


Figure 2 : Structure des récepteurs nucléaires.

http://www.facbio.com/content/index.php?option=com_content&task=view&id=73&Itemid=102

2- un domaine C de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD) le plus conservé des récepteurs nucléaires. Il joue un rôle crucial dans la reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN : en effet, ce domaine possède deux régions en « doigts de zinc », correspondant à 60-70 acides aminés et d'une extension de 25 acides aminés en C-terminal permettant la reconnaissance et la fixation de ces séquences spécifiques appelées élément de réponse (Figure 3).



4- un domaine C-terminal de liaison aux ligands (Ligand Binding Domain ou LBD) ou domaine E/F. La fixation du ligand induit des modifications de conformation qui permettent au domaine AF-2 d'interagir avec des co-activateurs et ainsi d'induire la transcription de gènes cibles. Le LBD présente des fonctions multiples telles que la liaison des ligands, la dimérisation, l'activation transcriptionnelle (AF-2) et l'interaction avec des protéines de choc thermique.

Les PPARs peuvent être des régulateurs transcriptionnels directs : la fixation de ligands endogènes ou synthétiques au LBD des PPARs seuls ou en hétérodimère avec RXR (activé par l'acide-9-cis rétinoïque), entraîne la dissociation des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs (Gelman et al. 1999) ce qui provoque un changement de conformation du LBD qui est spécifique de chaque isotype de PPAR, permettant ainsi une régulation très fine de l'activation de la transcription (Nettles & Greene 2005). L'hétérodimère PPAR/RXR reconnaît une séquence d'ADN dans le promoteur des gènes cibles comprenant deux motifs répétés et séparés d'un nucléotide, appelée DR-1 (direct repeat one). La séquence consensus reconnue pour la fixation des PPARs est AGGTCANAGGTCA. Cette séquence, appelée PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element), permet la fixation des 3 isotypes de PPAR avec des affinités variables (Figure 4).

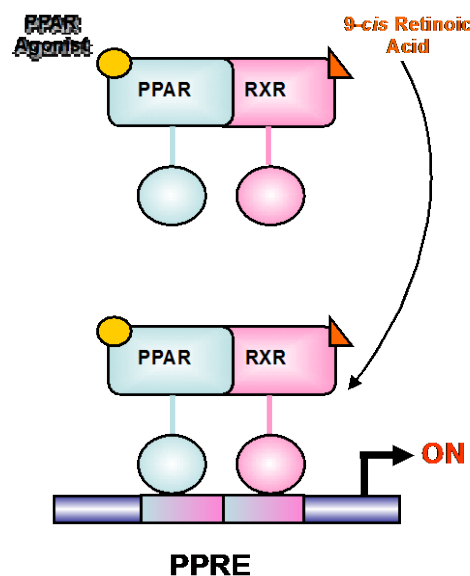


Figure 4 : Régulation transcriptionnelle directe par fixation de PPAR/RXR sur le PPRE

L'activation des PPARs peut se produire indépendamment du ligand : les protéines kinases p38 MAPK, JNK-MAPK, PKA et PKC phosphorylent soit le domaine A/B (ubiquitinylation), soit le domaine C (ce qui modifie les propriétés de liaison à l'ADN), ou les domaines D et E/F (ce qui modifie les propriétés de liaison au ligand, la dimérisation, le recrutement ou la dissociation de co-facteurs) entraînant ainsi des changements dans la structure des récepteurs (Diradourian 2005).

Les PPARs peuvent également être des régulateurs transcriptionnels indirects : en effet, l'hétérodimère PPAR/RXR, activé par son ligand ou non, peut entrer en compétition directe pour des co-activateurs communs avec des facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1, STAT, NF-AT), ou former un complexe avec ces mêmes facteurs (titration par interaction protéine-protéine), empêchant ainsi leur passage dans le noyau ou leur fixation à l'ADN. Un autre mécanisme de transrepression connu des PPARs est l'inhibition des MAPK, ce qui inactive les facteurs de transcription qui ne sont plus phosphorylés par les kinases (D. J. Kim et al. 2005) (Figure 5).

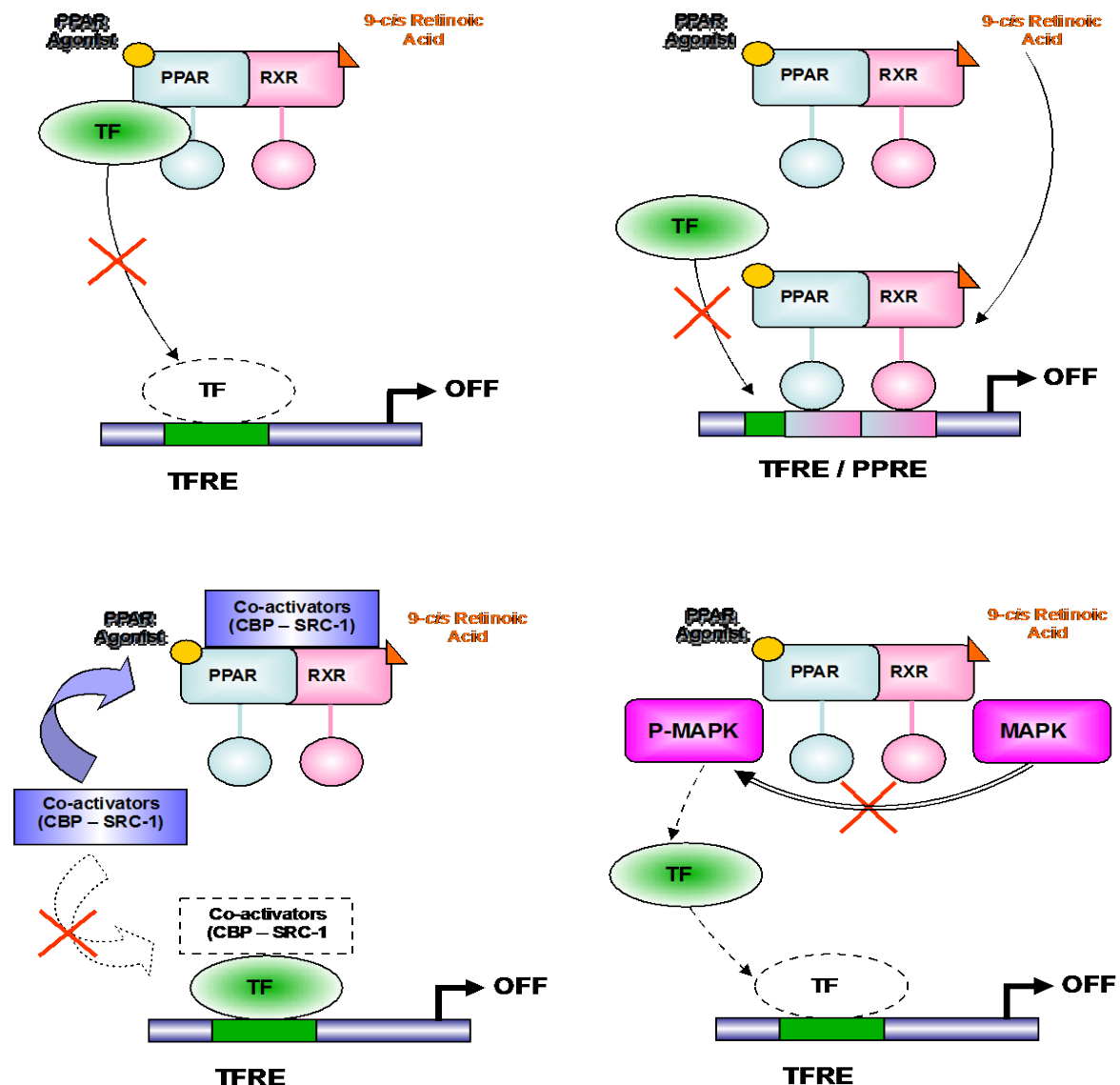


Figure 5 : Régulation transcriptionnelle indirecte par les PPARs

1.5 Les ligands de PPAR

Il existe de nombreux activateurs endogènes de PPAR qui ont été les premiers ligands identifiés. Ce sont des acides gras et des dérivés d'acides gras tels que les éicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique qui représentent, cependant, des ligands de faible affinité. Ils sont capables d'activer les trois isotypes de PPAR avec des sélectivités différentes. Ainsi la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J_2 (15d-PGJ₂), dérivée de la prostaglandine D₂, et des composants des LDL oxydées, tels que les acides 9- et 13-hydroxyoctadécadiénoïque, constituent des ligands naturels plus sélectifs de PPAR γ .

L'importance des récepteurs PPARs dans le métabolisme basal a conduit à l'élaboration de ligands synthétiques de forte affinité destinés à rétablir certains désordres métaboliques. Ces ligands synthétiques de haute affinité sont principalement des molécules hypolipémiantes, telles que les fibrates, capables d'activer PPAR α et les thiazolidinediones (TZD ou glitazones, dont les trois principales sont la troglitazone, la rosiglitazone et la pioglitazone), agents antidiabétiques, qui activent sélectivement PPAR γ (Berger J., 1996, Lehmann J.M., 1995). Les AINS tels que l'indométacine et l'ibuprofène, ainsi que l'ETYA, analogue de l'acide arachidonique sont également capables de se fixer aux PPARs mais à des concentrations élevées *in vitro*. Peu de ligands spécifiques de PPAR β ont été identifiés (GW501516).

Spécificité des ligands

Plusieurs études pharmacologiques et génétiques suggèrent qu'une partie des effets anti-inflammatoires des TZDs ou du ligand naturel la 15d-PGJ₂ serait indépendante de PPAR γ (Chawla et al. 2001) □ Les mécanismes d'action sont cependant peu connus. Récemment, deux protéines mitochondriales, mitoNEET et MPC/mTOT (Mitochondrial Pyruvate Transporter/ mitochondrial Target Of Thiazolidinones), de haute affinité pour les TZDs ont été mises en évidence (Colca et al. 2013) (Colca et al. 2004). Ainsi, certains des effets des TZD sont portés par ces protéines et non par PPAR γ . Des études *in vitro* ont montré que des ligands de PPAR γ pouvaient être des agonistes de faible ou de forte affinité en fonction du type cellulaire, probablement en raison du profil des co-facteurs mis en jeu. De plus, plusieurs co-activateurs de PPAR γ (DRIP205/TRAP220, NCoR) ont été associés aux effets secondaires tels que l'adipogénèse ou l'insulinorésistance. Ceci pourrait

expliquer comment des différences structurales mineures entre les ligands, qui entraînent le recrutement de co-facteurs spécifiques, pourraient résulter en une meilleure séparation de l'efficacité par rapport aux effets secondaires (Wright et al. 2014). C'est dans cet objectif que les études sont menées actuellement afin de développer des agonistes partiels ou mixtes PPAR α et PPAR γ (Ragaglitazar, Tesaglitazar, farglitazar) ou PPAR β/δ et γ (GW-2433).

1.6 Role des PPARs

1.6.1 PPAR γ

1.6.1.1 Rôle de PPAR γ dans l'adipogénèse et l'homéostasie du glucose

PPAR γ s'exprime fortement dans le tissu adipeux où il contrôle la différenciation adipocytaire via la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le phénotype adipocytaire et le stockage des lipides (Figure 6) (Rosen et al. 1999). Les premiers travaux avaient démontrés que la surexpression de PPAR γ dans des myoblastes (Teboul et al. 1995) ou des fibroblastes (Tontonoz et al. 1994) induisait leur différenciation en adipocytes. De plus l'inactivation de PPAR γ *in vivo* entraîne l'absence de tissu adipeux (Rosen et al. 1999). Ces résultats ainsi que de nombreuses autres études ont clairement mis en évidence que PPAR γ , en plus de son rôle dans l'adipogénèse, était un facteur clé dans le maintien des fonctions de l'adipocyte mature et du métabolisme des lipides. L'étude de souris hétérozygotes pour PPAR γ soumises à un régime riche en lipides a mis en évidence le développement d'une résistance à l'insuline (Kubota, Terauchi et al. 1999). Cette insulinoresistance est corrigée par des agonistes synthétiques de haute affinité pour PPAR γ , les thiazolidinediones (TZD) qui ont été utilisées dans la prise en charge du diabète de type II. Plus récemment, le rôle de régulateur majeur de l'adipogénèse de PPAR γ a été confirmé par la génération de souris déficientes totalement dépourvues de tissu adipeux (Barak et al. 1999). Il a été décrit une action conjointe de PPAR γ et de C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α) dans la régulation d'une voie de signalisation unique du développement et du maintien du phénotype adipocytaire. C/EBP α est un facteur de transcription de la famille des C/EBP dont l'expression, comme celle de PPAR γ , est induite par les facteurs C/EBP β et C/EBP δ . PPAR γ est capable d'induire l'adipogénèse dans des cellules déficientes pour C/EBP α mais à l'inverse C/EBP α est incapable de promouvoir l'adipogénèse dans des fibroblastes dans lesquels

PPAR γ a été invalidé. PPAR γ serait le régulateur direct de l'adipogénèse alors que le rôle majeur de C/EBP α serait le maintien de l'expression de PPAR γ et la régulation de la sensibilité à l'insuline. (Rosen et al. 2002).

De plus, la mise en évidence d'une population de progéniteurs adipocytaires exprimant PPAR γ dans le tissu adipeux blanc suggère qu'il pourrait participer à l'autorenouvellement des adipocytes (Tang et al. 2011). PPAR γ contrôle également les gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose, notamment Glut4 (glucose transporter type 4) ainsi que de nombreux autres facteurs sécrétés par le tissu adipeux tels que la leptine, l'adiponectine, la resistine ou le TNF α qui influencent aussi la résistance à l'insuline (Ahmadian et al. 2013). Les mécanisme d'action par lesquels ces facteurs régulent l'insulinorésistance sont encore peu connus, cependant des hypothèses sont émises quant à la complémentarité de ces facteurs qui ont la capacité de réguler soit l'inflammation (TNF α), soit la production de glucose hépatique (adiponectine) ou le comportement alimentaire (leptine), ce qui illustre les multiples possibilités thérapeutiques qu'offrent la modulation de ces facteurs.

Chez l'homme, une mutation dominant-négatif sur un allèle du gène PPARG s'accompagne de lipodystrophie partielle et d'une résistance à l'insuline, ce qui vient conforter le rôle prédominant de PPAR γ (Astapova & Leff 2014).

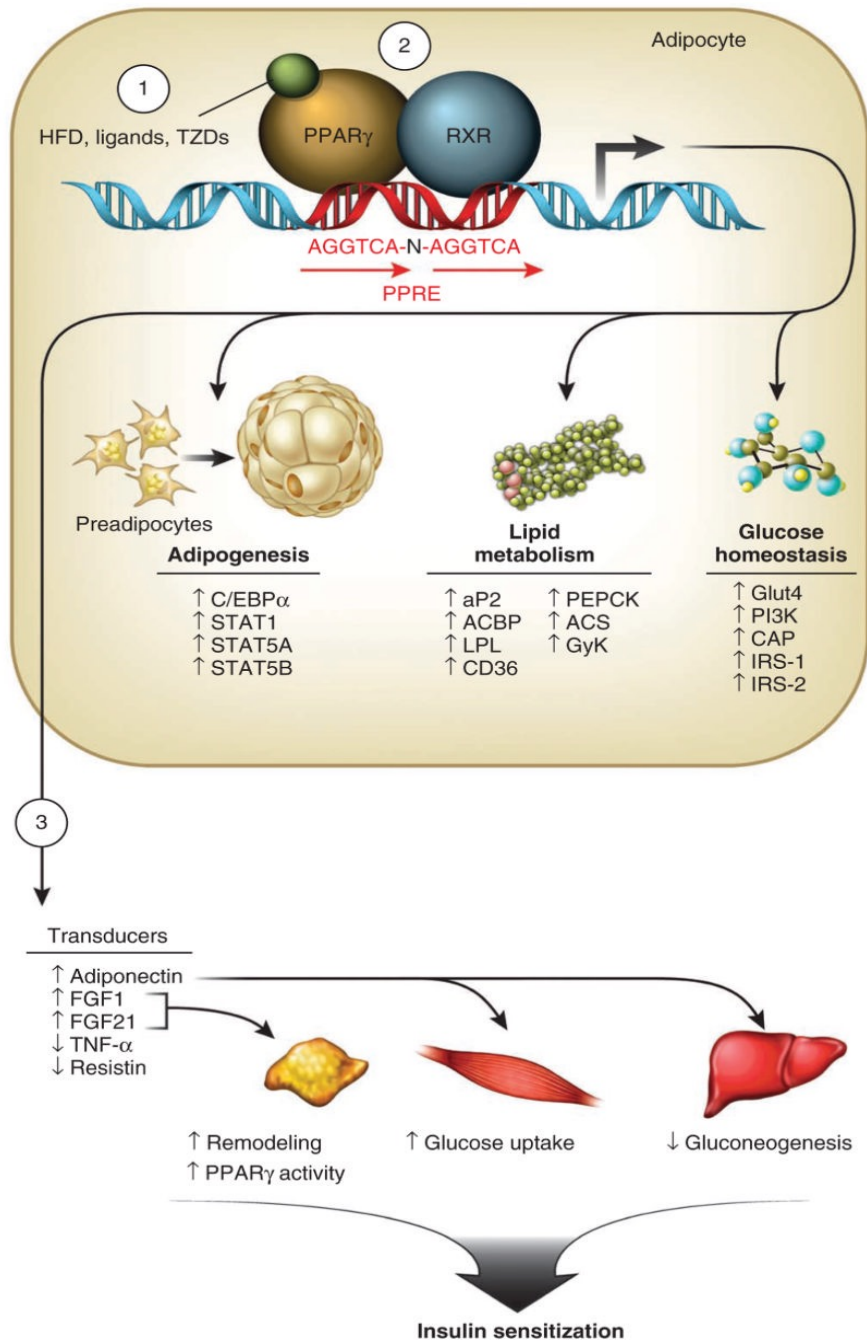


Figure 6 : Les multiples rôles de PPAR gamma dans le tissu adipeux. D'après Maryam A. et al., Nat Med., may 2013.

C/EBP α , CCAAT/enhancer-binding protein α ; STAT1, STAT5A et STAT5B, signal transducer and activator of transcription 1, 5A and 5B; aP2, fatty acid binding protein 2; ACBP, acyl-CoA-binding protein; LPL, lipoprotein lipase; CD36, cluster of differentiation 36; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; ACS, acyl-CoA synthetase; GyK, glycerol kinase; Glut4, glucose transporter 4; PI3K, phosphoinositide 3 kinase; IRS-1 and IRS-2, insulin receptor substrate 1 and 2.

1.6.1.2 Rôle de PPAR γ dans l'inflammation

Les trois isoformes de PPAR présentent des fonctions anti-inflammatoires et régulatrices de l'immunité innée ou adaptative (Glass & Ogawa 2006), cependant c'est l'isoforme PPAR γ qui a été la plus intensément étudiée dans les monocytes et les macrophages (dans lesquels c'est l'isoforme prédominante). L'activation *in vitro* de PPAR γ par des ligands spécifiques régule négativement l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion et de chémokines (Abdelrahman et al. 2005) par des mécanismes de transrepression de facteurs de transcription comme NF- κ B, AP-1, NF-AT et STAT. Dans les monocytes et les macrophages stimulés par des TZDs, PPAR γ diminue l'expression et la sécrétion de l'IL-1 β , du TNF α et de l'IL-6, associées aux macrophages M1 (C. Jiang et al. 1998). De même, l'activation de PPAR γ chez des patients a pour conséquence une réduction significative des marqueurs sériques de l'inflammation tels que l'IL-6, le TNF α et la protéine C-réactive, ce qui suggère un impact sur les pathologies inflammatoires chroniques, l'athérogenèse (Ohshima et al. 2012) ou le dysfonctionnement rénal (Sarafidis & Bakris 2006). L'activation de PPAR γ s'est également révélée intéressante dans les modèles expérimentaux de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), de myocardite auto-immune ou d'encéphalomyélite auto-immune alors qu'à l'inverse sa délétion a exacerbé les pathologies inflammatoires chroniques. Il a été démontré plus récemment que PPAR γ , ainsi que les deux autres isoformes, influençait directement ou indirectement la réponse immunitaire adaptative et contribuait au maintien de la tolérance immunologique (da Rocha Junior et al. 2013). PPAR γ inhibe l'activation des lymphocytes T et B et sa surexpression par des ligands spécifiques inhibe leur prolifération et diminue la viabilité cellulaire (Harris & Phipps 2001). PPAR γ s'exprime également dans les cellules NK (Natural Killer) et voit son expression augmentée dans les lymphocytes B activés (Garcia-Bates et al. 2009). De plus, la surexpression de PPAR γ a pour conséquence l'altération du phénotype des cellules dendritiques (DC), se traduisant par une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules de co-stimulation, ainsi que par l'altération de leur capacité migratoire et de présentation des antigènes (Ipseiz et al. 2014). La différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices Th 17 ou cellules régulatrices Treg est orchestrée par PPAR γ (Figure 7). Les cellules Th17 sont impliquées dans les défenses de l'organisme contre les pathogènes extracellulaires mais aussi dans le développement des pathologies auto-immunes telles

que la polyarthrite rhumatoïde (voir paragraphe 2.2.1.2) alors que les Treg confèrent une protection contre ces désordres auto-immuns. La délétion de $PPAR\gamma$ dans les lymphocytes T a pour conséquence une augmentation de la différenciation des Th17 et une aggravation des pathologies expérimentales auto-immunes médiées par Th17, alors que les agonistes de $PPAR\gamma$ inhibent la différenciation Th17 (Klotz et al. 2009).

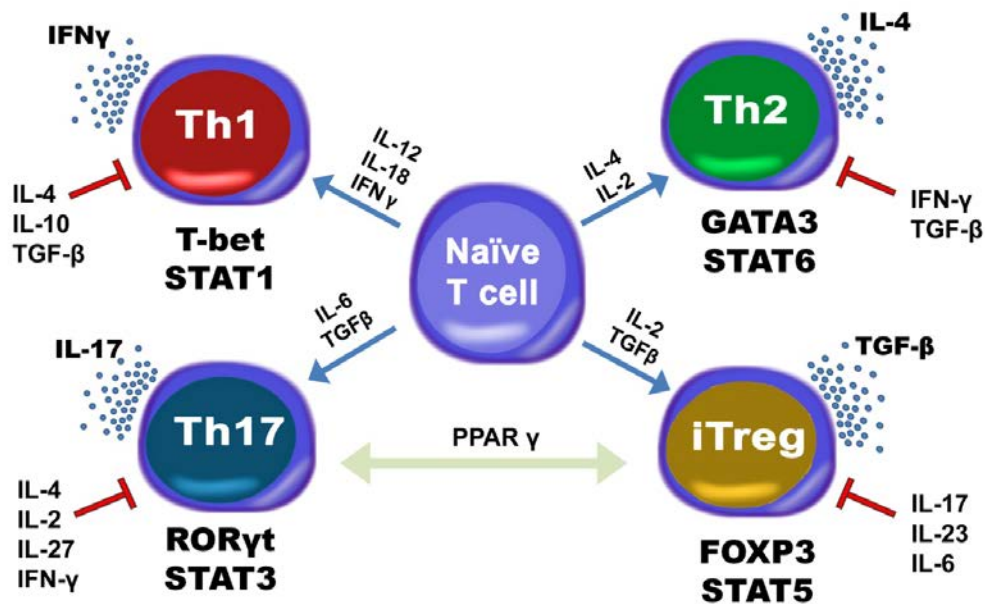


Figure 7 : Cytokines et facteurs de transcription régulant la différenciation des lymphocytes T naïfs.
D'après <http://miepdev.vbi.vt.edu/models/cd4-t-cell-model-archive/>

1.6.1.3 Rôle de $PPAR\gamma$ dans le métabolisme osseux

Les études épidémiologiques réalisées sur l'impact des TZDs utilisées dans le traitement du diabète de type II, ont montré qu'elles induisaient une perte osseuse, augmentant le risque de fracture notamment chez les femmes (A. V. Schwartz et al. 2006). Cependant une méta-analyse plus récente a montré qu'il existait déjà un risque plus élevé de fracture chez les patients atteints de diabète de type II, dû aux complications de la pathologie (Vestergaard 2007). Beaucoup de travaux s'intéressant aux conséquences des TZDs sur le métabolisme osseux sont controversés, cependant une méta-analyse récente réalisée par Loke YK et al. (Loke et al. 2009) a montré que la plupart des études réalisées chez des patients diabétiques de type II confirment que les TZDs augmentent le risque de fracture, de façon croissante avec l'âge, mais uniquement chez les femmes.

PPAR γ active la différenciation des progéniteurs issus de la moelle osseuse vers la voie adipocytaire au détriment de la voie ostéoblastique (Figure 8) (Gimble et al. 1996)), mais les agonistes de PPAR γ sont également capables de moduler l'ostéoclastogénèse. En effet bien que certaines études aient montré que la rosiglitazone accentuait la résorption osseuse en augmentant le nombre d'ostéoclastes chez le rat (Lazarenko et al. 2007), d'autres études à l'inverse suggèrent que l'activation de PPAR γ par son agoniste naturel, la 15-Désoxy-Delta-12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) inhibe la différenciation ostéoclastique chez l'homme et la souris (Mbalaviele et al. 2000). Ces données demeurent cependant ambiguës notamment en raison de la différence d'affinité de ces deux agonistes pour PPAR γ .

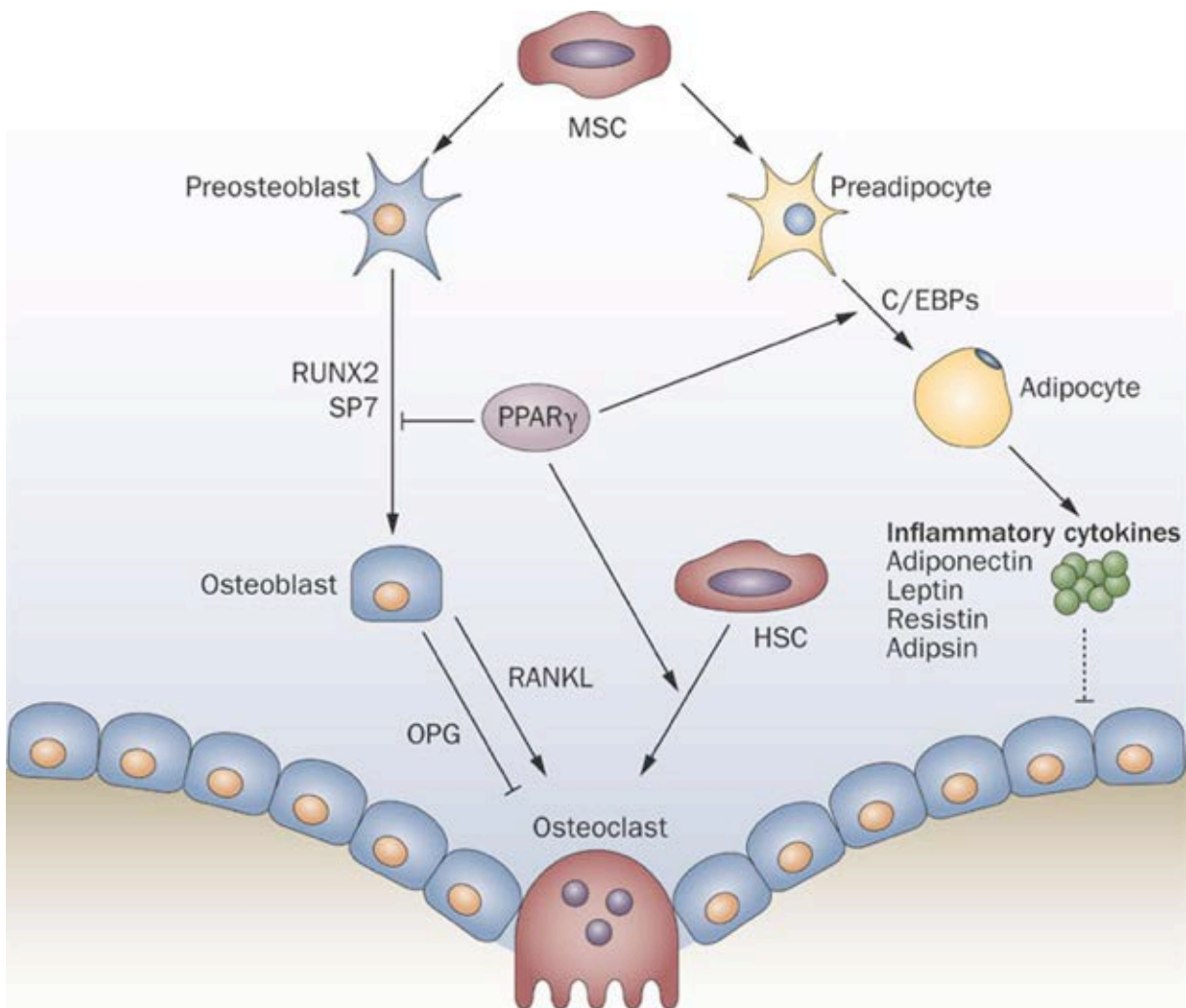


Figure 8 : PPAR gamma régule la masse osseuse. D'après Masanobu et al., Nature Reviews Rheumatology, July 2009

1.6.2 PPAR α

PPAR α est un « senseur nutritionnel » qui régule le métabolisme énergétique dans le foie et contrôle des gènes impliqués dans les étapes du catabolisme des lipides, telles que le transport intracytoplasmique des acides gras, leur passage à travers les membranes et leur oxydation (Desvergne & Wahli 1999). Le rôle clé de PPAR α dans la régulation du métabolisme lipidique a été démontré par la génération de souris dont le gène codant pour PPAR α a été invalidé. Après une période de jeûne, ces souris ne sont pas capables d'augmenter l'oxydation des lipides et présentent rapidement une hypoglycémie suivie d'hypocétonémie, une hyperlipidémie et une hypothermie (Kersten 1999). Chez l'homme, les agonistes de PPAR α améliorent le profil lipidique des sujets atteints de dyslipidémie en diminuant les taux plasmatiques de triglycérides et en augmentant ceux de Cholesterol-High-density Lipoprotein ou HDL (Linton 2000) (Zandbergen & Plutzky 2007). L'activation de PPAR α réduit le risque d'athérosclérose en limitant l'inflammation et la réponse vasculaire. Des études cliniques ont démontré que l'utilisation de ligands de PPAR α tels que les fibrates avait pour conséquence à la fois une diminution de l'inflammation mais aussi du développement de l'athérosclérose chez des patients présentant une insulino-résistance (Fruchart 2009).

1.6.3 PPAR β/δ

PPAR β/δ est le moins connu des trois isotypes. C'est un facteur de transcription capable d'intégrer des signaux externes ou internes et de moduler l'expression d'un grand nombre de gènes dans différents tissus. L'expression de PPAR β/δ étant ubiquitaire, son activation par des ligands naturels intervient dans un grand nombre de tissus et de fonctions physiologiques (Figure 9). La plupart des études réalisées *in vivo* a montré que l'activation ou la surexpression de PPAR β/δ réduit l'inflammation alors que sa délétion aggrave le statut inflammatoire. Les données les plus récentes sont en faveur d'un modèle de transrepression médié par BCL-6, cependant elles sont en contradiction avec les modèles de transrepression de NF- κ B et de polarisation des M2 médiés par PPAR β/δ (Neels & Grimaldi 2014). Les effets anti-inflammatoires consécutifs à l'activation de PPAR β/δ désignent ce facteur de transcription comme une cible thérapeutique potentielle. Le rôle majeur de PPAR β/δ au niveau des muscles squelettiques a également été largement décrit. En effet,

PPAR β/δ intervient dans la réponse adaptative au statut nutritionnel en modulant l'expression de gènes de différents type cellulaires conduisant à un changement significatif de la structure et du métabolisme musculaire, du réseau capillaire et en augmentant les défenses contre le stress oxydatif (Luquet et al. 2003). PPAR β/δ est également impliqué dans la physiologie de la peau (Man et al. 2008) : il est nécessaire au maintien de l'homéostasie de la barrière cutanée, et régule l'inflammation cutanée et la prolifération des kératinocytes. PPAR β/δ joue également un rôle dans la genèse du placenta (Lim et al. 1999) et le développement du tissu adipeux (Wu et al. 1999).

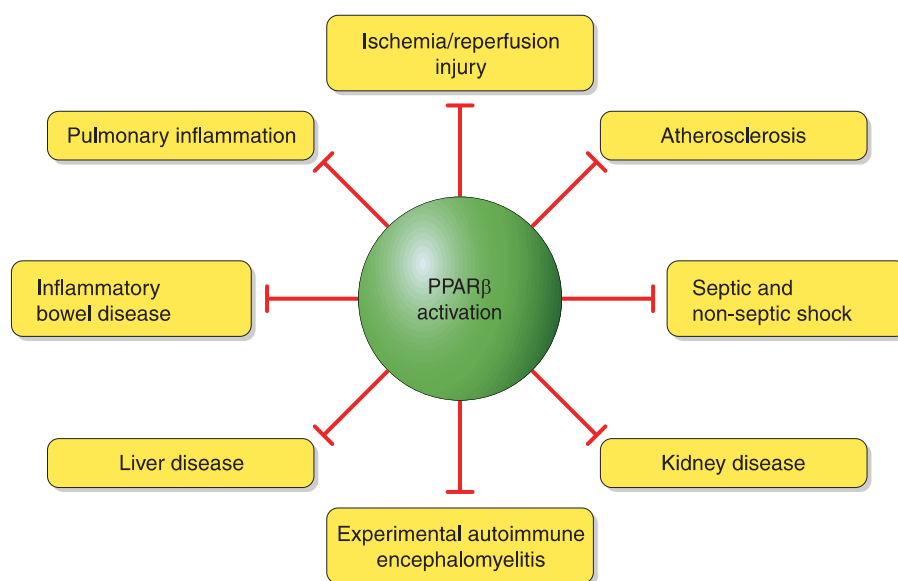


Figure 9 : Résumé des fonctions régulatrices majeures de PPAR beta (d'après G. Neels et P. Grimaldi, *Physiol Rev.* Vol 94. July 2014).

2. La polyarthrite rhumatoïde

2.1 La polyarthrite rhumatoïde : pathologie inflammatoire chronique

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme inflammatoire chronique qui atteint l'ensemble de l'appareil locomoteur avec une prédilection pour les mains, les poignets, les genoux et les pieds (Figure 10). C'est une pathologie auto-immune caractérisée par un dérèglement du système immunitaire et la production d'auto-anticorps, les facteurs rhumatoïdes et les anticorps anti peptides citrullinés (ACPA ou anti-CCP). Cette arthrite

se caractérise par la prolifération anormale des cellules de la membrane synoviale, conduisant à un épaissement et une désorganisation de la membrane synoviale, pour former un pannus érosif accompagné d'un épanchement responsable du gonflement articulaire et de la symptomatologie douloureuse. L'évolution de la maladie peut se faire quelques fois vers la guérison, mais évolue le plus souvent vers la persistance de l'inflammation. Ceci conduit à des lésions plus ou moins importantes des éléments de voisinage avec destruction du cartilage, de l'os, des ligaments et des tendons, aboutissant aux formes sévères (+/- 20%) voire malignes (5%) de la PR lorsqu'elles se compliquent de manifestations extra-articulaires.

Cette maladie, dans sa forme la plus fréquente, évolue par poussées entrecoupées de périodes de rémissions et est susceptible d'entraîner des déformations et des destructions articulaires parfois responsables d'une invalidité grave (Kay & Upchurch 2012).

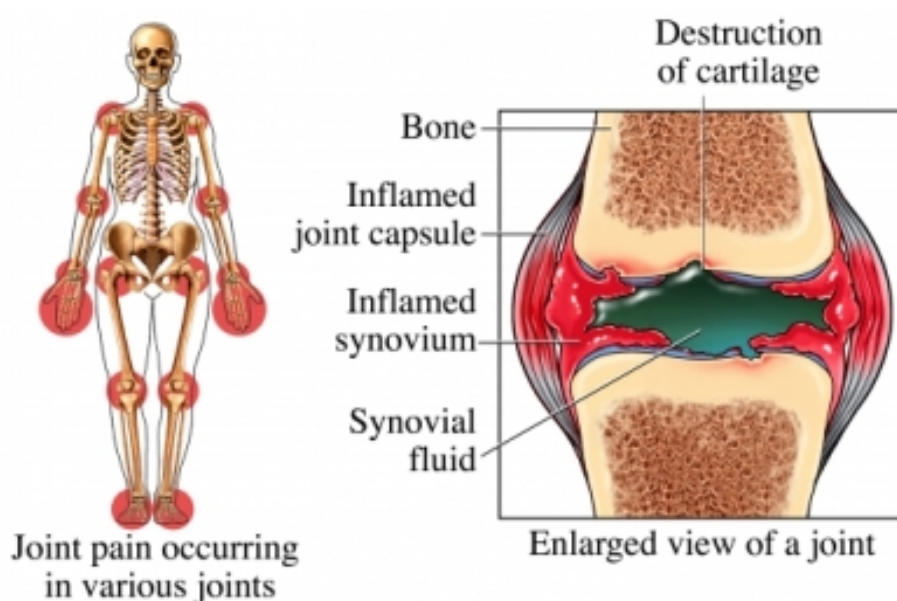


Figure 10 : Articulations arthritiques. D'après <http://stemrx.in/arthritis.html>

2.1.1 Données épidémiologiques

La P.R. est le rhumatisme inflammatoire le plus fréquent. C'est une pathologie qui touche en moyenne 0,31% de la population en France (Guillemin et al. 2005). Elle atteint cinq fois plus souvent la femme que l'homme et peut survenir à n'importe quel âge mais surtout entre 35 et 55 ans. Cette fréquence est d'autant plus élevée que la polyarthrite débute

précocement (3,7 femmes pour 1 homme si la P.R. débute avant 30 ans). La fréquence est, en revanche, identique chez l'homme et la femme si la maladie débute après 60 ans.

2.1.2 Facteurs étiologiques

La PR est une maladie auto-immune dont l'étiologie demeure inconnue. C'est une maladie polyfactorielle dont on ignore précisément les facteurs déclenchants, mais dont on connaît certains facteurs prédisposants:

Facteurs génétiques :

La PR n'est pas une maladie héréditaire même si plusieurs cas peuvent être retrouvés dans une même famille (le risque d'être atteint est alors multiplié par 2 ou 3). Le premier facteur génétique identifié a été le Human Leucocyte Antigen HLA-DR4. Dans un second temps, a été mis en évidence le gène HLA-DRB1 qui représente 30 % du risque génétique de développer une PR (Holoshitz 2010). Plus récemment, un deuxième gène de susceptibilité a été découvert: protein tyrosine phosphatase, non- receptor type 22 (PTPN22) qui code pour une tyrosine phosphatase et qui est impliquée dans plusieurs maladies auto immunes tel que le diabète de type 1 (Bowes & Barton 2008). D'autres gènes de susceptibilité de la PR identifiés grâce aux études d'association génétique pangénomiques (genome-wide association study, GWAS) (Kochi et al. 2014) sont en cours d'étude, tels que le TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1) ou le TNF α -induced protein 3-oligodendrocyte lineage transcription factor 3 (TNFAIP3-OLIG3), REL (c-Rel) et CCR6 (Chemokine (C-C motif) receptor 6).

Facteurs environnementaux :

Depuis quelques années, le tabagisme a clairement été identifié comme un facteur de risque important dans le développement d'une PR. L'inflammation provoquée par le tabac favoriserait la première phase de citrullination des protéines puis le facteur génétique représenté par le HLA-DRB1 induirait la deuxième phase qui correspond à la production d'anticorps antiprotéines citrullinées (Ruyssen-Witrand et al. 2012).

D'autres facteurs environnementaux supposés ont fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques et physiopathologiques, notamment les épitopes partagés des virus (parvovirus B19 notamment) ainsi que différents constituants du cartilage (collagène) sans cependant que des liens formels avec la maladie soient établis.

Facteurs endocriniens et immunitaires :

Les lésions articulaires observées dans la PR sont dues à une synovite auto-entretenu d'origine immunologique, secondaire à des processus impliquant l'immunité humorale et surtout cellulaire. Si l'origine de la dysimmunité demeure inconnue, les mécanismes de la réaction inflammatoire articulaire impliquant les cellules et leurs messagers (cytokines) sont de mieux en mieux identifiés. Les hypothèses hormonales sont quant à elles justifiées par la prévalence féminine de la maladie, par l'évolution favorable de la PR lors de la grossesse et par les poussées fréquentes lors de la période du post-partum. Le rôle immunomodulateur des œstrogènes a été démontré dans les modèles animaux.

2.2 Les cytokines dans la PR

La chronicité de l'inflammation dans la PR résulte d'un déséquilibre entre l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Boissier 2011) (Figure 11) qui jouent un rôle majeur dans la destruction de l'os et du cartilage. Ce phénomène correspond également à un déséquilibre entre les cytokines Th1 (IFN γ , IL-1, IL-12, TNF α) et Th2 (IL-10, IL-13, IL-11), favorable à l'activation du système immunitaire et donc à l'entretien de l'autoimmunité.

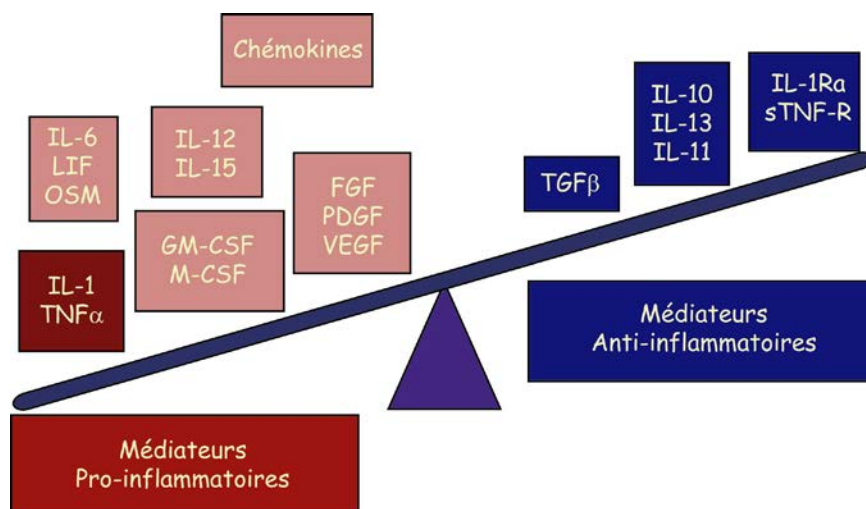


Figure 11 : Balance entre les médiateurs pro et anti-inflammatoires dans la PR

2.2.1 Les cytokines pro-inflammatoires

De très nombreux travaux ont démontrés les rôles fondamentaux du TNF α , de l'IL-6, de l'IL-1 β dans la cascade pathogénique de la PR. Je ne décrirai ici que sommairement le rôle de ces cytokines et développerai de façon plus approfondie le rôle de l'IL-17, une cytokine majeure et découverte plus récemment.

2.2.1.1 Interactions du TNF α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans la PR

Le rôle fondamental du TNF α dans la PR, qui le place en amont de la cascade cytokinique pro-inflammatoire, en fait une cible thérapeutique de choix, comme en témoigne le succès des biothérapies visant à neutraliser cette cytokine (Taylor & Feldmann 2009). Le TNF α , et dans une moindre mesure, l'IL-1 et l'IL-6, contrôlent la production de nombreuses autres cytokines, facteurs de croissance et chimiokines, mais aussi des molécules d'adhésion qui interviennent dans la réaction inflammatoire en favorisant l'angiogenèse et le recrutement des cellules dans la synoviale (Boissier 2011). La réponse biologique au TNF α se fait par l'intermédiaire de deux récepteurs membranaires de structures distinctes : le récepteur de type 1, TNFR1 et le récepteur de type 2, TNFR2. Ces deux récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires, dont les domaines extracellulaires partagent les mêmes propriétés structurelles et fonctionnelles. Par contre, leurs domaines intracellulaires sont distincts, et transduisent leurs signaux par des voies à la fois communes et distinctes. La caractéristique principale qui distingue les domaines intracellulaires du TNFR1 et du TNFR2 est la présence d'un domaine de mort cellulaire dans le TNFR1, absent sur le TNFR2. Ce domaine permet la fixation de protéines accessoires permettant l'activation des voies de signalisation pro-apoptotiques et inflammatoires caractéristiques du TNFR1 (Figure 12).

En conditions physiologiques, la signalisation cellulaire par le TNFR1 est responsable principalement des propriétés pro-inflammatoires du TNF α et a notamment été impliqué dans la physiologie du choc septique.

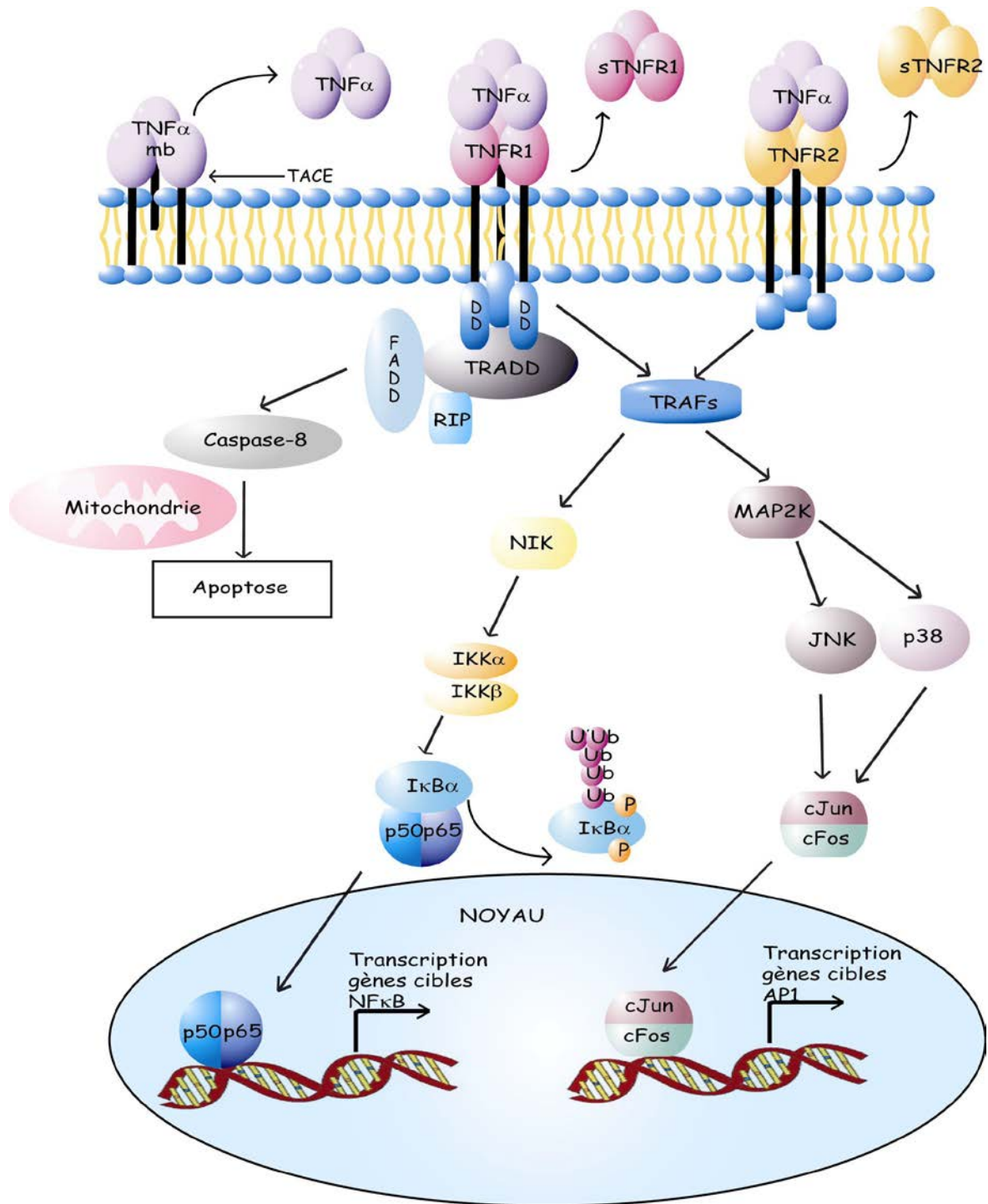


Figure 12 : Transduction du signal du TNF α

L'IL-1 β est l'autre médiateur clé de l'inflammation articulaire (van Den Berg 2000). C'est une cytokine multifonctionnelle, qui peut agir sur quasiment toutes les cellules immunitaires et souvent de concert avec d'autres cytokines ou médiateurs. L'IL-1 est, en outre, impliquée dans la prolifération cellulaire ou le chimiotactisme et elle joue, seule ou en synergie avec le TNF α , un rôle central dans la destruction progressive de la matrice cartilagineuse au cours des pathologies articulaires (Goldring 2003). Il existe deux types de récepteurs à l'IL-1 : le récepteur de type I (IL-1RI) et de type II (IL-1RII). Seul l'IL-1RI transmet le signal à la cellule cible après fixation de l'IL-1 et recrutement de la protéine accessoire indispensable à la transmission du signal, l'IL-1RAcP (Receptor Accessory Protein) (Wesche, Korherr et al. 1997). Ce complexe de haute affinité formé par l'IL-1, l'IL-1RI et l'IL-1RAcP permet ensuite le recrutement de la protéine accessoire MyD88 et de la kinase associée au récepteur de l'IL-1 (IRAK), initiant ainsi la réponse cellulaire à travers des voies de signalisations intracellulaires qui ne sont pas spécifiques de l'IL-1 seule. Le récepteur de type II est dépourvu du domaine intracellulaire permettant le recrutement des protéines accessoires (ne recrute pas l'IL-1RAcP après fixation de l'IL-1) et agit donc comme un récepteur « leurre », en fixant l'IL-1 sans transduction du signal (Dinarello 1996) (Figure 13).

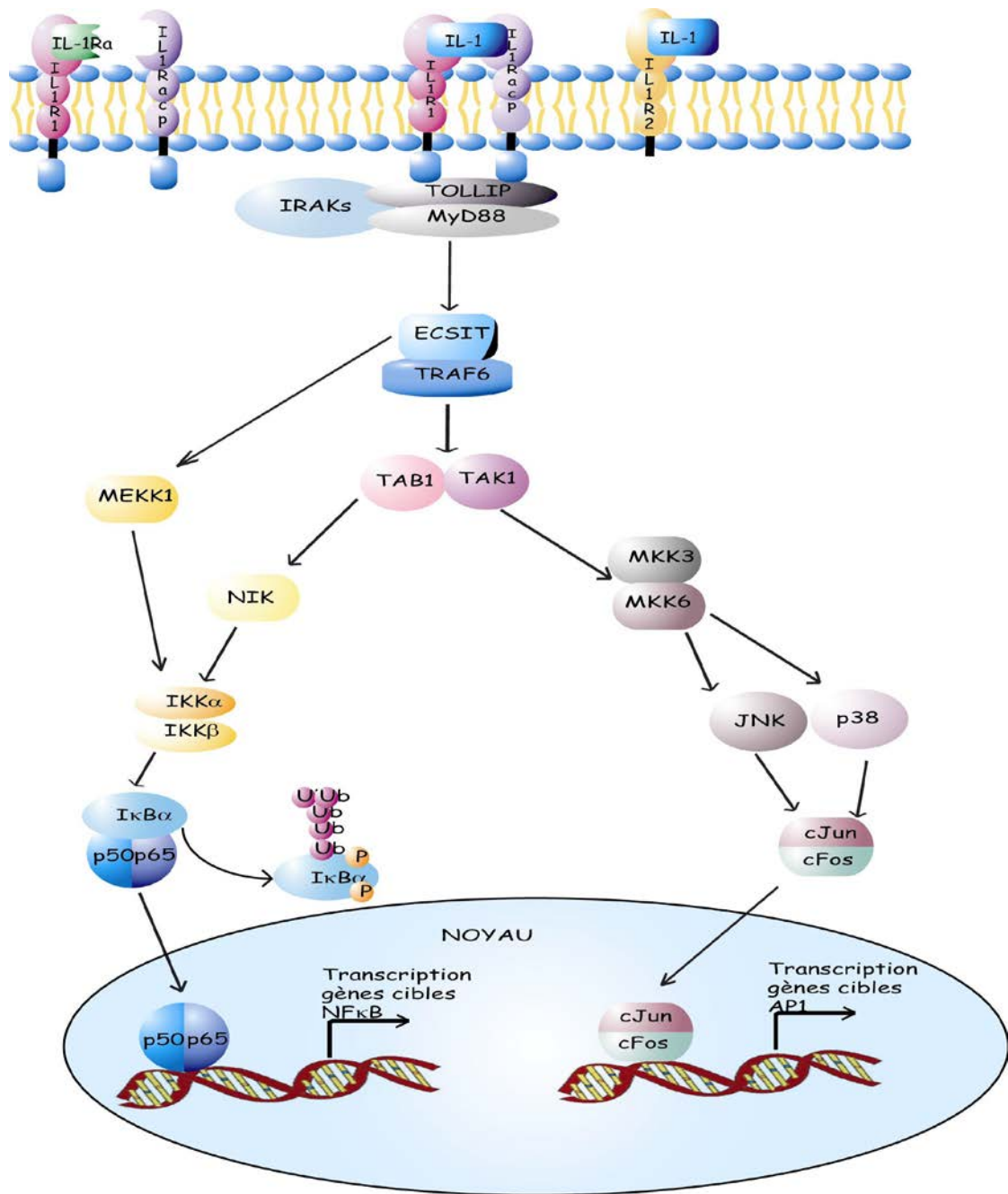


Figure 13: Transduction du signal de l'IL-1

L'IL-1 et le TNF α sont capables d'induire mutuellement leurs expressions. Des études menées principalement sur des modèles d'arthrites expérimentales permettent de faire l'hypothèse que l'action de l'IL-1 serait prédominante dans la destruction tissulaire alors que celle du TNF α le serait dans l'inflammation (Joosten et al. 1999). Le TNF α jouerait un rôle systémique, tandis que l'IL-1 β aurait une action locale prédominante. Les biothérapies visant à neutraliser le TNF α se sont révélées très efficaces dans le traitement de la PR, cependant une partie des patients ne répondent pas d'emblée ou échappent au traitement après plusieurs années. L'utilisation de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 β (Anakinra) n'a pas donné de résultats aussi probants que les thérapies anti-TNF α , bien que les premiers essais cliniques aient démontré une diminution de la progression radiographique des lésions articulaires (Y. Jiang et al. 2000) (Cohen et al. 2002). D'autres mécanismes d'inhibition de l'IL-1 β sont en cours de développement, mais aucun n'a trouvé, à ce jour, une réelle place dans la stratégie thérapeutique de la maladie (Cavalli & Dinarello 2015) alors qu'ils ont donné des résultats spectaculaires dans les syndromes auto-inflammatoires (Koné-Paut & Galeotti 2014). L'IL-6, qui est également retrouvée à des concentrations élevées dans le sang et le liquide synovial des patients atteints de PR (Steiner et al. 1999), affecte, comme le TNF α et l'IL-1 β , les fonctions des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes T et B, des monocytes et des ostéoclastes. Bien que possédant une action pléiotropique, l'IL-6 s'est révélée être une cible thérapeutique efficace. En effet, la thérapie basée sur le blocage du récepteur à l'IL-6 par un anticorps monoclonal (Tocilizumab) a donné des résultats encourageants (Hashizume et al. 2015) équivalents à ceux obtenus avec les anti-TNF α et d'autres anticorps ciblant cette fois la cytokine elle-même, sont en développement (G. W. Kim et al. 2015).

2.2.1.2 L'IL-17 : acteur majeur de l'arthrite

Le paradigme Th1/Th2 a été remis en cause depuis la découverte d'un troisième type de cellules effectrices, les lymphocytes Th17 (Bettelli et al. 2007), responsables entre autres de la production d'IL-17 (Figure 14). Les différents types de cellules effectrices sont orientés selon les cytokines qu'ils produisent : en lymphocytes Th1, associés à l'immunité cellulaire, lymphocytes Th2, associés à l'immunité humorale et lymphocytes Treg associés à la tolérance et à la régulation de la réponse immune. Les Th17 contribuent

activement au développement de différentes pathologies auto-immunes mais également à la défense de l'hôte contre certains pathogènes extracellulaires. En plus des lymphocytes T activés, les monocytes, les macrophages et les synoviocytes sont les principaux producteurs des cytokines pro-inflammatoires.

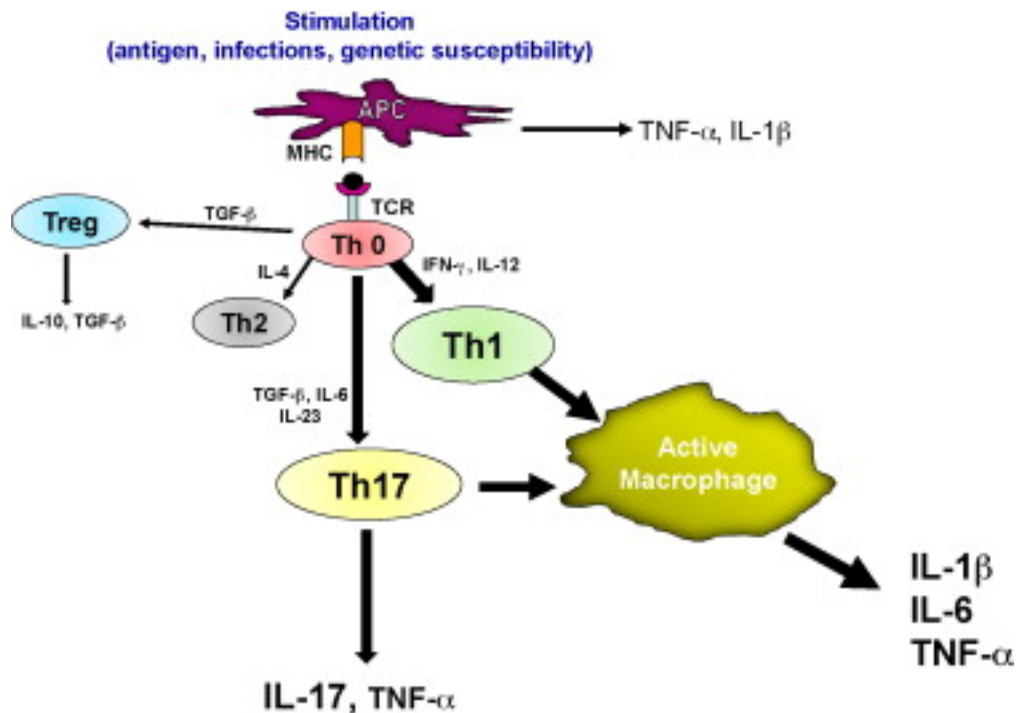


Figure 14 : Cascade pathogénique des cytokines de la PR. D'après M-C Boissier, Joint Bone Spine, 2011.

T helper (Th), Th0 (naïf), T-regulateur (Treg).

APC : Antigen presenting cell ; MHC : Major histocompatibility complex ; TCR : T-cell receptor.

La famille de l'IL-17 comporte six membres : IL-17A, B, C, D, E, F. L'IL-17A et F sont produites par les lymphocytes Th17. Cependant, l'IL-17A est largement prédominante dans le développement des réponses auto-immunes alors que l'IL-17E est capable d'initier une réponse Th2 qui inhibe la différenciation des Th17. On pensait, jusqu'à il y a quelques années, que les lymphocytes Th17 étaient seuls responsables de la production de l'IL-17. Il est désormais établi que d'autres types cellulaires tels que les mastocytes (Hueber et al. 2010) et les polynucléaires neutrophiles (L. Li et al. 2010) peuvent produire cette cytokine. La famille des récepteurs à l'IL-17, qui sont des protéines transmembranaires de type I, comporte cinq membres : IL-17RA, B, C, D, E. L'IL-17RA se lie à l'IL-17A avec une grande affinité, mais peut également lier l'IL-17E et F. Les lymphocytes Th17 expriment l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22, l'IL-26 et sont présents

[illegible]

-17



La Revue de médecine interne, 2011

of transcription; TGF- β :transforming growth factor-beta; TNF- α :tumor necrosis factor-alpha

L'IL-17 promeut l'activité transcriptionnelle de cytokines pro-inflammatoires, de cytokines hématopoïétiques et de médiateurs anti-microbiens, en synergie avec le TNF α et l'IL-1 β (Chabaud et al. 1998) (Katz et al. 2001).

Les taux d'IL-17 sont augmentés chez les patients atteints de PR. Wang et *al.* (Wang et al. 2012) ont en effet montré que le rapport des lymphocytes Th17/Treg circulants était relativement bas chez des patients sains alors qu'il est fortement augmenté chez les patients atteints de PR active. Ce déséquilibre joue un rôle majeur dans la pathogénèse de la PR en raison de la défaillance des Treg, du micro-environnement cytokinique et de la prédominance des Th17 qui, en plus d'induire la production de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6, de chémokines et de metalloprotéases, exercent une forte activité pro-inflammatoire via la production d'IL-17 (Volin & Shahrara 2011). En effet, cette cytokine est capable de provoquer la migration des monocytes du sang périphérique vers les articulations inflammatoires où ils se différencient en macrophages. Les macrophages et les fibroblastes synoviaux activés par l'IL-17 produisent un grand nombre de médiateurs inflammatoires qui sont responsables du recrutement des polynucléaires neutrophiles et qui participent, avec l'angiogenèse synoviale, à l'entretien de l'inflammation (Figure 16).

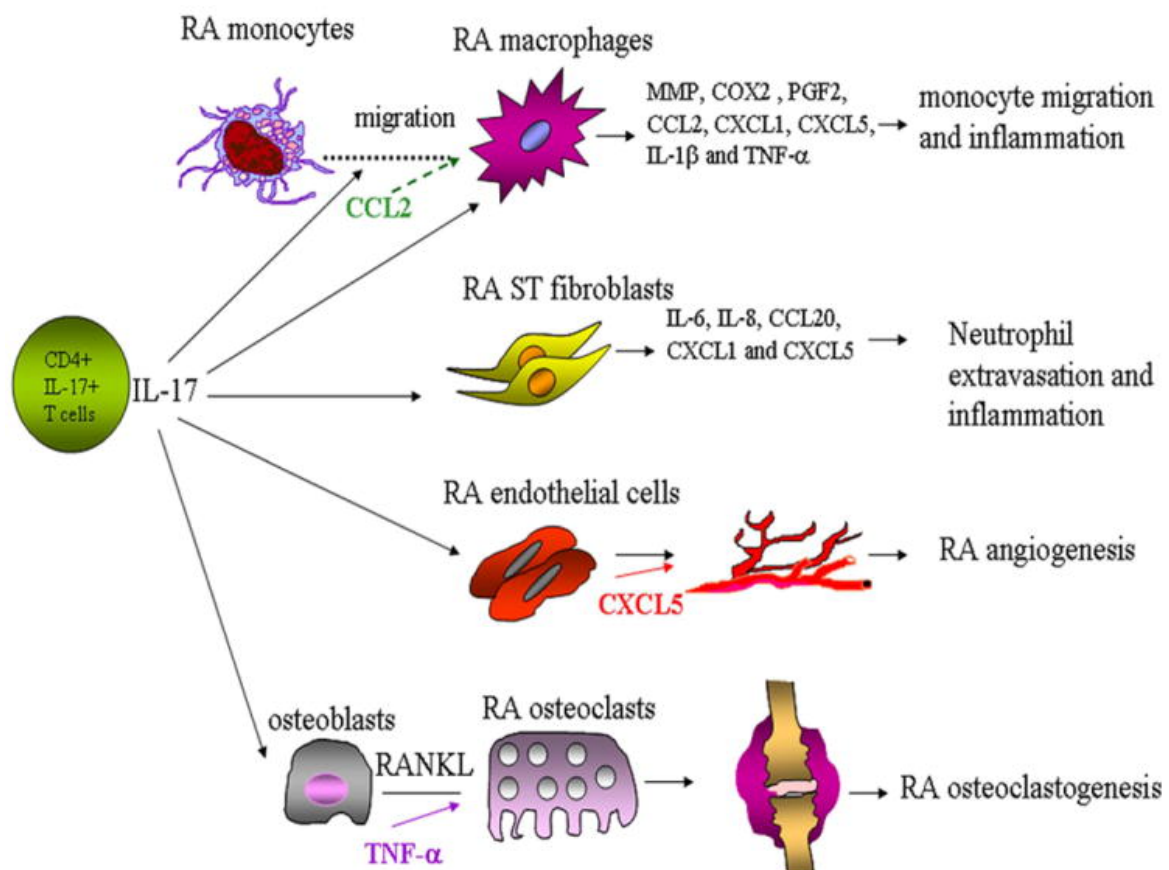


Figure 16 : Rôle pathologique de l'IL-17 dans la PR. D'après Michael V. Volin et Shiva Shahrara, *Rheumatology* (2011).

De plus, les études réalisées *in vivo* suggèrent que l'IL-17 pourrait être un médiateur clé des dégradations articulaires puisque son blocage par des anticorps spécifiques diminue la sévérité de l'arthrite expérimentale (Nakae et al. 2003). De même des souris IL-17^{-/-} résistent à l'arthrite induite au collagène (Nakae et al. 2003).

L'IL-17, seule ou en synergie avec le TNF α , l'IL-1 β ou l'IL-6 inhibe la synthèse des protéoglycanes (Lubberts et al. 2000) et promeut la dégradation des collagènes du cartilage (Koshy et al. 2002) ainsi que le relargage des métalloprotéases (Koenders et al. 2011). L'IL-17 induit également l'expression de RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) dans les ostéoblastes, et agit à nouveau de concert avec le TNF α en favorisant une augmentation de l'ostéoclastogénèse (voir paragraphe PR et perte osseuse). Dans un modèle d'arthrite induite au collagène, l'expression de l'IL-17 dans les tissus articulaires aggrave l'érosion osseuse (Lubberts et al. 2003). Ces observations suggèrent que l'IL-17, seule ou en synergie avec le TNF α ou l'IL-1 β joue un rôle majeur dans la dégradation du cartilage et de l'os dans la PR.

2.2.2 Les cytokines anti-inflammatoires

Ces cytokines sont des inhibiteurs naturels des cytokines pro-inflammatoires qui jouent un rôle majeur dans la régulation du système immunitaire et de la réaction inflammation. Cependant, à un stade évolué de la réaction inflammatoire, les monocytes, les macrophages et les cellules résidentes produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires dont l'activité ne peut plus être contrebalancée par leurs inhibiteurs naturels.

Les récepteurs solubles

L'antagoniste du récepteur à l'IL-1, l'IL1-Ra se fixe sur son récepteur (IL-1RI) et empêche le recrutement des protéines accessoires, inhibant ainsi l'initiation des voies de signalisations intracellulaires. L'IL-1RI et l'IL-1RII (récepteur leurre) peuvent être clivés et agir sous forme soluble, permettant ainsi de titrer avec des affinités différentes l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1Ra. Il en est de même pour les récepteurs du TNF α , TNF-RI et TNF-RII, par l'intermédiaire desquels s'effectue l'activation des voies de signalisation spécifiques au TNF α . Ces deux types de récepteurs peuvent être clivés de la surface des cellules par des métalloprotéases matricielles en réponse à des stimuli pro-inflammatoires. Le

fragment extracellulaire clivé conserve alors sa capacité de fixer le $\text{TNF}\alpha$, et fonctionne donc comme un inhibiteur.

L'IL-6, qui est une autre cytokine clé de la PR, agit via un récepteur formé de deux chaînes : IL-6Ra, spécifique de l'IL-6 et gp130, partagée avec d'autres récepteurs aux cytokines. Le rôle controversé de l'IL-6 peut être expliqué en partie par le fait que la forme soluble de l'IL-6R agit comme un inhibiteur (Knüpfers & Preiss 2008) mais peut aussi dans certains cas se comporter comme agoniste et activer les voies de signalisation pour amplifier le signal (Figure 17) (Assier et al. 2010).

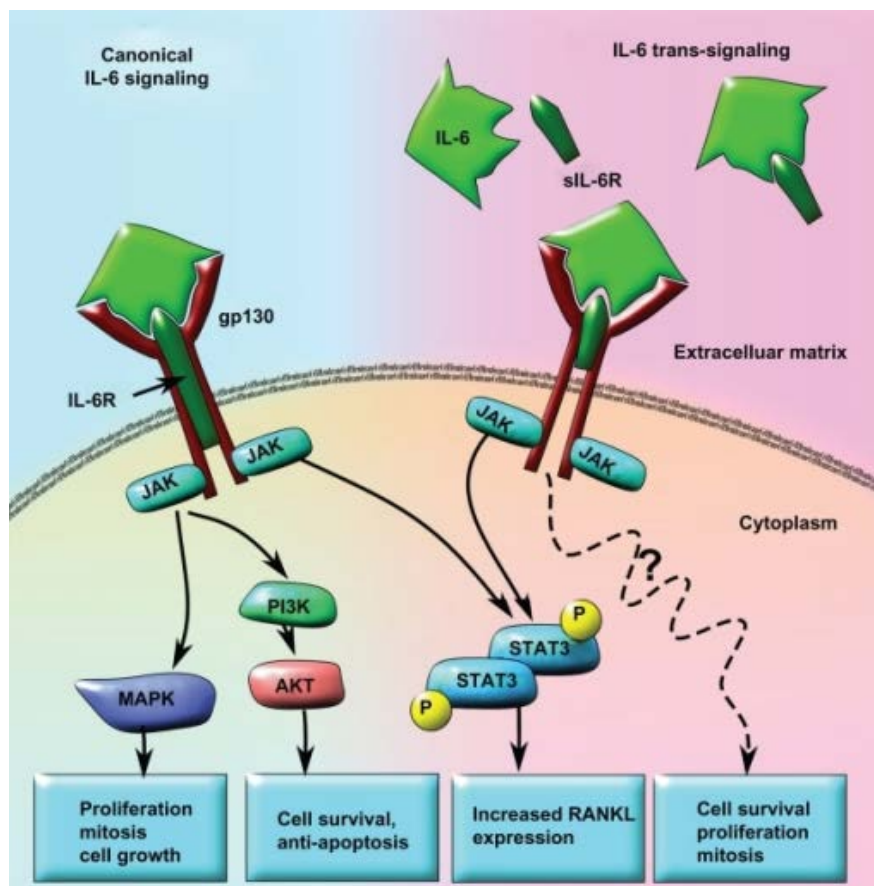


Figure 17 Transduction du signal de l'IL-6

D'autres cytokines présentent également des effets anti-inflammatoires avérés, telles que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-25, l'IL-27 et l'IL-35, ou des effets variables, telles que l'IFN γ , l'IL-10, l'IL-33 et le TGF β . Ces cytokines interagissent pour exercer leur activité, comme par exemple l'IFN γ , l'IL-4, l'IL-13 et le TGF β qui sont capables à la fois d'augmenter l'expression de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1, l'IL-1Ra et diminuer l'expression de l'IL-1 (Chizzolini et al. 2009). Cependant ces dernières cytokines n'ont pas encore connu de développement clinique.

2.3 Perte osseuse consécutive à la PR

La perte de fonction des articulations de patients atteints de PR résulte de la destruction progressive du cartilage et de l'os, visible par radiographie. Les lésions articulaires sont caractérisées par une synovite inflammatoire chronique associant la prolifération d'un tissu de granulation conjonctivo-vasculaire (pannus) et un infiltrat cellulaire (lymphocytes). Ce pannus synovial s'insinue entre les surfaces articulaires et est à l'origine de la destruction progressive des cartilages et des érosions osseuses. Les érosions sont visibles à l'interface entre le pannus et l'os, c'est à dire aux sites d'invasion de l'os cortical, de l'os sous-chondral et de l'os trabéculaire par le pannus.

Au niveau systémique, l'inflammation chronique est responsable d'une perte osseuse généralisée pouvant aller jusqu'à l'ostéoporose (Deal 2012) qui est due à un déséquilibre du processus de formation et de destruction de l'os. En effet, le tissu osseux est renouvelé en permanence par un processus de remodelage équilibré qui est assuré par deux types cellulaires : les ostéoclastes (OC), qui résorbent la matrice osseuse, et les ostéoblastes (OB), qui synthétisent une nouvelle matrice. Les OC ont clairement été identifiés comme responsables de l'érosion osseuse dans la PR. Les études réalisées *in vivo* ont montré que des souris déficientes en OC étaient protégées des érosions osseuses locales (Pettit et al. 2001). Ces résultats ont été confirmés chez des souris transgéniques surexprimant le TNF α croisées avec des souris ne possédant pas d'ostéoclastes fonctionnels (déficients pour le facteur de transcription c-fos) chez lesquelles il n'a pas été observé d'érosions osseuses, alors qu'elles présentaient le même statut inflammatoire que les souris contrôles exprimant c-fos (Redlich et al. 2002). De même, le blocage de l'activité des OC avec des biphosphonates a donné des résultats similaires avec très peu de modulation de l'inflammation (Herrak et al. 2004) (Sims et al. 2004).

Régulation de la différenciation ostéoclastique : balance RANKL/RANK/OPG

Les OC dérivent de progéniteurs hématopoïétiques (qui donnent aussi naissance aux macrophages) qui ont besoin du recrutement de M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) pour leur différenciation. La maturation des ostéoclastes et l'acquisition de leur fonction spécifique se font après leur migration vers la surface osseuse, où ils fusionnent pour former des cellules multinuclées. La différenciation des OC dépend de l'expression de RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB Ligand) et de RANK

(Receptor Activator of NF- κ B), qui appartiennent à la superfamille du TNF α ainsi que de l' OPG (Osteoprotegerin) qui est un récepteur « leurre » capable de piéger RANKL (Boyce & Xing 2007). RANKL se lie à RANK, ce qui active les voies de signalisation NF- κ B, AP1 (cFos) et NFATc1 nécessaires à l'activation et la différenciation des OC (Boyce & Xing 2008). RANKL est exprimé par les ostéoblastes, les lymphocytes T activés, les ostéocytes, le stroma médullaire et les poumons. Cependant, en présence d'une résorption osseuse pathologique, comme lors d'une PR, RANKL est exprimé par les fibroblastes synoviaux (Gravallese et al. 2000) et les lymphocytes T activés (Kotake et al. 2001) et participe à la dégradation des articulations. RANKL peut être induit par les glucocorticoïdes, la vitamine D3, l'IL-1, le TNF α , le TGF β , les ligands de Wnt et le LPS (M. C. Walsh & Choi 2014). Le principal rôle de RANKL est de stimuler la différenciation et la maturation des ostéoclastes. RANK est un récepteur transmembranaire exprimé par les précurseurs ostéoclastiques, les OC matures, les cellules dendritiques, les cellules des glandes mammaires et certaines cellules cancéreuses. RANK est indispensable à la différenciation et à la survie des OC. La différenciation des OC est régulée par l'OPG qui prévient l'interaction de RANKL avec son récepteur RANK, en piégeant RANKL. C'est la balance entre l'expression de l'OPG et de RANKL qui représente le mécanisme de régulation fondamental de la différenciation ostéoclastique. Cette balance est déséquilibrée en faveur de RANKL dans le tissu synovial de patients atteints de PR, créant un environnement qui stimule l'ostéoclastogénèse (Haynes et al. 2003). Dans un modèle d'arthrite par surexpression du TNF α , l'inhibition de l'activité de RANKL a eu pour conséquence l'augmentation des progéniteurs ostéoclastiques associée à une réduction de l'érosion osseuse et du nombre d'OC matures, confirmant que le système RANKL/RANK est nécessaire à la différenciation et à la fonction des OC (P. Li, Schwarz, O'Keefe, Ma, Boyce, et al. 2004).

Les ostéoblastes (OB) sont les cellules qui forment l'os et régulent la différenciation et la fonction des OC par l'expression de RANKL et de l'OPG. Les OB proviennent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses sous l'influence des facteurs de transcription Runx2 et Osterix et sont caractérisés, à l'état mature, par la production de phosphatase alcaline et l'expression d'ostéocalcine. Les OB atteignent leur ultime stade de maturation en se différenciant en ostéocytes. En situation inflammatoire, la maturation

des OB est affectée, conduisant à un déficit d'ostéogenèse et de minéralisation à différents sites, résultant en une réparation défectueuse de l'os (N. C. Walsh & Gravallese 2010).

Cytokines pro-inflammatoires et régulation du métabolisme osseux

Dans le contexte arthritique, les cytokines TNF α , IL-1, IL-6, et IL-17 produites par les lymphocytes T et les macrophages synoviaux induisent l'expression de RANKL par les ostéoblastes et favorisent ainsi l'ostéoclastogénèse.

Le TNF α stimule également la différenciation des précurseurs ostéoclastiques qui se retrouvent en quantité plus importante dans la circulation sanguine, inhibe la différenciation des ostéoblastes et induit la production de métalloprotéases par les chondrocytes (Kitaura et al. 2013). De plus, il a été démontré une forte corrélation entre l'importance des érosions dans l'arthrite et le taux de précurseurs ostéoclastiques (P. Li, Schwarz, O'Keefe, Ma, Looney, et al. 2004).

Les effets du TNF α sur l'ostéoclastogénèse semblent médiés par l'IL-1 et son récepteur l'IL-1R. En effet, le TNF α agit sur les ostéoblastes en augmentant l'expression de RANKL ou en stimulant la différenciation des ostéoclastes via l'IL-1 ou l'IL-1R. Ce rôle d'intermédiaire de l'IL-1 a été mis en évidence dans une étude *vivo* chez des souris surexprimant le TNF α , croisées avec des souris déficientes pour l'IL-1 : les souris issues de ce croisement avaient une ostéoclastogénèse et une érosion osseuse atténuées, un cartilage articulaire moins dégradé, malgré la présence d'une inflammation synoviale (Zwerina et al. 2007).

L'IL-6 est produite principalement par les synoviocytes et les macrophages et se retrouve en grande quantité dans le liquide synovial de patients atteints de PR.

L'IL-6 joue le rôle de promoteur majeur de l'inflammation chronique et de la résorption osseuse. Le blocage de son récepteur, l'IL-6R, par un anticorps spécifique (tocilizumab) inhibe la dégradation osseuse et cartilagineuse en plus de réduire l'inflammation locale et systémique (Fonseca et al. 2009). Ces données relatives au rôle de l'IL-6 sur le métabolisme osseux ont été confirmées par une étude récente lors de laquelle le récepteur à l'IL-6, l'IL-6R, a été bloqué par un autre anticorps monoclonal (MR16-1) dans un modèle de souris développant spontanément une arthrite rhumatoïde. En plus du bénéfice sur les paramètres inflammatoires, le blocage de l'IL-6R a limité la différenciation des

ostéoclastes et a rééquilibré le rapport RANKL/OPG qui est un indicateur important du remodelage osseux (Ohtsuji et al. 2015).

Interactions du système RANKL/RANK/OPG avec le système immunitaire

Par delà son rôle central dans la régulation de l'ostéoclastogénèse, le système RANKL/RANK/OPG semble être fortement impliqué dans la réponse immunitaire, ce qui a été à l'origine d'un nouveau champ d'investigation centré sur les interactions entre le système immunitaire et osseux. Ainsi, RANKL exprimé par les lymphocytes T, favorise la fonction et la survie de cellules dendritiques (DC) lors d'une réponse immunitaire (M. C. Walsh & Choi 2014). De même la déficience en RANK chez la souris entraîne comme attendu une sévère ostéopétrose due à un blocage de la différenciation des OC, mais également un défaut de formation des ganglions lymphatiques et une déficience en lymphocytes B dans la rate (Dougall et al. 1999). La PR représente un exemple type de relation étroite entre les cellules immunitaires et le tissu osseux puisque l'une de ses caractéristiques principales est l'infiltration des lymphocytes T dans le tissu synovial et leur rôle dans l'ostéoclastogénèse via la surexpression de RANKL. Il ne semble plus faire de doute que la résorption osseuse consécutive à la PR soit une conséquence de la surexpression de RANKL par les synoviocytes sous l'influence des lymphocytes Th17. Il est bien établi que le potentiel ostéoclastogénique des Th17 s'exprime par l'intermédiaire de l'IL-17 au travers de la modulation de la voie RANK (Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB)/ RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB Ligand) /OPG (osteoprotegerin) (Daoussis et al. 2008). En effet, l'IL-17 stimule directement la production de RANKL par les fibroblastes synoviaux, ou indirectement par le biais des macrophages synoviaux. Ces derniers secrètent des cytokines pro-inflammatoires, $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, qui amplifient l'action de l'IL-17 en stimulant l'expression de RANKL par les fibroblastes synoviaux, ou en agissant directement sur les précurseurs ostéoclastiques (Figure 18). Ce système est freiné en partie par les Th1 et les Th2 qui inhibent l'ostéoclastogénèse en prévenant la différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures via la sécrétion d'IFN γ (interféron gamma) et d'IL-4 respectivement.

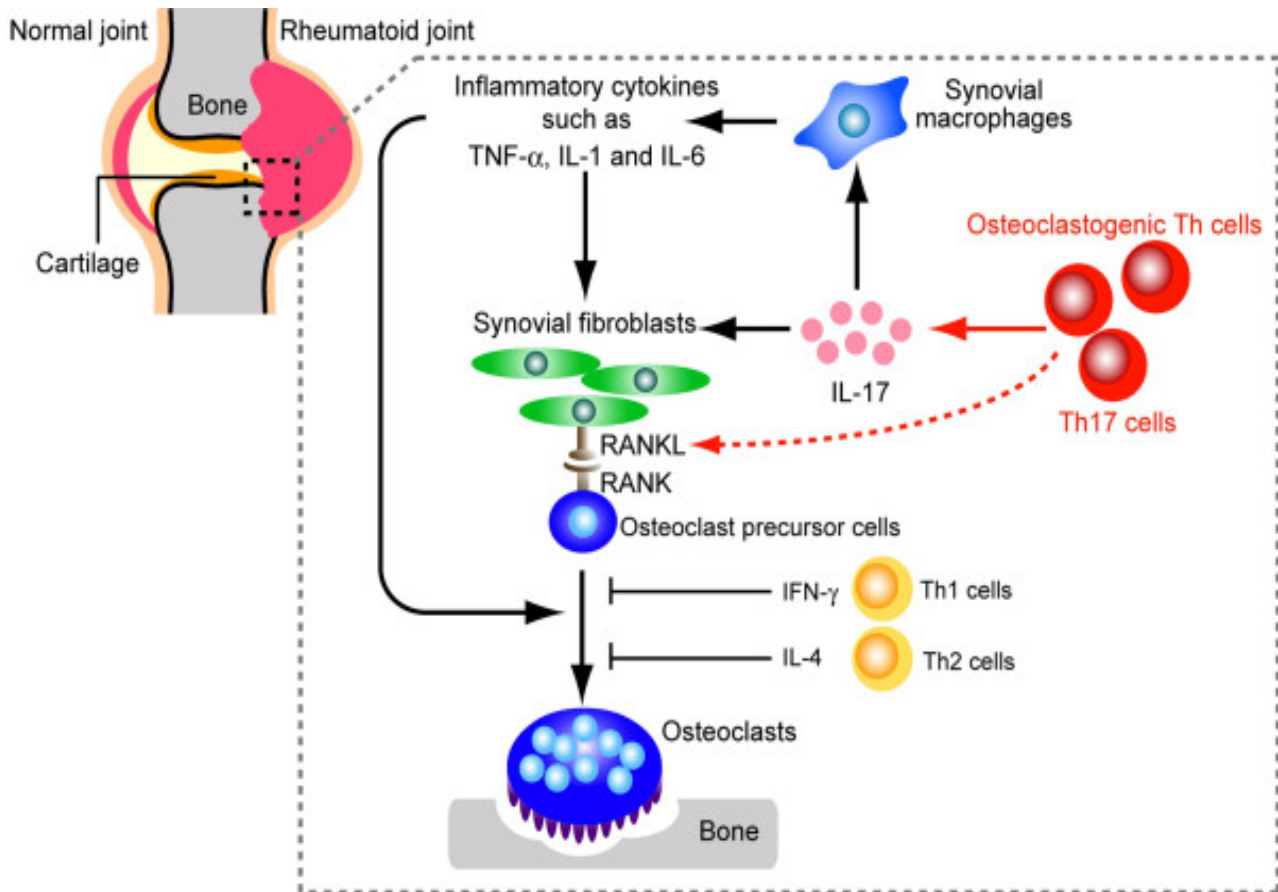


Figure 18: Rôle des Th17 dans la régulation de l'ostéoclastogénèse dans la PR. D'après H. Takayanagi, *Arthritis Res Ther.* 2011

Le système de régulation fondamental de l'ostéoclastogénèse est basé sur l'OPG, facteur endogène clé du mécanisme RANKL–RANK. L'OPG agit comme un récepteur leurre en se liant à RANKL, inhibant par ce moyen la résorption osseuse en s'opposant à la formation et au fonctionnement des ostéoclastes ainsi qu'à la survie des ostéoclastes préexistants (Boyce & Xing 2008) (Figure 19).

Osteoclast Formation, Function, and Survival Inhibited by OPG

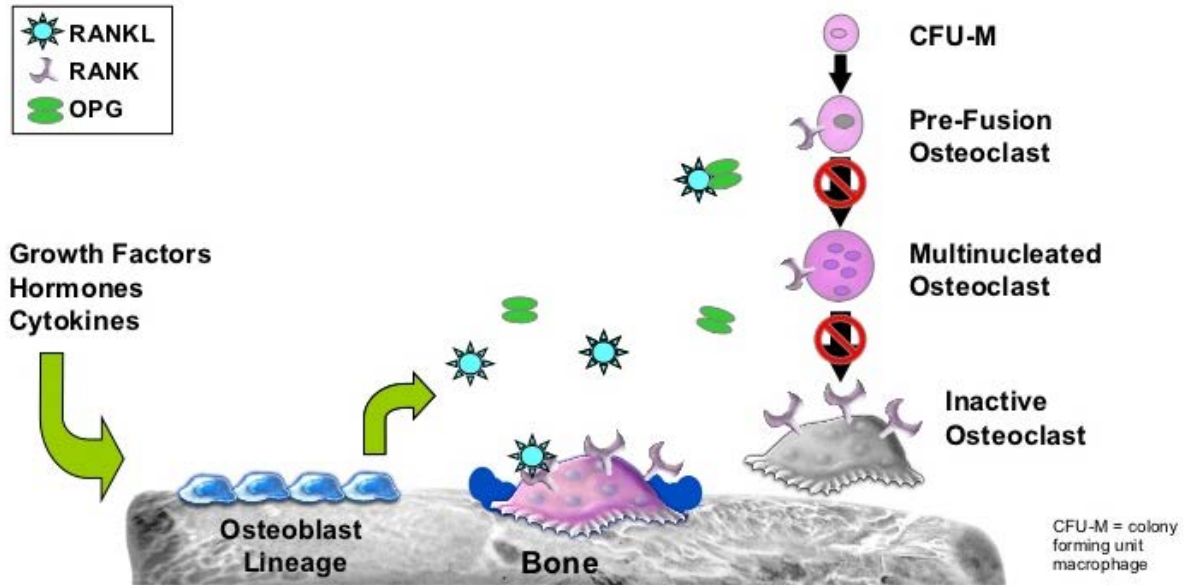


Figure 19 : Régulation de la résorption osseuse par le système RANKL/RANK/OPG. Adaptée de Boyle WJ et al., Nature, 2003

Le déséquilibre Th17/Treg aggrave la pathogénèse de la PR à cause de la prédominance des Th17, mais aussi en raison de la défaillance des Treg. Une étude très récente (Komatsu et al. 2014) a mis en évidence l'étroite relation entre les Th17 et les Treg dans l'arthrite en démontrant la capacité des Treg, caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3, à se transdifférencier en Th17 sous le contrôle de l'IL-6 exprimée par les fibroblastes synoviaux (Komatsu et al. 2014). Ils ont également démontré que les lymphocytes Th17 provenant de la conversion des Treg présentaient des capacités ostéoclastogéniques (notamment par la surexpression de RANKL) supérieures à celles des Th17 originaires des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Les résultats de ces travaux apportent des éléments fondamentaux sur la dérégulation de la balance Th17/Treg dans le cas d'une maladie auto-immune comme la PR, renforçant le rôle pathologique des Th17.

3. Les mastocytes

3.1 Origine

Les mastocytes se développent directement à partir de précurseurs myéloïdes immatures. Les précurseurs quittent la moelle osseuse avant leur maturation et migrent vers les tissus périphériques vascularisés où ils acquièrent leur phénotype grâce à l'expression de c-kit (CD117, protéine tyrosine kinase) et de son ligand le SCF (Stem Cell Factor), qui est le principal facteur de croissance des mastocytes. C'est le microenvironnement rencontré par les mastocytes qui détermine leur phénotype mature (Jamur & Oliver 2011). Cependant le développement des mastocytes autant chez la souris que chez l'homme demeure mal connu (Schmetzer et al. 2015). Plusieurs modèles ont été proposés chez la souris : ainsi les précurseurs des mastocytes proviendraient de progéniteurs pluripotents, ou d'un progéniteur myéloïde commun et/ou d'un progéniteur commun aux mastocytes et basophiles. Chez l'homme, l'hypothèse est faite que le développement des mastocytes est similaire à celui de la souris.

3.2 Distribution tissulaire

La population de mastocytes est hétérogène : elle peut être distinguée grâce à la localisation anatomique et aux caractéristiques de coloration acido-basique (Wingren & Enerbäck 1983). Deux sous-populations de mastocytes ont été identifiées chez la souris : les mastocytes du tissu conjonctif ou CTMC (Conjunctive Tissue Mast Cell) localisés au niveau de la peau ou de la cavité péritonéale, et les mastocytes des muqueuses ou MMC (Mucosal Mast Cell) localisés dans les poumons ou la muqueuse intestinale (Kambe et al. 2004). Chez l'homme, les mastocytes se distinguent en fonction de l'expression des enzymes présentes dans leurs granules : les mastocytes de type MMC expriment uniquement la tryptase (MC_T) alors que les mastocytes de type CTMC expriment la tryptase et la chymase (MC_{TC}) (Irani et al. 1989) (Figure 20).

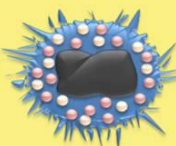
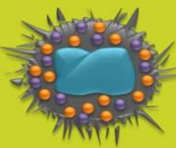
SOURIS			
CTMC		Type tissu connectif ou séreux Héparine , histamine (forte expression) mMCP-6 & mMCP-7 (tryptases), mMCP-4 & mMCP-5 (chymases), mMC-carboxypeptidase A (mMC-CPA) Prostaglandine D2	Dégranulation via FcεRI , 48/80 et substance P , Inhibée par le cromoglycate de sodium
MMC		Type mucosal Chondroïtine sulfate , Histamine (faible expression), mMCP-1 & mMCP-2 (chymases) Prostaglandine D2, Leukotriène C4	Dégranulation via FcεRI , NON inhibée par le cromoglycate de sodium Safranine-o - Bleu alcian +
HOMME			
MC_{TC}		Type tryptase/chymase Héparine, tryptases, Chymases, MC-CPA, MC-CPG	Dégranulation via FcεRI , 48/80 et substance P , NON inhibée par le cromoglycate de sodium
MC_T		Type tryptase Héparine, Tryptase	Dégranulation via FcεRI, Inhibée par le cromoglycate de sodium

Figure 20 : Caractéristiques phénotypiques des mastocytes. D'après Galli, S.J et al., Nat Immunol 2011)

Cependant les mastocytes conservent une certaine plasticité comme l'ont démontré les travaux de Nakano et *al.* (Nakano et al. 1985) dont les conclusions étaient que des mastocytes injectés dans un site pouvaient acquérir les caractéristiques des mastocytes qui y résident habituellement.

3.3 Fonctions physiologiques

3.3.1 Mastocytes : cellules sentinelles

En raison de leur localisation stratégique aux abords des zones de contact avec le milieu extérieur, les mastocytes sont les premières cellules immunitaires en contact avec les pathogènes (Urb & Sheppard 2012), les antigènes, les toxines et les parasites. Les mastocytes sont caractérisés par la présence de deux récepteurs majeurs à leur surface, le récepteur au SCF (décrit précédemment) et le récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI). Le mécanisme d'activation fonctionnelle des mastocytes le plus étudié est la dégranulation induite par l'activation du récepteur FcεRI.

Les mastocytes expriment une variété d'autres récepteurs (Toll Like Récepteurs) capables de détecter des signaux de danger et d'induire une réponse rapide et adaptée de la cellule par le relargage de médiateurs stockés dans des vésicules cytoplasmiques (histamine, hydrolases acides, protéases neutres, protéoglycanes, cytokines, facteurs de croissance) (Galli et al. 2011).

Ces médiateurs contribuent à l'élimination des pathogènes, augmentent la perméabilité vasculaire et participent à la réponse immune adaptative par l'intermédiaire de chimiokines capables d'attirer les cellules appropriées. Les granules des mastocytes contiennent notamment des peptides antimicrobiens qui agissent directement sur les bactéries et facilitent leur élimination (Féger et al. 2002). Par ailleurs, les mastocytes peuvent également libérer des médiateurs pro ou anti-inflammatoires, sans dégranuler, comme par exemple lors d'une activation du TLR-4 par des bactéries gram négatives (LPS) qui induit la production de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-1 β , d'IL-6 ou d'IL-13. Les mastocytes possèdent d'autres mécanismes de défense comme la phagocytose des bactéries et la production d'espèces réactives de l'oxygène pour les détruire (Malaviya et al. 1994) ou le relargage de protéases.

Le rôle des mastocytes lors d'infections virales est moins connu, cependant il semble que les mastocytes stimulent une réponse cellulaire visant la clairance des virus via le recrutement de lymphocytes CD8⁺ et d'INF-1.

3.3.2 Rôle des mastocytes dans le maintien de l'homéostasie des tissus

Les mastocytes sont essentiels dans le maintien de l'intégrité et de la fonction tissulaire : ils jouent notamment un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des tissus en remodelage constant tels que l'os ou les follicules pileux. L'histamine, l'IL-1 β , le TGF β ou l'IL-6 relargués par les mastocytes influencent le recrutement et la différenciation des ostéoclastes alors que la tryptase inhibe leur différenciation. L'ostéopontine sécrétée contribue également à la régulation du métabolisme osseux (Chiappetta & Gruber 2006).

De plus, les mastocytes interviennent au travers de leurs nombreux médiateurs dans toutes les étapes de la réparation tissulaire, depuis la réaction inflammatoire initiale jusqu'à la prolifération cellulaire nécessaire au remodelage de la matrice extracellulaire (Noli & Miolo 2001).

3.3.3 Rôle des mastocytes dans l'immunomodulation

Les mastocytes sont généralement associés à une réponse allergique de type Th2, cependant ils interviennent également dans la régulation des autres types lymphocytaires. Ainsi les mastocytes peuvent directement activer les lymphocytes T par l'intermédiaire du TNF α (Suto et al. 2006) mais ils sont aussi capables de prendre en charge et de présenter les antigènes via les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II (CMHI et CMH II) (Stelekati et al. 2009) (Poncet et al. 1999) puis d'activer les lymphocytes T CD8⁺ ou T CD4⁺. Les médiateurs relargués par les mastocytes stimulent la maturation des cellules dendritiques qui migrent vers les ganglions lymphatiques pour orienter la différenciation des Th. Les cellules dendritiques sont localisées aux mêmes endroits que les mastocytes et seule une relation indirecte entre les deux types cellulaires avait été mise en évidence (Caron et al. 2001). Ce sont les travaux très récents de Carroll-Portillo et al. (Carroll-Portillo et al. 2015) qui ont démontré que les mastocytes communiquaient directement avec les cellules dendritiques par l'intermédiaire de synapses spécifiques appelées synapses immunologiques : les mastocytes transfèrent alors les antigènes (via des exosomes) que les cellules dendritiques sont capables de présenter aux lymphocytes T.

En plus de leurs nombreuses fonctions dans l'immunité innée et adaptative, les mastocytes sont nécessaires dans le maintien de la tolérance immune (Lu et al. 2006).

3.4 Fonctions pathologiques

3.4.1 Les mastocytes acteurs de nombreuses pathologies

Les rôles pathologiques des mastocytes sont nombreux et commencent à être mieux décrits. Lorsque les mastocytes sont activés, ils semblent intervenir dans de nombreux désordres tels que le prurit, l'hypotension, les douleurs gastro-intestinales, l'irritabilité, la perte de concentration et de mémoire, certains désordres neuropsychiatriques (Petra et al. 2014) (Figure 21).

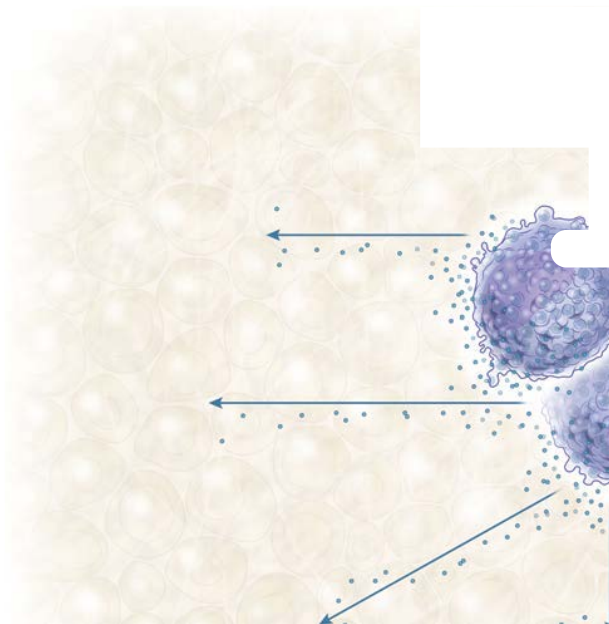


Figure 21 : Médiateurs relargués par les mastocytes ayant un effet clinique significatif et leurs rôles putatifs. D'après Theoharides C. et al., N Engl J Med, July 2015).

Ces pathologies peuvent être associées à une mutation de c-kit : (mastocytoses systémique et cutanée), à une activation clonale des mastocytes (allergies, urticaire, inflammation) ou à des syndromes associés à une activation anormale des mastocytes (urticaire et œdème de Quincke).

Cependant les pathologies dans lesquelles les mastocytes jouent un rôle prépondérant sont les réponses allergiques et anaphylactiques. L'hypersensibilité est médiée par les IgE (Galli & Tsai 2012), qui sont produites chez certains individus en réponse aux antigènes, et se fixent sur le récepteur FcεRI où elles provoquent la dégranulation des mastocytes lors de la réexposition aux antigènes, libérant ainsi de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chémokines, leukotriènes, prostaglandines...) et/ou « vaso-actifs » (histamine, sérotonine notamment) responsables des multiples symptômes observés chez l'homme. De plus, L'IL-6 et le TGFβ sécrétés par les mastocytes activés peuvent induire le développement des cellules Th17 en modulant la maturation et la fonction des cellules dendritiques (Dudeck et al. 2011), mais ils sont également capables de sécréter directement l'IL-17 (Ganeshan & Bryce 2012).

3.4.2 La mastocytose

3.4.2.1 *Mastocytose cutanée et systémique*

La mastocytose est définie comme un groupe hétérogène de désordres caractérisés par une prolifération anormale et une accumulation de mastocytes dans un ou plusieurs organes (Valent et al. 2001). On distingue la mastocytose cutanée (MC) au cours de laquelle les mastocytes ne s'accumulent que dans la peau, et la mastocytose systémique (MS) durant laquelle l'accumulation se fait dans un ou plusieurs organes. Le classement de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a défini trois formes de mastocytoses cutanées:

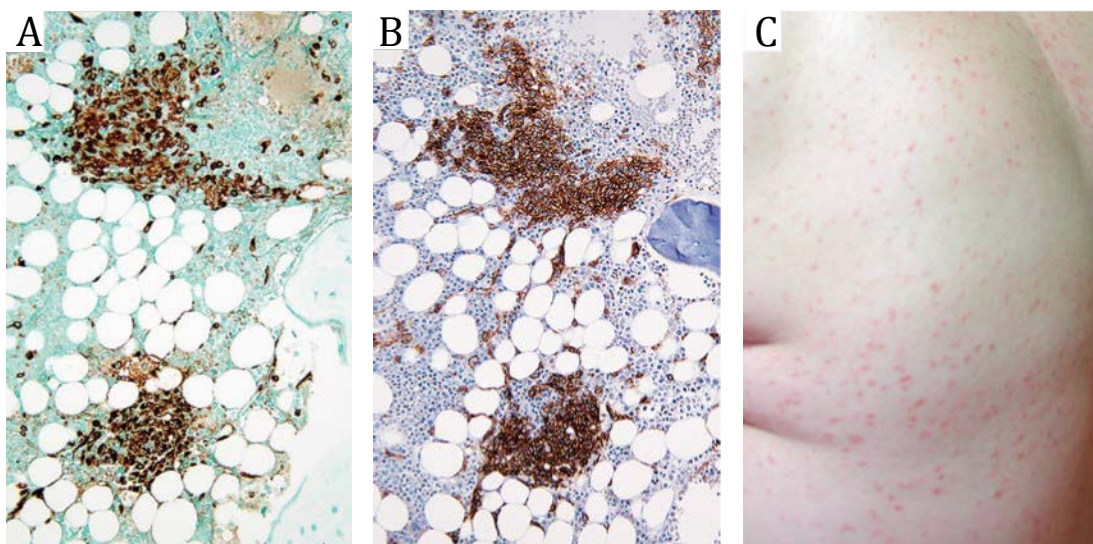
- maculo-papulaire ou Urticaria Pigmentosa
- diffuse
- mastocytome

La MC affecte principalement les enfants, chez la plupart desquels elle régresse à la puberté. La forme la plus commune de MC est la forme maculo-papulaire (Figure 22) qui se manifeste par de nombreuses petites taches violettes ou brunes apparaissent sur le corps mais généralement pas sur le visage. La MC est une maladie exclusivement dermatologique (Valent et al. 2007) qui est associée à une mutation gain de fonction de KIT dans 60 à 80% des cas.

La mastocytose systémique (MS) est une maladie hématologique qui apparaît généralement chez les adultes. La peau peut être atteinte mais pas nécessairement. Elle a une évolution chronique et n'est pas guérissable et il est rare qu'une forme de mastocytose systémique évolue vers une autre forme. Dans la plupart des cas, la mastocytose systémique n'est pas héréditaire. On distingue plusieurs types de mastocytoses systémiques :

- mastocytose systémique indolente (MSI)
- mastocytose systémique associée à une maladie hématologique
- mastocytose systémique agressive (MSA)
- leucémie à mastocytes

La mastocytose systémique indolente est la forme la plus courante (Figure 22): elle n'évolue pas et ne progresse pas vers une autre forme.



A : Cluster de mastocytes marqués avec un anticorps anti-CD-25.

B : Cluster de mastocytes marqués avec un anticorps anti-tryptase.

C : Patient présentant une mastocytose cutanée maculo-papulaire.

Figure 22 : Moelle osseuse d'un patient atteint d'ISM et image de peau présentant une Urticaria Pigmentosa. D'après Jason L. Hornick (N Engl J Med, July 2015).

La MSI est caractérisée par l'atteinte, le plus souvent, de la moelle osseuse, mais d'autres organes peuvent être affectés comme le foie, le tractus gastro-intestinal et l'os cortical (Theoharides et al. 2015). Les autres formes de MS sont plus rares. 80% des personnes atteintes de MS (100% pour celles atteintes de MSI) présentent une mutation « gain de fonction ». Cependant, la mastocytose n'est pas toujours associée à une activation des mastocytes. En effet, les mastocytes peuvent être présents en grand nombre et ne pas être activés et, à l'inverse, être activés dans des affections où leur nombre est normal, telles que les rhinites allergiques ou l'anaphylaxie. Chez des patients allergiques, par exemple, la tryptase sérique n'est détectée que lors de la crise, et son taux redescend peu après à des valeurs normales (L. B. Schwartz et al. 1987).

3.4.2.2 Mastocytose et atteinte osseuse

Les atteintes osseuses consécutives à une mastocytose sont dues à la fois à l'infiltration des mastocytes et à la libération de grandes quantités de médiateurs dans la moelle osseuse et la circulation. Ces atteintes osseuses concernent 50 % des patients souffrant de MS (Barete et al. 2010), l'ostéoporose étant l'atteinte la plus fréquente, bien que des lésions ostéosclérotiques puissent être observées. L'atteinte osseuse ne s'accompagne pas toujours de manifestations cutanées. L'ostéoporose est associée à un excès de fractures vertébrales, notamment chez les hommes (15 à 20 % des patients) et chez les personnes

présentant une mastocytose agressive, alors que le risque de fractures périphériques est moins important (van der Veer et al. 2012). Une relation entre la présence de fractures et des taux urinaires élevés d'histamine a été établie. Cependant, une autre étude a montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les marqueurs du remodelage osseux et les taux circulants de tryptase chez des patients ostéoporotiques (Rossini et al. 2011). De même aucune association n'a été trouvée entre la diminution de la densité minérale osseuse et la présence de la mutation C-kit.

L'histamine est le médiateur qui semble le plus impliqué dans le métabolisme osseux. Fitzpatrick et *al.* (Fitzpatrick et al. 2003) ont montré que des souris déficientes en histamine présentaient une densité minérale osseuse augmentée, un os cortical plus épais, un taux de renouvellement osseux plus important ainsi qu'une diminution du nombre d'ostéoclastes. L'histamine augmente les précurseurs des ostéoclastes ainsi que le nombre d'ostéoclastes matures, et stimule l'expression de RANKL par les ostéoblastes (Biosse-Duplan et al. 2009). L'héparine sécrétée par les mastocytes joue également un rôle majeur en augmentant la résorption osseuse (Simmons & Raisz 1991), de même les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6) qui sont aussi capables d'activer les ostéoclastes et contribuer à la résorption osseuse (Zupan et al. 2013).

3.4.3 Rôle des mastocytes dans les pathologies auto-immunes

3.4.3.1 Rôle des mastocytes dans la PR

De nombreuses études suggèrent un rôle important des mastocytes dans la physiopathologie de la PR. Ces hypothèses sont renforcées par des données démontrant la présence de mastocytes activés en grande quantité dans le tissu synovial des patients, la densité en mastocyte étant corrélée avec la sévérité de la pathologie (Gotis-Graham & McNeil 1997). Le facteur de croissance essentiel aux mastocytes, le SCF ainsi que l'IL-3 et l'IL-4 sont également présents dans le liquide synovial et induisent la prolifération des mastocytes. D'autre part, le SCF en association avec le TGF β , est capable de stimuler leur recrutement, suggérant que la présence massive des mastocytes dans l'articulation inflammatoire résulte à la fois de leur prolifération et leur recrutement accru (Olsson et al. 2001). Les taux d'histamine et de tryptase sont élevés dans le liquide synovial (Buckley et al. 1997), reflétant l'activation des mastocytes présents qui sont également les principales

cellules responsables de la production d'IL-17 (Hueber et al. 2010). L'ensemble de ces médiateurs contribue à l'inflammation articulaire.

Ci-dessous une traduction du paragraphe « Mast Cells and Rheumatoid Arthritis » issue de notre article » A case of rheumatoid arthritis associated to systemic mastocytosis », traitant des autres rôles des mastocytes dans la PR.

L'augmentation du nombre de mastocytes dans la PR est associée à une modification de l'expression des protéases par les différentes populations mastocytaires. Dans le tissu synovial normal, les mastocytes expriment essentiellement la tryptase et la chymase (MC_{TC}). Lors de la phase précoce de l'arthrite, seuls les mastocytes exprimant la tryptase prolifèrent (M_T), suivis d'une augmentation des MC_{TC} lorsque la pathologie devient chronique (McNeil & Gotis-Graham 2000) (Olsson et al. 2001).

Plusieurs voies d'activation des mastocytes ont été décrites dans la PR. En plus de l'activation médiée par les TLR (TLR2, 4 et TLRs endosomaux) ou les cytokines (IL-3, IL-4 et plus récemment IL-33 (Moulin et al. 2007)), Suurmond et al. ont démontré que les mastocytes pouvaient être activés par la fixation des complexes immuns auto-anticorps-anti-protéines citrullinées (ACPA) sur le récepteur FcγRIIA (Suurmond et al. 2014). Les mastocytes peuvent également interagir directement avec les lymphocytes T, contribuant à l'activation (Nakae et al. 2005) ou à la prolifération (Suurmond et al. 2013) des sous-populations spécifiques, ou modifier leur propre phénotype à leur contact (Baram et al. 2001). Il paraît plausible que la réponse des mastocytes dans la PR résulte de signaux intégrés de multiples voies d'activations, contribuant à la chronicité de la pathologie.

Les conséquences de l'activation des mastocytes peuvent aisément être reliées à la pathogénèse de la PR. En effet, une fois activés (par les ACPA par exemple), les mastocytes produisent de grandes quantités d'IL-8, un puissant activateur du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles (Suurmond et al. 2014). Les mastocytes peuvent aussi produire de l'IL-1β, du TNFα et de l'IL-17, tous responsables de l'activation des fibroblastes synoviaux et des conséquences néfastes sur le cartilage (Figure 23). De plus, les mastocytes pourraient être, en partie, responsables du remodelage drastique des tissus survenant dans la PR. Les mastocytes sont souvent retrouvés à proximité des vaisseaux sanguins de la synoviale et les médiateurs des mastocytes (VEGF, tryptase, chymase) sont connus pour être de puissants facteurs

angiogéniques (Suurmond et al. 2015). La sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs) et l'activation des ostéoclastes, responsables de la dégradation du cartilage et de l'érosion osseuse, deux caractéristiques de la PR, pourraient être considérés comme consécutifs à la libération des médiateurs mastocytaires (Figure 23). Comme mentionné ci-dessus, les mastocytes peuvent activer les fibroblastes synoviaux mais également induire la production de MMPs par les chondrocytes. De plus, la tryptase est reconnue comme un puissant activateur des MMPs (Magarinos et al. 2013). Les mécanismes expliquant l'ostéoporose associée à une mastocytose systémique sont supposés être identiques dans la PR, se produisant probablement par un effet direct de l'histamine sur les ostéoclastes (Seitz et al. 2013).

Figure 23 : Rôles des mastocytes dans la Polyarthrite Rhumatoïde. D'après Suurmond et al., Eur J Pharmacol 2015.

3.4.3.2 Rôle des mastocytes dans d'autres pathologies auto-immunes

Un faisceau d'arguments, résultant de l'intérêt croissant porté au rôle des mastocytes, a conduit à penser que les mastocytes sont impliqués dans plusieurs pathologies durant lesquelles la réponse immune est médiée par les lymphocytes T autoréactifs et/ou des auto-anticorps (Yu et al. 2015). La sclérose en plaque (SEP), pathologie affectant le

système nerveux central, est caractérisée par une inflammation chronique, une perte de myéline et un rôle prépondérant des Th1 et des lymphocytes Th17 (McFarland & Martin 2007), ainsi que des lymphocytes B. La quantité de mastocytes retrouvés dans les plaques des patients est corrélée à la sévérité de la maladie et les protéases relarguées par ces cellules s'accumulent dans le liquide céphalorachidien, suggérant une présence active des mastocytes dans les tissus cibles de la SEP.

Les mastocytes semblent également impliqués dans les maladies bulleuses auto-immunes (pemphigoïdes bulleuses) caractérisées par la production d'auto-anticorps dirigés contre les protéines de structure de la peau (Schmidt & Zillikens 2013). Ils sont présents en grande quantité au niveau des lésions cutanées, leurs médiateurs sont retrouvés dans le liquide contenu dans les bulbes (Wintroub et al. 1978) et de plus, des auto-anticorps IgE anti-COL17A sont produits par les patients, faisant des mastocytes un acteur potentiel de cette pathologie.

3.4.3.3 Apport des modèles animaux dans l'établissement du rôle des mastocytes

L'utilisation de modèles animaux s'est révélée indispensable à la compréhension du rôle des mastocytes dans les pathologies auto-immunes. Ce sont d'abord des modèles de souris présentant une mutation de cKIT et de ses voies de signalisations qui ont été utilisés, puis des modèles ciblant plus spécifiquement les mastocytes (Yu et al. 2015). Cependant, il demeure difficile d'établir le rôle exact des mastocytes, notamment parce que les modèles déficients présentent également des atteintes indépendantes des mastocytes.

Ainsi les données obtenues avec les différents modèles d'animaux déficients en mastocytes ne vont pas toujours dans le même sens et sont même parfois contradictoires. Bien qu'ils mettent en évidence un rôle indispensable des mastocytes dans le développement des pathologies auto-immunes, ils n'ont pas permis d'établir clairement un rôle central incontournable dans les pathologies auto-immunes.

3.4.3.4 Article 1 : « A case of rheumatoid arthritis associated to systemic mastocytosis »

Article en préparation

A case of rheumatoid arthritis associated to systemic mastocytosis

Ichraq LATAR^{1*}, Meriem KOUFANY^{1*}, Julie HABLOT¹, Damien LOEUILLE², Jean-Yves JOUZEAU¹, Isabelle CHARY-VALCKENAERE^{2†} and David MOULIN^{1†}.

*Ichraq LATAR and Meriem KOUFANY contributed equally to this work.

†Isabelle CHARY-VALCKENAERE and David MOULIN contributed equally to this work.

Authors' affiliations: ¹ UMR 7365 IMoPA CNRS-Université de Lorraine, Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus biologie-santé, 54505, Vandœuvre-lès-Nancy cedex, FRANCE. ² Department of Rheumatology, Nancy University Hospital, 54511, Vandœuvre -lès-Nancy, FRANCE.

Introduction

Classically, mast cells (MC) are considered as important actors of the innate immune response playing a pivotal role in IgE-mediated allergic and anti-parasite responses⁽¹⁾. In the last two decades, many experimental evidences demonstrated that these hematopoietic-derived cells present in both connective and mucosal tissues are also key modulators of the adaptive immune response and could contribute to autoimmune disease notably in rheumatoid arthritis (RA)⁽²⁾. Recently, Bader-Meunier and collaborators, reported a series of 31 patients suffering from inflammatory joint diseases associated with mastocytosis⁽³⁾, suggesting that mastocytosis was associated with a higher prevalence in spondyloarthritis. We discuss here the possible link between inflammatory arthritis and mastocytosis in light of a clinical case of concomitant RA and mastocytosis.

Case report

Our patient is a Caucasian male aged 78 years. Symptoms of cutaneous mastocytosis and multiple bone fractures (pelvis, acetabulum, ribs, feet, left hip bone, vertebral compression fracture, sternum) led to the diagnosis of cutaneous and bone mastocytosis confirmed by biopsy (Bone or skin or both) in 1999. High tryptase levels (positive >20ng/ml) indicative of systemic mastocytosis were found at this time. DEXA analysis evidenced major osteoporosis. His past medical history included a chronic obstructive pulmonary disease that led the patient to smoking cessation in 1975 after 26 years as a consumer (30 Pack-year).

Once diagnosed, the patient was treated for osteoporosis with injectable (Aredia®) then oral bisphosphonates (Fosamax®) associated with vitamin D and calcium supplementation (Orocal® vitamine D3 then Cacit vitamine D3®). He was also prescribed a daily oral intake of selective H1 receptor antagonist Zyrtec®. Anti-osteoporotic treatment resulted in an improvement of bone mineral density with stable and normal values leading to treatment discontinuation in 2010. In the meantime, the patient decided to stop antihistamine treatment on his own in January 2005.

In 2012 (june), mastocytosis flared up with severe cutaneous signs. Patient underwent L5 vertebroplasty in September of the same year after traumatic spinal fracture. Six months later, he was admitted to our hospital with joint pain and oedematous swelling of hands, shoulders and pelvis.

Blood tests showed, the presence of ACPA, high levels of tryptase (52 ng/ml) and CRP (66 mg/L), and accelerated erythrocyte sedimentation rate (46 mm). Patient is HLA-B27 negative. Rheumatoid factor was negative in February 2013 but became positive in September 2013. X-rays imaging and ultrasonography showed active inflammatory and erosive polyarthritis. Pathology was consistent with RA. As he suffered from bilateral lung injury, methotrexate

was not suitable. He was treated daily with Zyrtec® for the mastocytosis, cortisone 7,5mg (0.1mg/Kg), and tramadol LP 100mg and paracetamol 1g as painkillers.

Currently, both mastocytosis and RA are inactive; patient is only treated with antihistamine treatment. Last examination showed intracarpal and interphalangeal and metacarpophalangeal radiographic lesions without active synovitis.

Discussion

Mastocytosis and Mast cells

The patient suffered from mastocytosis diagnosed 15 years ago. Mastocytosis is generally classified into two major types, the cutaneous mastocytosis (CM) corresponding to the accumulation of MC only in skin and the systemic mastocytosis (SM) where the accumulation is occurring in one or more organs, each could be subdivided in a total of seven different categories⁽⁴⁾. Despite etiology of mastocytosis remains largely unknown, abnormal mast cell activation/survival or proliferation frequently results from auto-activating mutation on the tyrosine kinase receptor c-KIT⁽⁵⁾.

Three types of CM are identified, urticaria pigmentosa, diffuse CM and mastocytoma of the skin, usually affecting people in childhood. The most frequently form of CM is urticaria pigmentosa characterized by yellow-brown macules located at the trunk or extremities of the body. Diffuse CM is more severe and it manifests by blisters and bullae.

SM are divided into indolent SM (ISM), SM with an associated hematopoietic non-mast cell lineage disease, aggressive SM and mast cell leukemia (MCL).

Patients affected by ISM present skin lesions, similar to urticaria pigmentosa, and bone marrow infiltration⁽⁶⁾. The aggressive form of mastocytosis is associated with an important infiltration of tissues and MCL is characterized by infiltration with atypic or immature MCs in organs and bone marrow.

Organ infiltration by MCs can lead to organomegaly, impairment or loss of organ function.

The different forms of mastocytosis depend on the type of MCs involved and the type and the quantity of mediators released. At the moment of admission, the patient had a CM that progressed into SM. This evolution of mastocytosis is known and correlated with MCs proliferation in bones and organs⁽⁷⁾.

MC derived from hematopoietic stem cells. They circulate in the blood to migrate to vascularized tissues where they mature under cytokines control, particularly the stem cell factor. They contain several mediators that are histamine, proteases, cytokines, chemokines, growth factors, arachidonic acid metabolites, and reactive oxygen and nitrogen species. All these mediators could be secreted by MCs after degranulation and are involved in different functions of MCs⁽¹⁾.

Mast cells could be subdivided according to their serine proteases expression (tryptase or chymase only, or both tryptase and chymase⁽⁸⁾ or to staining characteristics of their granules and localization (connective tissue MC possesses safranin positive granules whereas mucosal mast cells are safranin-negative)⁽⁹⁾.

MCs can be activated by many stimuli, via the high-affinity immunoglobulin E (IgE) receptor (FcεRI) in allergic response, after IgE cross-linking which triggers Lyn and Syk kinase cascade⁽¹⁰⁾. Pathogens such as bacteria and viruses can result on direct MCs activation through pattern recognition receptor. Other activators are cytokines, chemokines, immunoglobulin G via Fcγ receptor⁽⁴⁾.

Once activated, MCs are considered as double-edged sword. In innate and acquired immunity MCs are known to act rapidly via toll-like receptors, complement receptors and Fc receptors and activate neutrophils, dendritic cells and T cells thanks to their mediators. MCs can also phagocyte bacteria and protect against viruses by the recruitment of T cells and

natural killers⁽¹¹⁾. Another function of MCs is their role in host defense against parasites, via IgE response⁽¹²⁾.

Although MCs have protective effects, an abnormal activation can promote inflammatory disorders. They are mostly described for their role in anaphylaxis and allergic response by hypersensitivity reactions via IgE binding⁽¹³⁾. Accumulation of MCs mediators in airway smooth muscle are correlated with asthma activity⁽¹⁴⁾. Moreover, evidence from their overabundant representation/activity in intestine is amply described in inflammatory bowel disease (Crohn's disease or ulcerative colitis) and irritable bowel⁽¹⁵⁾.

More controversially, MCs may also play a role in cancer by promoting growth of tumors via angiogenesis factors⁽¹⁵⁾.

Mastocytosis and osteoporosis

Osteoporosis and vertebral fracture are frequent in patients with systemic mastocytosis with respectively 31% and 17% in a cohort of 75 adult patients⁽¹⁶⁾. Pathogenesis of mastocytosis-related osteoporosis is not fully understood but release of mediators by mast cells within bone marrow is thought to be central. Histamine acts directly on osteoclasts by promoting osteoclast formation directly through paracrine action on the precursors and indirectly through increased osteoblasts secretion of RANKL⁽¹⁷⁾. Moreover, heparin and bone resorptive cytokines (IL-1, IL-6 TNF α) are known to play a role in osteoclast activation by mast cells⁽¹⁸⁾.

Histomorphometric studies performed in systemic mastocytosis patients have revealed an increased number of osteoclasts due to presence of mast cells, leading to osteoporosis.⁽¹⁹⁾

Multiple bone fracture associated to high tryptase levels indicated that our patient was suffering from mastocytosis and osteoporosis. Treatment with bisphosphonates and Vitamin D supplementation in association with antihistaminergic drugs leads to absence of bone complication during 10 years with normal BMD values. Such beneficial effects of

bisphosphonates treatment in patient suffering from osteoporosis secondary to mastocytosis was already reported ^(16,18,20-23). Our patient underwent a vertebroplasty after traumatic spinal fracture only 2 years after bisphosphonates cessation but 7 years after patient quit antihistamine treatment.

Six months later our patient presented signs of inflammatory joint disease; blood tests and medical imaging led us to consider a starting rheumatoid arthritis according to ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria⁽²⁴⁾.

Mast Cells and Rheumatoid Arthritis

Clinical implication of MCs in inflammatory arthritis is not yet well defined but has been established in several studies. Increased density of MCs in synovial tissues is found in patients with RA when compared to osteoarthritis (OA) and normal joints patients, density of mast cells correlated positively with disease severity index and swollen joint counts⁽²⁵⁾. RA-associated mast cell hyperplasia is associated with changes in mast cells subset regarding their protease expression. In normal synovium, tryptase and chymase double positive mast cells (MC_{TC}) are mainly found. In early inflammatory rheumatoid arthritis, specific expansion of tryptase only positive mast cells (MC_T) is observed followed by increases of MC_{TC} in established or chronic disease^(26,27).

Mast cells specific mediators such as histamine and tryptase are elevated in synovial fluid from RA patients⁽²⁸⁾. Mast cells are also the main IL-17 producing cells in synovium of established RA and spondyloarthritic patient⁽²⁹⁾ contributing to synovial inflammation⁽³⁰⁾.

Several mast cells activation pathways have been described in RA. In addition to toll like receptors (TLR2, 4 and endosomal TLRs) or cytokines (IL-3, IL4 and the more recently studied IL-33⁽³¹⁾) mediated activation, Suurmond and collaborators recently demonstrated that mast cells could be activated by ACPA immune complex in a citrulline dependent manner through crosslinking FcγRIIA ⁽³²⁾. Mast cells could also interact directly with T cell,

contributing to Tcell subset expansion⁽³³⁾ or activation⁽³⁴⁾ but also changing their own phenotype⁽³⁵⁾.

It is plausible that mast cells response in RA results from integrated signals of multiple activation pathways contributing to the chronicity of disease.

Consequences of mast cells activation could easily be linked to pathogenesis of RA. Indeed, once activated (by ACPA for instance) MC produce large amount of IL-8, a potent activator of neutrophil chemotaxis⁽³²⁾. Mast cells can also produce IL-1, TNF and IL-17, all responsible for synovial fibroblast activation and deleterious consequences on cartilage. Finally, MCs are thought to be partly responsible for drastic tissue remodeling occurring in RA. MC are often found in the vicinity of blood synovial vessels and MC-mediators (VEGF, tryptase, chymase) are known to be potent angiogenic factors⁽³⁶⁾. Matrix metalloproteinases (MMPs) secretion and osteoclasts activation responsible for cartilage breakdown and bone erosion, two hallmarks of RA, could be considered as consequence of mast cells mediators' release. As mentioned above, mast cells could activate synovial fibroblasts but also induce MMPs release by chondrocyte. Moreover tryptase is recognized as a potent activator of MMPs⁽³⁷⁾. Mechanisms explaining systemic mastocytosis-associated osteoporosis are supposed to be identical in RA, possibly through a direct effect of histamine on osteoclasts⁽³⁸⁾.

Conclusion

Association between MCs and inflammatory arthritis can lead to new considerations in inflammatory arthritis therapy. Bader-meunier et al. recently described the association between mastocytosis and spondyloarthritis in a serie of 31 patients. They conclude that mastocytosis was associated with a higher prevalence of SpA and that DMARS, notable anti-TNF α agents were well tolerated in these patients⁽³⁾. Inhibiting the c-kit receptor by imatinib, decreased MCs numbers in rheumatoid synovium extracted from patients⁽³⁹⁾. Sulfasalazine a

drug used to treat peripheral SpA was proven to have an effect on MCs⁽³⁰⁾. In our case only antihistamine and symptomatic treatment were sufficient to stop arthritis progression.

Patients with mastocytosis should be closely monitored for rheumatoid arthritis or other autoimmune diseases. One should also consider that case of mastocytosis-associated autoimmune disease are underestimated since signs and symptoms of mastocytosis are unspecific and overlap with many other diseases, correct diagnosis may be difficult and is often made later than first symptoms⁽⁶⁾.

This case report and the literature provide data in favor of a possible development of autoimmune disease secondary to mastocytosis.

References

1. DeBruin EJ, Gold M, Lo BC, Snyder K, Cait A, Lasic N, Lopez M, McNaghy KM, Hughes MR. Mast cells in human health and disease. *Methods Mol. Biol.* New York, NY: Springer New York; 2015;1220(Chapter 7):93–119.
2. Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, Adachi R, Gurish MF, Gobezie R, Stevens RL, Lee DM. Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J. Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):647–56.
3. Bader-Meunier B, Livideanu CB, Larroche C, Durieu I, Artru L, Beucher A, Cormier G, Cornec D, Delarco M, Dubost J-J, Fontaine C, Gourin M-P, Javier R-M, de Jauréguiberry J-P, Maisonneuve H, Toussiot E, Ugo V, Echaubard S, Mahlaoui N, Aouba A, Bodemer C, Briot K, Frenzel L, Lortholary O, Chandesris M-O, Hermine O, on the behalf of CEREMAST CAS. Association of mastocytosis with inflammatory joint diseases_ A series of 31 patients. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* Elsevier; 2014 Dec 1;44(3):362–5.
4. Theoharides TC, Valent P, Akin C. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N. Engl. J. Med.* 2015 Jul 9;373(2):163–72.
5. Cruse G, Metcalfe DD, Olivera A. Functional deregulation of KIT: link to mast cell proliferative diseases and other neoplasms. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014 May;34(2):219–37.
6. Magliacane D, Parente R, Triggiani M. Current concepts on diagnosis and treatment of

- mastocytosis. *Transl Med UniSa. Università Degli Studi di Salerno*; 2014 Jan;8:65–74.
7. Golkar L, Bernhard JD. Mastocytosis. *The Lancet*. 1997 May 10;349(9062):1379–85.
 8. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol. Nature Publishing Group*; 2010 Mar;3(2):111–28.
 9. Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006 Jun;117(6):1285–91.
 10. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol. Nature Publishing Group*; 2008 Nov;9(11):1215–23.
 11. Urb M, Sheppard DC. The role of mast cells in the defence against pathogens. Heitman J, editor. *PLoS Pathog. Public Library of Science*; 2012;8(4):e1002619.
 12. Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group*; 2010 Jun;10(6):440–52.
 13. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med. Nature Publishing Group*; 2012 May;18(5):693–704.
 14. Cruse G, Bradding P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *Eur. J. Pharmacol*. 2015 May 8.
 15. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol. Nature Publishing Group*; 2010 Mar;3(2):111–28.
 16. Barete S, Assous N, de Gennes C, Grandpeix C, Feger F, Palmerini F, Dubreuil P, Arock M, Roux C, Launay JM, Fraïtag S, Canioni D, Billemont B, Suarez F, Lanternier F, Lortholary O, Hermine O, Francès C. Systemic mastocytosis and bone involvement in a cohort of 75 patients. *Ann. Rheum. Dis*. 2010 Oct;69(10):1838–41.
 17. Biosse-Duplan M, Baroukh B, Dy M, de Vernejoul M-C, Saffar J-L. Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts. *Am. J. Pathol*. 2009 Apr;174(4):1426–34.
 18. Rossini M, Zanotti R, Viapiana O, Tripi G, Idolazzi L, Biondan M, Orsolini G, Bonadonna P, Adami S, Gatti D. Zoledronic acid in osteoporosis secondary to mastocytosis. *Am. J. Med*. 2014 Nov;127(11):1127.e1–4.
 19. Guillaume N, Desoutter J, Chandesris O, Merlusca L, Henry I, Georgin-Lavialle S, Barete S, Hirsch I, Bouredji D, Royer B, Gruson B, Lok C, Sevestre H, Mentaverri R, Brazier M, Meynier J, Hermine O, Marolleau J-P, Kamel S, Damaj G. Bone complications of mastocytosis: a link between clinical and biological characteristics. *Am. J. Med*. 2013 Jan;126(1):75.e1–7.
 20. Laroche M, Livideanu C, Paul C, Cantagrel A. Interferon alpha and pamidronate in osteoporosis with fracture secondary to mastocytosis. *Am. J. Med*. 2011

Aug;124(8):776–8.

21. Marshall A, Kavanagh RT, Crisp AJ. The effect of pamidronate on lumbar spine bone density and pain in osteoporosis secondary to systemic mastocytosis. *Br. J. Rheumatol.* 1997 Mar;36(3):393–6.
22. Brumsen C, Hamdy NAT, Papapoulos SE. Osteoporosis and bone marrow mastocytosis: dissociation of skeletal responses and mast cell activity during long-term bisphosphonate therapy. *J. Bone Miner. Res.* John Wiley and Sons and The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR); 2002 Apr;17(4):567–9.
23. Lim AYN, Ostor AJK, Love S, Crisp AJ. Systemic mastocytosis: a rare cause of osteoporosis and its response to bisphosphonate treatment. *Ann. Rheum. Dis.* BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism; 2005 Jun;64(6):965–6.
24. Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology.* Oxford University Press; 2012 Dec;51 Suppl 6(suppl 6):vi5–9.
25. Gotis-Graham I, McNeil HP. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum.* 1997 Mar;40(3):479–89.
26. McNeil HP, Gotis-Graham I. Human mast cell subsets—distinct functions in inflammation? *Inflamm. Res.* 2000 Jan;49(1):3–7.
27. Olsson N, Ulfgren AK, Nilsson G. Demonstration of mast cell chemotactic activity in synovial fluid from rheumatoid patients. *Ann. Rheum. Dis.* BMJ Group; 2001 Mar;60(3):187–93.
28. Buckley MG, Walters C, Wong WM, Cawley MI, Ren S, Schwartz LB, Walls AF. Mast cell activation in arthritis: detection of alpha- and beta-tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid. *Clin. Sci.* 1997 Oct;93(4):363–70.
29. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, Melendez AJ, McInnes IB. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol.* American Association of Immunologists; 2010 Apr 1;184(7):3336–40.
30. Noordenbos T, Yermenko N, Gofita I, van de Sande M, Tak PP, Cañete JD, Baeten D. Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012 Jan;64(1):99–109.
31. Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, Mézin F, Palmer G, Gabay C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine.* 2007 Dec;40(3):216–25.
32. Suurmond J, Rivellese F, Dorjée AL, Bakker AM, Rombouts YJPC, Rispen T, Wolbink G, Zaldumbide A, Hoeben RC, Huizinga TWJ, Toes REM. Toll-like receptor triggering augments activation of human mast cells by anti-citrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism; 2014 May 12;:annrheumdis-2014-205562.

33. Suurmond J, van Heemst J, van Heiningen J, Dorjée AL, Schilham MW, van der Beek FB, Huizinga TWJ, Schuerwegh AJM, Toes REM. Communication between human mast cells and CD4(+) T cells through antigen-dependent interactions. *Eur. J. Immunol.* 2013 Jul;43(7):1758–68.
34. Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Acad Sciences*; 2005 May 3;102(18):6467–72.
35. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, HersHKoviz R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF- α . *The journal of Immunology.* 2001 Oct 1;167(7):4008–16.
36. Suurmond J, van der Velden D, Kuiper J, Bot I, Toes REM. Mast cells in rheumatic disease. *Eur. J. Pharmacol.* 2015 May 2.
37. Magarinos NJ, Bryant KJ, Fosang AJ, Adachi R, Stevens RL, McNeil HP. Mast cell-restricted, tetramer-forming tryptases induce aggrecanolysis in articular cartilage by activating matrix metalloproteinase-3 and -13 zymogens. *J. Immunol.* 2013 Aug 1;191(3):1404–12.
38. Seitz S, Barvencik F, Koehne T, Priemel M, Pogoda P, Semler J, Minne H, Pfeiffer M, Zustin J, Püschel K, Eulenburg C, Schinke T, Amling M. Increased osteoblast and osteoclast indices in individuals with systemic mastocytosis. *Osteoporos Int.* 2013 Aug;24(8):2325–34.
39. Eklund KK. Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol. Rev. Blackwell Publishing Ltd*; 2007 Jun;217(1):38–52.

Chapitre 2

Résultats

1. Comparaison des potentialités anti-arthritiques d'agonistes sélectifs des récepteurs PPAR α et PPAR γ

1.1 Objectif du travail

Ces travaux avaient pour but de comparer l'effet de deux agonistes synthétiques de haute affinité pour les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes PPAR α et PPAR γ sur la sévérité d'une arthrite expérimentale et la perte osseuse qui y est associée. Nous avons utilisé le fénofibrate pour PPAR α et la pioglitazone pour PPAR γ .

1.2 Résultats marquants

Le fénofibrate, qui active sélectivement PPAR α , est utilisé avec succès dans le traitement des hypertriglycémies. Cependant il a également été démontré que l'activation de PPAR α produisait des effets anti-inflammatoires *in vitro* sur différents types cellulaires mais également *in vivo* dans des modèles d'inflammation chronique. Dans nos travaux, le traitement des animaux avec le fénofibrate a réduit de façon importante la sévérité de l'arthrite expérimentale comme démontré par l'ensemble des paramètres cliniques. La réduction de l'œdème des pattes et du score clinique de sévérité de l'arthrite reflète l'effet bénéfique de l'activation de PPAR α , confirmée par l'évolution favorable du poids, qui témoigne du développement d'une arthrite moins sévère chez les animaux traités. Au niveau de l'inflammation articulaire, le traitement avec le fénofibrate a réduit l'expression de deux cytokines majeures de l'arthrite, l'IL-1 β et l'IL-6. En plus de l'effet anti-inflammatoire observé, l'activation de PPAR α a limité la perte osseuse associée à l'arthrite, en préservant partiellement le contenu minéral osseux et la densité minérale osseuse globale et dans les régions.

Le traitement des animaux avec un agoniste sélectif de PPAR γ , la pioglitazone à 30 mg/Kg, a produit des effets comparables au traitement avec le fénofibrate à 100 mg/Kg, tant sur les paramètres cliniques que sur l'expression locale des cytokines pro-inflammatoires. La pioglitazone a également limité la perte du contenu osseux, même si son effet a été moindre que le fénofibrate sur la densité minérale osseuse, sans que cette

différence soit significative. Dans la littérature, les données sont contradictoires, notamment en ce qui concerne le rôle de PPAR γ : bien qu'il soit décrit comme un facteur majeur de différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers les adipocytes au détriment des ostéoblastes, d'autres études suggèrent que l'activation de PPAR γ par son agoniste naturel, la 15-Désoxy-Delta-12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) inhibe la différenciation ostéoclastique (voir article 3 et discussion générale).

1.3 Conclusion

Le fénofibrate (agoniste PPAR α) à 100 mg/Kg a produit des effets comparables à la pioglitazone (agoniste PPAR γ) à 30 mg/Kg, tant au niveau de la réduction de la sévérité de l'arthrite expérimentale, qu'au niveau de la perte osseuse qui y est associée. Ces résultats suggèrent que l'activation simultanée des isotypes PPAR α et PPAR γ , par des agonistes mixtes, pourrait conduire à un effet « synergique » dans le traitement de l'arthrite chronique.

1.4 Article 2 : « Fenofibrate vs pioglitazone: Comparative study of the anti-arthritic potencies of PPAR-alpha and PPAR-gamma agonists in rat adjuvant-induced arthritis »

Fenofibrate vs pioglitazone: Comparative study of the anti-arthritic potencies of PPAR-alpha and PPAR-gamma agonists in rat adjuvant-induced arthritis

Meriem Koufany ^a, Jean-Yves Jouzeau ^{a,b} and David Moulin ^{a,*}

^a *Faculté de Médecine, UMR-7365 CNRS, Université de Lorraine (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire IMoPA), Biôpole de l'Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France*

^b *Pôle Laboratoires, Département de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Nancy, France*

Abstract.

BACKGROUND: Rheumatoid arthritis is characterized by synovial hyperplasia, inflammatory infiltration, cartilage destruction and juxta-articular as well as generalized bone demineralization. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor superfamily which behave as ligand-activated transcription factors in response to endogenous fatty acids and eicosanoids or isotype selective synthetic compounds as fibrates and thiazolidinediones. Beyond their key role in lipid metabolism, increased evidence has shown a role of the three isotypes in inflammatory modulation. We and others demonstrated previously that PPAR-gamma agonists reduced the severity of experimental polyarthritis and the overall inflammatory-induced bone loss.

OBJECTIVE: To compare the anti-arthritic potencies of a PPAR-alpha agonist (fenofibrate, a lipid lowering drug) and a PPAR-gamma agonist (pioglitazone, formerly used as an antidiabetic drug) in rat adjuvant-induced arthritis.

METHODS: Male Lewis rats were sensitized by an intra-dermal injection of 1 mg complete Freund's adjuvant at the basis of the tail and were treated orally for 21 days with fenofibrate 100 mg/kg/day (FENO) or pioglitazone 30 mg/kg/day (PIO), or with vehicle only. Arthritis severity was evaluated by clinical observations (oedema, clinical score, body weight). Global and femoral bone mineral density (BMD), femoral bone mineral content (BMC) were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) before sensitization and at day 20. Synovial mRNA levels of IL-1beta and IL-6 were determined by real-time RT-PCR.

RESULTS: Administration of fenofibrate (100mg/kg/d) and pioglitazone (30 mg/kg/d) significantly reduced hindpaw oedema and arthritis score. Treatment with fenofibrate exerted a better effect on clinical scoring. DEXA analysis revealed that pioglitazone and fenofibrate treatment to a greater extent, reduced inflammatory-bone loss and increased BMD versus vehicle-treated rats. Finally, we demonstrated that both agonists decreased synovial expression of IL-1beta and IL-6.

CONCLUSION: Pioglitazone and fenofibrate decreased arthritis severity in adjuvant-induced arthritis. Both agonists partially protected animals from inflammatory induced-bone loss.

Keywords: Adjuvant arthritis, PPARs, pioglitazone, fenofibrate, bone

* Address for correspondence: David Moulin, Faculté de Médecine, UMR-7365 CNRS, Université de Lorraine IMoPA, Biôpole de l'Université de Lorraine, avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 54 25; Fax: +33 3 83 68 54 09; E-mail: david.moulin@univ-lorraine.fr.

1. Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor superfamily, which behave as ligand-activated transcription factors in response to endogenous fatty acids and eicosanoids or isotype selective synthetic compounds. Among the three characterized isoforms, PPAR- α is expressed mainly in tissues contributing actively to the catabolism of fatty acids and contributes to the control of inflammation. PPAR- γ is highly expressed in adipose tissue, where it has a pivotal role in adipocyte differentiation and lipid storage and is also a prominent player in inflammation control [1,2]. All PPARs are expressed in both human and rodent osteoblasts and osteoclasts, supporting a role for the PPARs in the regulation of bone metabolism, although the significance of PPAR- α and its agonists in bone metabolism remains poorly elucidated. More is known about the role of PPAR- γ which agonists promote adipocyte differentiation preferentially over osteoblast differentiation [3].

Because of their metabolic actions, PPAR- α and PPAR- γ have become major drug targets [4]. Fenofibrate belongs to a class of fibrates, which are well-known PPAR- α agonists, and are widely used for treatment of hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Thiazolidinediones are synthetic PPAR- γ agonists previously used for treatment of type 2 diabetes mellitus.

Experimental model of Adjuvant-Induced Arthritis (AIA) in rats reproduces major features upcoming in rheumatoid arthritis (RA). Its relevance to the pathogenesis of RA is further supported by the demonstration that pro-inflammatory cytokines are highly expressed in the developing arthritic process and by the reproduction of most bone changes found in RA [5], including inflammatory bone loss, which has been linked to an increased risk of fracture. We and others demonstrated previously that PPAR agonists reduced the severity of experimental polyarthritis and the overall inflammatory-induced bone loss. In the present study, we compare the effect of a PPAR- α (fenofibrate) and a PPAR- γ agonist (pioglitazone) on arthritis development and secondary bone loss.

2. Material and methods

2.1. Animals

Twenty-four inbred male Lewis rats (Charles River, L'Arbresle, France) weighing 150–175 g were acclimated for 1 week in the laboratory before use. Animals were housed in groups of three or four in solid-bottomed plastic cages with access to tap water and standard rodent pelleted chow (Scientific Animal Food & Engineering A04, Villemoisson-sur-Orge, France) *ad libitum*. Room temperature was set at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and animals were subjected to a 12-hour light cycle. All experiments were performed in accordance with national animal care guidelines and were pre-approved by a local ethics committee. Arthritis sensitization, BMD measurements and blood sampling at necropsy were performed under general anaesthesia with volatile anaesthetics (AErraneTM; Baxter SA, Maurepas, France).

2.2. Induction of arthritis and treatment regimen

Arthritis was induced according to the protocol we have previously described [6]. Animals were randomly assigned to one of the following treatment groups: arthritic vehicle-treated controls (AIA + vehicle) arthritic rats treated with 30 mg/kg/day of pioglitazone (AIA + PIO) or arthritic rats treated with 100 mg/kg/day of fenofibrate (AIA + FENO). Naive animals served as controls (vehicle-treated controls). Pioglitazone or fenofibrate were given orally from the day of sensitization until necropsy

(day 21) under a volume of 1 ml/100 g body-weight. Treatment was prepared daily from marketed pills of Actos™ (Takeda, Puteaux, France) or Fénofibrate BIOGARAN® (Biogran, Colombes, France) as a suspension in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC). Naive rats and arthritic controls received CMC only.

2.3. Assessment of arthritis

2.3.1. Body-weight

Total body-weight was recorded twice a week from day 0 (D0) to day 21 (D21).

2.3.2. Arthritic score

Animals were scored regularly until day 21 (D21) by 2 investigators who were blind to the treatment. Each paw was graded according to the severity and extent of erythema and swelling of peri-articular soft tissues, and the enlargement and distortion of the joints [7]. Clinical score ranged from 0 (no sign) to 4 (severe lesions), yielding to a maximum score of 16 per animal.

2.3.3. Hindpaw oedema

Swelling of both hindpaws was measured regularly until day 21 by plethysmography. Briefly, hindpaw volume was measured up to the skin-coat junction of the rear footpad through the displacement of an equivalent volume of water in a plethysmometer 7150 (Apelex, France). At the indicated times, paw volume was compared to the basal level (D0) and oedema was expressed as changes in ml.

2.4. Bone mineral density measurements

BMD was determined *in vivo* by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) using a model QDR-4500A densitometer (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) with a small-animal module. Rats were anesthetized as mentioned above, placed in a supine decubitus position with abduction of the four limbs and scanned both the day before arthritis induction (D1) and the day before necropsy (D20). Each animal was scanned five times consecutively after repositioning, each measurement being performed by the same investigator, who was blind to the treatment. BMD (g/cm²) determined on whole body and bone mineral content (BMC, g) were determined on the whole body (total BMC) and one region of interest, left femur (ROI). Data were expressed as changes in BMC or BMD over study duration, each animal being used as its proper control. Internal variations of repeated measures of total rat BMD have been determined to be 1.5–2%.

2.5. RNA isolation and real-time reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR)

Synovial mRNA levels were determined using SYBR Green®-based quantitative PCR. Total RNA was isolated using RNeasyplus mini kit® (Qiagen, France), which allows total removal of genomic DNA with an on-column DNA elimination step. Two hundred ng of total RNA were reverse-transcribed for 90 minutes at 37°C in a 20 µl reaction mixture containing 2.5 mM dNTP, 5 µM random hexamer primers, 1.5 mM MgCl₂ and 200U Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen) in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, France).

Real time-PCR was performed using Step One Plus (Applied Biosystems) technology with set of specific primers (0.5 µM each; for sequence see Koufany et al. [6]) and iTAQ SYBRgreen master mix system (Biorad) at concentrations provided by the manufacturer. Melting curve was performed to de-

termine the melting temperature of the specific PCR products and after amplification product size was checked on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Each run included positive and negative reaction controls. The mRNA level of the gene of interest and of rat ribosomal protein S29, chosen as housekeeping gene, was determined in parallel for each sample. Quantification was determined using the $\Delta\Delta C_T$ methods and results were expressed as fold change over control.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Arthritis score and histological grading were analysed with the Kruskal–Wallis test, using StatView™ version 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All other data were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$ compared with vehicle-treated controls (Control); # $p < 0.05$ compared with arthritic vehicle-treated rats (AIA)).

3. Results

3.1. Effect of pioglitazone and fenofibrate on arthritis severity

Arthritis occurred in all animals sensitized with complete Freund's adjuvant. Treatment with pioglitazone or fenofibrate did not reduce arthritis incidence (data not shown). As shown in Fig. 1(a), arthritis became obvious by day 13 and was maximal around day 20 after sensitization. At necropsy, the arthritic score averaged 13 in vehicle-treated animals, reflecting a severe arthritis, confirmed by ankle joint histological analysis (data not shown). Analysis of paw volume by plethysmometry revealed a bilateral paw swelling at day 13 with a maximum around day 17. Pioglitazone and fenofibrate treatment reduced both clinical score and oedema to a higher extent with fenofibrate.

Body-weight of naive animals increased gradually with a mean gain of approximately 5 g/day over study duration (Fig. 1(c)). In all arthritic rats, body-weight peaked at day 9, then decreased when arthritis settled. The rate of changes in body-weight was similar in arthritic controls and in rats treated with pioglitazone. The loss in body-weight gain was reduced from D13 to D20 in arthritic animals receiving 100 mg/kg/d of fenofibrate.

3.2. Effect of pioglitazone and fenofibrate on arthritis-induced bone changes

Changes in BMC and BMD were evaluated by DEXA on the whole body and on one region of interest (left femur). BMD increased over study duration globally and in the region of interest of vehicle-treated controls (data not shown). Arthritic animals showed a limited progression of BMD, due to the development of the disease. Fenofibrate treatment induced an improvement in global and femoral BMD. A marked decrease in BMC (Fig. 2(c)) was observed in arthritic AIA controls. This loss in BMC was prevented in arthritic animals treated with 30 mg/kg/d of pioglitazone or with 100 mg/kg/d of fenofibrate (Fig. 2(c)).

3.3. Effect of PPAR agonists on cytokines expression

Synovial mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and IL-17 was determined by RT-PCR. IL-17 was barely detectable in our experimental conditions. Interleukin-1beta was overexpressed in arthritic an-

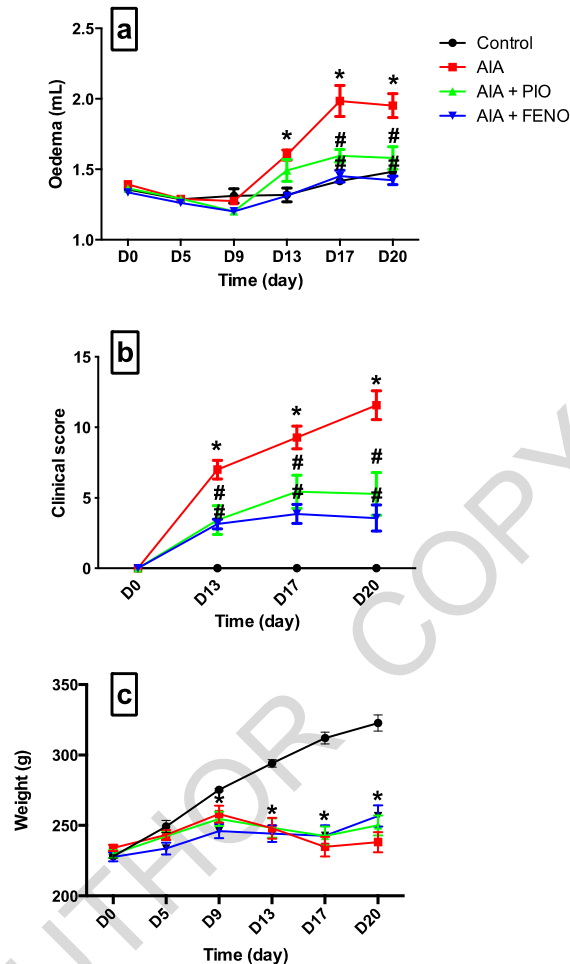


Fig. 1. Oedema (a), arthritic score (b), body-weight (c). Lewis male rats were sensitized intradermally at the basis of the tail with 1 mg of *M. tuberculosis*. Animals were treated daily with 100 mg/kg of FENO ($n = 6$) or 30 mg/kg of PIO ($n = 6$) by oral administration. Arthritic (AIA, $n = 6$) and healthy controls ($n = 6$) were given CMC 0.5% alone. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs control and # $p < 0.05$ vs AIA groups. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-140977>.)

imals compared to healthy controls. Treatment with both agonists significantly reduced IL-1beta expression (Fig. 3). The same observation was made with IL-6, agonists of the both alpha and gamma PPAR isotypes totally suppressed IL-6 induction in arthritic treated animals.

4. Discussion

In our experimental model, fenofibrate at 100 mg/kg/day and pioglitazone at 30 mg/kg/day decreased several aspects of arthritis severity as shown by partial inhibition of paw edema and reduction of arthritic

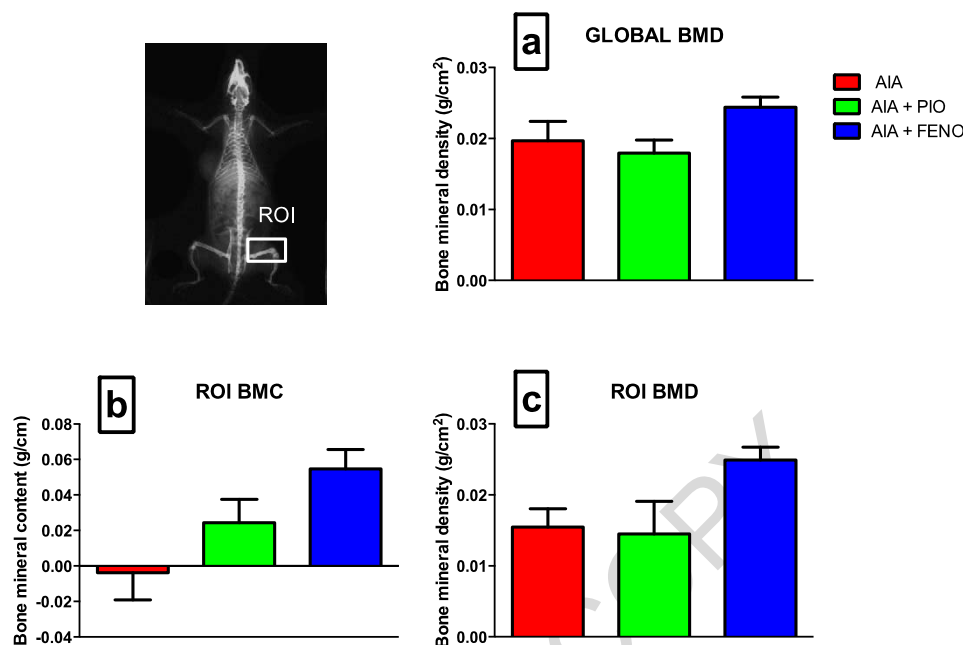


Fig. 2. Effect of fenofibrate (FENO) and pioglitazone (PIO) treatment on bone mineral density in adjuvant-induced arthritic rats. Global bone mineral density at day 20 (a), femoral bone density at day 20 (b), femoral bone content (day 20–day 0) (c). Male Lewis rats were sensitized intradermally on the basis of the tail with 1 mg *M. tuberculosis*. Animals were treated daily with FENO 100 mg/kg ($n = 6$) or PIO 30 mg/kg ($n = 6$) by oral administration. Arthritic (AIA, $n = 6$) and normal controls ($n = 6$) were given CMC 0.5% alone. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. [#] $p < 0.05$ vs AIA controls. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-140977>.)

score. The anti inflammatory potency of fenofibrate and pioglitazone extended the general meaning that inflammation was a target for PPAR- α and PPAR- γ agonists as reported by previous studies [8–12].

We demonstrated that both agonists reduced the expression in arthritic synovial of two key cytokines involved in arthritic process, IL-6 and IL-1 β ; this finding being consistent with the report of their decrease by a PPAR- γ agonist in joints of mice with established collagen-induced arthritis [9]. In fenofibrate treatment, pro-inflammatory cytokines inhibition could be attributed to the ability of PPAR- α agonists to inhibit the NF- κ B pathway in arthritic tissues [8].

Focal erosions or generalized osteopenia, are a very active topic in RA. In our study, animals with AIA reproduced this important bone resorption, administration of fenofibrate or pioglitazone prevented arthritis-induced bone loss. We already demonstrated a bone protective effect of pioglitazone in adjuvant-induced arthritis. Indeed, pioglitazone decreased inflammatory-bone destruction and reduced bone micro-architecture in AIA rats by controlling circulating and local expression of IL-17 with a subsequent decrease of the (RANKL/OPG) ratio [13]. Of interest, three recent studies have demonstrated the efficacy of pioglitazone alone or in combination with methotrexate in RA patients [14–16].

Acknowledgement

This work was supported by grants from the Arthritis Foundation Courtin.

IL-1beta

Fold changes



itis Res. Ther. **8**(1) (2006), R7.

- [10] A. Szanto and L. Nagy, The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means?, *Immunobiology* **213**(9,10) (2008), 789–803.
- [11] P.R. Devchand, H. Keller, J.M. Peters, M. Vazquez, F.J. Gonzalez and W. Wahli, The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control, *Nature* **384**(6604) (1996), 39–43.
- [12] D.S. Straus and C.K. Glass, Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms, *Trends Immunol.* **28**(12) (2007), 551–558.
- [13] M. Koufany, D. Chappard, P. Netter, C. Bastien, G. Weryha, J.-Y. Jouzeau et al., The peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone preserves bone microarchitecture in experimental arthritis by reducing the interleukin-17-dependent osteoclastogenic pathway, *Arthritis Rheum.* **65**(12) (2013), 3084–3095.
- [14] M.J. Ormseth, A.M. Oeser, A. Cunningham, A. Bian, A. Shintani, J. Solus et al., Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist effect on rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial, *Arthritis Res. Ther.* **15**(5) (2013), R110.
- [15] D. Shahin, E.E. Toraby, H. Abdel-Malek, V. Boshra, A.Z. Elsamanoudy and D. Shaheen, Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist (pioglitazone) and methotrexate on disease activity in rheumatoid arthritis (experimental and clinical study), *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* **4** (2011), 1–10.
- [16] W. Marder, S. Khalatbari, J.D. Myles, R. Hench, S. Lustig, S. Yalavarthi et al., The peroxisome proliferator activated receptor- γ pioglitazone improves vascular function and decreases disease activity in patients with rheumatoid arthritis, *J. Am. Heart Assoc.* **2**(6) (2013), e000441.

2. Etude des potentialités anti-arthritiques et anti-résorptives d'un agoniste sélectif de PPAR γ

2.1 Objectif du travail

L'objectif de ces travaux était d'étudier l'impact de la pioglitazone, un agoniste synthétique de haute affinité pour le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes PPAR γ , sur les modifications de la microarchitecture osseuse consécutives à une arthrite chronique expérimentale chez le rat. Nous nous sommes particulièrement intéressé au rôle de l'IL-17 et aux mécanismes de sa régulation, ainsi qu'aux régulateurs majeurs de l'ostéoclastogenèse, RANKL et OPG.

2.3 Résultats marquants

Potentialités anti-arthritiques de PPAR γ

Comme nous l'avions déjà démontré lors de travaux précédents (Koufany et al. 2008) et en conformité avec les données de la littérature, l'activation de PPAR γ par un agoniste synthétique de haute affinité a diminué la sévérité de l'arthrite expérimentale, comme le montre l'amélioration des paramètres cliniques. L'analyse histologique a confirmée que l'activation sélective de PPAR γ réduisait également l'hyperplasie synoviale et les lésions des tissus cartilagineux et osseux dans les articulations périphériques.

Potentialités anti-résorptives de PPAR γ

La diminution de l'inflammation observée chez les animaux traités a été accompagnée par une prévention importante de la perte osseuse associée à l'arthrite. En effet, l'activation sélective de PPAR γ a diminué le nombre d'ostéoclastes, a limité la baisse de la densité minérale osseuse au niveau du rachis lombaire et du fémur, mais a également permis de prévenir la détérioration de la microarchitecture osseuse comme en témoigne l'amélioration de l'ensemble des paramètres morphométriques. Nous avons démontré que la prévention de la résorption osseuse par l'agoniste de PPAR γ s'accompagnait d'une baisse de l'expression à la fois locale et systémique de RANKL soluble, le principal facteur de différenciation des ostéoclastes, corrigeant ainsi partiellement le déséquilibre du rapport sRANKL/OPG associé à l'arthrite. En effet, chez les animaux non traités, ce rapport augmente en faveur d'une résorption osseuse accrue, en accord avec ce qui est

rapporté dans la littérature dans les modèles d'arthrite chronique et dans la polyarthrite rhumatoïde chez l'homme.

Effet de l'activation de PPAR γ sur l'expression de l'IL-17

L'IL-17 est un facteur clé de régulation de la physiopathologie articulaire, capable d'induire la production de TNF α et d'IL-1, de réguler positivement la production de RANKL et serait un médiateur majeur des dégradations articulaires. Nous avons démontré que l'IL-17 était abondamment produite dans la synoviale inflammatoire, en accord avec l'augmentation des taux d'IL-17 sérique. Le traitement par la pioglitazone a significativement diminué la production locale et systémique de l'IL-17 chez les animaux arthritiques. Il est établi que le potentiel ostéoclastogénique de l'IL-17 humaine s'exprime au travers de la modulation de la voie RANKL/OPG, ce rapport étant un indicateur important du remodelage osseux.

Identification des cellules responsables de la production de l'IL-17

L'entretien de l'inflammation et la dégradation progressive des tissus articulaires résulte en grande partie de l'activité des cellules infiltrant l'articulation via la néovascularisation qui se produit dans la synoviale. Nous avons caractérisé les différentes populations cellulaires infiltrant ce tissu synovial inflammatoire dans les articulations périphériques, afin de déterminer quel type cellulaire était responsable de la production d'IL-17. Parmi les populations infiltrantes (majoritairement des Polynucléaires Neutrophiles ou PMN, des lymphocytes, des macrophages et des mastocytes), se sont les PMN qui se sont révélés être majoritairement responsables de la production d'IL-17 (96%), alors que les lymphocytes ne représentaient que 4% des cellules positives.

Contribution de ROR γ t dans les effets de l'activation de PPAR γ par son agoniste

Dans le but de confirmer que les propriétés anti-arthritiques et anti-résorptives observées dans notre étude sont dépendantes de l'activation de PPAR γ , nous avons étudié le mécanisme de régulation de l'expression de l'IL-17. Nous avons mis en évidence, grâce à un modèle cellulaire, que l'inhibition de l'IL-17 était dépendante de la répression de ROR γ t par PPAR γ . En effet, l'activation de PPAR γ par la pioglitazone réprime

l'expression de ROR γ t, qui est le régulateur clé de la différenciation des Th17 et de la production d'IL-17. Nos données suggèrent donc que les effets anti-arthritiques observés résultent du contrôle de l'expression de l'IL-17 par PPAR γ , via le facteur de transcription ROR γ t.

2.2 Article 3 : « The Peroxisome Proliferator–Activated Receptor Agonist Pioglitazone Preserves Bone Microarchitecture in Experimental Arthritis by Reducing the Interleukin-17–Dependent Osteoclastogenic Pathway »

The Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Agonist Pioglitazone Preserves Bone Microarchitecture in Experimental Arthritis by Reducing the Interleukin-17–Dependent Osteoclastogenic Pathway

Meriem Koufany,¹ Daniel Chappard,² Patrick Netter,³ Claire Bastien,⁴ Georges Weryha,⁴ Jean-Yves Jouzeau,³ and David Moulin¹

Objective. To investigate the effect of pioglitazone on inflammation-induced bone loss and changes in bone microarchitecture in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA), focusing on the contribution of interleukin-17 (IL-17) and the balance of RANKL and osteoprotegerin (OPG).

Methods. Male Lewis rats sensitized with Freund's complete adjuvant were treated orally for 21 days with 30 mg/kg/day of pioglitazone or vehicle. Arthritis severity was evaluated by clinical and histologic examination. Bone mineral density (BMD) was assessed by dual x-ray absorptiometry. The therapeutic effect of pioglitazone on changes of the bone architecture was determined by micro-computed tomography (micro-CT). Levels of RANKL, OPG, and IL-17 were determined by serum immunoassay and by synovial tissue immunohistochemistry. Messenger RNA for IL-17 and retinoic acid receptor–related orphan nuclear receptor γ t (ROR γ t) was evaluated by quantitative reverse

transcription–polymerase chain reaction and IL-17 promoter activity by gene-reporter assay.

Results. Micro-CT analysis revealed that pioglitazone treatment reduced arthritis severity and bone erosion scores and increased BMD in comparison to vehicle treatment. Cortical bone thickness was preserved, although the major beneficial effect of pioglitazone was on indices of the trabeculae, especially trabecular separation. Pioglitazone reduced the ratio of RANKL to OPG, in both the serum and the inflamed synovium. Circulating levels of IL-17 were significantly reduced by pioglitazone treatment, as were the percentages of IL-17–positive cells, mainly polymorphonuclear cells, in the inflamed synovium. Induction of IL-17 was strictly dependent on the binding of ROR γ t to IL-17 promoter, and lentiviral overexpression of peroxisome proliferator–activated receptor γ (PPAR γ) reduced the expression of ROR γ t.

Conclusion. Pioglitazone decreased the level of inflammatory bone destruction and protected the bone microarchitecture in rats with AIA by controlling the circulating and local expression of IL-17, with a subsequent decrease in the RANKL-to-OPG ratio. Along with the inhibition of ROR γ t expression after PPAR γ overexpression, these findings provide evidence of the major contribution of reduced IL-17/RANKL-dependent osteoclastogenesis.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by symmetric synovitis, inflammatory exudates in joint cavities, and profound cartilage and bone changes (1). One of the hallmarks of the disease is the destruction of periarticular bone, which leads to functional disability of the joint (2). Patients with RA also develop progressive systemic bone

Supported by grants from the Arthritis Foundation Courtin.

¹Meriem Koufany, MSc, David Moulin, PhD: UMR-7365, CNRS, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ²Daniel Chappard, MD: IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé and Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France; ³Patrick Netter, MD, PhD, Jean-Yves Jouzeau, PharmD, PhD: UMR-7365, CNRS, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, and Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Nancy, France; ⁴Claire Bastien, MD, Georges Weryha, MD: Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Drs. Jouzeau and Moulin contributed equally to this work.

Address correspondence to Jean-Yves Jouzeau, PharmD, PhD, or David Moulin, PhD, UMR-7365, CNRS, Université de Lorraine, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: jean-yves.jouzeau@univ-lorraine.fr or david.moulin@univ-lorraine.fr.

Submitted for publication September 28, 2012; accepted in revised form August 8, 2013.

loss. Indeed, the formation of osteoclasts is enhanced in inflammatory conditions and is not balanced by increased activity of bone-forming osteoblasts. Such an imbalance results in joint destruction and increased fracture risk, both of which are major causes of functional disability in RA (2).

Th17 cells have been shown to be involved in the pathogenesis of autoimmune diseases, including RA, and are characterized by their ability to produce interleukin-17 (IL-17). The differentiation and survival of Th17 cells are regulated by IL-6, transforming growth factor β , IL-1 β , IL-21, and IL-23 under the control of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t (ROR γ t) (3). Murine models suggest that IL-17 may be a critical mediator of joint destruction, since its blockade reduces arthritis severity (4). The osteoclastogenic potential of human IL-17 is now well established through the modulation of the RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) pathway (5,6). The ratio of RANKL to OPG in the bone marrow is an important determinant of bone mass control in normal and disease states.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor superfamily that behave as ligand-activated transcription factors in response to endogenous fatty acids and eicosanoids (7) or to isotype-selective synthetic compounds, such as fibrates or thiazolidinediones (8). Besides their ability to reduce the metabolic syndrome, several studies have shown that activation of one or more PPAR isotypes (PPAR α , PPAR β/δ , or PPAR γ) had variable power to control inflammation (9,10). We and other investigators have demonstrated an antiinflammatory effect of PPAR γ agonists on experimental polyarthritis (11–14), which was supported mainly by the findings of reduced activation of the proinflammatory cytokine network, including tumor necrosis factor α (TNF α) (14,15), IL-6, or IL-1 β (11–14,16). Cell studies and animal studies further showed that most of this cytokine-suppressive capacity was linked to the ability of PPAR agonists to inhibit transcription factor pathways by mechanisms that included the formation of direct complexes with activator protein 1 (AP-1) and with NF- κ B family members (11,17).

Since thiazolidinediones (TZDs) have become clinically available for the treatment of type 2 diabetes mellitus, several epidemiologic studies have suggested that these compounds increased the rate of bone loss, and therefore the risk of fracture, at least in women with the disease (18). The implication that activation of PPAR γ may have adverse effects on the skeleton was

further supported by animal studies showing that prolonged administration of rosiglitazone (19) or pioglitazone (20) to healthy rodents resulted in a significant decrease in bone mineral density (BMD), or that PPAR γ haploinsufficiency increased bone mass throughout the life of the mice (21). More recently, PPAR γ was also shown to regulate osteoclastogenesis, since its targeted deletion in osteoclasts using a TIE-2/Cre/loxP-flanked mouse model caused osteopetrosis (22), which further suggests that PPAR γ activation may hinder bone homeostasis.

In contrast to the capacity of TZDs to decrease bone mass in patients with diabetes mellitus, a few animal studies support the notion that TZDs may paradoxically display some bone-sparing properties in severe inflammatory conditions. Thus, PPAR agonists with an established antiarthritic effect have also been shown to decrease osteoclast formation from bone marrow progenitors (23) or peripheral blood mononuclear cells (17). Our previous study also demonstrated that at a dosage that reduced arthritis severity, pioglitazone prevented inflammation-induced bone loss, as assessed by dual x-ray absorptiometry (DXA) (13).

In the present study, we used adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats as a model of chronic inflammation to investigate the effect of pioglitazone on bone microarchitecture and circulating mediators of osteoclastogenesis. We found that an antiarthritic dose of pioglitazone reduced bone loss in the lumbar spine and femur, and it prevented trabecular weakening of the bone more efficiently than cortical thinning. Pioglitazone decreased circulating levels as well as joint expression of IL-17 in inflammatory cells while reducing the ratio of RANKL to OPG in serum and synovium. We also demonstrated that the expression of IL-17 in the Jurkat T cell line was strongly controlled by PPAR γ activation, in a ROR γ t-dependent way, further supporting the notion of an inhibitory effect of pioglitazone on transcriptional activation of IL-17. These results are the first to demonstrate that the paradoxical “bone-protective” effect of pioglitazone during chronic arthritis occurred through the control of IL-17/RANKL-driven osteoclastogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Twenty-two inbred male Lewis rats (Charles River France) weighing 150–175 gm were acclimated for 1 week in the laboratory before experimentation. Animals were housed in groups of 3 or 4 in solid-bottomed plastic cages, with access to tap water and standard pelleted rodent chow (Scientific Animal Food and Engineering) ad libitum. Room temper-

ature was set at 23°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), and animals were subjected to a 12-hour cycle of light/dark. All experiments were performed in accordance with national animal care guidelines and were preapproved by the local ethics committee. Arthritis sensitization, BMD measurements, and blood sampling at necropsy were performed while the animals were under general anesthesia with the volatile anesthetic isoflurane (AErrane; Baxter France).

Induction of arthritis and treatment regimen. Arthritis was induced according to the protocol we have previously described (13). Rats with AIA were randomly assigned to treatment with vehicle (vehicle-treated arthritic controls) or treatment with 30 mg/kg/day of pioglitazone. Naive animals without AIA were treated with vehicle and served as additional controls (vehicle-treated controls). Pioglitazone was given orally, at a volume of 1 ml/100 gm of body weight, from the day of sensitization until necropsy (day 21). Treatment was prepared daily from commercially available pills (Actos; Takeda) as a suspension in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC). Naive rats and arthritic controls received CMC only.

Assessment of arthritis. The severity of arthritis was assessed by the periodic monitoring of total body weight and arthritis scores, which were performed at the indicated times, as previously described (13).

Histologic analysis of ankle joints. Ankle joints were processed as described elsewhere (13) and stained with hematoxylin–eosin–safran (HES) or toluidine blue. Bone erosion and synovium inflammation were graded as previously described (24).

Immunohistochemical analysis. Ankle sections were rehydrated in a graded ethanol series and then incubated for 10 minutes in 3% hydrogen peroxide. Sections were washed 3 times in water and incubated overnight at 70°C in citrate buffer, pH 6 (Zytomed Systems). After washing in water and phosphate buffered saline (PBS), slides were incubated for 20 minutes in blocking serum and then overnight at 4°C with IL-17 (Tebu-Bio), OPG (Santa Cruz Biotechnology), and RANKL (Santa Cruz Biotechnology) polyclonal primary antibodies. After washing in PBS, slides were covered for 30 minutes with secondary antibodies conjugated to a micro-polymer containing horseradish peroxidase (ImmPRESS kit; Vector) and then washed in PBS. Staining was developed with 3,3'-diaminobenzidine (0.05% in hydrogen peroxide) (Novostain Super ABC kit; Novocastra). All slides were counterstained for 10 seconds with Harris' hematoxylin (Réactifs RAL). Identification of IL-17-positive cells on HES-stained serial sections was performed by 2 pathologists who were blinded with regard to the treatment.

BMD measurements. BMD was determined in vivo by DXA, using a QDR-4500A densitometer (Hologic) equipped with a small-animal module. Rats were anesthetized as described above and scanned as described elsewhere (13). Data were expressed as changes in BMD over the duration of the study, with each rat being used as its own control.

Micro-computed tomographic (micro-CT) analysis. Rats were killed, and 1 femur from each rat was carefully dissected and fixed in 10% phosphate buffered formalin, pH 7.4. Ten days later, the femurs were dehydrated successively in 70%, 95%, and 100% ethanol, cut through the middle of the diaphysis, and measured without additional preparation using

a SkyScan 1072 micro-CT apparatus at 21 $\times$ magnification, as previously described (25).

Sandwich bead immunoassay for mediators of osteoclastogenesis. Serum levels of IL-17, soluble RANKL (sRANKL), and OPG were determined on day 21 with the use of a Milliplex kit (Millipore). Assays were run in triplicate according to the manufacturer's protocol. Data were analyzed using a Bio-Plex system (Bio-Rad). A 5-parameter regression formula was used to calculate the concentrations in the samples from the standard curves (from 5 pg/ml to 20,000 pg/ml). The limits of quantification (manufacturer's data) were 1.6 pg/ml for IL-17, 1.0 pg/ml for RANKL, and 2.3 pg/ml for OPG.

Lentiviral vector production and viral transduction. A ViraPower lentiviral expression system (Invitrogen) was used to generate replication-incompetent human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-based lentivirus to express PPAR γ and β -galactosidase proteins. Generation of lentiviral vectors was accomplished using 3 packaging plasmids, pLP1, pLP2, and pLP/VSVG (Invitrogen), which supply the helper functions as well as the structural and replication proteins required to produce the lentivirus.

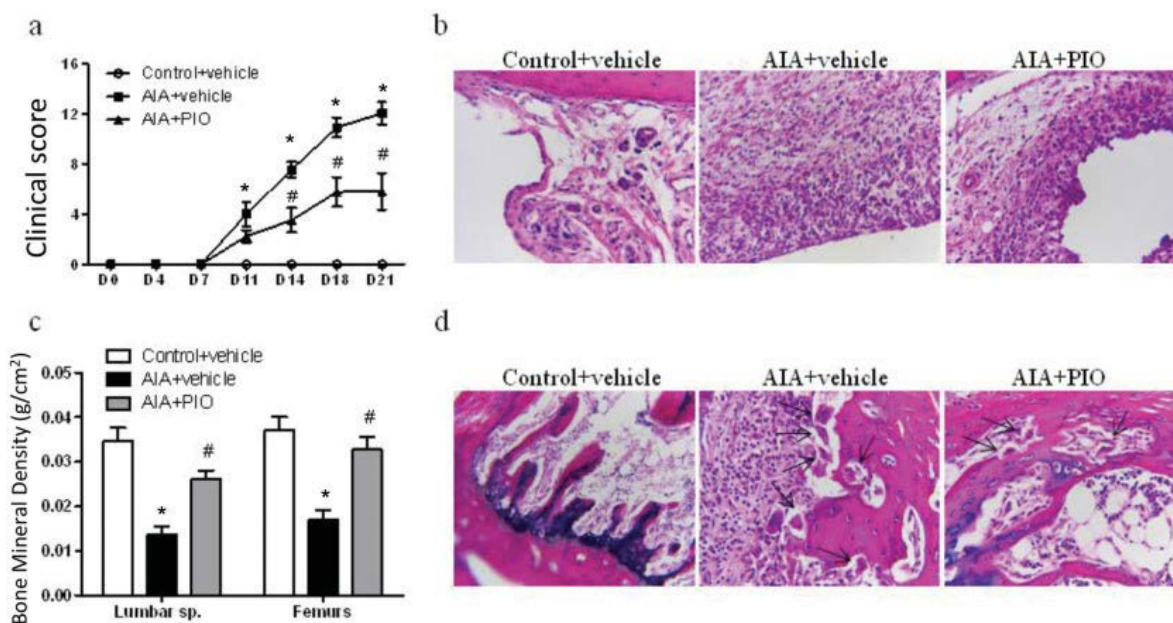
Vector production. We used 293 T cells to produce lentivirus according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). The viral supernatants were filtered and concentrated 250-fold by ultracentrifugation at 29,000 revolutions per minute for 90 minutes at 4°C in a Sorvall W α Ultra 90 ultracentrifuge (Thermo Fisher Scientific). The pellets were resuspended overnight in PBS and then stored at -80°C . The titer of the lentiviral vector was determined with an HIV p24 enzyme-linked immunosorbent assay kit (Cell Biolabs).

Viral transduction. Cell transduction was performed in growth medium supplemented with 6 $\mu\text{g/ml}$ of Polybrene (catalog no. H9268; Sigma-Aldrich). The virus-containing medium was removed the following day and replaced with fresh growth medium. On day 3, medium was replaced by growth medium containing 4 $\mu\text{g/ml}$ of blasticidin (Gibco Invitrogen) to select stably transduced cells. Medium was replaced every 3 or 4 days with growth medium containing antibiotic until resistant cells could be identified.

IL-17 expression and regulation. IL-17 promoter assay. Jurkat cells were electroporated with plasmids encoding for either wild-type or ROR γ t binding site-deleted murine IL-17 promoter and pCMV-*Renilla* luciferase (Promega) using a Nucleofector kit (Amaxa/Lonza) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 3×10^6 cells were gently mixed with 2 μg of plasmid and with 5 ng of pCMV-*Renilla* luciferase before electroporation using a Nucleofector kit, program X-001. Immediately after transfection, cells were split equally into 3 wells containing 10% fetal calf serum-RPMI 1640 growth medium, left to recover for 24 hours, and IL-17 promoter activity was analyzed.

Reporter gene assay. IL-17 promoter activity was measured using a dual-luciferase reporter assay kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. Results were expressed as the mean ratio of firefly to *Renilla* luciferase activity.

Jurkat T cell assay for cells with the Th17-like phenotype. Jurkat T cells were stimulated with 20 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 μM ionomycin. The concentrations of PMA and ionomycin were determined by a preliminary dose-ranging study. The duration of stimulation



was 6 hours for assessment of IL-17 promoter activity and 48 hours for quantification of messenger RNA (mRNA). Cells were challenged when indicated with 30 μ M pioglitazone (a generous gift from Takeda Japan).

Assays for IL-17 and ROR γ t expression. To quantify the expression of mRNA for the genes of interest, a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was performed using LightCycler (Roche) technology. PCR was performed with a SYBR Green Master Mix system (Qiagen). The gene-specific primer pairs used were 5'-TGTC-CAAACGCCGAGGCCAAT-3' (forward) and 5'-AAGCG-AGCTCCAGAAGGCCCT-3' (reverse) for IL-17 and 5'-CG-GGCCTACAATGCTGACA-3' (forward) and 5'-GCCACC-GTATTTGCCTTCAA-3' (reverse) for ROR γ t. Results were expressed as the ratio of the mRNA level of each gene to that of the housekeeping gene RP29.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Arthritis scores and histologic grades were analyzed with the Kruskal-Wallis test, using StatView version 5.0 software (SAS Institute). All other data were compared by analysis of variance followed by the Bonferroni post hoc test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Effect of pioglitazone on arthritis severity. As shown in Figure 1a, arthritis became obvious by day 11 and was maximal around day 20 after sensitization. At the end of the experiment, the arthritis score averaged 12 in vehicle-treated animals, reflecting severe arthritis. This was confirmed by histologic analysis of the ankle joints (Figure 1b). Administration of pioglitazone (30 mg/kg/day) significantly reduced the arthritis score (by almost 50% on day 21) as compared to that of vehicle-treated rats with AIA. Noteworthy, the major bone erosion seen in the vehicle-treated rats with AIA (mean $\pm$ SEM 3.00 $\pm$ 0.02) as compared to the vehicle-treated controls (0.00 $\pm$ 0.02) was significantly reduced in the pioglitazone-treated rats with AIA (1.60 $\pm$ 0.11; *P* < 0.05 for each comparison). In addition, synovial inflammation seen in the vehicle-treated rats with AIA (mean $\pm$ SEM 5.50 $\pm$ 0.08) as compared to the vehicle-

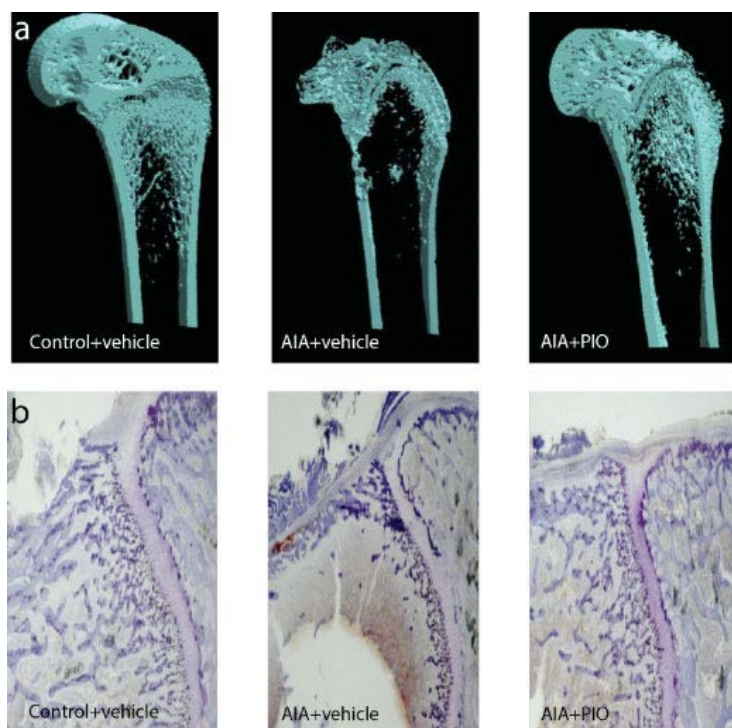


Figure 2. Effect of pioglitazone (PIO) on arthritis-induced changes of bone morphometry in male Lewis rats. Rats were sensitized subcutaneously at the base of the tail with a single injection of 1 mg of *Mycobacterium tuberculosis*. One group of rats with adjuvant-induced arthritis (AIA; $n = 8$) was treated once daily with 30 mg/kg of pioglitazone orally. A second group of rats with AIA ($n = 7$) was treated with vehicle alone (0.5% carboxymethylcellulose). A group of naive rats without AIA ($n = 7$) was treated with vehicle alone (controls). Shown are **a**, representative 3-dimensional images of the distal femur obtained by micro-computed tomography on day 21 of the study, and **b**, representative histologic sections of the uncanceled femoral metaphysis, which was embedded in methylmethacrylate and then stained with modified Goldner's trichrome. Original magnification $\times 200$.

treated control rats (1.00 ± 0.32) was also reduced in the pioglitazone-treated rats with AIA (3.75 ± 0.88), but the difference was not significant.

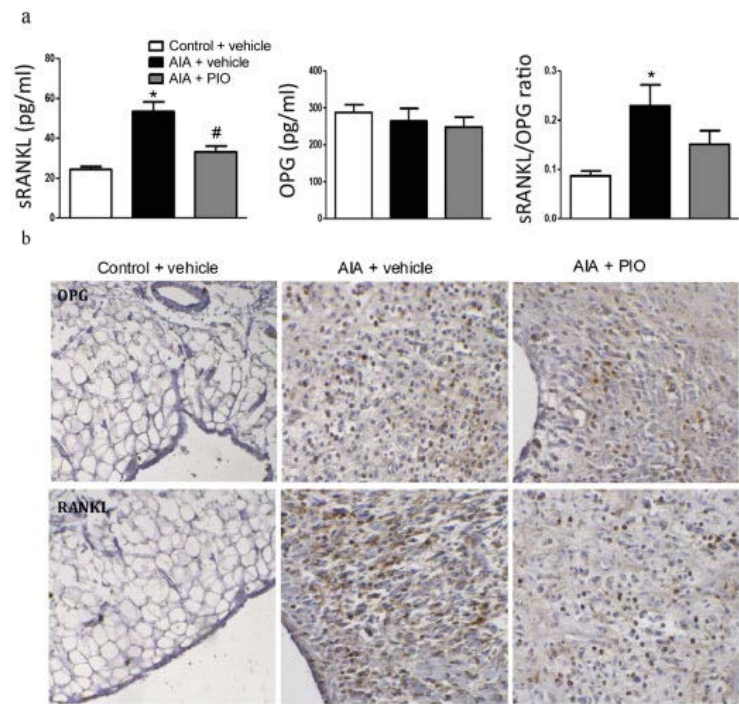
Bone mineral density (BMD) increased over the duration of the study in the 3 regions of interest (lumbar spine, right femur, and left femur) in the vehicle-treated controls (Figure 1c). The mean gain in BMD in arthritic vehicle-treated rats was 61% lower in the lumbar spine and 54% lower in the femur as compared to the values in vehicle-treated controls. Beyond its ability to decrease arthritis severity, pioglitazone efficiently reduced bone erosion and significantly increased the BMD in the femurs of arthritic rats almost to the levels in vehicle-treated controls. Furthermore, histologic analysis of the ankle bones showed a marked decrease in osteoclast density ($\sim 60\%$) at the synovium–bone margin in arthritic animals treated with pioglitazone (Figure 1d).

Effect of pioglitazone on arthritis-induced bone changes. Three-dimensional (3-D) reconstruction of the distal femur showed that vehicle-treated arthritic animals displayed a thinning of the cortices and a massive disorganization of the trabecular network, with a large area having no trabeculae (Figure 2a). In arthritic animals treated with pioglitazone, the cortices were preserved, and the trabecular network was globally conserved, except for some holes corresponding to areas of loss of connectivity. These 3-D images were highly consistent with the bone architecture seen on the corresponding histology sections (Figure 2b).

Bone morphometric parameters. In arthritic rats, the 2-D section images of the primary spongiosa, the secondary spongiosa, and the central diaphysis showed a significant reduction in cortical bone thickness in all areas (-37% , -42% , and -33% , respectively) as

compared to vehicle-treated controls (Table 1). Treatment with pioglitazone preserved cortical bone thick-

ness in 2 of the 3 zones studied (–23% in the secondary spongiosa and –14% in the diaphysis) and slightly



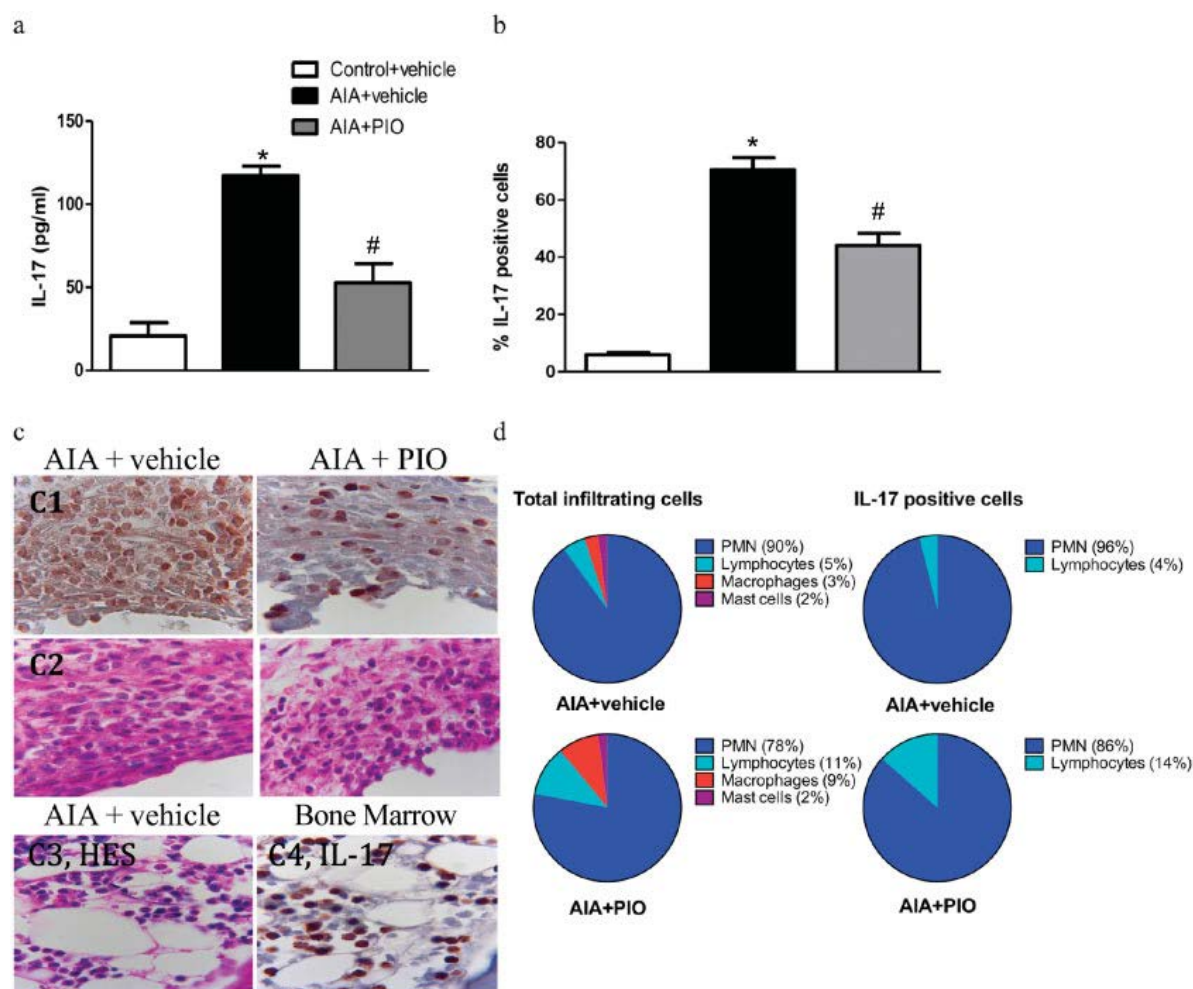


Figure 4. Effect of pioglitazone (PIO) on interleukin-17 (IL-17) expression in male Lewis rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). One group of rats with adjuvant-induced arthritis (AIA; $n = 8$) was treated once daily with 30 mg/kg of pioglitazone orally. A second group of rats with AIA ($n = 7$) was treated with vehicle alone (0.5% carboxymethylcellulose). A group of naive rats without AIA ($n = 7$) was treated with vehicle alone (controls). Shown are **a**, circulating levels of IL-17, **b**, percentages of IL-17-positive cells in ankle joint sections, as determined by immunohistochemical analysis, **c**, immunohistochemical analysis of ankle joint synovial tissue in arthritic rats, and **d**, cellular profile of the inflamed synovium in arthritic rats. In **c**, C1 = IL-17 in synovium, C2 = hematoxylin-eosin-saffron (HES)-stained section of synovium, C3 = HES-stained section of bone marrow, and C4 = IL-17 in bone marrow. Original magnification $\times 1,000$. Values in **a** and **b** are the mean $\pm$ SEM. * = $P < 0.05$ versus vehicle-treated controls; # = $P < 0.05$ versus vehicle-treated arthritic rats. PMN = polymorphonuclear cells.

improved bone thinning in the other zone (-32% in the primary spongiosa) as compared to vehicle-treated controls.

The bone morphometric parameters derived from 3-D microtomography measurements confirmed that arthritis induced an overall loss of bone (Table 1). Thus, the bone volume ratio decreased significantly in

vehicle-treated arthritic rats, as did the trabecular number and trabecular thickness, in comparison to the values in the vehicle-treated controls. Consistent with the reductions in the trabecular number and trabecular thickness, vehicle-treated arthritic animals displayed an increased trabecular separation as compared to that in the vehicle-treated naive controls. In rats administered

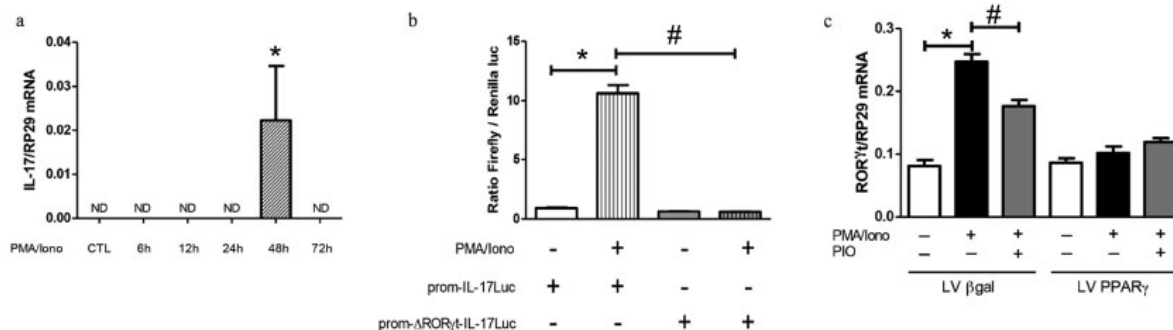


Figure 5. Effect of pioglitazone (PIO) on interleukin-17 (IL-17) expression in the Jurkat T cell line. **a**, Induction of IL-17 mRNA expression by Jurkat T cells after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin (Iono), as determined by real-time quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). Data were expressed as the ratio of mRNA for the IL-17 gene to that of the HP29 housekeeping gene. **b**, Dependence of PMA/ionomycin-induced transactivation of the IL-17 promoter on retinoic acid receptor–related orphan nuclear receptor γ (ROR γ t) binding to the promoter. Jurkat cells were nucleofected with either wild-type (prom-IL-17-Luc) or ROR γ t binding site–deleted (prom-ΔROR γ t-IL-17-Luc) murine IL-17 promoter. After 24 hours, cells were left untreated or were treated with 30 μ M pioglitazone and then were left unchallenged or were challenged for 6 hours with PMA/ionomycin. The ratio of firefly to *Renilla* luciferase (Luc) was determined by luminometry. **c**, Pioglitazone reduction of ROR γ t expression via activation of peroxisome proliferator–activated receptor γ (PPAR γ). Jurkat cells were lentivirally transduced with β -galactosidase or PPAR γ and then selected with blasticidin. Transduced cells were then left untreated or were treated with 30 μ M pioglitazone and then were left unchallenged or were challenged with PMA/ionomycin. After 48 hours, ROR γ t expression was analyzed by real-time quantitative RT-PCR. Data were expressed as the ratio of mRNA for the ROR γ t gene to that of the HP29 housekeeping gene. Values are the mean $\pm$ SEM of 3 experiments. * = $P < 0.05$ versus unstimulated cells in **a**, and for the indicated comparisons in **b** and **c**; # = $P < 0.05$ for the indicated comparisons. ND = not detected.

pioglitazone at 30 mg/kg/day, the bone volume ratio recovered significantly, as did the trabecular number and trabecular thickness indices, in comparison to the values in the vehicle-treated rats with AIA. Pioglitazone-treated animals also had a remarkable decrease in trabecular separation as compared to the vehicle-treated arthritic controls.

Effect of pioglitazone on the RANKL/OPG balance. Circulating levels of sRANKL were increased in arthritic vehicle-treated animals as compared to those in the vehicle-treated controls (mean $\pm$ SEM 53.5 $\pm$ 4.9 pg/ml versus 24.4 $\pm$ 1.4 pg/ml), whereas OPG levels were not significantly reduced (mean $\pm$ SEM 264.2 $\pm$ 34.3 pg/ml versus 287.8 $\pm$ 20.8 pg/ml) (Figure 3a). In pioglitazone-treated arthritic rats, a significant reduction in sRANKL levels (33.0 $\pm$ 3.1 pg/ml) was observed, without a significant difference in the circulating levels of OPG (247.9 $\pm$ 26.9 pg/ml). As a consequence, the mean ratio of sRANKL to OPG increased from 0.09 to 0.22 in rats with established arthritis, and was reduced to 0.15 in rats treated with pioglitazone. Immunohistochemical analysis of the ankle joint synovium confirmed a major overproduction of RANKL in vehicle-treated arthritic animals as compared to vehicle-treated controls, whereas a modest increase in the density of OPG-positive cells was also observed (Figure 3b). Sec-

tions from pioglitazone-treated arthritic animals revealed a marked decrease in the number of RANKL-positive cells in the synovium, but no major reduction of the density of OPG-positive cells as compared to the arthritic vehicle-treated animals (Figure 3b).

Effect of pioglitazone on IL-17 expression. As shown in Figure 4a, circulating levels of IL-17 were significantly increased in vehicle-treated arthritic animals as compared to vehicle-treated controls (mean $\pm$ SEM 117.2 $\pm$ 5.7 pg/ml versus 20.8 $\pm$ 7.8 pg/ml). A significant reduction in the IL-17 level (52.7 $\pm$ 11.7 pg/ml) was observed in pioglitazone-treated arthritic rats on day 21.

Immunohistochemical analysis of ankle joint sections confirmed that IL-17 was weakly expressed in the synovium of vehicle-treated controls but that 70% of the cells in the inflamed synovium of vehicle-treated arthritic animals stained positively for IL-17 (Figure 4b). HES staining of serial sections examined at high magnification revealed that IL-17–positive infiltrating cells were mainly polymorphonuclear cells (PMNs) and, to a lesser extent, lymphocytes (Figures 4c and d). Bone histologic analysis showed that all IL-17–positive cells in the bone marrow were from the granulocyte lineage and that 100% of osteoclasts stained positively for IL-17.

IL-17–positive cells were mainly located at the

periphery of the synovial tissue, along the area of bone invasion. Pioglitazone treatment decreased the percentage of IL-17-positive cells by 37% (Figures 4b and d), affecting essentially the IL-17-positive PMN population.

Contribution of ROR γ t to the inhibitory effect of pioglitazone on IL-17. To confirm the specificity of the inhibitory effect of pioglitazone, we further investigated the regulatory mechanisms of IL-17 expression in an in vitro model of T cells. After 48 hours of stimulation with PMA/ionomycin, we found that Jurkat cells transiently expressed mRNA for IL-17, which remained undetectable in the resting cells (Figure 5a). In our T cell line model, IL-17 induction by PMA/ionomycin was strictly dependent on ROR γ t binding to the IL-17 promoter, since transactivation was suppressed when we used a mutated IL-17 promoter construct in which the ROR γ t binding site had been deleted (Figure 5b). In addition, incubation of Jurkat cells with pioglitazone reduced the stimulating effect of PMA/ionomycin on ROR γ t expression by 43% (Figure 5c). Finally, in PPAR γ -overexpressing T cells, no induction of ROR γ t was noted in response to PMA/ionomycin challenge (Figure 5c).

DISCUSSION

Pioglitazone is an insulin-sensitizing thiazolidinedione, acting as a selective agonist for the PPAR γ subtype. Aside from cardiovascular safety considerations and the possible risk of bladder cancer (26), alterations in bone metabolism, such as increased skeletal fragility, have become a major question about the therapeutic use of TZDs in type 2 diabetes mellitus, since it remains to be clarified whether it is dependent on the drugs (27) rather than on the association between disease complications (28). On the one hand, PPAR γ activation can promote the diversion of pluripotent marrow progenitors from an osteoblastic to an adipocytic lineage (29). On the other hand, PPAR γ agonists may modulate osteoclastogenesis, but again, reported data have been the subject of controversy, with rosiglitazone being able to increase osteoclast numbers and bone resorption in aged animals (30) and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ being able to reduce osteoclast formation and activity in human and mouse models of osteoclastogenesis (31).

Despite the well-established antiarthritic properties of PPAR γ ligands (11), no previous study has addressed the effect of PPAR γ ligands on bone structure in chronic inflammatory conditions. The experimental model we used reproduces several pathologic

features of RA, such as chronic synovitis with secondary joint destruction and systemic osteoporosis (32). The results of the DXA analysis are consistent with our previous report of an overall bone loss in the course of AIA (13) and confirm that both the axial skeleton and the peripheral joints were involved. In arthritic animals, a thinning of the cortices and a weakening of the trabecular architecture were obvious by day 21, and bone erosions were observed mainly at the joint margins. The severe fragmentation of trabecular bone (33) was characterized by decreased trabecular number, trabecular thickness, and bone volume ratio and increased trabecular separation. These findings are indicative of increased osteoclast resorption, which is consistent with the kinetics of osteoclastogenesis reported in this model (34) and suggests decreased bone strength in arthritic animals (35). Interestingly, arthritic animals treated with pioglitazone showed improvements in all bone morphometric parameters, although with a more marked effect on trabecular indices, especially trabecular separation, rather than on bone thickness.

Thus, data from the current study suggest that pioglitazone prevented bone loss by decreasing bone resorption under inflammatory conditions, although the drug was previously shown to disrupt bone homeostasis in healthy animals when given at a similar dosage (20). Despite some variability originating from differences in both the sex of the animals studied (36) and treatment duration (20), we suggest that such discrepancies are likely attributable to the variable level of inflammation. Thus, polyarthritis is characterized by deterioration of mechanical bone properties, resulting in increased fragility (37), which can be prevented by the antiarthritic potency of TZDs, although PPAR γ activation is able to impair bone mechanical strength under basal conditions (20). In clinical situations, this proposed mechanism would make sense with regard to the increased risk of fracture reported in type 2 diabetes mellitus patients who have a low level of chronic inflammation, while suggesting that TZDs might be beneficial in the prevention of inflammation-induced bone loss in RA patients, particularly during disease flares.

Osteoclastogenesis and bone turnover are regulated mainly by the balance between RANKL/RANK and their soluble decoy receptor OPG (38). An increase in the ratio of sRANKL to OPG in the synovium was reported following an increase in the severity of joint inflammation and bone destruction in animals with collagen-induced arthritis (39). We demonstrated that PPAR γ activation lowered the ratio of circulating sRANKL to OPG (−59%) toward a normal level while

reducing the severity of the arthritis. A similar trend was observed in inflamed joint tissue, since a marked decrease in the number of cells staining positive for RANKL was observed, whereas OPG expression remained poorly affected. As OPG therapy was shown to be ineffective with regard to clinical and histopathologic measures of inflammation (40), our data support the idea that pioglitazone reduced arthritis-induced bone loss through direct modulation of osteoclastogenesis. This proposed mechanism is further substantiated by the previous demonstration that rosiglitazone, another TZD, prevented inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis and decreasing RANKL expression (41). Soluble RANKL was shown to be a reliable circulating biomarker and a mediator of local and systemic bone loss in experimental arthritis (42), highlighting the idea that the reduction in the ratio of circulating sRANKL to OPG induced by pioglitazone reflected its ability to reduce osteoclastogenesis.

However, IL-17 was recently shown to be an upstream regulatory cytokine with a major role in osteoclastic bone resorption. Indeed, IL-17 induced the production of TNF α and IL-1, up-regulated the production of RANKL, and stimulated the activity of matrix metalloproteinases and matrix catabolism (43). High levels of IL-17 were found in synovial fluid from RA patients, and the neutralization of culture supernatants from RA synovial tissue samples with an antibody against IL-17 suppressed their ability to promote osteoclast formation (44). We report here a 5.6-fold increase in serum levels of IL-17 in vehicle-treated arthritic rats, and we demonstrated that pioglitazone reduced this increase by 67%. Interestingly, the potency of pioglitazone to reduce the imbalance between sRANKL and OPG was in the same range, supporting the idea that its correcting effect was IL-17-dependent. We also demonstrated that IL-17 was highly expressed in the inflamed joint and that IL-17-positive cells consisted mainly of neutrophils, followed by lymphocytes. Our data are highly consistent with a recent report that IL-17A expression was localized to several immune cell subtypes in the inflamed synovium of RA patients (45). Infiltration of synovial tissue by neutrophils is a classic finding in inflamed joints in RA (46) and experimental arthritis (47). Pioglitazone treatment efficiently reduced the local production of IL-17, as shown by the marked decrease in cells staining positive for IL-17 in ankle joint synovium from arthritic animals.

The findings of several recent studies support the notion of a regulatory role of PPAR activation on IL-17 expression and/or Th17 activation (48). The nuclear

orphan receptor ROR γ t is a key regulator of the differentiation program of proinflammatory IL-17-positive T helper cells (49) that acts synergistically with ROR α to promote Th17 cell differentiation (50). Consistent with this is the recent report of a high-affinity synthetic ROR ligand that was shown to inhibit Th17 cell differentiation and function while reducing the severity of experimental allergic encephalopathy in mice (51). Activation of PPAR γ is another way to regulate ROR γ t expression and function. Indeed, the PPAR γ agonist pioglitazone was reported to repress the expression of ROR γ t in human and mouse T cells and to selectively suppress Th17 cell differentiation, but not Th1, Th2, or Treg cell differentiation (52). Our data are consistent with a similar ROR γ t-dependent reduction in IL-17 expression induced by pioglitazone during arthritis.

Thus, we demonstrated first that activation of the IL-17 promoter in transfected Jurkat cells required integrity of the ROR γ t binding capacity. Indeed, the deletion of the ROR γ t binding site abrogated IL-17 promoter activity under the experimental conditions used in our study, which is consistent with the ability of a novel isoform of ROR γ t lacking the hinge-encoding exons 5–8 to repress IL-17 gene transcription (53). Second, we demonstrated that ROR γ t expression was increased 3-fold in Th17 phenotype-like Jurkat cells and that this stimulatory effect was completely suppressed by lentiviral overexpression of PPAR γ while being reduced by pioglitazone treatment in wild-type transduced cells. These data support the idea that PPAR γ activation reduced arthritis severity, at least in part, by controlling IL-17 expression in a ROR γ t-dependent way. As ROR γ t activity is known to be induced by cytokines of the IL-6 family in a STAT-3-dependent manner (54), one cannot exclude the possibility that the reduction of circulating levels of IL-6 by treatment with the PPAR γ agonist (12) may have also contributed to the reduced IL-17 expression in arthritic animals. However, our *in vitro* data in a T cell model of IL-17-induced expression demonstrate the transcriptional inhibition of IL-17 by pioglitazone that could result in correction of the RANKL/OPG imbalance, leading to a reduction in bone resorption. As mentioned above, this inhibitory effect was not restricted to T cells and, therefore, to Th17 cell differentiation, but involved all IL-17-producing cells, including neutrophils.

In conclusion, this study is the first to demonstrate a protective effect of pioglitazone treatment on arthritis-induced changes of the bone microarchitecture. This effect was concomitant with a reduction of arthritis severity and bone loss in selected regions of interest

relevant for trabecular and cortical components. Based on the major suppressive effect of pioglitazone on IL-17 expression in blood and inflamed joint tissue, on local and systemic RANKL expression, and on the induced expression of IL-17 in Jurkat cells, we suggest that its bone-sparing effect during chronic arthritis is supported mainly by the modulation of IL-17/RANKL-dependent osteoclastogenesis. Even when considering the limitations of data extrapolation from animal models to clinical situations, our data support the idea that TZDs may “paradoxically” display bone-sparing properties in RA patients despite their adverse skeletal effects in diabetic patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Lydie Venteo (Labelhistologie, Reims, France) for technical assistance with the immunohistochemical analyses and François Plénat (Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) for expertise with the histologic analysis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Koufany had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Koufany, Netter, Jouzeau, Moulin.

Acquisition of data. Koufany, Chappard, Bastien, Weryha, Jouzeau, Moulin.

Analysis and interpretation of data. Koufany, Chappard, Netter, Bastien, Weryha, Jouzeau, Moulin.

REFERENCES

- Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:903–11.
- Gough AK, Lilley J, Eyre S, Holder RL, Emery P. Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:23–7.
- Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T_H-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 2008;9:641–9.
- Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2005;7:29–37.
- Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis SN. Wnt pathway and IL-17: novel regulators of joint remodeling in rheumatic diseases: looking beyond the RANK-RANKL-OPG axis. *Semin Arthritis Rheum* 2008;39:369–83.
- Nakashima T, Takayanagi H. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:166–71.
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4318–23.
- Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 2000;43:527–50.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79–82.
- Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2007;28:551–8.
- Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, et al. PPAR γ ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol* 2002;448:231–8.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Patel NS, Serrano I, Di Paola R, et al. Reduction in the evolution of murine type II collagen-induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Arthritis Rheum* 2003;48:3544–56.
- Koufany M, Moulin D, Bianchi A, Muresan M, Sebillaud S, Netter P, et al. Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R6.
- Shahin D, Toraby EE, Abdel-Malek H, Boshra V, Elsamanoudy AZ, Shaheen D. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist (pioglitazone) and methotrexate on disease activity in rheumatoid arthritis (experimental and clinical study). *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 2011;4:1–10.
- Giaginis C, Giagini A, Theocharis S. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis. *Pharmacol Res* 2009;60:160–9.
- Rizzo G, Fiorucci S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:421–7.
- Okamoto H, Iwamoto T, Kotake S, Momohara S, Yamanaka H, Kamatani N. Inhibition of NF- κ B signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:323–30.
- Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, Palermo L, Lecka-Czernik B, Feingold KR, et al. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3349–54.
- Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, Montague DC, Lecka-Czernik B. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology* 2004;145:401–6.
- Syversen U, Stunes AK, Gustafsson BI, Obrant KJ, Nordsletten L, Berge R, et al. Different skeletal effects of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α agonist fenofibrate and the PPAR γ agonist pioglitazone. *BMC Endocr Disord* 2009;9:10.
- Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, et al. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 2004;113:846–55.
- Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR- γ regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med* 2007;13:1496–503.
- Tomita T, Kakiuchi Y, Tsao PS. THR921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R7.
- Denninger K, Rasmussen S, Larsen JM, Orskov C, Seier Poulsen S, Sorensen P, et al. JNK1, but not JNK2, is required in two mechanistically distinct models of inflammatory arthritis. *Am J Pathol* 2011;179:1884–93.
- Libouban H, Blouin S, Moreau MF, Basle MF, Audran M, Chappard D. Effects of risedronate in a rat model of osteopenia due to orchidectomy and disuse: densitometric, histomorphometric and microtomographic studies. *Micron* 2008;39:998–1007.
- Abbas A, Blandon J, Rude J, Elfart A, Mukherjee D. PPAR- γ agonist in treatment of diabetes: cardiovascular safety considerations. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2012;10:124–34.

27. Grey A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int* 2008;19:129–37.
28. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18:427–44.
29. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliewer SA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol* 1996;50:1087–94.
30. Lazarenko OP, Rzonca SO, Hogue WR, Swain FL, Suva LJ, Lecka-Czernik B. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. *Endocrinology* 2007;148:2669–80.
31. Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, Jaiswal R, Beck S, Pittenger MF, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2000;275:14388–93.
32. Aota S, Nakamura T, Suzuki K, Tanaka Y, Okazaki Y, Segawa Y, et al. Effects of indomethacin administration on bone turnover and bone mass in adjuvant-induced arthritis in rats. *Calcif Tissue Int* 1996;59:385–91.
33. Jee WS, Li XJ, Ke HZ, Li M, Smith RJ, Dunn CJ. Application of computer-based histomorphometry to the quantitative analysis of methylprednisolone-treated adjuvant arthritis in rats. *Bone Miner* 1993;22:221–47.
34. Schett G, Stolina M, Bolon B, Middleton S, Adlam M, Brown H, et al. Analysis of the kinetics of osteoclastogenesis in arthritic rats. *Arthritis Rheum* 2005;52:3192–201.
35. Noguchi M, Kimoto A, Sasamata M, Miyata K. Micro-CT imaging analysis for the effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, on inflammatory bone destruction in adjuvant arthritis rats. *J Bone Miner Metab* 2008;26:461–8.
36. Fujita Y, Yamada Y, Kusama M, Yamauchi T, Kamon J, Kadowaki T, et al. Sex differences in the pharmacokinetics of pioglitazone in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003;136:85–94.
37. Caetano-Lopes J, Nery AM, Canhao H, Duarte J, Cascao R, Rodrigues A, et al. Chronic arthritis leads to disturbances in the bone collagen network. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R9.
38. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139–46.
39. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF- κ B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003;170:2655–62.
40. Campagnuolo G, Bolon B, Feige U. Kinetics of bone protection by recombinant osteoprotegerin therapy in Lewis rats with adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1926–36.
41. Hassumi MY, Silva-Filho VJ, Campos-Junior JC, Vieira SM, Cunha FQ, Alves PM, et al. PPAR- γ agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1150–8.
42. Stolina M, Adamu S, Ominsky M, Dwyer D, Asuncion F, Geng Z, et al. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2005;20:1756–65.
43. Koenders MI, Joosten LA, van den Berg WB. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65 Suppl 3:iii29–33.
44. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103:1345–52.
45. Moran EM, Heydrich R, Ng CT, Saber TP, McCormick J, Sieper J, et al. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One* 2011;6:e24048.
46. Pillinger MH, Abramson SB. The neutrophil in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995;21:691–714.
47. Eyles JL, Hickey MJ, Norman MU, Croker BA, Roberts AW, Drake SF, et al. A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood* 2008;112:5193–201.
48. Lytle C, Tod TJ, Vo KT, Lee JW, Atkinson RD, Straus DS. The peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand rosiglitazone delays the onset of inflammatory bowel disease in mice with interleukin 10 deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:231–43.
49. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121–33.
50. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 2008;28:29–39.
51. Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, et al. Suppression of T_H17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 2011;472:491–4.
52. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Huckle S, et al. The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med* 2009;206:2079–89.
53. Rauen T, Juang YT, Hedrich CM, Kis-Toth K, Tsokos GC. A novel isoform of the orphan receptor ROR γ t suppresses IL-17 production in human T cells. *Genes Immun* 2012;13:346–50.
54. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007;19:400–8.

3. Etude des conséquences de la délétion totale in vivo de PPAR γ sur le développement de l'arthrite

3.1 Objectif du travail

Dans les chapitres précédents ont été présentés nos résultats relatifs aux propriétés anti-arthritiques et ant-resorptives d'un agoniste de haute affinité pour PPAR γ , la pioglitazone, ainsi que les mécanismes moléculaires qui participent à la régulation de ces phénomènes. L'objectif des travaux décrits ci-dessous était d'étudier les conséquences de la délétion totale de PPAR γ *in vivo* chez la souris, notamment sur le phénotype articulaire.

3.2 Résultats marquants

Les souris déficientes pour PPAR γ développent une arthrite spontanée

L'analyse histologique des articulations a montrée que l'invalidation de PPAR γ chez la souris avait pour conséquence le développement d'une polyarthrite sévère (cheville, genoux) avec une incidence de 100%. Nous avons également démontré que la synovite apparaissait dès l'âge de 3 semaines et que les articulations synoviales partageaient de nombreuses caractéristiques avec la PR, telles que l'hyperplasie de la membrane synoviale, une vascularisation très abondante, une infiltration de cellules immunitaires, une érosion cartilagineuse et un remodelage osseux importants. Nous avons également observé des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-17 et TNF α), de chimiokines (KC) et des taux réduits de cytokines anti-inflammatoires/immunomodulatrices (IL-10).

Les mastocytes sont abondants chez les souris PPAR γ déficientes

Nous avons mis en évidence une accumulation importante de mastocytes dans le tissu synovial des souris déficientes par comparaison aux souris sauvages. Ces mastocytes expriment l'IL-17 et leur facteur de différenciation, le SCF. Des résultats préliminaires nous ont permis de déterminer que la présence d'un grand nombre de mastocytes semble liée à l'environnement dépourvu de tissu adipeux.

3.3 Article 4 : « PPAR gamma deficient mice develop spontaneous arthritis associated to synovial mastocytosis ».

Article en préparation

PPAR GAMMA DEFICIENT MICE DEVELOP SPONTANEOUS ARTHRITIS ASSOCIATED TO SYNOVIAL MASTOCYTOSIS

Meriem KOUFANY¹, Federica GILARDI², Mariano SCHIFFRIN², Carine WINKLER², Arnaud BIANCHI¹, Jean-Yves JOUZEAU¹, Béatrice DESVERGNE², David MOULIN¹

¹IMoPA, UMR7365 CNRS-Université de Lorraine, Vandoeuvre les Nancy, France, ²Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, LAUSANNE, Switzerland.

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors. PPAR γ is involved in the regulation of adipocyte differentiation, glucose homeostasis and inflammation. Others and ourselves have previously demonstrated that PPAR γ agonists could be successfully used in the treatment of experimental arthritis, representing an attractive potential approach for rheumatoid arthritis (RA) therapy. In the light of the major role of PPARgamma in chronic inflammation, we studied the consequences of its total deletion on the development of arthritic process. **Objectives:** The aim of this study was first to characterize the articular phenotype of PPAR γ deficient mice, then characterize Th1/Th17/Treg population and study IL-17-producing cells. **Methods:** Fully viable PPAR γ -null mice were generated through specific and total epiblastic gene deletion using Sox2Cre/PPAR γ L2/L2 mice. Histologic examination of ankle and knee joints after specific staining of cartilage and synovium tissues was performed. Synovial mast cells were specifically stained with toluidine blue. Serum levels of the pro-inflammatory cytokines IL-17 and TNF α , the anti-inflammatory/immunomodulatory cytokine IL-10 and the chemokine KC were determined using multiplex cytokine ELISA. **Results:** We have observed that adult PPAR γ -/- mice show evidence of arthritis in the ankle and knee with

100% incidence. We found elevated levels of the pro-inflammatory cytokines IL-17 and TNF α , the chemokine KC and reduced levels of IL-10. Of major interest, we observed an increased number of mast cells expressing IL-17 and stem cell factor in the synovium of PPAR γ ^{-/-} mice, as compared to wild type littermates. **Conclusion** : PPAR γ deficient mice develop spontaneous arthritis associated with increased number of IL-17-producing mast cells.

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors. PPAR γ is involved in the regulation of adipocyte differentiation, glucose homeostasis and inflammation. We and others have previously demonstrated that PPAR γ agonists could be successfully used in the treatment of experimental arthritis (1) representing an attractive potential approach for rheumatoid arthritis (RA) therapy. Indeed, we recently demonstrated that treatment of experimental arthritis with synthetic agonist of PPAR γ isotype (pioglitazone) in addition to decreasing arthritis severity, specifically reduced inflammatory-bone destruction and protected bone micro-architecture by controlling circulating and local expression of Interleukin-(IL-)17 with a subsequent decrease of the RANKL/OPG ratio (2). These results, along with inhibition of RAR-Related Orphan Receptor ROR γ t expression after PPAR γ over-expression, support a major contribution of reduced IL-17-RANKL-dependent osteoclastogenesis in pioglitazone's effect. *In vitro*, activation of PPAR γ by specific ligands negatively regulates the expression of proinflammatory cytokine genes, adhesion molecules and chemokines (3) by transrepression mechanisms of transcription factors such as NF- κ B (4), AP-1, STAT and NF-AT (5). The differentiation of naive T cells into Th 17 or T regulatory effector cells is orchestrated by PPAR γ . Therefore, deletion of PPAR γ in T cells results in an increase in the differentiation of Th17 cells and aggravation of experimental autoimmune pathologies mediated by Th17 cells, while PPAR γ agonists inhibit Th17 differentiation (6).

Setoguchi et al. (7) developed a PPAR γ heterozygote knockout mice that exhibit resistance to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. Haploinsufficiency of PPAR γ enhanced B cell proliferative response without affecting T cells indicating that

PPAR γ plays a critical role in regulating homeostasis of B cell function. Therefore, the antigen-specific immune response was enhanced in PPAR γ +/- mice, leading to an exacerbated antigen-induced arthritis compared to wild-type mice. Furthermore, recent genetic studies have demonstrated an association between a SNP in the PPARG gene and psoriatic arthritis (8). In recent clinical studies, a PPAR γ agonist, used alone or in combination with NSAIDs or methotrexate appears to represent a promising therapeutic strategy for rheumatoid or psoriatic arthritis patients.

Given the key role of PPAR γ in chronic inflammation, using PPAR γ deficient mice is an interesting tool to further investigate its function in articular physiopathology. We therefore investigated the consequences of its total deletion *in vivo* on the development of arthritic process. We postulated initially that these mice might develop spontaneous arthritis following deregulation of Th17 differentiation and IL-17 production. In the present work, we characterized articular phenotype of full PPAR γ -/- mice, Th1/Th17/Treg population and identified cell population responsible for IL-17 production.

Material & Methods

Animals

Animals were housed in solid-bottomed plastic cages, with access to tap water and standard pelleted rodent chow (Scientific Animal Food and Engineering) ad libitum. Room temperature was set at 23°C, and animals were subjected to a 12-hour cycle of light/dark. All experiments were performed in accordance with national animal care guidelines and were preapproved by the local ethics committee. Blood sampling was performed on animals under general anesthesia with the volatile anesthetic isoflurane (AErrane; Baxter France).

Mouse models

Generation of the PPAR γ ^{-/-} mice has been described in Nadra et al (9). Sox2Cre and PPAR γ floxed mice were a generous gift from Prof B Desvergne. Because Sox2Cre transgene expression in the ovocyte leads to transgene-independent recombination, all matings were organized so that the Sox2Cre transgene was inherited from the male. Construction of the PPAR γ floxed allele (PPAR γ L2) and the PPAR γ -null allele resulted from Cre recombination (PPAR γ L-) as described. Genotyping was realized by PCR amplification using the following primers: AGGTGTAGAGAAGGCACTTAGC and CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG, which amplified a product of 450 bp derived from the Sox2Cre transgene; GACCCAGCTCTACAACAGGC (F1) and GGGACAGACCTCACTAACCCGTAAGT (R1), which amplified a product of 700 bp derived from the PPAR γ wild-type allele and a product of 500 bp derived from the PPAR γ L2 allele, respectively; and CCACGTCTGTTAGAATAGCTAGTCCA (F2) and R1, which amplified a product of 400 bp derived from the PPAR γ L- allele.

Histological analysis of knee and ankle joints of PPAR γ -/- and littermates Knee and Ankle joints were processed as described elsewhere (10) and stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) or Safranin O–Fast green. Bone erosion and synovium inflammation were graded as previously described (10). Mast cells were revealed by metachromatic staining of their granules following toluidine blue staining.

Immunohistochemical analysis

Knee and ankle sections were rehydrated in a graded ethanol series. Sections were washed three times in distilled water and incubated overnight at 70°C in citrate buffer pH6 (Zytomed System, FRANCE). After washing in distilled water, slides were incubated for 10 minutes in hydrogen peroxide 3%, washed in Tris buffer and incubated for one hour with mouse Ig blocking reagent to saturate endogenous immunoglobulin. After washing in Tris buffer, nonspecific binding sites were blocked in normal goat serum (Vector laboratories, United Kingdom) for one hour, then slides were incubated 2 hours with anti-IL-17 (Abbiotec, USA) rabbit polyclonal primary antibody. After washing in Tris buffer, slides were covered with secondary antibody attached to a micropolymer containing horseradish peroxidase (ImmPRESS™ kit, Vector Laboratories, United Kingdom) for 30 minutes, then washed in Tris buffer. Staining was developed with 3,3'-diaminobenzidine (0.05% in hydrogen peroxide) (AEC permanent kit, Zytomed, France). All slides were counterstained for 10 seconds with Harris hematoxylin (Reactif RAL, France). Identification of IL-17 positive cells was performed by two pathologists blinded to the treatment on TB stained serial sections.

Detection of SCF was performed using anti-SCF polyclonal primary antibody (Santa Cruz biotechnology, France) as previously described (2).

FACS analysis of splenic and lymph node T effectors and regulators population

Splenocytes cells were depleted of erythrocytes using the mouse erythrocyte lysing kit (eBioscience, France). Splenocytes and lymph node were mashed through a 100-µm filter then incubated with FcR Block (BD Biosciences, 553142) to prevent nonspecific antibody

binding before staining with appropriate surface antibodies for 30 min at 4°C, and used for FACS analysis. For intracellular cytokine staining, cells were stimulated with 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma), 500 ng ionomycin (Sigma) and GolgiPlug (BD Biosciences) for 5h. After 4 hours of fixation, cells were permeabilized with the fixation/permeabilization kit (ebioscience kit, France) before staining with specific cell surface or intracellular marker antibodies. Data acquisition was performed on a GALLIOS cell analyzer (Becton Dickinson). Data analysis was conducted using the Flowjo software (Tree Star Inc).

Sandwich bead immunoassay for circulating cytokines levels

Serum levels of IL-17, TNF α , KC and IL-10 were determined in sera at day 21 with Milliplex kit (Millipore, France). Assays were run in triplicate according to the manufacturer's protocol. Data were analysed using Bioplex system (Bio-Rad, CA). A five-parameter regression formula was used to calculate the sample concentrations from the standard curves (from 5 to 20.000pg/ml).

Cell culture

Bone marrow-derived mast cells (BMMC) were generated from bone marrow of wild-type or deficient mice as previously described (11). Sterile endotoxin-free RPMI-1640 medium was repeatedly flushed through the bone shaft of intact femurs and tibias using a syringe with a 25-G needle. The suspension of bone marrow cells was centrifuged at 250g for 5 min. Red blood cells were lysed on ice by incubation in Tris 20 mM/NH₄Cl 150 mM during 5 min. Cells were washed and cultured at a concentration of $0.5-1 \times 10^6$ cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate at 37 °C in a

humidified atmosphere with 5% CO₂. A combination of SCF (50 ng/ml, Peprotech, France) and IL-3 (5 ng/ml, Peprotech, France) was added weekly to the culture medium for two weeks, and IL-3 (5 ng/ml) alone was added weekly during the following weeks. Nonadherent cells were transferred to fresh medium at least once a week. Cells were used after 5–7 weeks of culture, when a mast cell purity of >95% was achieved as assessed by toluidine blue.

Peritoneal cell-derived cultured mast cells (PCMC) were obtained from wild type or PPAR γ deficient mice after i.p. injection of 10 ml sterile PBS and then cultured (0.5 10^6 cells per ml) in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 5 ng/ml recombinant mouse IL-3 (Peprotech, France) and 50 ng/ml recombinant mouse SCF (Peprotech, France) at 37°C. 3 days later, non-adherent cells were removed and replaced by fresh culture medium to achieve expansion and purification of residual PCMCs. After 10 days of culture, purity of PCMCs were measured by FACS analysis of cell surface expression of Kit and Fc ϵ RI.

PCMC stimulation and measurement of IL-17 secretion

Peritoneal cell-derived cultured mast cells were stimulated with LTA (Lipoteichoic acid at 25 μ g/ml ; Sigma, France) or IL-33 (10 ng/ml; Peprotech, France) for 24h at 37°C. Supernatants were assessed for IL-17 levels using commercial ELISA (R&D System, France).

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Histological grading were analysed with the Kruskal-Wallis test, using StatView™ version 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC,

USA). All other data were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Analyses of PPAR γ knockout animals have been so far preempted by the early embryonic death of PPAR γ ^{-/-} embryos as a consequence of the severe alteration of their placental vasculature. Using Sox2Cre/PPAR γ L2/L2 mice, group of Béatrice Desvergne obtained, for the first time, fully viable PPAR γ -null mice through specific and total epiblastic gene deletion, thereby demonstrating that the placental defect in vasculature was the unique cause of PPAR γ ^{-/-} embryonic lethality (9). Interestingly, we have observed that adult PPAR γ ^{-/-} mice bred either in Prof. Desvergne's laboratory or in our animal facility show evidence of arthritis in the ankle and knee with 100% incidence. We have determined the onset of the disease between 3 to 7 weeks of age. Joints share many histological features with Rheumatoid Arthritis (RA), such as synovial lining hyperplasia, blood vessel proliferation and infiltration by immune cells in the synovium, cartilage erosion and bone remodeling (Figure 1). Heterozygous PPAR γ ^{+/-} littermates, displayed an intermediate phenotype. These histological findings were confirmed by cytokines levels measurement in serum of these mice. IL-17 and to a lesser extent TNF α levels were increased in the serum (figure 2) of these mice, as observed in patient suffering from active arthritis (RA, Spondylo-arthritis (12, 13)). KC, the murine homolog of GRO α /CXCL1 is also elevated in serum from PPAR γ ^{-/-} mice. This potent neutrophil chemotactic factor, along with other chemokines (IL-8, MCP1, MIP data not shown), that are also found elevated in PPAR γ ^{-/-} mice, are known to be involved in arthritis pathogenesis both in human (14) and mice. The anti-inflammatory cytokine IL-10 was also found decreased in serum, has been shown to regulate endogenous proinflammatory cytokine production in RA synovial tissue (15).

Arthritis is not associated with enhanced Th17 population in target tissues

Rheumatoid arthritis is known to be an autoimmune disease highly linked to the imbalance between T effectors and T regulators cells. The high amount of IL-17 and other pro-inflammatory cytokines led us to investigate the representation of Tcell subpopulation in these mice. We focused firstly on the balance between Th17/Treg. Th17 lymphocytes constitutes a subset of CD4⁺ T helper lymphocytes producing pro-inflammatory cytokines such as IL-17, IL-21 and IL-22 contributing to deleterious effects observed in autoimmune diseases like RA (16, 17). In physiological conditions, Th17 cells are involved in extracellular pathogens defence and act more specifically in the mucosal firewall (18). Indeed, in basal conditions most Th17 are found in the GI tract (*lamina propria*) and develop from signals that are derived from the microbiota (19, 20). Patients with RA have defective circulating Treg cell function and increased abundance of Th17 cells (and their signature cytokine, IL-17) in both plasma and synovium that are highly correlated to disease activity. Indeed, High numbers of Th17 cells are found in the synovium of patients suffering from active RA whereas in efficiently-treated patients (DMARDS or biotherapy) these cells are considerably reduced (21). Of interest, active RA joint-isolated Th17 cells are strongly CCR4 and CCR6 positive, indicating specific chemotaxis through the joint. Here we failed to demonstrate Th17 overabundance in PPAR γ ^{-/-} mice or Teff/Treg altered ratio (Figure 3A). Furthermore, lymphocytes from spleen or lymph nodes of PPAR γ ^{-/-} mice produced less IL-17 than wild type littermates (Figure 3B). This is unexpected since PPAR γ has been demonstrated to be a key regulator of Th17, interfering with ROR γ t transcription (6, 22). Since PPAR γ activation has been shown to repress Th17 differentiation in EAE (6), Th17 subpopulation in PPAR γ ^{-/-} mice would have been largely increased.

We cannot exclude the possibility that a Th17 overabundant subpopulation could contribute earlier to the disease and we are currently investigating this hypothesis in younger animals before arthritis onset. Nonetheless, the IL-17 overproduction observed in adult mice cannot be assigned to these cells.

IL-17 overproduction is supported by mast cells in joint tissues

We demonstrated that IL-17 was highly overproduced in synovium from PPAR γ ^{-/-} mice (Figure 4A). This finding is in accordance with the important bone remodelling observed in these arthritic mice which could be supported by the loss of regulation of the IL-17-RANKL osteoclastogenesis by PPAR γ , as we inversely demonstrated with PPAR γ agonists (2). We observed that cells of archetypal morphological aspects, identified as mast cells by pathologists, were overabundant in these mice. The identification was further confirmed by the presence of metachromatic granules after toluidine blue staining (Figure 4B). Colocalization experiments allowed us to confirm that mast cells were the main producers of IL-17 in synovium from PPAR γ ^{-/-} mice (Figure 4C). The observation of mast cells as producers of IL-17 confirms previous work (23) showing that the majority of IL-17A expression colocalized within mast cells in RA synovium. Furthermore these authors demonstrated *in vitro* that mast cells produced IL-17A in a RORc-dependent manner upon stimulation. Here, we further demonstrated that peritoneal-cultured mast cells, characterized as double positive for c-kit and Fc ϵ RI (Figure 4D), produce large amount of IL-17A when compared to wild-type littermate controls after TLR2 activation (Figure 4E). We next investigated if PPAR γ deficiency was intrinsically involved in mast cells differentiation/proliferation. We first observed that mast cells found in PPAR γ ^{-/-} synovium produced high quantity of SCF (Stem Cell factor, c-Kit ligand) (Figure 5A).

Beyond its ability to stimulate the differentiation of Mast Cell progenitors in mature mast cells, SCF is supposed to play a role in mast cells recruitment as demonstrated when overexpressed in keratinocyte (24, 25). Using bone marrow-derived mast cells (BMMCs), we demonstrated that mast cells progenitors are more numerous in PPAR γ ^{-/-} bone marrow than heterozygous or wild-type mice (Figure 5B). This was confirmed by the altered population of LSK (lineage⁻, Sca1⁺, CD117⁺) and LK (lineage⁻, sca⁻, CD117⁺) in these mice showing relative increase in granulocyte/monocyte progenitor (GMPs) and a decrease in megakaryocyte/erythrocyte progenitors (MEPs) (B Desvergne, personal communication). BMMC from wild-type mice displayed more granularity and were more mature than BMMC from PPAR^{-/-} (59% c-kit-Fc ϵ RI double positive vs 30% of total population) (Figure 5C). Taken together, these results suggest that PPAR γ is a crucial regulator of mast cells proliferation/differentiation lineage. Unfortunately, BMMCs are not able to produce IL-17 *in vitro* and cannot therefore be considered as a good paradigm to study IL-17/ mast cells pathway (26).

Lack of adipose tissue is critical for mast cell differentiation

One of the major metabolic functions of PPAR γ is the control of adipogenesis (27). Consequently, PPAR γ ^{-/-} mice are devoid of adipocytes. Synovial joints are lacking any fat pad tissues as demonstrated by histological sections (Figure 1 and 4). To investigate the role of the absence of fat in mast cells presence in mice, we studied the phenotype of another lipodystrophic mice A-ZIP/F1 mice. A-ZIP/F1 transgenic mice, first described by Moitra et al. (28), contain approximately 16 transgene copies expressing A-ZIP/F protein under the control of the adipocyte-specific promoter aP2 (Fabp4). AZIP/F is a dominant-negative protein that inhibits the DNA binding of both C/EBP and AP-1. A-ZIP/F-1 mice have no white adipose tissue and dramatically reduced amounts of brown adipose tissue,

which is inactive. As expected, the synovium from these mice is devoid of fat pad, but of great interest, contains a lot of mast cells (Figure 6).

These results suggested that synovial microenvironment might also contribute to the homing of mast cells. Lack of adipose tissue in PPAR γ ^{-/-} mice seems to favour mast cells proliferation/migration as the same phenotype is observed in AZIP/F1 mice (where PPAR γ remained expressed). We therefore proposed that absence of fat could contribute, with PPAR γ intrinsic role, to the exaggerated recruitment/proliferation or differentiation of mast cells observed in these mice.

To conclude, PPAR γ ^{-/-} mice develop spontaneous arthritis associated with increased number of IL-17-producing mast cells in synovium. Studying PPAR γ deficient mice provides new insights into the role of PPAR γ in arthritic process and in the possible link between mast cells, PPAR γ and arthritis.

Figure legends

Figure 1: Histological examination of knee joint sections of 42 weeks-old wild type and PPAR γ ^{-/-} littermates showing evidence of severe arthritis in PPAR γ deficient mice: cartilage (black arrow) and bone erosion (red arrow) (A, representative histological sections stained with Safanin O-Fast Green), synovial lining hyperplasia (yellow arrow), blood vessel proliferation (blue arrow), infiltrating immune cells (green arrow) (B, representative histological sections stained with Hematoxylin-Eosin) and C) Cartilage, bone and synovial histological scoring of PPAR γ ^{-/-}, heterozygous and wild type littermates (n $\geq$ 5). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p < 0.05 versus WT.

Figure 2: “Arthritic like” serum cytokine profile in PPAR γ null mice (KO), heterozygote (HET) and wild type littermates (WT). (n=8). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * : p < 0.05 versus WT.

Figure 3: Lymphocyte T effectors/T regulators population and IL-17 production in PPAR γ deficient mice. A) FACS analysis of splenic and lymph node T effectors and T regulators cells. B) IL-17 production from PMA and ionomycin 24h-stimulated lymphocytes measured by ELISA. (n=3, representative of two independent experiments). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p < 0.05 versus WT.

Figure 4: Mast cells produce IL-17 in PPAR γ deficient mice. A) IL-17 overproduction in synovium from PPAR γ ^{-/-} mice compared to wild type littermates control. B) Overabundance of mast cells stained with toluidine blue in synovium from PPAR γ ^{-/-} mice compared to wild type littermates control. C) Synovial mast cells from PPAR γ ^{-/-} mice produce IL-17 as

demonstrated by co-localization of mast cells with metachromatic granules stained by toluidine blue and immunohistochemistry against IL-17. D) FACS analysis of c-kit and FcεRI double positive peritoneal-cultured mast cells from PPAR γ ^{-/-} mice and WT. E) IL-17 production from LTA 24h-stimulated PCMC measured by ELISA (n=3). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * : p < 0.05 versus WT.

Figure 5: Mast cells differentiation. A) Mast cells from PPAR γ ^{-/-} mice produced large amount of SCF. B) BM from PPAR γ ^{-/-} mice contains more mast cells progenitors compared to wild type littermates; BMMC (Bone Marrow Mast Cells).

Figure 6: Mast cells in A-ZIP/F-1 mice. A-ZIP/F-1 mice are devoid of fat pad adipose tissue and contain an increased number of mast cells compare to WT littermates.

Figure 1

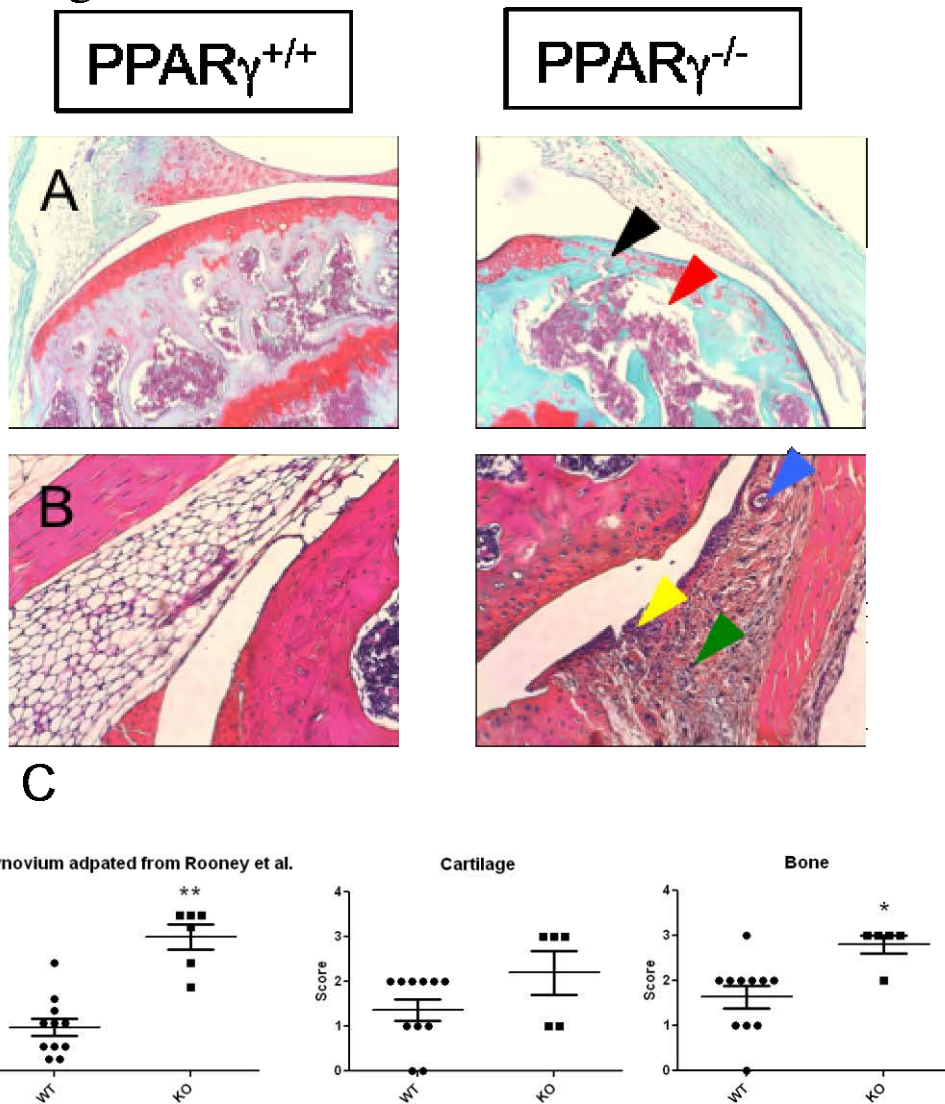


Figure 2

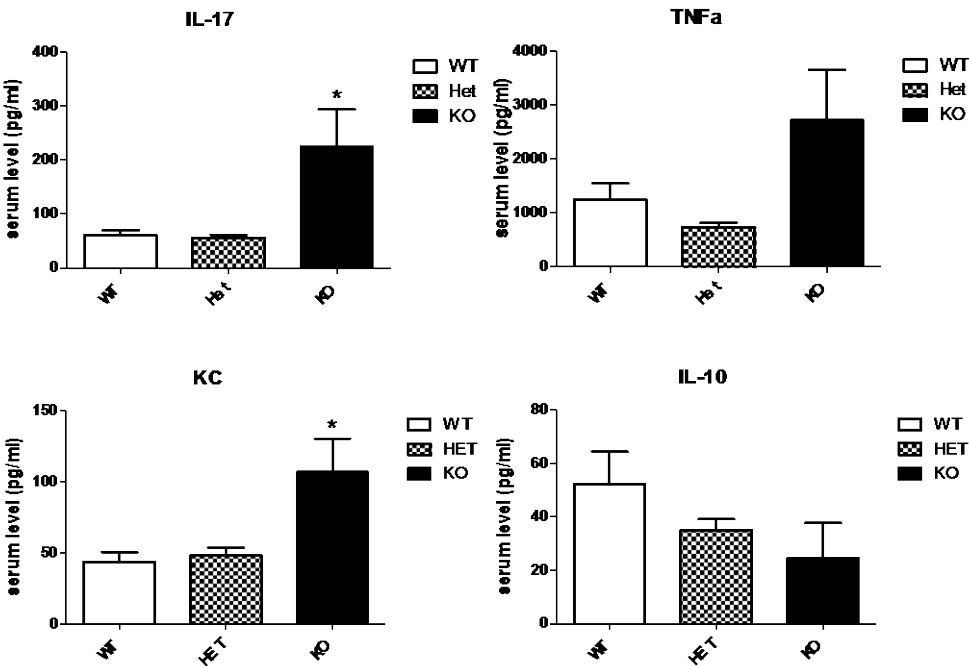


Figure 3

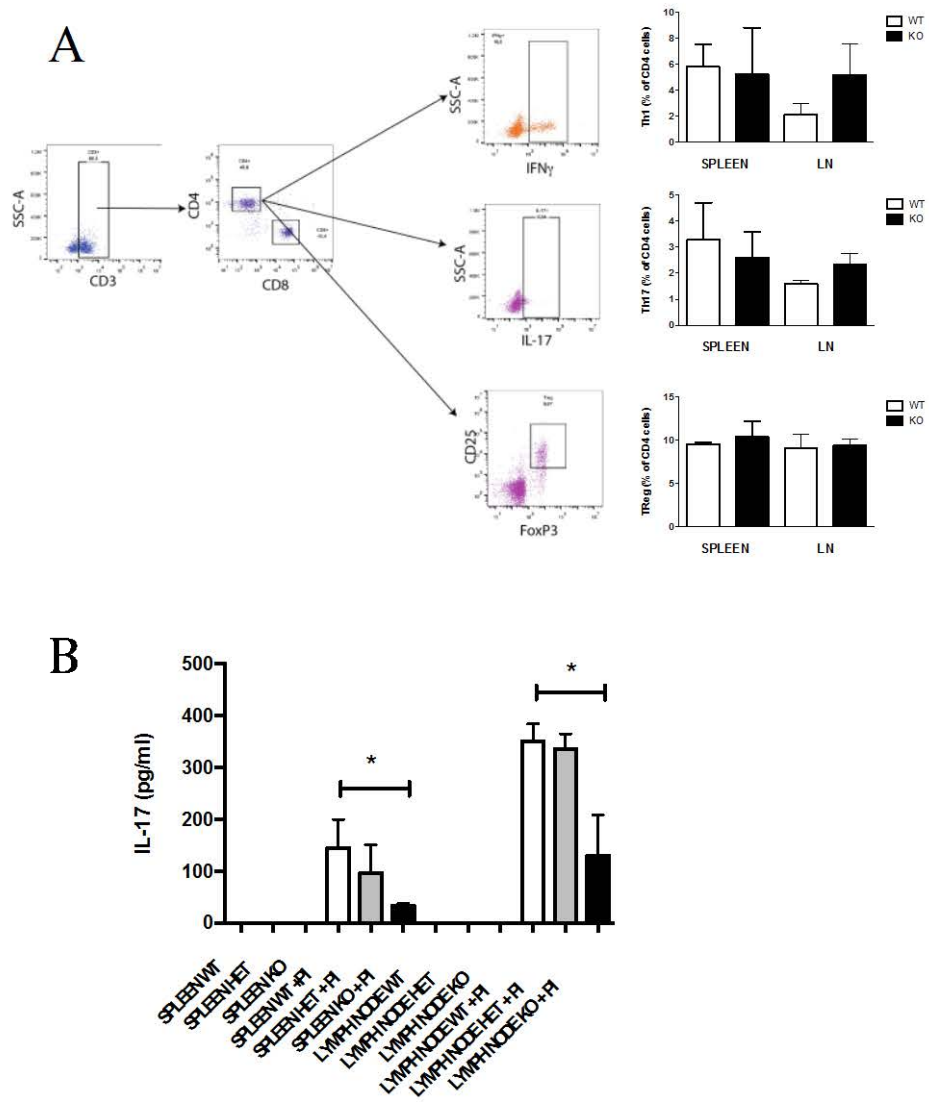


Figure 4

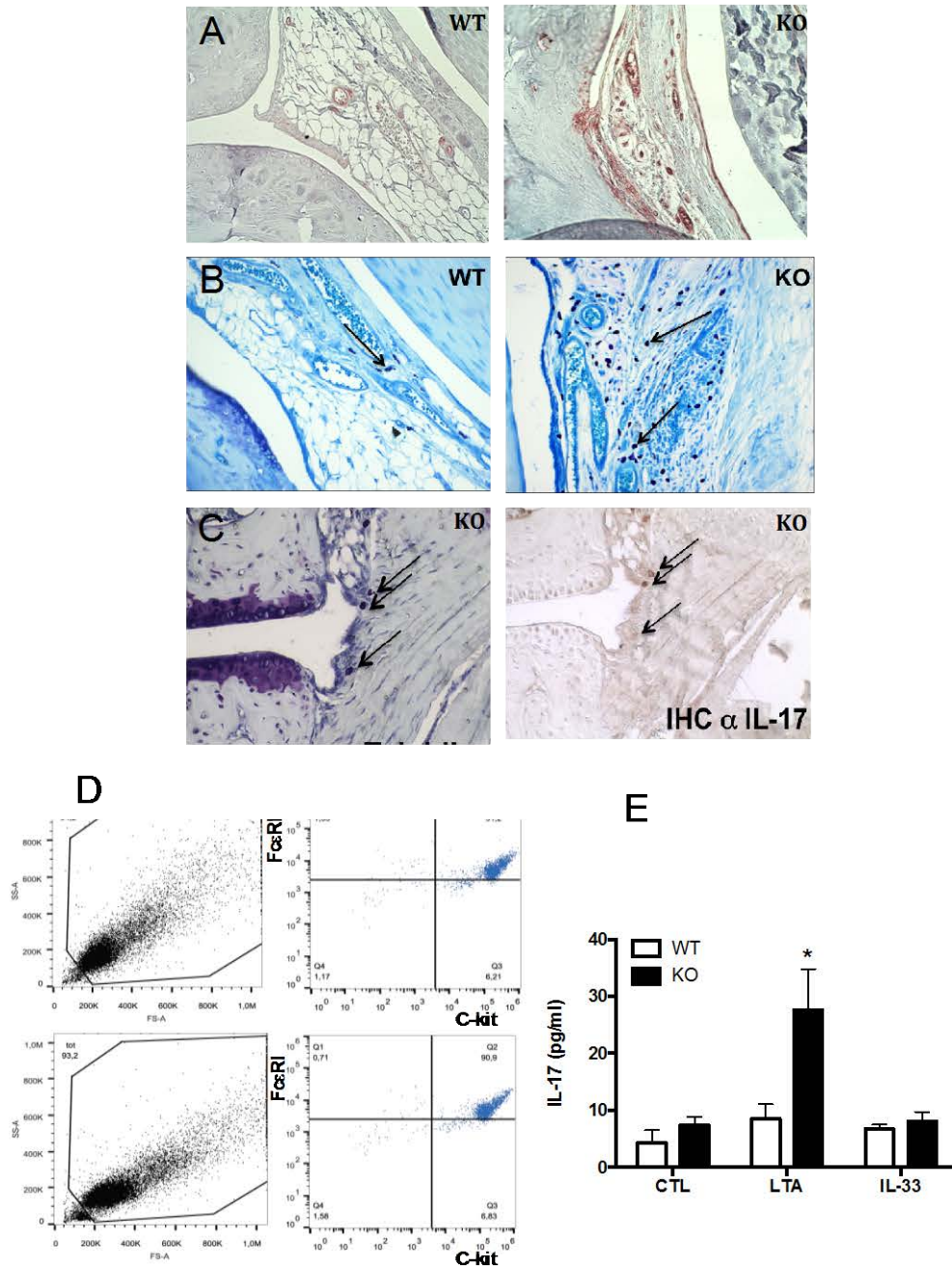
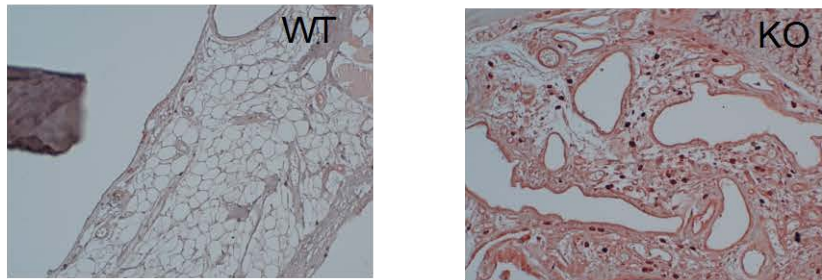
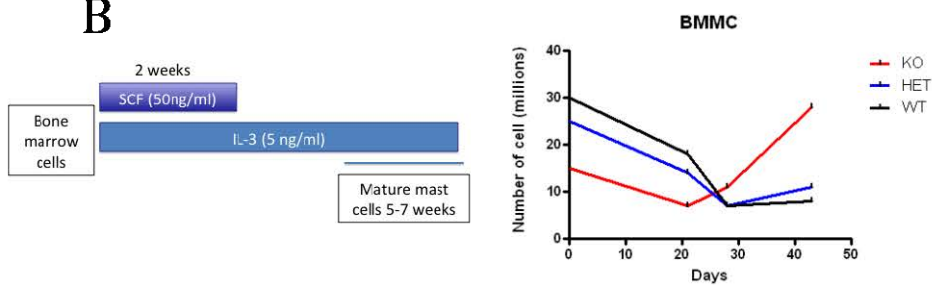


Figure 5

A



B



C

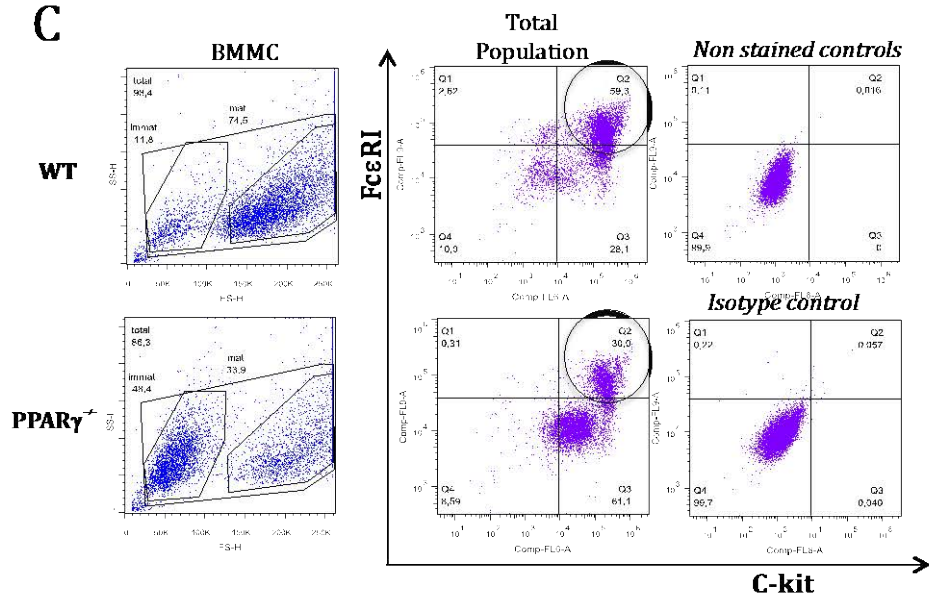
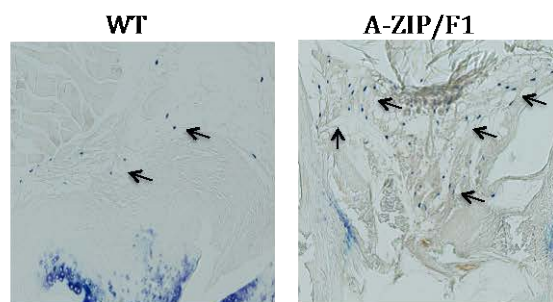


Figure 6



References

1. Tomita T, Kakiuchi Y, Tsao PS (2006) THR0921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 8(1):R7.
2. Koufany M, et al. (2013) The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist Pioglitazone Preserves Bone Microarchitecture in Experimental Arthritis by Reducing the Interleukin-17-Dependent Osteoclastogenic Pathway. *Arthritis Rheum* 65(12):3084–3095.
3. Abdelrahman M, Sivarajah A, Thiernemann C (2005) Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res* 65(4):772–781.
4. Consoli A, Devangelio E (2005) Thiazolidinediones and inflammation. *Lupus* 14(9):794–797.
5. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391(6662):79–82.
6. Klotz L, et al. (2009) The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *Journal of experimental Medicine* 206(10):2079–2089.
7. Setoguchi K, et al. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest* 108(11):1667–1675.
8. Butt C, Gladman D, Rahman P (2006) PPAR-gamma gene polymorphisms and psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 33(8):1631–1633.
9. Nadra K, et al. (2010) PPARgamma in placental angiogenesis. *Endocrinology* 151(10):4969–4981.
10. Koufany M, et al. (2008) Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res Ther* 10(1):R6.
11. Moulin D, et al. (2007) Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 40(3):216–225.
12. Wendling D, Cedoz J-P, Racadot E, Dumoulin G (2007) Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 74(3):304–305.
13. Cernea N (2012) The Cellular Source of IL-17A in the Pathogenesis of Inflammatory Joint Diseases. 1–5.

14. Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch AE (2010) Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2:153–167.
15. Mitchell A, et al. (2008) LILRA5 is expressed by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis, selectively induces pro-inflammatory cytokines and IL-10 and is regulated by TNF-alpha, IL-10 and IFN-gamma. *Eur J Immunol* 38(12):3459–3473.
16. Pöllinger B, et al. (2011) Th17 cells, not IL-17+ $\gamma\delta$ T cells, drive arthritic bone destruction in mice and humans. *J Immunol* 186(4):2602–2612.
17. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27(1):485–517.
18. Belkaid Y, Hand TW (2014) Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 157(1):121–141.
19. Ivanov II, et al. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139(3):485–498.
20. Atarashi K, Tanoue T, Honda K (2010) Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. *Vaccine* 28(50):8036–8038.
21. Leipe J, et al. (2010) Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 62(10):2876–2885.
22. Berger H, et al. (2013) SOCS3 transactivation by PPAR γ prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer Res* 73(12):3578–3590.
23. Hueber AJ, et al. (2010) Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 184(7):3336–3340.
24. Kunisada T, et al. (1998) Murine cutaneous mastocytosis and epidermal melanocytosis induced by keratinocyte expression of transgenic stem cell factor. *J Exp Med* 187(10):1565–1573.
25. Huang B, et al. (2008) SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood* 112(4):1269–1279.
26. Ikeda K, et al. (2003) Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 101(9):3594–3596.
27. Rosen ED, et al. (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4(4):611–617.
28. Moitra J, et al. (1998) Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 12(20):3168–3181.

Chapitre 3

Discussion générale et perspectives

Même si les PPARs ont fait l'objet de nombreuses investigations depuis vingt cinq ans, toutes leurs potentialités thérapeutiques n'ont probablement pas encore été exploitées. PPAR γ est un régulateur fondamental de l'adipogenèse et de la sensibilité à l'insuline, et régule le métabolisme lipidique. PPAR α contrôle le métabolisme énergétique et lipidique. L'utilisation en clinique des agonistes de PPAR γ ou PPAR α respectivement dans le traitement de la résistance à l'insuline ou des dyslipidémies témoigne du rôle clé de ces cibles thérapeutiques. Au delà de ces propriétés majeures, ce sont leurs propriétés régulatrices de l'inflammation aiguë ou chronique qui suscitent un intérêt croissant, notamment dans les pathologies inflammatoires chroniques mais plus généralement dans toutes les pathologies dans lesquelles l'inflammation joue un rôle pathogénique, telles que la résistance à l'insuline et le diabète de type II, la stéatose hépatique ou les maladies cardio-vasculaires.

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence un rôle anti-inflammatoire de PPAR α dans des modèles d'inflammation chronique. Okamoto *et al.* (2005) ont montré que le fénofibrate administré à des animaux développant une polyarthrite par adjuvant a diminué la sévérité et la progression de l'arthrite, ce qui a été confirmé plus tard par une autre équipe (Castillero et al. 2011). Ce même traitement, sur des fibroblastes synoviaux issus de patients atteints de PR a inhibé l'expression de l'IL-6, de l'IL-8 et du GM-CSF via l'inhibition de NF- κ B (Okamoto et al. 2005). Okamoto et al. ont également obtenu des résultats similaires, avec un agoniste sélectif de PPAR γ ; ces deux agonistes ont, de plus, inhibé la différenciation des ostéoclastes à partir des progéniteurs du sang périphérique.

Par ailleurs, des animaux sains traités avec le fénofibrate présentent une concentration plus élevée en ostéocalcine et une densité minérale osseuse augmentée au niveau des métaphyses, conférant à cet agoniste des propriétés de régulation de la formation osseuse (périoste) (Still et al. 2008). Les résultats de nos travaux sont en accord avec les données ci-dessus qui mettent en avant un potentiel anti-arthritique des agonistes de PPAR α et PPAR γ . Les potentialités anti-inflammatoires d'agonistes de PPAR γ ont été mises en évidence *in vitro* dans plusieurs types cellulaires, via une diminution des marqueurs de l'inflammation (Simonin et al. 2002; Sumariwalla et al. 2009). *In vivo*, des agonistes naturels ou synthétiques de PPAR γ diminuent la réaction inflammatoire dans des modèles d'inflammation vasculaire (Li 2004), pulmonaire, (Cuzzocrea 2004), digestive

(Desreumaux 2001) ou articulaire (Suke et al. 2013) (Sumariwalla et al. 2009) (Shahin et al. 2011), témoignant de l'implication de PPAR γ dans la régulation de l'inflammation associée à de nombreuses pathologies. Dans le processus arthritique, l'ensemble des travaux portant sur des agonistes de PPAR γ dans des modèles expérimentaux d'arthrite chronique a montré une diminution de la sévérité des lésions articulaires, une réduction de l'inflammation articulaire et systémique (diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, réduction de l'activation de NF- κ B) et une modulation de la réponse immunitaire se traduisant par un retardement dans l'apparition de l'arthrite (Giaginis et al. 2009).

Le rôle de PPAR γ dans le contrôle de l'inflammation ne fait plus de doute, cependant son impact sur le métabolisme osseux demeure controversé. Il est établi que PPAR γ régule la différenciation des cellules mésenchymateuses au profit de la lignée adipocytaire (Gimble et al. 1996), déséquilibrant ainsi la balance ostéoclastes/ostéoblastes. Ce rôle a été démontré dans un modèle de souris haplo-insuffisant pour PPAR γ 2, cette mutation ayant pour conséquence une augmentation de la masse osseuse, une activation de l'ostéoclastogenèse ainsi qu'une réduction de l'adiposité de la moelle osseuse (Akune et al. 2004). A l'inverse, la surexpression de PPAR γ 2 dans les cellules mésenchymateuses a conduit à l'inhibition de l'ostéoclastogenèse et à l'augmentation de l'adiposité dans la moelle osseuse.

Les patients diabétiques traités par des TZDs présentent en effet un métabolisme osseux altéré se traduisant par une fragilité osseuse (Grey 2008), même si Vestergaard P. (Vestergaard 2007) a montré que le risque de fracture, chez les personnes diabétiques, était en partie associé aux complications liées à la pathologie. Bien qu'un agoniste sélectif de PPAR γ induise l'augmentation du nombre d'ostéoclastes et la résorption osseuse chez des animaux sains âgés (pas chez les animaux jeunes) (Lazarenko et al. 2007), un autre agoniste naturel, la 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2, est capable au contraire de diminuer l'activité et le nombre d'ostéoclastes dans des modèles cellulaires d'ostéoclastogenèse (Mbalaviele et al. 2000). Cependant l'effet des agonistes de PPAR γ sur le métabolisme osseux a été décrit chez l'homme sain ou diabétique (Grey 2008) et chez les animaux sains (Sorocéanu et al. 2004), et les potentialités de ces molécules sur le remodelage osseux en contexte arthritique n'ont pas été rapportées. Nos

travaux s'inscrivent dans cette optique : après avoir évalué la capacité de ligands de haute affinité pour PPAR à réduire le processus arthritique, nous nous sommes particulièrement attaché à l'impact d'un ligand sélectif de PPAR γ sur le métabolisme osseux dans un modèle expérimental de polyarthrite chez le rat.

Nous confirmons les potentialités anti-arthritiques de la pioglitazone décrites dans la littérature, notamment sur le score clinique de sévérité de l'arthrite. L'analyse histologique a montré que cette activation sélective de PPAR γ réduisait également l'hyperplasie synoviale et les lésions des tissus cartilagineux et osseux dans les articulations périphériques. Le modèle d'arthrite à l'adjuvant chez le rat que nous avons utilisé reproduit les caractéristiques pathologiques majeures de la PR chez l'homme, comme l'inflammation chronique, l'atteinte des articulations périphériques et la dégradation progressive du cartilage et de l'os. Chez l'homme la perte osseuse peut aller jusqu'à l'ostéoporose (Hoes et al. 2015). Dans ce contexte d'inflammation chronique sévère, l'activation sélective de PPAR γ par la pioglitazone a réduit de façon importante la perte osseuse tant au niveau du squelette axial que des articulations périphériques. Ceci s'est traduit par une diminution de la résorption osseuse et le maintien de la structure de la micro-architecture osseuse chez les animaux traités, alors que les animaux arthritiques non traités ont présenté, comme chez l'homme, une perte osseuse importante due à une activité ostéoclastique exacerbée.

L'ostéoclastogénèse et le remodelage osseux sont régulés par le couple RANKL/RANK et le récepteur soluble « leurre », l'OPG, qui maintient un équilibre constant dans les conditions physiologiques. Dans nos conditions expérimentales reproduisant une PR active, le rapport sRANKL/OPG dans le sérum est déséquilibré, en raison d'une surexpression de RANKL, et est concomitant à la diminution de la densité minérale osseuse. Nos résultats sont en accord avec les travaux récents de Fadda et *al.* (Fadda et al. 2015) qui ont démontré une corrélation significative entre l'augmentation du rapport sRANKL/OPG et la baisse de la densité minérale osseuse chez des patients atteints de PR. Nous avons également mis en évidence une importante production locale et systémique d'IL-17, qui joue un rôle majeur en amont de la cascade du processus arthritique. L'activation de PPAR γ par l'administration d'un ligand de haute affinité, la pioglitazone, a réduit de façon significative les productions locales et systémiques de RANKL et d'IL-

17. Comme il est établi que le potentiel ostéoclastogénique de l'IL-17 s'exprime à travers de la modulation de la voie RANK / RANKL / OPG (Daoussis et al. 2008), nous avons émis l'hypothèse d'une régulation directe de l'expression de l'IL-17 par PPAR γ . Les travaux de Solt et *al.* (Solt et al. 2011) ont démontré que le développement des lymphocytes Th17 est contrôlé par le facteur de transcription ROR γ t. Par ailleurs, ceux de Klotz et *al.* (Klotz et al. 2009) ont démontré que PPAR γ régule négativement la différenciation des Th17 chez l'homme et la souris. De plus, ces mêmes travaux ont montré que l'activation de PPAR γ par la pioglitazone inhibait spécifiquement la polarisation des lymphocytes T vers la voie Th17, sans affecter les Th1, Th2 et Treg, en réprimant ROR γ t. En accord avec ces données, nous avons pu montrer à l'aide d'un modèle cellulaire de lymphocytes T que la pioglitazone, en activant PPAR γ , inhibait l'expression de ROR γ t, réduisant ainsi la transactivation du promoteur de l'IL-17. Cette inhibition affecte non seulement les Th17 mais également les polynucléaires neutrophiles que nous avons identifiés comme les principales cellules produisant l'IL-17 au sein de la synoviale inflammatoire des rats arthritiques. L'activation de PPAR γ inhibe donc l'expression de l'IL-17 et de RANKL, conduisant à la régulation de la balance IL-17/ sRANKL / OPG en faveur d'une réduction de la résorption osseuse.

Cependant, d'autres mécanismes d'action peuvent être mis en jeu. En effet, les cytokines de la famille de l'IL-6 ont la capacité d'induire STAT3 qui, d'une part peut contribuer à la différenciation des Th17 via ROR γ t, et, d'autre part, semble réguler directement l'expression de l'IL-17 (Chen et al. 2007). Par ailleurs, en condition arthritique, l'IL-6 sécrétée par les fibroblastes synoviaux pourrait être responsable de la conversion des Treg en Th17 qui auraient un pouvoir ostéoclastogénique supérieur à celui des Th17 issus des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. De ce fait, l'inhibition potentielle de l'IL-6 par la pioglitazone pourrait également contribuer à limiter la différenciation des Th17 et à réduire l'expression de l'IL-17 (Komatsu et al. 2014).

Le rôle hautement inflammatoire et pléiotropique de l'IL-17 fait de cette cytokine une cible thérapeutique potentielle prometteuse dans le traitement des différentes formes d'arthrite et particulièrement de la PR. Cependant, la réponse clinique suite à la neutralisation de l'IL-17 avec un anticorps spécifique a été limitée et variable chez des

patients arthritiques (Patel et al. 2013), probablement due à l'hétérogénéité de l'expression de l'IL-17 (PR débutante/ PR avancée) dont les taux restent très bas aux sites inflammatoires chez beaucoup de patients (van Baarsen et al. 2014). Chez des patients atteints de psoriasis, l'inhibition de l'IL-17 a produit un effet bénéfique significatif (Papp et al. 2012). Actuellement, la thérapie anti-IL17 la plus avancée (essai clinique en phase III chez des patients atteints de PR) met en œuvre le secukinumab (Cosentyx®), un anticorps anti-IL17A humanisé ayant obtenu l'AMM en 2014 dans le psoriasis, qui a donné des résultats significatifs en co-traitement avec le méthotrexate (Burmester et al. 2013). D'autres biomédicaments ciblant l'IL-17 ou ses récepteurs sont en développement : le brodalumab (IL-17RA) et l'ixekizumab (IL-17A).

Les résultats de nos travaux ont donc démontré qu'une activation de PPAR γ par un agoniste sélectif, la pioglitazone, réduisait la sévérité d'une arthrite expérimentale via la diminution de l'expression de l'IL-17. Compte tenu de ces données, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'absence de PPAR γ pourrait augmenter la susceptibilité des animaux à développer une arthrite induite et/ou à développer une arthrite spontanée consécutive à une perte du contrôle du système ROR γ t/Th17/IL-17. Nous avons alors débuté une collaboration avec l'équipe qui a créé des souris totalement déficientes pour PPAR γ (Nadra et al. 2010) afin de caractériser leur phénotype articulaire. L'analyse histologique des articulations a confirmé la présence d'une inflammation importante au niveau des articulations périphériques dès l'âge de trois semaines, associée à une infiltration lymphocytaire de la synoviale et à une dégradation des tissus cartilagineux et osseux. De plus, cette inflammation est associée à des taux circulants élevés d'IL-17, de G-CSF et de KC ainsi qu'à une augmentation modérée (non significative) du TNF α et de l'IL-1 β .

L'analyse des populations de lymphocyte T effecteurs dans les organes lymphoïdes secondaires a montré que la balance entre T effecteurs (Th1 et Th17) et T régulateurs (CD25 FoxP3+) était identique chez les animaux contrôle ou déficients pour PPAR γ . Ces données inattendues pourraient être la résultante d'une conversion, en conditions inflammatoires, des Th17 en Th1, comme cela a été décrit par Nistala K. et *al.* (Nistala et al. 2010) chez des patients arthritiques.

Bien que nous ne puissions exclure la possibilité d'une surabondance de Th17 chez des animaux plus jeunes que ceux étudiés, il est évident que les taux circulants élevés d'IL-17 retrouvé chez les animaux PPAR γ -/- ne peuvent résulter de la seule production par ces lymphocytes CD4+.

Par ailleurs, nous avons démontré que les souris déficientes pour PPAR γ sont également caractérisées par la présence d'un grand nombre de mastocytes dans la synoviale inflammatoire. Ces mastocytes expriment l'IL-17, ce qui est en accord avec le profil cytokinique des mastocytes retrouvés dans le tissu synovial des patients arthritiques (Hueber et al. 2010). D'autre part, les fibroblastes synoviaux et les mastocytes eux-mêmes produisent également le SCF, facteur essentiel de leur différenciation. La concentration élevée en mastocytes dans le tissu synovial pourrait résulter d'une infiltration importante de progéniteurs qui matureraient *in situ* ou d'une prolifération des mastocytes matures (Bischoff & Sellge 2002).

L'étude de chimère obtenue par l'équipe du Professeur B. Desvergne (Université de Lausanne), et dans laquelle la moelle osseuse d'une souris déficiente pour PPAR γ a été transplantée chez une souris sauvage, sans conséquences sur la population mastocytaire, suggère que ce n'est pas uniquement la présence d'un nombre plus important de progéniteurs mastocytaires qui serait responsable de leur accumulation dans l'articulation. Cependant, la surexpression du SCF chez les animaux déficients pourrait y contribuer puisque le SCF est connu pour promouvoir la prolifération des mastocytes, mais également pour inhiber leur apoptose, la régulation de SCF par PPAR γ n'est à notre connaissance pas établie. De plus, la déficience pour PPAR γ pourrait stimuler la migration et l'adhésion des mastocytes puisqu'il a été montré que la rosiglitazone, agoniste de haute affinité de PPAR γ , inhibait la migration et l'adhésion des mastocytes par un mécanisme dépendant de PPAR γ (Zhang et al. 2014).

D'autre part, nous avons observé que les zones de concentration des mastocytes chez les animaux déficients coïncidaient avec les zones où le tissu adipeux est absent. Pour vérifier cette hypothèse nous avons réalisé une analyse histologique des animaux transgéniques A-ZIP/F1 dépourvus de tissu adipeux (Moitra et al. 1998). Nous avons également mis en

évidence, chez ces animaux, une accumulation de mastocytes dans le tissu synovial articulaire et la peau. Le grand nombre de mastocytes présents chez les souris A-ZIP, qui expriment PPAR γ , nous amène à émettre l'hypothèse d'une régulation de la prolifération et/ou de la différenciation des mastocytes par des facteurs exprimés par les adipocytes. Il existe une étroite relation entre le tissu adipeux blanc et les mastocytes comme démontré par l'augmentation du nombre de mastocytes dans le tissu adipeux d'homme ou de souris obèses comparé aux non obèses (Liu et al. 2009). De plus des animaux déficients pour les mastocytes ou chez lesquels ces cellules ont été stabilisées résistent à l'obésité induite par un régime gras (Liu et al. 2009). Nous proposons en perspective de ces travaux d'étudier ces relations étroites entre tissu adipeux et mastocytes au travers des expériences suivantes:

- ✓ de vérifier le statut inflammatoire des animaux A-ZIP, afin de tenter d'établir une corrélation entre l'absence de tissu adipeux, la présence d'un grand nombre de mastocytes et l'inflammation, par analyse histologique et dosage des cytokine pro-inflammatoires.
- ✓ de vérifier l'impact de l'absence de tissu adipeux sur la prolifération et le « homing » des mastocytes. Après différenciation *in vitro* des progéniteurs issus de la moelle osseuse en BMMC (Bone Marrow Mast Cell), les mastocytes obtenus seront marqués au CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) avant transplantation aux sites d'intérêt chez des animaux dépourvus de tissu adipeux blanc (A-ZIP/F1 ou déficient pour PPAR γ). Le marquage des cellules nous permettra de suivre leur prolifération ainsi que leur différenciation (marquage CFSE, et expression du Récepteur Fc ϵ par cytométrie en flux) et leur migration éventuelle au niveau des articulations (histologie).
- ✓ d'étudier le devenir de mastocytes PPAR γ -/- dans un environnement « normal », c'est à dire chez des souris receveuses possédant un tissu adipeux normal. Ceci nous permettra de confirmer la contribution ou non de PPAR γ dans la mastocytose synoviale observée chez les animaux KO.

- ✓ d'étudier les conséquences d'une invalidation conditionnelle de PPAR γ restreinte à certains types cellulaires. En effet, les souris totalement déficientes pour PPAR γ sont d'obtention difficile et présentent un phénotype métabolique sévère (notamment glucidique et lipidique). Nous proposons donc de restreindre la déficience en PPAR γ aux seules cellules produisant l'IL-17 (par croisement de souris ROR γ t cre x PPAR γ floxées) ou encore aux cellules de l'articulation synoviale uniquement (utilisation de souris Gdf5-cre) pour étudier les conséquences articulaires de l'absence de ce récepteur nucléaire.

Afin de conclure de façon plus générale, les travaux présentés dans cette thèse ont confirmé l'intérêt d'une modulation des récepteurs nucléaires PPAR γ en physiopathologie articulaire. En effet, nous avons démontré que l'activation sélective de PPAR γ , avec un agoniste synthétique de haute affinité, diminue la sévérité de l'arthrite chronique expérimentale et la résorption osseuse qui y est associée, via l'inhibition de l'IL-17 et de RANKL.

Corollairement, nos résultats ont montré que la délétion totale de PPAR γ , *in vivo*, a pour conséquence le développement d'une inflammation polyarticulaire spontanée chez la souris. De façon intéressante, cette arthrite est associée à une infiltration synoviale importante par des mastocytes, avec des cinétiques qui sont contingentes, ce qui suggère une possible implication physiopathologique de ce type cellulaire chez les souris déficientes. D'autre part, nos travaux ont suggéré une contribution possible du tissu adipeux, puisque la présence des mastocytes semble être liée à l'absence du tissu adipeux, observation confirmée dans un autre modèle de souris lipodystrophiques (souris AZIP/F1). Des expériences complémentaires sont en cours de réalisation pour tenter d'élucider si la mastocytose relève davantage d'un contrôle de la différenciation cellulaire par PPAR γ ou d'un effet indirect dû à l'absence du tissu adipeux.

En l'espace de quelques décennies, l'intérêt pour ces récepteurs nucléaires et le champ d'application de leur modulation se sont développés, ouvrant des perspectives thérapeutiques non seulement dans les anomalies du métabolisme lipidique (PPAR α) ou dans le traitement du diabète de type 2 (PPAR γ), mais également dans le traitement de pathologies inflammatoires à composante immunitaire comme la PR. Nos résultats expérimentaux sont confortés par des essais cliniques réalisés récemment (en 2011 et

2013) chez des patients atteints de PR traités par la pioglitazone qui ont montré un effet « adjuvant » de la molécule sur la réduction des manifestations cliniques et biologiques. D'intenses recherches sont encore en cours afin de développer de nouveaux agonistes ou des agonistes mixtes PPAR α/γ dont les effets indésirables seraient minimisés.

Références

- Abdelrahman, M., Sivarajah, A. & Thiernemann, C., 2005. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res*, 65(4), pp.772–781.
- Aggarwal, S. et al., 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry*, 278(3), pp.1910–1914.
- Ahmadian, M. et al., 2013. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 19(5), pp.557–566.
- Akune, T. et al., 2004. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *The Journal of clinical investigation*, 113(6), pp.846–855.
- Assier, E., Boissier, M.-C. & Dayer, J.-M., 2010. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine*, 77(6), pp.532–536.
- Astapova, O. & Leff, T., 2014. PPAR γ mutations, lipodystrophy and diabetes. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 20(2), pp.63–70.
- Auboeuf, D. et al., 1997. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, 46(8), pp.1319–1327.
- Barak, Y. et al., 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular cell*, 4(4), pp.585–595.
- Baram, D. et al., 2001. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *The journal of Immunology*, 167(7), pp.4008–4016.
- Barete, S. et al., 2010. Systemic mastocytosis and bone involvement in a cohort of 75 patients. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(10), pp.1838–1841.
- Berger, J. & Moller, D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. *The mechanisms of action of PPARs*, 53(1), pp.409–435.
- Bettelli, E., Korn, T. & Kuchroo, V.K., 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current opinion in immunology*, 19(6), pp.652–657.
- Biosse-Duplan, M. et al., 2009. Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts. *The American journal of pathology*, 174(4), pp.1426–1434.
- Bischoff, S.C. & Sellge, G., 2002. Mast cell hyperplasia: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol*, 127(2), pp.118–122.
- Bishop-Bailey, D. & Wray, J., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical

- review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 71(1-2), pp.1–22.
- Boissier, M.-C., 2011. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Joint Bone Spine*, 78(3), pp.230–234.
- Bordji, K. et al., 2000. Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 275(16), pp.12243–12250.
- Bowes, J. & Barton, A., 2008. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology*, 47(4), pp.399–402.
- Boyault, S. et al., 2001. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human chondrocytes by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett*, 501(1), pp.24–30.
- Boyce, B.F. & Xing, L., 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, 473(2), pp.139–146.
- Boyce, B.F. & Xing, L., 2007. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep*, 5(3), pp.98–104.
- Braissant, O. et al., 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), pp.354–366.
- Buckley, M.G. et al., 1997. Mast cell activation in arthritis: detection of alpha- and beta-tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid. *Clinical science (London, England : 1979)*, 93(4), pp.363–370.
- Burmester, G.R., Feist, E. & Dörner, T., 2013. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(2), pp.77–88.
- Caron, G. et al., 2001. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *The journal of Immunology*, 167(7), pp.3682–3686.
- Carroll-Portillo, A. et al., 2015. Mast cells and dendritic cells form synapses that facilitate antigen transfer for T cell activation. *The Journal of cell biology*, 210(5), pp.851–864.
- Castillero, E. et al., 2011. Fenofibrate, a PPAR{alpha} agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 300(5), pp.E790–9.
- Cavalli, G. & Dinarello, C.A., 2015. Treating rheumatological diseases and co-morbidities with interleukin-1 blocking therapies. *Rheumatology*, p.kev269.
- Chabaud, M. et al., 1998. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *The journal of Immunology*, 161(1), pp.409–414.

- Chawla, A. et al., 2001. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*, 7(1), pp.48–52.
- Chen, Z., Laurence, A. & O'Shea, J.J., 2007. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in immunology*, 19(6), pp.400–408.
- Chiappetta, N. & Gruber, B., 2006. The role of mast cells in osteoporosis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 36(1), pp.32–36.
- Chizzolini, C., Dayer, J.-M. & Miossec, P., 2009. Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance? *Arthritis research & therapy*, 11(5), p.246.
- Cohen, S. et al., 2002. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and rheumatism*, 46(3), pp.614–624.
- Colca, J.R. et al., 2013. Clinical proof-of-concept study with MSDC-0160, a prototype mTOT-modulating insulin sensitizer. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 93(4), pp.352–359.
- Colca, J.R. et al., 2004. Identification of a novel mitochondrial protein (“mitoNEET”) cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 286(2), pp.E252–60.
- da Rocha Junior, L.F. et al., 2013. PPAR γ Agonists in Adaptive Immunity: What Do Immune Disorders and Their Models Have to Tell Us? *PPAR research*, 2013(3), pp.519724–9.
- Daoussis, D., Andonopoulos, A.P. & Liossis, S.N., 2008. Wnt Pathway and IL-17: Novel Regulators of Joint Remodeling in Rheumatic Diseases. Looking Beyond the RANK-RANKL-OPG Axis. *Semin Arthritis Rheum*.
- Deal, C., 2012. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Curr Rheumatol Rep*, 14(3), pp.231–237.
- Desvergne, B. & Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 20(5), pp.649–688.
- Dougall, W.C. et al., 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism*, 13(18), pp.2412–2424.
- Dudeck, A. et al., 2011. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. *European journal of immunology*, 41(7), pp.1883–1893.
- Escher, P. & Wahli, W., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation research*, 448(2), pp.121–138.
- Fadda, S. et al., 2015. Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with rheumatoid arthritis and their relation to bone mineral density and disease activity. *The*

Egyptian Rheumatologist, 37(1), pp.1–6.

- Fahmi, H. et al., 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1 β -induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*, 44(3), pp.595–607.
- Féger, F. et al., 2002. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends in Immunology*, 23(3), pp.151–158.
- Fitzpatrick, L.A. et al., 2003. Targeted deletion of histidine decarboxylase gene in mice increases bone formation and protects against ovariectomy-induced bone loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), pp.6027–6032.
- Fonseca, J.E. et al., 2009. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity reviews*, 8(7), pp.538–542.
- Francois, M. et al., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element. *The Journal of biological chemistry*, 279(27), pp.28411–28418.
- Fruchart, J.-C., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 205(1), pp.1–8.
- Galli, S.J. & Tsai, M., 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*, 18(5), pp.693–704.
- Galli, S.J., Borregaard, N. & Wynn, T.A., 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, 12(11), pp.1035–1044.
- Ganeshan, K. & Bryce, P.J., 2012. Regulatory T cells enhance mast cell production of IL-6 via surface-bound TGF- β . *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(2), pp.594–603.
- Garcia-Bates, T.M. et al., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands enhance human B cell antibody production and differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(11), pp.6903–6912.
- Gelman, L., Fruchart, J.C. & Auwerx, J., 1999. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci*, 55(6-7), pp.932–943.
- Giaginis, C., Giagini, A. & Theocharis, S., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis. *Pharmacol Res*, 60(3), pp.160–169.
- Gimble, J.M. et al., 1996. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol*, 50(5), pp.1087–1094.

- Glass, C.K. & Ogawa, S., 2006. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6(1), pp.44–55.
- Goldring, S.R., 2003. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 42 Suppl 2(90002), pp.ii11–6.
- Gotis-Graham, I. & McNeil, H.P., 1997. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis and rheumatism*, 40(3), pp.479–489.
- Gravallese, E.M. et al., 2000. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis and rheumatism*, 43(2), pp.250–258.
- Grey, A., 2008. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int*, 19(2), pp.129–137.
- Guillemin, F. et al., 2005. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(10), pp.1427–1430.
- Harris, S.G. & Phipps, R.P., 2001. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *European journal of immunology*, 31(4), pp.1098–1105.
- Hashizume, M. et al., 2015. Tocilizumab, a humanized anti-IL-6R antibody, as an emerging therapeutic option for rheumatoid arthritis: molecular and cellular mechanistic insights. *International reviews of immunology*, 34(3), pp.265–279.
- Haynes, D.R. et al., 2003. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology (Oxford)*, 42(1), pp.123–134.
- Herrak, P. et al., 2004. Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 50(7), pp.2327–2337.
- Hoes, J.N., Bultink, I.E.M. & Lems, W.F., 2015. Management of osteoporosis in rheumatoid arthritis patients. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 16(4), pp.559–571.
- Holoshitz, J., 2010. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol*, 22(3), pp.293–298.
- Hueber, A.J. et al., 2010. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(7), pp.3336–3340.
- Ipseiz, N. et al., 2014. Adopted orphans as regulators of inflammation, immunity and skeletal homeostasis. *Swiss Med Wkly*, 144, p.w14055.
- Irani, A.M. et al., 1989. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 37(10), pp.1509–1515.
- Issemann, I. & Green, S., 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor

- superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), pp.645–650.
- Jamur, M.C. & Oliver, C., 2011. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 3, pp.1390–1406.
- Jiang, C., Ting, A.T. & Seed, B., 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391(6662), pp.82–86.
- Jiang, Y. et al., 2000. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis and rheumatism*, 43(5), pp.1001–1009.
- Joosten, L.A. et al., 1999. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(9), pp.5049–5055.
- Kambe, N. et al., 2004. Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body. *Blood*, 103(3), pp.860–867.
- Katz, Y., Nadiv, O. & Beer, Y., 2001. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a “fine-tuning cytokine” in inflammation processes. *Arthritis and rheumatism*, 44(9), pp.2176–2184.
- Kay, J. & Upchurch, K.S., 2012. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology*, 51 Suppl 6(suppl 6), pp.vi5–9.
- Kersten, S., Desvergne, B. & Wahli, W., 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405(6785), pp.421–424.
- Kim, D.J. et al., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits epidermal cell proliferation by down-regulation of kinase activity. *The Journal of biological chemistry*, 280(10), pp.9519–9527.
- Kim, G.W. et al., 2015. IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future. *Archives of pharmacal research*, 38(5), pp.575–584.
- Kitaura, H. et al., 2013. Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013(2), pp.181849–8.
- Klotz, L. et al., 2009. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *Journal of experimental Medicine*, 206(10), pp.2079–2089.
- Knüpfer, H. & Preiss, R., 2008. sIL-6R: more than an agonist? *Immunology and cell biology*, 86(1), pp.87–91.
- Kochi, Y., Suzuki, A. & Yamamoto, K., 2014. Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current

- review. *Biochemical and biophysical research communications*, 452(2), pp.254–262.
- Koenders, M.I. et al., 2011. Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1 β , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 63(8), pp.2329–2339.
- Komatsu, N. et al., 2014. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*, 20(1), pp.62–68.
- Koné-Paut, I. & Galeotti, C., 2014. Anakinra for cryopyrin-associated periodic syndrome. *Expert review of clinical immunology*, 10(1), pp.7–18.
- Koshy, P.J. et al., 2002. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Annals of the rheumatic diseases*, 61(8), pp.704–713.
- Kota, B.P., Huang, T.H.-W. & Roufogalis, B.D., 2005. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, 51(2), pp.85–94.
- Kotake, S. et al., 2001. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*, 44(5), pp.1003–1012.
- Koufany, M. et al., 2008. Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis research & therapy*, 10(1), p.R6.
- Langrish, C.L. et al., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 201(2), pp.233–240.
- Lazarenko, O.P. et al., 2007. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. *Endocrinology*, 148(6), pp.2669–2680.
- Li, L. et al., 2010. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*, 120(1), pp.331–342.
- Li, P., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., Ma, L., Boyce, B.F., et al., 2004. RANK signaling is not required for TNF α -mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNF α -mediated inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*, 19(2), pp.207–213.
- Li, P., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., Ma, L., Looney, R.J., et al., 2004. Systemic tumor necrosis factor α mediates an increase in peripheral CD11b^{high} osteoclast precursors in tumor necrosis factor α -transgenic mice. *Arthritis and rheumatism*, 50(1), pp.265–276.
- Lim, H. et al., 1999. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β / δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism*, 13(12), pp.1561–1574.

- Liu, J. et al., 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*, 15(8), pp.940–945.
- Loke, Y.K., Singh, S. & Furberg, C.D., 2009. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 180(1), pp.32–39.
- Lu, L.-F. et al., 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, 442(7106), pp.997–1002.
- Lubberts, E. et al., 2003. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *The journal of Immunology*, 170(5), pp.2655–2662.
- Lubberts, E. et al., 2000. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis and rheumatism*, 43(6), pp.1300–1306.
- Luquet, S. et al., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(15), pp.2299–2301.
- Magarinos, N.J. et al., 2013. Mast cell-restricted, tetramer-forming tryptases induce aggrecanolytic activity in articular cartilage by activating matrix metalloproteinase-3 and -13 zymogens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(3), pp.1404–1412.
- Malaviya, R. et al., 1994. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *The journal of Immunology*, 152(4), pp.1907–1914.
- Man, M.-Q. et al., 2008. Deficiency of PPARbeta/delta in the epidermis results in defective cutaneous permeability barrier homeostasis and increased inflammation. *Functions of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) alpha and beta in Skin Homeostasis, Epithelial Repair, and Morphogenesis*, 128(2), pp.370–377.
- Mbalaviele, G. et al., 2000. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), pp.14388–14393.
- McFarland, H.F. & Martin, R., 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(9), pp.913–919.
- McNeil, H.P. & Gotis-Graham, I., 2000. Human mast cell subsets--distinct functions in inflammation? *Inflammation Research*, 49(1), pp.3–7.
- Michalik, L. et al., 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacological reviews*, 58(4), pp.726–741.
- Moitra, J. et al., 1998. Life without white fat: a transgenic mouse. *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism*, 12(20), pp.3168–3181.
- Moulin, D. et al., 2007. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators

- by mast cells. *Cytokine*, 40(3), pp.216–225.
- Moulin, D. et al., 2005. Rosiglitazone induces interleukin-1 receptor antagonist in interleukin-1beta-stimulated rat synovial fibroblasts via a peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-dependent mechanism. *Arthritis and rheumatism*, 52(3), pp.759–769.
- Nadra, K. et al., 2010. PPARgamma in placental angiogenesis. *Endocrinology*, 151(10), pp.4969–4981.
- Nakae, S. et al., 2005. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), pp.6467–6472.
- Nakae, S. et al., 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *The journal of Immunology*, 171(11), pp.6173–6177.
- Nakano, T. et al., 1985. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *The Journal of experimental medicine*, 162(3), pp.1025–1043.
- Neels, J.G. & Grimaldi, P.A., 2014. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor β . *Physiol Rev*, 94(3), pp.795–858.
- Nettles, K.W. & Greene, G.L., 2005. Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. *Annu Rev Physiol*, 67, pp.309–333.
- Nistala, K. et al., 2010. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), pp.14751–14756.
- Noli, C. & Miolo, A., 2001. The mast cell in wound healing. *Veterinary dermatology*, 12(6), pp.303–313.
- Ohshima, K., Mogi, M. & Horiuchi, M., 2012. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Vascular Inflammation. *International journal of vascular medicine*, 2012(5), pp.508416–9.
- Ohtsuiji, M. et al., 2015. IL-6 signal blockade ameliorates the enhanced osteoclastogenesis and the associated joint destruction in a novel Fc γ RIIB-deficient rheumatoid arthritis mouse model. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 25(2), pp.270–277.
- Okamoto, H. et al., 2005. Inhibition of NF-kappaB signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 23(3), pp.323–330.
- Olsson, N., Ulfgren, A.K. & Nilsson, G., 2001. Demonstration of mast cell chemotactic activity in synovial fluid from rheumatoid patients. *Annals of the rheumatic diseases*, 60(3), pp.187–193.
- om, 2013. PPARs AS LIPID SENSORS AND MASTER REGULATORS ININFLAMMATION. pp.1–14.

- Papp, K.A. et al., 2012. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med*, 366(13), pp.1181–1189.
- Patel, D.D. et al., 2013. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Annals of the rheumatic diseases*, 72 Suppl 2(Supplement 2), pp.ii116–23.
- Petra, A.I. et al., 2014. Spectrum of mast cell activation disorders. *Expert review of clinical immunology*, 10(6), pp.729–739.
- Pettit, A.R. et al., 2001. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *The American journal of pathology*, 159(5), pp.1689–1699.
- Poleni, P.E. et al., 2007. Agonists of peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) alpha, beta/delta or gamma reduce transforming growth factor (TGF)-beta-induced proteoglycans' production in chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 15(5), pp.493–505.
- Poncet, P., Arock, M. & David, B., 1999. MHC class II-dependent activation of CD4+ T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation. *Journal of leukocyte biology*, 66(1), pp.105–112.
- Redlich, K. et al., 2002. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *The Journal of clinical investigation*, 110(10), pp.1419–1427.
- Rizos, C.V. et al., 2009. How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice? *Expert opinion on drug safety*, 8(1), pp.15–32.
- Rosen, E.D. et al., 2002. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism*, 16(1), pp.22–26.
- Rosen, E.D. et al., 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell*, 4(4), pp.611–617.
- Rossini, M. et al., 2011. Bone mineral density, bone turnover markers and fractures in patients with indolent systemic mastocytosis. *Bone*, 49(4), pp.880–885.
- Ruyssen-Witrand, A. et al., 2012. New insights into the genetics of immune responses in rheumatoid arthritis. *Tissue antigens*, 80(2), pp.105–118.
- Sarafidis, P.A. & Bakris, G.L., 2006. Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside. *Kidney international*, 70(7), pp.1223–1233.
- Schmetzer, O. et al., 2015. Murine and human mast cell progenitors. *European journal of pharmacology*.
- Schmidt, E. & Zillikens, D., 2013. Pemphigoid diseases. *Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis*, 381(9863), pp.320–332.
- Schwartz, A.V. et al., 2006. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. *J*

- Clin Endocrinol Metab*, 91(9), pp.3349–3354.
- Schwartz, L.B. et al., 1987. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med*, 316(26), pp.1622–1626.
- Seitz, S. et al., 2013. Increased osteoblast and osteoclast indices in individuals with systemic mastocytosis. *Osteoporos Int*, 24(8), pp.2325–2334.
- Shahin, D. et al., 2011. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist (pioglitazone) and methotrexate on disease activity in rheumatoid arthritis (experimental and clinical study). *Clinical medicine insights. Arthritis and musculoskeletal disorders*, 4(4), pp.1–10.
- Simmons, H.A. & Raisz, L.G., 1991. Effects of acid and basic fibroblast growth factor and heparin on resorption of cultured fetal rat long bones. *J Bone Miner Res*, 6(12), pp.1301–1305.
- Simonin, M.A. et al., 2002. PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(1), pp.C125–33.
- Sims, N.A. et al., 2004. Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 50(7), pp.2338–2346.
- Solt, L.A. et al., 2011. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature*, 472(7344), pp.491–494.
- Sorocéanu, M.A. et al., 2004. Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. *J Endocrinol*, 183(1), pp.203–216.
- Steiner, G. et al., 1999. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38(3), pp.202–213.
- Stelekati, E. et al., 2009. Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8+ T cell effector functions. *Immunity*, 31(4), pp.665–676.
- Still, K. et al., 2008. The peroxisome proliferator activator receptor alpha/delta agonists linoleic acid and bezafibrate upregulate osteoblast differentiation and induce periosteal bone formation in vivo. *Calcif Tissue Int*, 83(4), pp.285–292.
- Suke, S.G. et al., 2013. Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of combined pioglitazone and prednisolone on adjuvant-induced arthritis. *European journal of pharmacology*, 718(1-3), pp.57–62.
- Sumariwalla, P.F. et al., 2009. Suppression of tumour necrosis factor production from mononuclear cells by a novel synthetic compound, CLX-090717. *Rheumatology*, 48(1), pp.32–38.
- Suto, H. et al., 2006. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *The journal of Immunology*, 176(7), pp.4102–4112.
- Suurmond, J. et al., 2013. Communication between human mast cells and CD4(+) T cells through antigen-dependent interactions. *European journal of immunology*, 43(7),

pp.1758–1768.

Suurmond, J. et al., 2015. Mast cells in rheumatic disease. *European journal of pharmacology*.

Suurmond, J. et al., 2014. Toll-like receptor triggering augments activation of human mast cells by anti-citrullinated protein antibodies. *Annals of the rheumatic diseases*, pp.annrheumdis–2014–205562.

Tang, W. et al., 2011. Thiazolidinediones regulate adipose lineage dynamics. *Cell metabolism*, 14(1), pp.116–122.

Taylor, P.C. & Feldmann, M., 2009. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(10), pp.578–582.

Teboul, L. et al., 1995. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *The Journal of biological chemistry*, 270(47), pp.28183–28187.

Theoharides, T.C., Valent, P. & Akin, C., 2015. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N Engl J Med*, 373(2), pp.163–172.

Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79(7), pp.1147–1156.

Urb, M. & Sheppard, D.C., 2012. The role of mast cells in the defence against pathogens. J. Heitman, ed. *PLoS pathogens*, 8(4), p.e1002619.

Valent, P. et al., 2001. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. In *Leukemia research*. pp. 603–625.

Valent, P. et al., 2007. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *European journal of clinical investigation*, 37(6), pp.435–453.

van Baarsen, L.G.M. et al., 2014. Heterogeneous expression pattern of interleukin 17A (IL-17A), IL-17F and their receptors in synovium of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis: possible explanation for nonresponse to anti-IL-17 therapy? *Arthritis research & therapy*, 16(4), p.426.

van Den Berg, W.B., 2000. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 59 Suppl 1(Suppl 1), pp.i81–4.

van der Veer, E. et al., 2012. High prevalence of fractures and osteoporosis in patients with indolent systemic mastocytosis. *Allergy*, 67(3), pp.431–438.

Vestergaard, P., 2007. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int*, 18(4), pp.427–444.

Volin, M.V. & Shahrara, S., 2011. Role of TH-17 cells in rheumatic and other autoimmune diseases. *Rheumatology (Sunnyvale, Calif.)*, 1(104).

Walsh, M.C. & Choi, Y., 2014. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity,

- Bone, and Beyond. *Frontiers in immunology*, 5, p.511.
- Walsh, N.C. & Gravallesse, E.M., 2010. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev*, 233(1), pp.301–312.
- Wang, W. et al., 2012. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 32(4), pp.887–893.
- Willson, T.M. et al., 2000. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 43(4), pp.527–550.
- Wingren, U. & Enerbäck, L., 1983. Mucosal mast cells of the rat intestine: a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glycosaminoglycan. *The Histochemical journal*, 15(6), pp.571–582.
- Wintroub, B.U. et al., 1978. Morphologic and functional evidence for release of mast-cell products in bullous pemphigoid. *N Engl J Med*, 298(8), pp.417–421.
- Wright, M.B. et al., 2014. Minireview: Challenges and opportunities in development of PPAR agonists. *Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis*, 28(11), pp.1756–1768.
- Wu, Z., Puigserver, P. & Spiegelman, B.M., 1999. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 11(6), pp.689–694.
- Yang, X.O. et al., 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, 28(1), pp.29–39.
- Yu, X., Kasprick, A. & Petersen, F., 2015. Revisiting the role of mast cells in autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 14(9), pp.751–759.
- Zandbergen, F. & Plutzky, J., 2007. PPARalpha in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1771(8), pp.972–982.
- Zhang, G. et al., 2014. Rosiglitazone inhibits HMC-1 cell migration and adhesion through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 13(1), pp.11–18.
- Zupan, J., Jeras, M. & Marc, J., 2013. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochimica medica*, 23(1), pp.43–63.
- Zwerina, J. et al., 2007. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), pp.11742–11747.

Résumé

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et de la tolérance au glucose. Les PPARs contrôlent également l'inflammation associée à de multiples pathologies, dont la polyarthrite rhumatoïde. Dans les travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons comparé les potentialités anti-arthritiques, dans un modèle expérimental, de deux agonistes synthétiques de haute affinité pour deux isotypes de PPARs, PPAR α et PPAR γ . Nous avons démontré qu'un traitement avec un agoniste sélectif de PPAR γ , la pioglitazone, en plus de diminuer la sévérité de l'arthrite expérimentale, réduisait la perte osseuse inflammatoire en préservant la micro-architecture osseuse. Nous avons mis en évidence que PPAR γ , d'une part, régulait l'expression locale et systémique de l'interleukine-17 et de RANKL, et que, d'autre part, il inhibait l'expression du facteur de transcription ROR γ t, acteur majeur de la voie IL-17/Th17. Les animaux déficients pour PPAR γ nous ont permis de confirmer son rôle majeur dans le développement du processus arthritique. En effet, ces animaux présentent tous et de façon spontanée une arthrite associée à une augmentation du nombre de mastocytes capables de produire l'IL-17 et leur propre facteur de différenciation, le SCF dans la synoviale inflammatoire. Enfin, nous avons discuté le lien possible entre l'arthrite inflammatoire et la mastocytose à la lumière de l'étude d'un cas clinique d'un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde concomitante à une mastocytose systémique.

Mots clés : PPAR, inflammation, arthrite, os, interleukine-17, mastocytes

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are transcription factors implicated in lipid metabolism and glucose tolerance. Once activated by specific agonists, PPARs control inflammation associated with numerous diseases, notably Rheumatoid arthritis. The first study presented here aim to compare the anti-arthritic potency of two high-affinity synthetic agonists for PPAR α and PPAR γ in an experimental model. Then we focused on the effect of pioglitazone, a high-affinity synthetic agonists for PPAR γ , and demonstrated that a *per os* treatment with this agonist not only reduced experimental arthritis but also inhibited partly inflammation-related bone loss by preserving bone microarchitecture. We pointed out that PPAR γ , on one hand, regulated local and systemic expression of interleukine-17 (IL-17) and RANKL and on the other hand, inhibited expression of transcription factor ROR γ t, a main regulator of IL-17/Th17 pathway. Study of mice deficient for PPAR γ confirmed its major role in the development of the arthritic process since these mice developed spontaneously arthritis. Of interest arthritis in these mice is associated with increased number of synovial mast cells able to produce IL-17 and their own differentiation factor, the SCF. Finally, we discussed the possible link between inflammatory arthritis and mastocytosis in a case report of a patient suffering from rheumatoid arthritis concomitant to systemic mastocytosis.

Keywords : PPAR, inflammation, arthritis, bone, interleukin-17, mast cells