



L'autotaxine est un nouveau facteur autocrine contrôlant l'activité ostéoclastique et la perte osseuse en conditions inflammatoires

Sacha Flammier

► To cite this version:

Sacha Flammier. L'autotaxine est un nouveau facteur autocrine contrôlant l'activité ostéoclastique et la perte osseuse en conditions inflammatoires. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1056 . tel-01785396

HAL Id: tel-01785396

<https://theses.hal.science/tel-01785396>

Submitted on 4 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1056

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 03 avril 2018, par :

Sacha FLAMMIER

L'autotaxine est un nouveau facteur autocrine contrôlant l'activité ostéoclastique et la perte osseuse en conditions inflammatoires

Devant le jury composé de :

Pr. CHAPURLAT Roland, PU-PH, Université de Lyon
Pr. COHEN-SOLAL Martine, PU-PH, Université Paris-Diderot
Pr. HEYMANN Dominique, PU-PH, Université de Nantes
Dr. BOUVARD Daniel, CR1, CNRS, Université de Grenoble
Dr. MACHUCA-GAYET Irma, CR1, CNRS, Université de Lyon
Dr. COURY Fabienne, MCU-PH, Université de Lyon

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

L'autotaxine (ATX) est une protéine sécrétée par différents tissus y compris le foie, le tissu adipeux et l'os. L'ATX possède une activité lysophospholipase D responsable du clivage de la lysophosphatidyl-choline (LPC) en acide lysophosphatidique (LPA), facteur de croissance affectant la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration. Il a été démontré que les effets biologiques du LPA pourraient être la conséquence de la production locale d'ATX dans un tissu ou une cellule donnée. Nous avons récemment démontré que le LPA contrôle l'ostéoclastogenèse et l'activité de résorption ostéoclastique. De plus, nous avons démontré que l'expression de *Enpp2* (gène de l'ATX) augmente au cours de l'ostéoclastogenèse. Le but de notre étude était d'évaluer l'implication de l'ATX produite par les ostéoclastes au cours de l'ostéoclastogenèse et dans le contrôle de la masse osseuse, en particulier en conditions inflammatoires.

La production et le rôle de l'ATX au cours de l'ostéoclastogenèse ont été analysés sur les ostéoclastes murins et humains. De plus, l'ATX a été spécifiquement ciblée dans les ostéoclastes avec l'utilisation des souris *Enpp2^{fl/fl} Ctsk-Cre* et par le traitement pharmacologique des souris par un anti-ATX. La perte osseuse en conditions inflammatoires a été évaluée dans le modèle d'inflammation induite par le lipopolysaccharide (LPS) et dans les modèles de souris arthritiques par transfert de sérum K/BxN et avec la lignée transgénique surexprimant le TNF humain *hTNF*.

La production de l'ATX par les ostéoclastes est cruciale pour l'activité de résorption osseuse ostéoclastique *in vitro*. Les souris *Enpp2^{fl/fl} Ctsk-Cre* ne présentent pas de phénotype osseux en conditions physiologiques mais sont protégées de la perte osseuse systémique et des érosions osseuses observées en conditions arthritiques. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'ATX protège les souris de la perte osseuse systémique et des érosions focales observées dans le modèle *hTNF^{+/-}*.

L'inhibition pharmacologique et génétique de l'ATX améliore la perte osseuse locale et systémique inflammatoire en inhibant la résorption osseuse. L'ATX semble être une cible thérapeutique prometteuse dans la prévention de la perte osseuse associée à l'inflammation.

Mots clés : autotaxine, ostéoclastes, résorption osseuse, polyarthrite rhumatoïde

Abstract

Autotaxin (ATX) is a secreted protein produced by various tissues including the liver, adipose tissue and bone. ATX exhibits a lysophospholipase D activity responsible for cleavage of lysophosphatidyl-choline (LPC) in lysophosphatidic acid (LPA) that in turn acts as a growth factor, affecting cell proliferation, differentiation, and migration. It has been shown that biological effects of LPA could be the direct consequence of local production of ATX in a given tissue or cell type. We showed that LPA controls osteoclastogenesis and osteoclast bone resorption activity. In addition, we observed that *Enpp2* (ATX gene) was upregulated during osteoclastogenesis. The aim of the study was to evaluate if ATX produced by osteoclasts could play a role in osteoclastogenesis and bone mass control, especially in inflammatory conditions.

The role of ATX on osteoclastogenesis and osteoclast activity were analysed by murine and human assays. ATX was targeted by conditional inactivation of *Enpp2* (ATX gene) in osteoclasts (*Enpp2^{fl/fl} Ctsk-Cre*) and by treatment with anti-ATX. Arthritic and erosive diseases were studied in arthritis models using human tumor necrosis factor transgenic (*hTNF^{+/-}*) mice and K/BxN serum-treated mice. Systemic bone loss was analysed in the Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation model. Joint inflammation and osteoclasts were assessed by histology and bone mass and bone erosion by micro-CT.

ATX production by osteoclasts was observed and was revealed as a crucial factor controlling osteoclast activity. Inhibition of ATX led to reduced bone resorption *in vitro*. Then, we generated *Enpp2^{fl/fl} Ctsk-Cre^{+/-}* mice allowing ATX depletion specifically in mature osteoclasts. These mice showed no specific bone phenotype under physiological conditions but displayed significant protection against systemic bone loss and almost an absence of bone erosion formation after challenge with LPS and K/BxN serum transfer. Pharmacological inhibition of ATX significantly mitigated focal and systemic TNF-induced bone loss.

Pharmacological and genetic inactivation of ATX ameliorates systemic and focal inflammatory bone loss by inhibiting bone resorption. ATX emerges as a new promising therapeutic target for the prevention of inflammatory associated bone loss.

Keywords: autotaxin, osteoclast, bone loss, rheumatoid arthritis

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire de Physiopathologie, Diagnostic et Traitement des Maladies Osseuses – INSERM UMR1033 – grâce à une bourse ministérielle.

En premier lieu, je tiens à remercier M. le docteur Philippe Clézardin, directeur de cette unité, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses conseils avisés et l'attention qu'il porte aux étudiants.

Je tiens à remercier M. le docteur Olivier Peyruchaud, qui m'a accueilli dans sa nouvelle équipe. Merci pour sa patience, son encouragement, sa disponibilité et sa gentillesse pendant ces trois années. Je n'oublierai pas ses multiples créations et bricolages qui ont fait de lui le vrai « Mc Gyver » de l'équipe.

Je remercie particulièrement Mme le docteur Irma Machuca-Gayet, ma directrice de thèse, qui a misé sur moi dès mon stage de master 2, qui m'a convaincu de présenter le concours de l'EDISS et d'intégrer ce nouveau laboratoire à ses côtés. Son expérience et sa rigueur m'ont permis d'apprendre énormément d'un point de vue professionnel. Je retiens également son franc parler, sa gentillesse et sa bienveillance, nos grandes discussions sous la hotte de culture pendant les prép d'ostéoclastes, nos échanges sur les petits potins du labo, le shopping à Rome, les Spritz et sans oublier... Lasco !

Je remercie également Mme le docteur Fabienne Coury, ma co-directrice de thèse, pour son éclairage en tant que rhumatologue mais également pour ses conseils, son écoute, sa patience et sa confiance.

Je remercie les Pr Martine Cohen Solal et Dominique Heymann pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu me porter en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. J'exprime également mes remerciements au Pr Roland Chapurlat pour avoir accepté de présider mon jury et au Dr Daniel Bouvard qui a accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe U1033 qui ont été là pour m'aider et me conseiller. Merci à Johnny qui m'a aidé et formé pour l'expérimentation animale, merci à Martine pour son aide précieuse notamment au FACS, merci à Lamia et Sandra qui sont adorables et toujours disponibles. Merci à Caroline, Edith et Chantal pour leurs conseils scientifiques et pratiques. Un grand merci à Christine pour sa gentillesse, son sourire et sa bonne humeur ainsi que son aide « administrative » et pour les mots croisés ! Merci à François et Geoffrey, mes « co-thésards », toujours très gentils bien qu'un peu turbulents ! Merci également à Casina et Sofia, aussi adorables l'une que l'autre. Merci à Lise qui est maintenant outre-atlantique, pour ses conseils, sa gentillesse et ses bons gâteaux ! Merci à Hélène pour sa bonne humeur permanente, ma « copine de clope », ses conseils et sa gentillesse. Merci à Jean Paul et François, le couple infernal, sans qui nos journées seraient bien moins drôles. Merci à Delphine et Nathalie pour leur gentillesse et leur écoute. Merci à Sébastien, Martin, Marc et Benjamin pour leur bonne humeur et nos grandes conversations de « footix » ! Merci également à Anouardo-da-vinci pour sa bonne humeur et son sourire permanent.

Un grand merci à Margaux, Paola, Charlène, Débora et Julie pour leur soutien, nos soirées, nos grandes discussions, nos délires et pour les fameux algorithmes de facebook ... ! Des collègues qui sont devenues de vraies amies. Un immense merci à ma Fanounou, qui était mon amie avant de devenir ma collègue, sans qui je n'aurais probablement pas obtenu la moitié de mes résultats. Merci pour ton soutien, ta gentillesse, ta patience, ta persévérance, ton aide pour toutes les manips, ton écoute, pour nos discussions interminables, pour tout ! Tu m'as trop manqué pendant ton congé maternité... !

Je tiens également à remercier ma famille, ma Mamoune et ses Tupp' de compét', mon Papounet le scientifique de la famille qui s'intéresse même à mes cellules, et ma Nanou (ooooh des bébés souris... !) pour leur soutien sans faille depuis toujours. Enfin, un immense merci à Malek qui a toujours cru en moi, qui m'a aidé, soutenu et même secoué les jours de blues (arrête hein, y'a plus grave dans la vie, y'a personne qui est mort !). Merci de m'avoir accompagné au labo au milieu de la nuit, pendant les weekends, et de m'avoir nourri à base d'alloresto pendant ma rédaction. Tu es aussi important qu'un Kebab ;)

SOMMAIRE

Résumé.....	2
Abstract.....	3
Remerciements.....	4
Liste des abréviations	9
Table des illustrations	11
Liste des tableaux.....	14
INTRODUCTION.....	15
I. Acide lysophosphatidique et autotaxine	16
A. L'acide Lysophosphatidique (LPA).....	16
1) Structure et localisation	16
2) Synthèse et dégradation du LPA.....	17
3) Récepteurs et signalisation.....	19
B. L'autotaxine (ATX).....	22
1) La famille des NPPs.....	23
2) Structure.....	24
3) Isoformes	26
4) Fonction.....	27
C. Rôles de l'axe ATX/LPA.....	27
1) Invalidation de l'axe ATX/LPA : souris transgéniques.....	27
2) Pathologies associées	29
a) Pathologies inflammatoires	29
b) Cancers	33
II. La physiologie osseuse.....	35
A. Structure de l'os.....	35
B. Composition	36
1) Organisation.....	36
2) Les cellules osseuses.....	37
a) Les ostéoclastes.....	38
b) LPA et ostéoclastes.....	42
c) Les ostéoblastes.....	43
d) LPA et ostéoblastes	46
e) Cellules bordantes et ostéocytes.....	47

C. Le remodelage osseux.....	48
III. Les rhumatismes inflammatoires	51
A. Les articulations.....	51
B. La polyarthrite rhumatoïde.....	53
1) Généralités	53
2) Physiopathologie	54
Théorie Inside-Outside	57
C. Les spondyloarthrites	58
1) Généralités	58
2) Physiopathologie	59
a) HLA-B27.....	59
b) Réponse IL-23/Th17	60
c) Les micro-organismes et le microbiote intestinal.....	61
D. L'atteinte osseuse au cours des rhumatismes inflammatoires.....	62
1) Ostéoimmunologie.....	62
2) La dégradation osseuse.....	64
a) Cas des autoanticorps dans la PR.....	67
b) Inhibition de la formation osseuse dans la PR.....	69
3) La formation osseuse dans la SA.....	69
E. Axe ATX/ LPA et arthrite	70
Objectifs	73
MATERIEL ET METHODES.....	77
A. Expérimentation animale.....	78
1) Animaux.....	78
2) Modèles animaux d'arthrite.....	78
3) Inflammation induite par le LPS.....	79
4) Ovariectomie.....	79
B. Micro-tomographie	80
C. Ostéodensitométrie.....	81
D. Histologie	81
E. Analyses <i>in vitro</i>	83
1) Ostéoclastogénèse murine.....	83
2) Ostéoclastogénèse humaine.....	83
3) Analyses de résorption	84
4) Western Blot.....	85

5) PCR quantitative.....	85
6) Dosage de l'activité lysoPLD de l'ATX plasmatique	86
F. Analyses statistiques	86
RESULTATS.....	87
A. L'autotaxine est un nouveau facteur autocrine contrôlant l'activité ostéoclastique et la perte osseuse induite par l'inflammation.....	88
1) Le TNF et l'inflammation stimulent l'expression d'ATX par les ostéoclastes.....	88
2) L'ATX issue des ostéoclastes et fonctionnellement active au cours de la résorption....	91
3) L'inhibition sélective de l'ATX dérivée des ostéoclastes prévient de la perte osseuse induite par le LPS.....	97
4) La délétion spécifique de l'ATX dérivée des ostéoclastes impacte le volume osseux et le développement des érosions osseuses dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde.....	100
5) L'inhibition pharmacologique de l'activité de l'ATX réduit les érosions focales induites par le TNF et la perte osseuse systémique sans intervenir sur la synovite.....	104
B. La surexpression du TNF induit principalement l'ostéoclastogenèse au site vertébral mais n'induit pas l'apparition de syndesmophytes.....	109
1) Les souris <i>hTNF^{+/-}</i> ne présentent pas de syndesmophytes et d'anomalies de l'espace intervertébral.....	109
2) Les souris <i>hTNF^{+/-}</i> présentent une diminution du volume osseux vertébral.....	111
3) L'ostéoclastogenèse augmente chez les souris <i>hTNF^{+/-}</i>	113
4) La surface ostéoïde augmente chez les souris <i>hTNF^{+/-}</i>	114
5) Les surfaces ostéoclastiques et surfaces ostéoïdes relatives à la surface osseuse augmentent chez les souris <i>hTNF^{+/-}</i>	116
DISCUSSION.....	118
A. L'atteinte osseuse dans la spondylarthrite ankylosante	119
B. La perte osseuse dans la PR et ciblage de l'ATX	121
C. Régulation hormonale et sources d'ATX dans l'os.....	124
ANNEXES	127
A. Liste des publications et présentations.....	128
1) Publications	128
2) Présentations orales.....	129
B. Travaux publiés annexes.....	130
Bibliographie.....	157

Liste des abréviations

ACPA : Anticorps anti-protéines citrullinées	FGF: Fibroblast growth factor
ADP : Adénosine diphosphate	Frz : Frizzled
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens	GPAT : Glycérol phosphate acyltransférase
ATP : Adénosine triphosphate	GPI : Glycosylphosphatidyl inositol
ATX : Autotaxine	HCV : Hepatitis C virus
AxSpA : Spondyloarthrite axiale	HLA-DR : Human leucocytes antigen-antigen D related
BMD : Bone mineral density	HPS : Hématoxyline phloxine safran
BMP : Bone morphogenic protein	HSPG : Héparane sulfate protéoglycanes
BMU : Basic Multicellular Unit	IDS : espace intervertébral
BS/BV : Bone Surface / Bone Volume	IFN γ : Interféron gamma
BV/TV : Bone Volume / Total Volume	IGF : Insulin growth factor
CFU-GM : Colony Forming Unit – Granulocyte Macrophage	IgG : Immunoglobuline G
CIA : Collagen induced arthritis	IL : Interleukine
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	ITAM : Immunorecepteur tyrosine-based activation motif
COX-2 : Cyclo-oxygénase 2	LCAT : Lécithine cholestérol-acyltransférase
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	LDL : Low density lipoprotein
CSF1R : Colony stimulating factor 1 receptor	LPA : Acide lysophosphatidique
CTGT : Connective tissue growth factor	LPAAT : LPA acyltransférase
Ctsk : Cathepsine K	LPAR : Récepteur du LPA
CXCL : Chémokine CXC-motif ligand	LPC : Lysophosphatidylcholine
DAP12 : DNAX associated protein 12 kDa	LPP : Lipide phosphate phosphatase
DKK1: Dickkopf 1	LPR5/6 : Low density receptor related protein 5/6
Dvl : Dishevelled	LPS : Lipopolysaccharide
Edg : Endothelial differentiation gene	L Th : Lymphocyte T helper
EGF : Epithelial Growth Factor	LV : Vertèbre lombaire
FAK : Focal adhesion kinase	
FcR γ : Fc Receptor gamma chain	

M-CSF : Macrophage colony stimulating factor	PR : Polyarthrite rhumatoïde
MAG : Monoacylglycérol	pSpA : Spondyloarthrite périphérique
MAPK : Mitogen activated protein kinase	PTH : Hormone parathyroïdienne
MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin	PTPN22 : Protéine tyrosine phosphatase non récepteur type 22
MMP : Métallopeptidase matricielle	RANKL : Receptor activator of NFκB ligand
MTX : Méthotrexate	RE : Réticulum endoplasmique
N.OB/B.Pm : Number of ostéoclastes/bone perimeter	Runx2 : Runt related transcription factor
NFATC1 : Nuclear factor of activated T cells 1	S1P : Sphingosine 1 phosphate
NFκB : Nuclear factor κB	SA : Spondylarthrite ankylosante
NK : Natural Killer	sFRP : Soluble Frz related protein
NPP: Nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase	SIBLING : Small integrin binding ligand N linked glycoprotein
OC.Le : Osteoclast length	SMB : Somatomédine B
OC.S/BS : Osteoclast surface/bone surface	SNP : Single nucleotide polymorphism
OPG : ostéoprotégérine	SpA : Spondyloarthrite
OS.S/BS : Osteoclast surface/bone surface	Tb.N : Trabecular number
OSCAR : Osteoclast associated receptor	Tb.Sp : Trabecular spacing
OVX : Ovariectomie	Tb.Th : Trabecular thickness
PA : Acide phosphatidique	TGFβ : Transforming growth factor β
PAD : peptidyl arginine déiminase	TNF : Tumor necrosis factor
PDE : Phosphodiesterase	TRAP : Phosphatase acide tartrate résistante
PI3K : Phosphoinositide 3 phosphate kinase	TREM2 : Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
PLA : Phospholipase A	WIF1 : Wnt inhibitory receptor 1
PLD : Phospholipase D	Wnt : Wingless integration site
PPARγ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	WT : Wild type
	ZOL : Zolédronate

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation de la molécule de LPA (1 Oléoyl-LPA C18 :1).....	16
Figure 2: Représentation des voies de synthèse et de dégradation du LPA.....	18
Figure 3: Voies de signalisation majeures en réponse au LPA.	21
Figure 4 : La famille des NPPs.....	23
Figure 5 : Organisation schématique et représentation 3D des domaines de l'ATX humaine.	24
Figure 6 : Organisation schématique et représentation 3D de la poche hydrophobique ou tunnel ouvert, susceptible de recevoir le LPC et permettre la sortie du LPA.....	25
Figure 7 : Les différentes isoformes de l'autotaxine humaine.....	26
Figure 8 : Structure d'un os long humain adulte.....	36
Figure 9 : Etapes de la différenciation ostéoclastique.....	39
Figure 10 : Signalisation des voies RANK/RANKL et ITAM.....	40
Figure 11 : Ultrastructure et fonction des ostéoclastes.	42
Figure 12 : Les voies de signalisation Wnt dans l'ostéoblaste.....	44
Figure 13 : La différenciation ostéoblastique.....	45
Figure 14 : Représentation schématique du processus de remodelage osseux humain.	48
Figure 15: Représentation schématique d'une articulation synoviale.	52
Figure 16 : Photographie et radiographie de mains de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.....	53
Figure 17 : P. gingivalis et citrullination.....	55
Figure 18 : La destruction osseuse au cours de la polyarthrite rhumatoïde.....	57

Figure 19 : L'IL-23 et les cellules T résidentes de l'enthèse favorisent l'enthésite et l'ostéoprolifération dans la spondylarthrite ankylosante	62
Figure 20 : Le TNF et l'inflammation stimulent l'expression de Enpp2 par les ostéoclastes.	90
Figure 21 : L'ATX issue des ostéoclastes n'affecte pas directement l'ostéoclastogénèse.....	92
Figure 22 : L'ATX issue des ostéoclastes est fonctionnellement impliquée au cours de la résorption.....	94
Figure 23 : Les souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes ne présentent pas de phénotype osseux.	96
Figure 24 : Les souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes sont protégées de la perte osseuse induite par le LPS.....	99
Figure 25 : Les souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes sont protégées de la perte osseuse systémique et des érosions osseuses induites par le transfert de sérum K/BxN.....	102
Figure 26 : Le blocage de l'activité de l'ATX n'a pas d'effet sur la synovite induite par le TNF.....	105
Figure 27 : L'inhibition de l'activité de l'ATX prévient en partie de l'érosion osseuse et de la perte osseuse systémique induite par le TNF.....	106
Figure 28 : La morphologie des disques intervertébraux est inchangée chez les souris hTNF ^{+/-} par rapport aux souris WT.....	110
Figure 29 : Les souris hTNF ^{+/-} présentent une diminution du volume osseux trabéculaire vertébral.....	111
Figure 30 : La quantification des paramètres microarchitecturaux par μ -CT a révélé une faiblesse architecturale de l'os trabéculaire.	112

Figure 31 : La différenciation ostéoclastique est augmentée dans l'os trabeculaire.....	114
Figure 32 : La surface ostéoïde augmente chez les souris hTNF^{+/-}.....	115
Figure 33 : Les surfaces ostéoclastiques et ostéoides relatives à la surface osseuse augmentent chez les souris hTNF^{+/-}.....	117
<i>Figure 1:</i> L'inhibition de l'ATX ne protège pas de la perte osseuse induite par ovariectomie.....	123
Figure 35 : Ciblage de l'ATX issue des ostéoclastes dans la perte osseuse en conditions inflammatoires.	125

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des récepteurs du LPA.	20
Tableau 2: Phénotypes des souris invalidées pour ATX et les récepteurs du LPA.....	29
Tableau 3 : Modèles expérimentaux démontrant l'implication de l'axe ATX-LPA dans la PR.....	72
Tableau 4 : Amorces utilisées dans cette étude.....	86

INTRODUCTION

I. Acide lysophosphatidique et autotaxine

A. L'acide Lysophosphatidique (LPA)

L'acide lysophosphatidique (1- ou 2-acyl-sn-glycerol-3-phosphate) est le plus simple des phospholipides. Historiquement, le LPA était considéré uniquement comme intermédiaire métabolique de la synthèse de phospholipides membranaires [1]. Depuis plusieurs années, il a été démontré comme étant une molécule de la signalisation lipidique agissant dans de nombreux processus cellulaires (motilité, croissance, survie) via l'activation de six récepteurs transmembranaires spécifiques couplés aux protéines G (LPA₁-LPA₆) [2].

1) Structure et localisation

L'acide lysophosphatidique est un glycérophospholipide constitué d'un squelette glycérol possédant un groupement hydroxyle en position sn-2 (ou sn-1), un groupement phosphate libre en position sn-3, et un acide gras en position sn-1 (ou sn-2). Les acides gras composant le LPA chez les mammifères sont majoritairement à longues chaînes saturées (C18 :0, C16 :0) ou insaturées (C18 :1, C20 :4) [3]. La forme oléoyl (C18 :1) est la plus couramment utilisée dans les études expérimentales (figure 1).

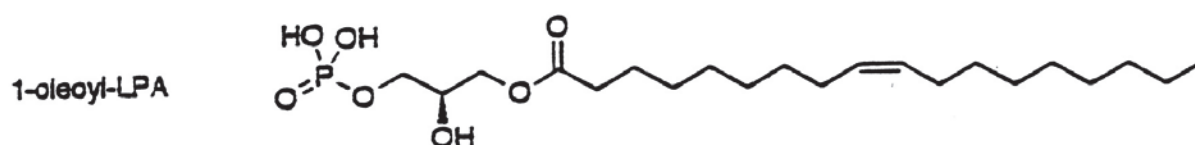


Figure 2 : Représentation de la molécule de LPA (1 Oléoyl-LPA C18 :1) (Hooks et al., 1998 ([4])).

Les concentrations de LPA mesurées dans le sang varient de 0,1 μ M dans le plasma à 10 μ M dans le sérum. Le LPA présent dans le sang est non pas sous forme libre, mais associé à des protéines de transport telles que l'albumine, la gelsoline ou des lipoprotéines de faible densité [5,6]. La présence de LPA a été mise en évidence dans le liquide folliculaire ainsi que dans le milieu interstitiel du tissu adipeux sous-cutané humain avec comme origine cellulaire les adipocytes [7]. Les plaquettes

activées, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les adipocytes et certaines cellules cancéreuses produisent du LPA [8,9]. La présence de LPA dans le milieu extracellulaire ne peut résulter que d'un transfert actif ou d'une synthèse dans le milieu extracellulaire. Il existe des protéines de liaison au LPA mais aucun transporteur spécifique n'a encore été identifié [10].

2) Synthèse et dégradation du LPA

On distingue deux voies majeures de synthèse du LPA (figure 2). La première implique la dégradation des acides phosphatidiques (PA) membranaires par les phospholipases A1 et A2 (PLA₁ et PLA₂) [11]. En conditions physiologiques, les PAs sont peu accessibles car situés sur la face interne du double feuillet de la membrane plasmique. En conditions inflammatoires, les membranes de certaines cellules (plaquettes, érythrocytes) peuvent subir des remaniements (flip-flop ou production de micro vésicules), rendant les PAs accessibles [11]. Certaines phospholipases peuvent également être sécrétées comme la PLA₂, dont l'action dépend de sa fixation à la membrane plasmique [12].

La deuxième voie, plus récemment identifiée, a été décrite comme la voie majeure de production du LPA dans l'organisme [11]. Elle met en jeu un type particulier de phospholipase D (PLD) : l'autotaxine (ATX). Cette voie est à l'origine de la production du LPA dans la circulation sanguine. En effet, le sérum et le plasma dépourvus d'ATX ne présentent aucune trace de LPA [13]. Le principal substrat de l'ATX est la lysophosphatidylcholine (LPC), notamment libérée par les plaquettes activées [14]. La concentration de LPC dans la circulation sanguine est d'environ 400µM. On retrouve également le LPC dans divers liquides biologiques, ascites, ou liquide folliculaire, principalement sous forme liée à l'albumine [15]. Par exemple, dans le plasma, le LPC est produit via l'hydrolyse de la phosphatidylcholine, aussi connue sous le nom de lécithine, issue de l'alimentation et contenue dans les lipoprotéines, par l'action combinée de la lécithine-cholestérol-acyl-transférase (LCAT) et de la PLA₂ [15].

Via une troisième voie, le LPA peut être généré par l'acylation du glycérol 3-phosphate par la glycérolphosphate acyltransférase (GPAT) et la phosphorylation du monoacylglycérol (MAG) par les monoacylglycérol kinases (MAG kinases). Cependant, le LPA produit par ces voies semble servir uniquement de précurseur

pour la synthèse des glycérolipides intracellulaires, plutôt que d'une source de médiateur de signalisation extracellulaire [10].

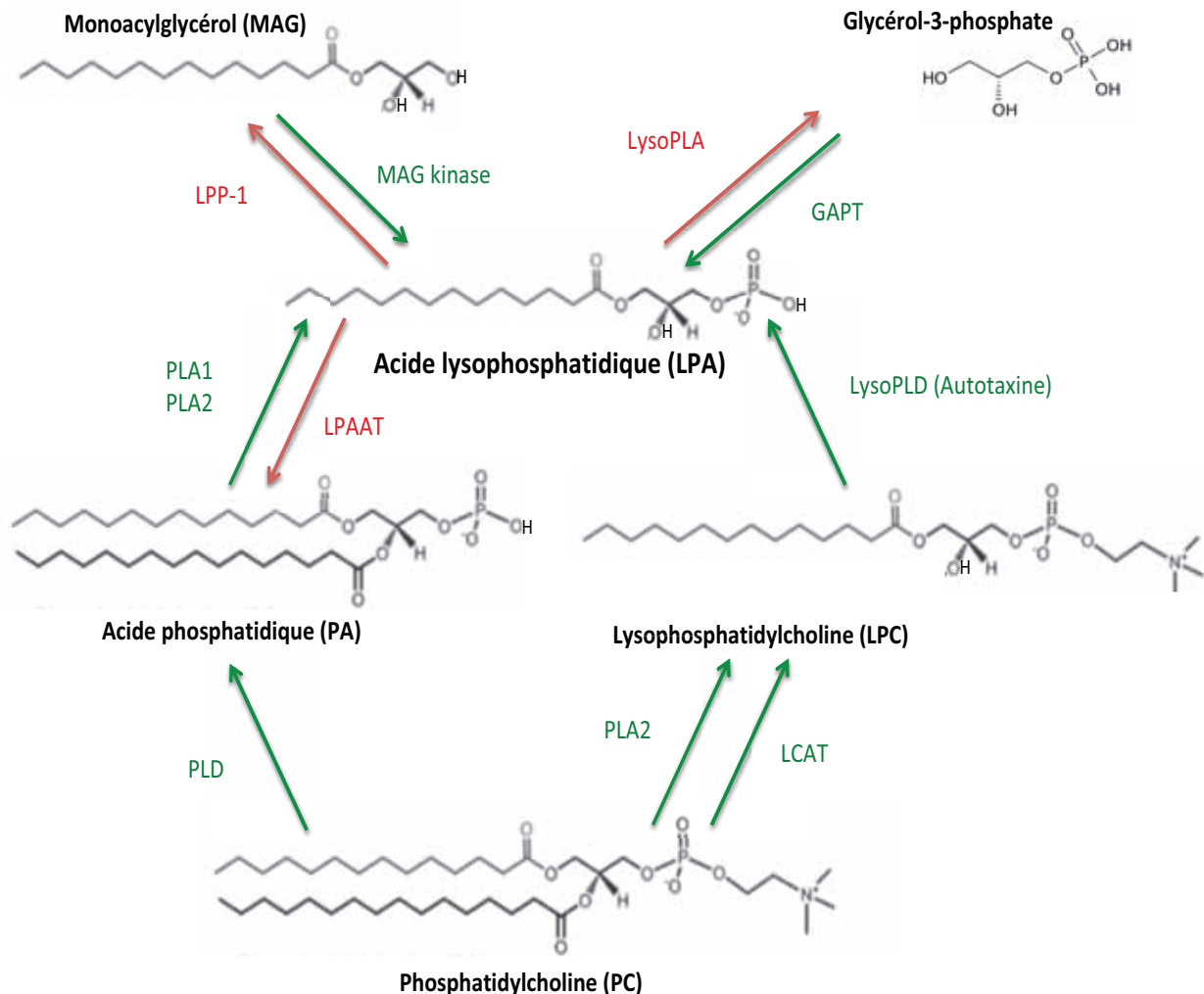


Figure 3: Représentation des voies de synthèse et de dégradation du LPA.

La dégradation du LPA est médiée par plusieurs classes d'enzymes dont trois types de lipide phosphate phosphatases (LPPs) qui déphosphorylent plus de 90% du LPA [16]. La LPA-acyltransférase (LPAAT), principalement retrouvée au niveau des membranes plasmiques et des microsomes, converti le LPA en PA [17]. Enfin, le LPA peut être hydrolysé et converti en glycérol-3-phosphate par les lysophospholipases spécifiques du LPA (lysoPLA) (figure 2).

3) Récepteurs et signalisation

L'effet pléiotropique du LPA s'explique par sa capacité à se lier à un grand nombre de récepteurs transmembranaires. On dénombre à ce jour six récepteurs au LPA, possédant tous sept domaines transmembranaires, conformation typique des récepteurs couplés aux protéines G. La partie cytoplasmique de ces récepteurs interagit avec des protéines G hétérodimériques ($\alpha\beta\gamma$). Ils sont distribués en deux sous-familles : les récepteurs Edg (Endothelial differentiation gene), et les récepteurs purinergiques (tableau 1).

Les récepteurs de la famille Edg se distinguent par leur sélectivité respective pour le LPA et la sphingosine-1-phosphate (S1P). On distingue trois sous-types de récepteurs au LPA : LPA₁ (Edg2), LPA₂ (Edg4) et LPA₃ (Edg7) qui possèdent des domaines transmembranaires très homologues (86%) [18]. Le récepteur LPA₁ humain est exprimé au niveau basal dans la plupart des tissus, avec une forte expression au sein du système nerveux [19]. Les niveaux d'expression de LPA₂ et LPA₃ sont bien plus faibles. LPA₂ est notamment retrouvé au niveau des leucocytes, de la rate et des testicules, alors que LPA₃ est exprimé au niveau du cœur, du pancréas, de la prostate et du foie [19].

Les récepteurs purinergiques sont capables d'être stimulés par des nucléotides tels que l'adénoside diphosphate (ADP) ou l'adénosine triphosphate (ATP). Dans cette famille se trouvent les récepteurs LPA₄ (p2y9, GPR23), LPA₅ (GPR92/GPR93) et LPA₆ (p2y5) qui possèdent 35% d'homologie [20]. Chez l'Homme, LPA₄ est principalement exprimé par le cœur et le foie [20]. Chez la souris, *lpar4* est impliqué dans le développement embryonnaire et est également exprimé au niveau du cœur, des ovaires, de la peau et de la moelle osseuse [21]. LPA₅ est très exprimé au niveau de la rate, et une expression basale est détectée dans le cœur, le colon, le foie et le placenta. LPA₆ est le dernier récepteur à avoir été classé parmi les récepteurs du LPA [20]. Il présente une forte homologie avec les récepteurs P2Y et est le seul récepteur du LPA associé à une pathologie humaine, l'hypertrichose simple, correspondant à une pilosité excessive [20]. Enfin, lorsqu'un type cellulaire exprime plusieurs types de récepteurs au LPA, leur sensibilité respective est peu connue.

Tableau 1 : Caractéristiques des récepteurs du LPA.

Récepteurs	Protéines G	Réponses cellulaires	Affinités du LPA
LPA1/Edg2	G _{i/o} , G _{q/11} , G _{12/13}	Rétractation neurites [22], inhibition AC [18] , activation SRE [22], augmentation [Ca ²⁺] _i , production IP, activation MAPK [18], formation fibres de stress, incorporation BrdU [22], inhibition apoptose, libération acide arachidonique [18].	18:2>18:3>20:4>18:1>16:0>18:0
LPA2/Edg4	G _{i/o} , G _{q/11} , G _{12/13}	Idem LPA1	18:3>20:4>18:2=18:1>18:0>16:0
LPA3/Edg7	G _{i/o} , G _{q/11}	Inhibition AC, augmentation [Ca ²⁺] _i , production IP, activation MAPK, libération acide arachidonique	18:3>18:2>18:1>20:1>18:0>16:0
LPA4/p2y9/GRP23	G _{q/11} , G _{12/13} , G _s , (G _i)	Stimulation AC, augmentation [Ca ²⁺] _i [23], rétractation neurites, agrégation cellulaire [23], formation fibres de stress [24].	18:1>18:0>16:0>14:0
LPA5/GPR92/GRP93	G _{q/11} , G _{12/13}	Stimulation AC, augmentation [Ca ²⁺] _i , production IP, rétractation neurites [25].	16:0>18:3>18:2>18:1=20:4
LPA6/p2y5	G _{12/13} , (G _s), (G _i)	Activation CRE, rétractation neurites, bourgeonnement membranes [26].	18:2>sn2-18:1>sn1-18:1>20:4>18:0>16:0>14:0
PPARγ			LPA insaturés

AC : adénylate cyclase, **BrdU** : bromodeoxyuridine, **CRE** : cAMP response element, **IP** : inositol phosphate, **MAPK** : mitogen-activated protein kinase ; **SRE** : serum responsive element.

Les récepteurs du LPA activent un grand nombre de voies de transduction du signal en fonction de la nature des protéines G impliquées (figure 3).

Selon le récepteur engagé, une ou plusieurs sous-unité G α (G_{12/13}, G_{q/11}, G_{i/o} et G_s) interagiront avec le domaine intracellulaire du récepteur et activeront de multiples voies de signalisation [27] dont la mobilisation du calcium intracellulaire, l'inhibition ou l'activation l'adénylate cyclase, la stimulation de la voie des MAP kinases (Mitogen-activated Protein Kinases) via des voies sensibles (G_{i/o}) ou insensibles (G_{q/11} et G_{12/13}) à la toxine pertussique ou encore l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc [20].

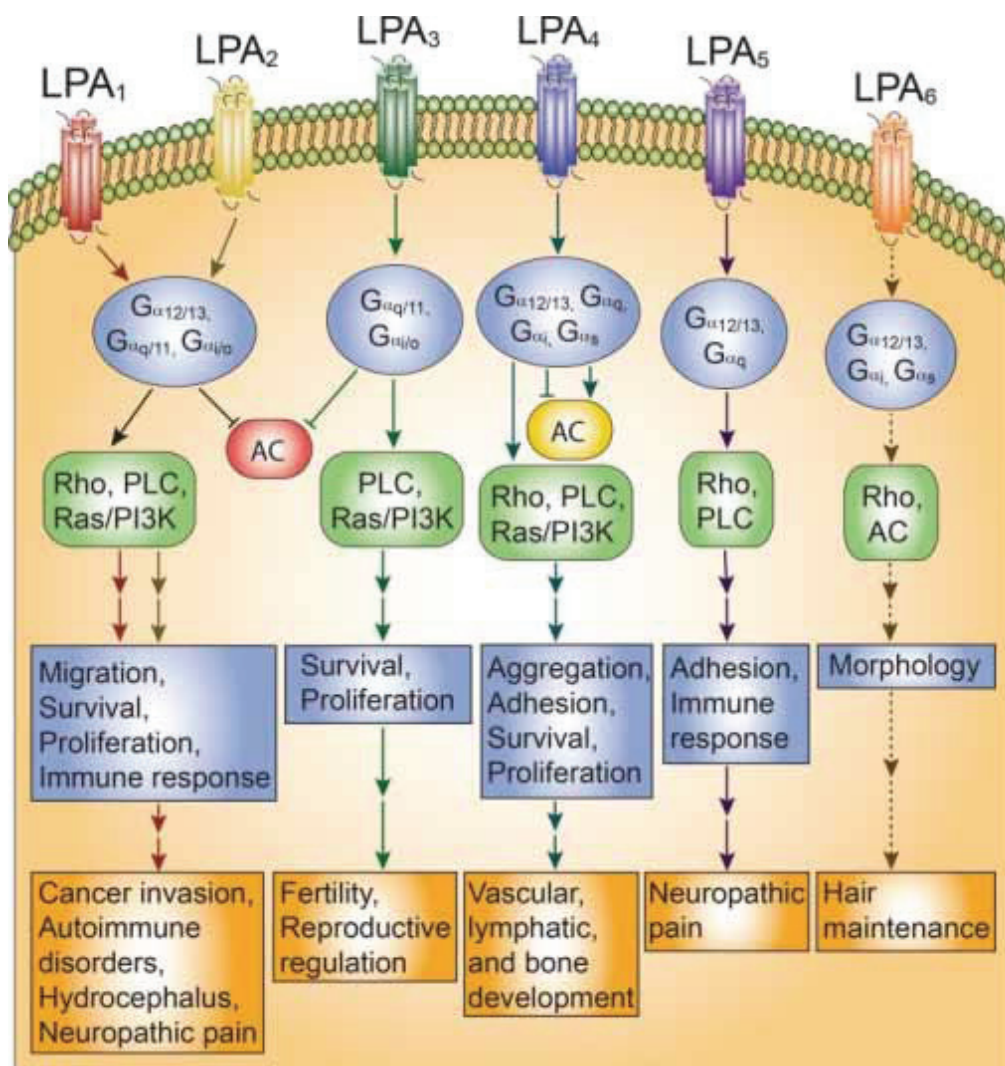


Figure 4: Voies de signalisation majeures en réponse au LPA [28]). Interaction des récepteurs du LPA avec les différentes familles de protéines G et les effets en aval. AC : adénylate cyclase, PI3K : phosphoinositide 3 kinase, PLC : phospholipase C.

Ceci permet d'illustrer l'activité pléiotropique du LPA en fonction des récepteurs impliqués. Cependant, il existe un deuxième niveau de complexité concernant les effets cellulaires induits par le LPA. En effet, outre son rôle de médiateur extracellulaire, le LPA peut également agir comme messenger intracellulaire en activant des récepteurs nucléaires comme PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) et induire la transcription de gènes impliqués dans le remodelage vasculaire [29]. Il a également été démontré que le récepteur LPA₁ pouvait être transloqué au noyau où il serait impliqué dans la transcription de gènes de

l'inflammation comme la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) [30]. Ces résultats restent cependant controversés et auraient besoin d'être confirmés.

Enfin, la structure du LPA semble influencer sa liaison avec les différents récepteurs (tableau 1). Les espèces biologiquement actives contiennent un acide gras à chaîne longue et les formes insaturées sont plus actives que les saturées. Par exemple, LPA₁ présente une plus grande affinité pour la forme 18:2, LPA₂ et LPA₃ pour la forme 18:3 et PPAR γ ne répond qu'aux formes insaturées. Ces différences d'affinité laissent à penser qu'il existe un niveau supplémentaire de complexité dans la signalisation induite par le LPA en fonction de la prévalence du récepteur exprimé au sein des tissus [31].

B. L'autotaxine (ATX)

L'autotaxine (ATX) est une glycoprotéine de 125 kDa, identifiée comme facteur de mobilité autocrine dans le milieu conditionné des cellules A2058 de mélanome humain [32]. D'importantes quantités d'ARNm d'ATX ont été détectées dans le cerveau, les poumons, l'utérus et au niveau du placenta [33]. Elle est également exprimée par les cellules endothéliales des ganglions lymphatiques, où elle contrôle l'entrée des lymphocytes T [34]. L'ATX est abondamment exprimée dans les liquides biologiques comme le plasma (environ 200 μ M), le sérum, l'urine, les liquides séminaux et les fluides cérébrospinaux. L'équipe d'Umezū-Goto a montré que son activité lysophospholipase D (lysoPLD) était à l'origine de l'hydrolyse du LPC permettant la formation de LPA [12]. Aujourd'hui, l'ATX est décrite comme la source majeure de LPA dans la circulation sanguine. Sa demi-vie est cependant très courte et l'ATX est rapidement dégradée par le foie [35]. Il a également été démontré que l'ATX était capable d'hydrolyser la sphingosylphosphorylcholine (SPC) en sphingosine-1-phosphate (S1P), bien que la source majeure de S1P extracellulaire provienne de la phosphorylation intracellulaire de la sphingosine par la sphingosine kinase [36]. Cependant cet effet est controversé car s'il a été démontré *in vitro*, il ne l'a pas été *in vivo*. Le S1P est un lysophospholipide bioactif, structuellement similaire au LPA et connu pour induire une variété de réponses biologiques dans différents types cellulaires, via sa fixation sur ses récepteurs spécifiques intermembranaires couplés aux protéines G (S1PR₁₋₅) [37].

1) La famille des NPPs

L'ATX, ou NPP2, appartient à la famille des nucléotides pyrophosphatases phosphodiesterases (NPPs), qui, en règle générale, hydrolysent les ponts pyrophosphates et phosphodiester des nucléotides comme l'ATP et ses dérivés. Au sein de la famille des NPPs (composée de 7 membres : NPP1-7), l'ATX se distingue des autres protéines car elle est la seule à posséder une activité lysoPLD. Les NPPs ont des structures très similaires, avec un large domaine catalytique (figure 4). NPP1 et NPP3 sont des glycoprotéines constituées d'un domaine transmembranaire et sont extracytosoliques (orientées vers l'extérieur de la cellule). NPP4 à NPP7 sont intracytosoliques (orientées vers l'intérieur de la cellule). NPP4 et NPP5 possèdent un domaine transmembranaire alors que NPP6 et NPP7 sont liés à la membrane via une ancre glycosylphosphatidyl inositol (GPI) [38]. L'ATX, quant à elle, est une protéine sécrétée, possédant un domaine hydrophobique en N-terminal qui fonctionne comme un peptide signal. Ainsi, elle est synthétisée sous forme de pré-enzyme avant d'être clivée puis sécrétée [39].

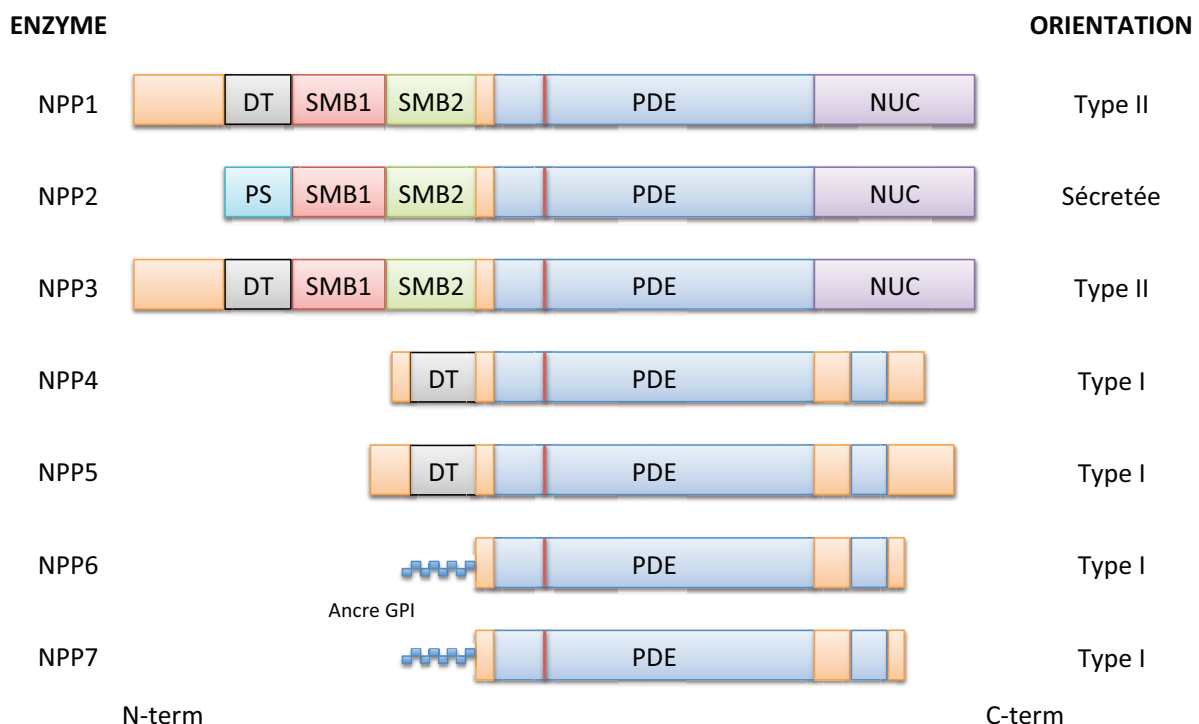


Figure 5 : La famille des NPPs (d'après Nakanaga et al., 2010 [40]). Les sept NPPs possèdent un domaine catalytique nucléase structuellement similaire (NUC). NPP1 et NPP3 ont une orientation de type II (C-term extracytosolique) alors que NPP4 à NPP7 sont de type I (C-term intracytosolique). NPP2 (ATX) est la seule protéine sécrétée. Le trait rouge représente le site catalytique. DT : domaine transmembranaire, PS : peptide signal, SMB : somatomédine B, PDE : phosphodiesterase.

2) Structure

L'ATX est constituée de deux domaines somatomédine-B (SMB) en N-terminal, un domaine catalytique central phosphodiesterase (PDE, environ 400 acides aminés) et un domaine nucléase catalytique (NUC) inactif en C-terminal [41]. Deux études cristallographiques réalisées récemment révèlent une organisation complexe : le domaine central PDE interagit à la fois avec les domaines SMB et avec le domaine NUC [41,42]. La rigidité structurale du domaine catalytique est renforcée par la présence de N-glycosylation (N542) et d'un pont disulfure entre le domaine PDE et NUC. De plus, l'extrémité du domaine PDE forme une sorte de « lasso » qui s'enroule à proximité du domaine NUC et pénètre le pli ainsi formé de l'autre côté (figure 5). L'ATX est fortement N-glycosylée, notamment en N140 et en N524. Cette dernière, résidu très conservé du domaine catalytique, semble essentielle à l'activité de l'ATX[41].

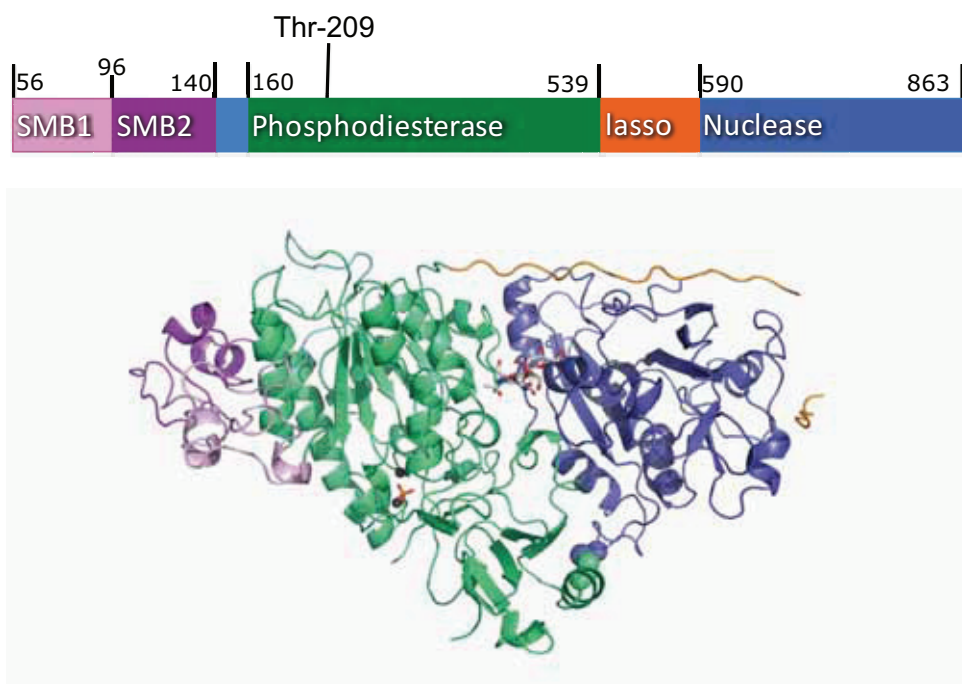


Figure 6 : Organisation schématique et représentation 3D des domaines de l'ATX humaine (d'après Nishimasu et al., 2011 (40)).

NPP1 et l'ATX possèdent un domaine catalytique structuralement similaire. Leur activité se localise au niveau d'une thréonine nucléophile, en position 209 pour l'ATX humaine et en position 256 pour NPP1. Elle est située à proximité de deux ions zinc

et entourée de deux chaînes latérales portant des résidus histidine (His) et acide asparatique (Asp) très conservés. Ces acides aminés s'organisent pour former un sillon peu profond, capable de fixer des substrats nucléotidiques pour NPP1 et des groupements glycérol de substrats lysophosphotidiques pour l'ATX [42]. Contrairement à NPP1 et aux autres phospholipases, le domaine catalytique d'ATX est constitué d'une poche hydrophobique située en dessous du sillon. D'un volume de 800 angstroms et d'une profondeur de 15 angstroms, cette poche montre une forte plasticité structurelle permettant d'accueillir différents phospholipides, comme le LPC circulant ou différentes formes de LPA [42]. Cette structure est donc facilement accessible, ce qui contraste avec l'organisation habituelle des autres phospholipases. En effet, leur site actif est fermé par une sorte de « couvercle » ou une boucle inhibitrice, uniquement ouverte lors de l'interaction avec les membranes plasmiques comme dans le cas de PLA2 [43]. Le sillon et le domaine catalytique sont séparés par un « tunnel ouvert » majoritairement hydrophobique même si une portion est hydrophile [41,42]. Il a été suggéré que ce tunnel permettrait la sortie et le relargage du LPA à proximité de ses récepteurs [44]. Sa proximité avec le site catalytique laisse supposer son implication dans l'activité catalytique de l'ATX et/ou dans l'attraction du LPC [44] (figure 6).

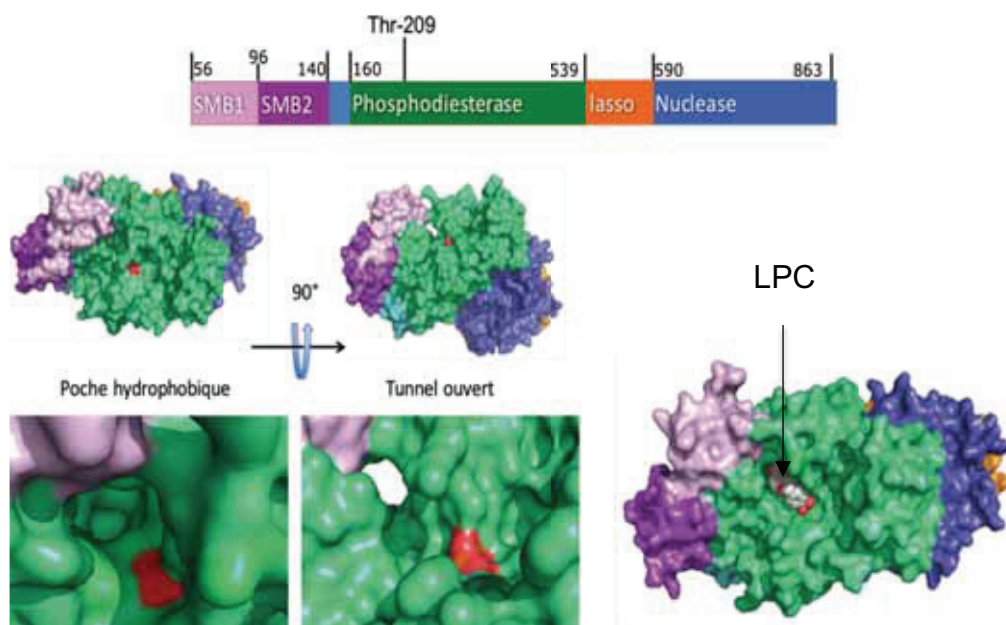


Figure 7 : Organisation schématique et représentation 3D de la poche hydrophobique ou tunnel ouvert, susceptible de recevoir le LPC et permettre la sortie du LPA.

3) Isoformes

Le gène, *Enpp2*, codant pour l'ATX humaine est composé de 27 exons. L'épissage alternatif de trois exons (exons 12, 19 et 21) conduit à la formation de cinq isoformes : ATX α , ATX β , ATX γ , ATX δ et ATX ϵ qui diffèrent à la fois dans leur structure mais également dans la localisation de leur expression [45][46] (figure 7).

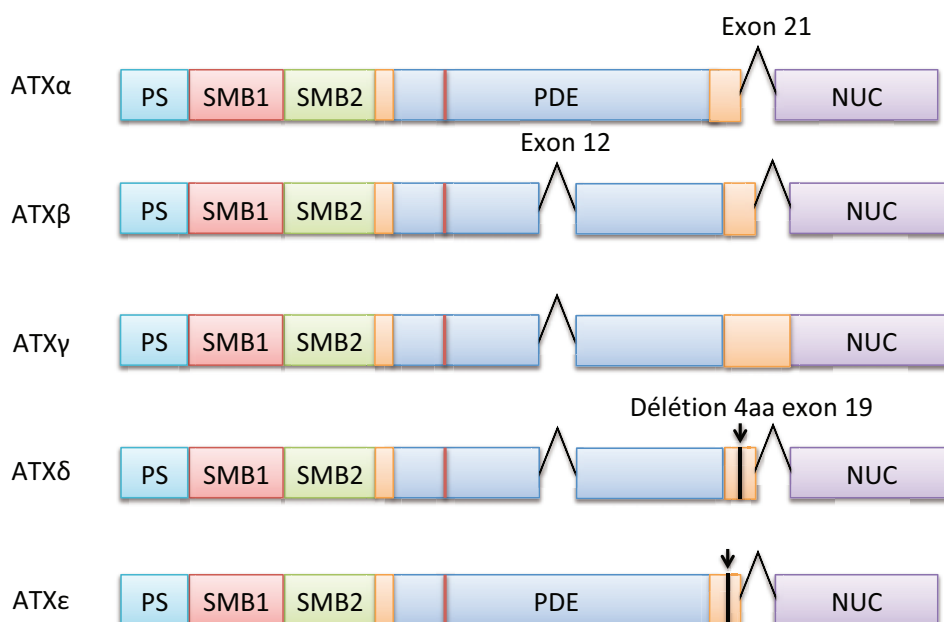


Figure 8 : Les différentes isoformes de l'autotaxine humaine.

Les formes ATX β et ATX γ sont les deux isoformes majoritaires. De récentes études sur la structure cristallographique de l'autotaxine ont montré que la plupart des domaines structuraux de ces deux isoformes étaient identiques, à tel point qu'elles sont identiques d'un point de vue biochimique. ATX β est la forme majeure, exprimée dans la plupart des tissus et dans le plasma. Elle est à l'origine de la production de LPA dans la circulation sanguine [47] ; ATX γ est l'isoforme spécifique du cerveau, principalement exprimée par les oligodendrocytes. ATX α et ATX δ sont les isoformes minoritaires d'ATX [48]. ATX α , historiquement identifiée dans les cellules humaines de mélanome, a montré un faible pouvoir catalytique par rapport aux autres isoformes, lui suggérant d'autres rôles que celui d'une enzyme. Les autres formes sont catalytiquement actives bien que l'on ne sache pas encore comment elles sont respectivement utilisées.

4) Fonction

Les domaines SMB sont connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine. Les deux domaines SMB sont structurellement similaires mais présentent des interactions intra- et intermoléculaires différents. SMB1 est impliqué dans la formation du tunnel et SMB2, en surface, semble être en meilleure position pour assurer la fixation aux protéines [41,49]. En effet, il a été démontré que l'ATX se fixe aux plaquettes activées et aux autres cellules via les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ par l'intermédiaire de SMB2 [50]. Cependant, des études de mutagenèse dirigées ont montré que la fixation de l'ATX serait indépendante de ce domaine, qui semble dépourvu de la flexibilité nécessaire à l'interaction [41]. Il semblerait que l'interaction dépende de deux acides aminés : un acide glutamique en position 109 et une histidine en position 119 [49]. L'ATX se lie également aux lymphocytes T via les intégrines $\alpha 4\beta 1$, une interaction induisant une augmentation de la motilité des lymphocytes ainsi que la transmigration du sang vers les organes lymphoïdes secondaires, en réponse à une production locale de LPA [51]. Le site de fixation de l'ATX reste inconnu mais il faut noter qu'un motif connu de fixation aux intégrines, le motif Acide asparatique-Valine (LVD) est présent au sein du domaine PDE et que ce domaine est très exposé et probablement accessible pour l'interaction avec les intégrines [44]. L'ensemble de ces données permet de supposer que l'ATX est maintenue à proximité des membranes cellulaires, favorisant la production locale de LPA qui agirait de façon autocrine ou paracrine sur ses récepteurs. Enfin, l'ATX peut être purifiée par chromatographie d'affinité via l'utilisation de colonnes d'héparine. Ceci indique donc que l'ATX se fixe à l'héparine, suggérant qu'elle pourrait potentiellement interagir avec les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs), à la surface cellulaire ou dans la matrice extracellulaire et ainsi contribuer à la production locale de LPA [52].

C. Rôles de l'axe ATX/LPA

1) Invalidation de l'axe ATX/LPA : souris transgéniques

L'inactivation du gène *Enpp2* chez la souris est létale au stade embryonnaire E 9,5 [53–55] en raison de défauts de vascularisation du sac embryonnaire et de l'embryon lui-même ainsi que d'une malformation du tube neural. Les souris *Enpp2*^{-/-}

présentent un phénotype similaire à celui des souris déficientes pour le gène codant la protéine Gα13. Ce phénotype semble lié à une perte de migration dépendante de la voie Gα13-RhoA, activée par les récepteurs du LPA [55,56]. Cependant, les phénotypes des souris déficientes pour les récepteurs du LPA sont moins sévères (Tableau 2). L'invalidation des récepteurs LPA₁ à LPA₃, ou le triple KO *lpar1/lpar2/lpar3* sont viables et ne présentent pas de malformations vasculaires. Néanmoins, les souris *lpar4*^{-/-} ont un taux de survie diminué car ces animaux présentent des hémorragies et/ou oedèmes dans plusieurs organes et ce, à différents stades embryonnaires [57]. Dès lors, on peut imaginer que le phénotype des souris *Enpp2*^{-/-} pourrait en partie être attribué au récepteur LPA₄, sans exclure l'implication potentielle d'autres récepteurs au LPA.

L'axe ATX/LPA joue également un rôle dans la neurogenèse. En effet, les défauts de fermeture du tube neural chez les animaux *Enpp2*^{-/-} sont attribués à une carence locale en ATX. De façon intéressante, l'addition de LPA exogène aux embryons *in vitro* permet la fermeture du tube neural [53]. Des études menées chez le poisson zèbre ont également démontré l'implication de l'ATX dans la différenciation des oligodendrocytes au cours du développement du cerveau postérieur [58]. Enfin, les souris hétérozygotes *Enpp2*^{+/-} sont viables et les taux sériques d'ATX et de LPA sont diminués de moitié par rapport aux souris sauvages. Ces animaux présentent une hypersensibilité à la vasoconstriction induite par l'hypoxie et développent une hypertension pulmonaire mais ils ne présentent pas de phénotype lourd, malgré la diminution des taux d'ATX et de LPA [59].

L'étude de la fonction de l'ATX chez les individus adultes est difficile en raison du phénotype léthal des souris *Enpp2*^{-/-}. L'ATX étant exprimée dans de nombreux tissus (cerveau, poumons, reins, intestin, placenta, ovaires, ...), l'utilisation de souris avec des délétions conditionnelles est utile pour comprendre le rôle de l'ATX à l'âge adulte.

Tableau 2: Phénotypes des souris invalidées pour ATX et les récepteurs du LPA.

Gènes	Létalité	Phénotypes
Lpar1	Semi-létal	Dysmorphie cranio-faciale Taille réduite Problèmes à l'allaitement (défaut de succion) [60] Apoptose accrue des cellules nerveuses de Schwann du nerf sciatique Schizophrénie [61] Inhibition douleur neuropathique Inhibition différenciation adipocytaire [62] Diminution masse osseuse [63]
Lpar2	Viable	Hypersensibilité aux radiations de la crypte intestinale Atténuation tumorigénèse du colon [64]
Lpar3	Viable	Retard développement embryonnaire Implantation embryonnaire retardée Hypertrophie du placenta [65]
Lpar4	Semi-létal	Migration accrue des fibroblastes lors d'une stimulation par le LPA Dilatation vaisseaux sanguins et lymphatiques Oedèmes sévères Epanchement péricardique, hémorragies [66] Augmentation volume osseux
Lpar5	Viable	Inhibition douleur neuropathique [67]
Lpar6	NC	NC
Enpp2	Létal	Défauts vascularisation [55] Défauts fermeture tube neural [53]

2) Pathologies associées

L'étude des souris invalidées pour l'ATX ou les récepteurs du LPA a permis de mieux caractériser l'importance de l'axe ATX/LPA dans certains processus pathologiques. La première fonction identifiée du LPA était son action sur l'agrégation plaquettaire [68]. Dès lors, le LPA a été décrit dans la régulation de plusieurs processus biologiques telles que les pathologies inflammatoires et les cancers.

a) Pathologies inflammatoires

L'axe ATX/LPA a été décrit dans un grand nombre de pathologies inflammatoires telles que la fibrose pulmonaire et hépatique, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et la polyarthrite rhumatoïde.

- **Fibrose pulmonaire et fibrose hépatique**

L'axe LPA/ATX a été décrit comme ayant une implication dans la fibrose pulmonaire idiopathique et notamment via LPA₁ [69]. En effet, les souris *lpar1*^{-/-} sont résistantes à cette maladie et des taux de LPA élevés ont été mesurés dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires de patients atteints de fibrose pulmonaire ainsi que dans des modèles murins et le traitement de ces souris par un inhibiteur de LPA₁ inhibe cette fibrose. Plus récemment, il a été démontré que le LPA, via LPA₁ et LPA₃ stimule la prolifération des fibroblastes pulmonaires stimulant l'expression de TGF-β1 (transforming growth factor) et de CTGT (connective tissue growth factor). L'utilisation du VPC12249, un inhibiteur de LPA₁ et LPA₃, a permis une atténuation de la fibrose pulmonaire suggérant l'implication de ces récepteurs au cours de cette maladie [70]. La délétion génétique conditionnelle de l'ATX dans les cellules épithéliales et les macrophages des bronchioles diminue la gravité de la fibrose et l'inhibition pharmacologique atténue le développement de la maladie dans des modèles murins de fibrose pulmonaire [71]. Enfin, GLPG1690, un inhibiteur de l'ATX est actuellement étudié dans un essai clinique de phase II pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique [72].

L'hépatite C est une maladie infectieuse du foie transmissible par le sang due au virus HCV (Hepatitis C virus). L'infection est caractérisée par une inflammation du foie (hépatite), souvent asymptomatique mais pouvant évoluer vers une hépatite chronique voire une cirrhose (fibrose cicatricielle) et secondairement un cancer du foie. Les patients atteints d'hépatite C chronique présentent des taux sériques de LPA et d'ATX élevés, et une corrélation a été établie entre les niveaux d'ATX/LPA et le grade histologique de la fibrose hépatique [73]. Cette augmentation est également retrouvée dans des modèles de rat de fibrose chronique du foie induite par le tétrachlorométhane, dans des fibroses aiguës induites par diméthylnitrosamine et chez 70% des rats ayant subi une hépatectomie [74]. Un mécanisme a été proposé pour expliquer ce phénomène : en situation physiologique, l'ATX est captée par les sinusoides hépatiques pour y être dégradée au sein des cellules endothéliales sinusoidales. En cas de fibrose, les cellules étoilées du foie produisent de la matrice extracellulaire en excès, inhibant la fenestration des cellules endothéliales et donc la

captation de l'ATX [75]. Le niveau sérique d'ATX est actuellement considéré comme un des trois meilleurs marqueurs pour le diagnostic de la cirrhose du foie [73].

- **Le diabète**

L'accumulation excessive de tissu adipeux est un facteur clé conduisant au développement du diabète de type II. Le rapport entre les précurseurs adipocytaires et les adipocytes différenciés est étroitement contrôlé chez les personnes ayant un poids normal. La prolifération et la différenciation des pré-adipocytes sont contrôlées par de nombreux facteurs et plusieurs études suggèrent l'implication de l'axe ATX/LPA. En effet, le récepteur LPA₁ est le sous type le plus abondant dans le tissu adipeux. Le LPA stimule la motilité et la prolifération des pré-adipocytes mais inhibe leur différenciation en adipocytes (adipogénèse). Cet effet anti-adipogénique se caractérise par une inhibition de l'accumulation des triglycérides et par une diminution de l'expression de gènes adipocytaires et notamment du facteur de transcription PPAR γ 2 [62]. Les pré-adipocytes isolés du tissu adipeux des souris invalidées pour *lpar1* possèdent une plus grande propension à se différencier en adipocytes que celles issues de souris sauvages [62]. De plus, les souris *lpar1*^{-/-} présentent une augmentation significative du pourcentage de masse grasseuse par rapport aux souris sauvages. L'ensemble de ces observations suggère que le LPA, via son effet anti-adipogénique dépendant de LPA₁, exerce un effet inhibiteur local et paracrine sur le recrutement de nouveaux adipocytes au sein du tissu adipeux. Par ailleurs, il a été démontré que le tissu adipeux était riche en ATX qui participerait à la production extracellulaire de LPA [76]. La délétion génétique conditionnelle de l'ATX spécifique du tissu adipeux engendre une réduction de près de 40% des niveaux de LPA plasmatique et une amélioration du niveau de tolérance au glucose [76]. En effet, lorsque ces animaux sont nourris avec des aliments riches en graisse, une augmentation de la masse grasseuse et de la taille des adipocytes sont détectées par rapport aux animaux contrôles. Ces résultats indiquent que l'ATX est un régulateur négatif de l'expansion de la masse grasseuse en réponse à un régime riche en graisse [76]. Récemment, une étude a démontré qu'au sein des adipocytes, l'expression de l'ATX serait contrôlée par le glucose et l'insuline [77]. De plus, il a été démontré que les niveaux d'ATX sériques chez des patients âgés et obèses corrôlaient avec leur résistance à l'insuline, soulevant l'ATX comme marqueur potentiel pour le diabète de type II dans cette population [78]. L'ensemble de ces

résultats suggère que l'axe ATX/LPA représente une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement des atteintes métaboliques associées à l'obésité.

- **Maladies cardiovasculaires**

L'athérosclérose est une maladie due à l'accumulation de lipides dans les parois des vaisseaux artériels. L'athérome débute par la formation de « la strie lipidique » formée par l'accumulation de cellules spumeuses au niveau de l'endothélium vasculaire. Ces cellules sont des macrophages, qui s'engorgent de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées. Ces dernières stimulent l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion au sein des cellules endothéliales, permettant alors le recrutement et l'accumulation de monocytes [79]. Avec le temps, cette strie s'épaissit, se charge en lipides, en calcium et en cellules sanguines pour former une plaque d'athérome. L'inflammation joue un rôle actif à tous les stades de cette pathologie [79]. L'oxydation des LDL induit la production locale de LPC, ensuite converti en LPA via l'ATX [80]. Le LPA agit alors sur ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales et stimule la libération de CXCL1 (chemokine CXC-motif ligand 1) qui favorise le recrutement de monocytes. Le blocage de LPA₁ et LPA₃ par le Ki16425, freine la sécrétion de CXCL1 et inhibe le recrutement des monocytes [80]. Le LPA stimule également la formation des cellules spumeuses en stimulant l'intégration de LDL oxydés par les macrophages et ce, via les récepteurs LPA₁ et LPA₃ [81]. De plus, le LPA présent dans les plaques d'athérome déclenche une activation plaquettaire rapide via la stimulation des récepteurs LPA₁ et LPA₃ et favorise l'athérosclérose [82].

L'axe ATX/LPA est également impliqué dans d'autres maladies cardiovasculaires associées à une activation excessive des plaquettes sanguines comme l'infarctus du myocarde ou la thrombose veineuse [83]. Les plaquettes humaines activées sécrètent du LPA, ce dernier active alors une boucle de rétroaction positive conduisant à une sur-activation et à l'agrégation des plaquettes sanguines, processus indispensable à la formation du clou plaquettaire [83]. Les plaquettes sont également capables de fixer l'ATX et ainsi de favoriser une production locale de LPA [84]. De façon surprenante, l'addition de LPA atténue l'agrégation des plaquettes murines, empêchant ainsi la thrombose [50]. En effet, la surexpression d'ATX chez les animaux transgéniques, ou l'administration intravasculaire de LPA prolonge le temps de saignement chez la souris [50]. Les souris hétérozygotes pour l'ATX

Enpp2^{+/-}, chez lesquelles le niveau de LPA plasmatique est diminué de moitié, sont aussi plus sensibles à la thrombose [49]. Cela signifie donc que l'axe ATX/LPA pourrait jouer un double rôle en tant que modulateur espèce-spécifique dans la fonction plaquettaire, la thrombose et l'hémostase. La différence d'action du LPA sur les plaquettes murines et humaines peut être attribuée à une expression différentielle des récepteurs du LPA, qui aurait pour conséquence l'activation de voies de signalisation différentes.

- **Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Le trafficking des lymphocytes à travers la muqueuse intestinale joue un rôle crucial dans la pathogenèse des maladies intestinales inflammatoires et dépend de l'interaction entre les lymphocytes et les veinules endothéliales. Il a été démontré que ces veinules endothéliales sécrètent de l'ATX qui induit l'augmentation de la motilité des lymphocytes. En effet, une étude a démontré que l'expression d'ATX était considérablement augmentée au sein de la muqueuse intestinale de patients atteints de la maladie de Crohn par rapport aux muqueuses saines [85]. De même, dans deux modèles murins de colite, l'expression d'ATX est augmentée dans la muqueuse colique des souris malades par rapport à celle des souris saines, en association avec une augmentation de la migration des lymphocytes. Enfin, le traitement des animaux dans les deux modèles par un inhibiteur de l'ATX permet une réduction significative du phénotype de la maladie.

Enfin, l'implication de l'axe ATX/LPA dans la polyarthrite rhumatoïde, contexte de notre étude, sera détaillée dans une autre partie de ce manuscrit.

b) Cancers

On retrouve une forte expression d'ATX dans de nombreux cancers tels que les neuroblastomes [86], les glioblastomes [87], les hépatocarcinomes [88], les lymphomes à cellules B [89], les mélanomes [32], les cancers du rein [90], de la thyroïde [91], du sein [92] et du poumon non à petites cellules [93]. Dans certains glioblastomes, l'ATX est présente aussi bien dans la tumeur primaire que dans les cellules invasives [87], alors que dans les cancers du poumon, une expression plus forte est détectée dans les tumeurs faiblement différenciées [93]. Ces données suggèrent que l'ATX favorise la manifestation des caractéristiques cellulaires

nécessaires à l'agressivité d'une tumeur, bien que les mécanismes contrôlant l'expression de l'ATX ne soient pas encore totalement compris. Par exemple, dans des cellules de carcinome thyroïdien, le EGF (epithelial growth factor) et le FGF (fibroblast growth factor) stimulent l'expression d'ATX alors que d'autres cytokines comme l'IL-4, l'IL-1 β et le TGF β la freinent [32]. Dans des cellules d'hépatocarcinome, l'expression d'ATX est stimulée par le TNF (Tumor necrosis factor) via l'activation de la voie NF κ B (nuclear factor κ B) [88]. Il a également été démontré que la surexpression de l'intégrine α 6 β 4 dans les cellules MDA-MB435 de cancer du sein stimulait l'expression de l'ATX via le facteur de transcription NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cells) [94]. Ce mécanisme pourrait expliquer l'effet stimulateur de l'intégrine α 6 β 4 sur la migration et l'invasion des cellules tumorales.

L'utilisation des cellules murines fibroblastiques NIH3T3 surexprimant ATX a permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle d'ATX dans le développement tumoral. En effet, sa surexpression se traduit par une stimulation de la croissance tumorale, une forte agressivité de la tumeur et une importante angiogenèse. Les cellules contrôles, surexprimant une ATX mutée dans son site catalytique, ne présentent pas ce profil invasif ce qui prouve le rôle de l'ATX dans la tumorigenèse via son activité lysoPLD [95]. Plus récemment, notre laboratoire a démontré également que la surexpression d'ATX dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231/B02 favorise la formation de métastases osseuses, alors que son inhibition dans le modèle murin de cancer du sein (4T1), freine la dissémination métastatique à l'os et au poumon, sans toutefois affecter la croissance de la tumeur primaire [96].

Enfin, plusieurs analyses de données de microarrays révèlent une expression élevée d'ATX dans certains cancers humains, en particulier les lymphomes à cellules B, les carcinomes rénaux, les cancers du foie et les cancers du pancréas [97]. Les niveaux sériques d'ATX dans les lymphomes folliculaires sont corrélés avec la masse tumorale et l'évolution clinique, révélant l'ATX comme potentiel biomarqueur dans ce type de lymphomes [89]. Une augmentation de l'activité lysoPLD de l'ATX a également été décrite chez les patients atteints de cancer du pancréas [98].

L'ensemble de ces données permet d'envisager la relevance de l'ATX comme biomarqueur clinique dans certains cancers.

II. La physiologie osseuse

L'os se caractérise par sa dureté et son apparente rigidité et assure différentes fonctions au sein de l'organisme. Les os constituent la charpente du corps sur laquelle s'insèrent les muscles, les tendons et les ligaments permettant ainsi le mouvement. Ils soutiennent le corps en assurant une fonction de protection des organes vitaux et du système nerveux et supportent les contraintes mécaniques. Les os sont les acteurs majeurs de la régulation du métabolisme minéral et sont le site principal de l'hématopoïèse [99]. L'os est un tissu complexe, dynamique tant au niveau biochimique que cellulaire. Il est constitué de tissu osseux, hématopoïétique, adipeux, cartilagineux et conjonctif, ainsi que de nombreux vaisseaux et nerfs.

A. Structure de l'os

Le squelette représente une part importante du corps humain. On recense 206 os, de forme et de taille variées, représentant 1/5^e du poids humain. Les os sont classés en trois catégories : les os longs (humérus, fémur, tibia), les os courts (carpes, tarses et vertèbres) et les os plats (crâne, sternum, côtes). Les os longs sont constitués de trois parties : la diaphyse, les épiphyses et la métaphyse (figure 8). La diaphyse correspond à la partie centrale de l'os. Elle délimite la cavité médullaire contenant la moelle osseuse où se déroule l'hématopoïèse (la moelle rouge) et représente également un centre de stockage des graisses (la moelle jaune). La diaphyse est entourée de deux fines enveloppes conjonctives : le périoste, côté externe, contribuant à l'innervation, la croissance et la cicatrisation de l'os, et l'endoste, situé le long de la cavité centrale contenant les cellules ostéoprogénitrices et les cellules bordantes. Les extrémités des os longs, recouvertes de cartilage articulaire sont les épiphyses. La métaphyse est une zone intermédiaire située entre la diaphyse et l'épiphyse. Chez l'enfant, entre l'épiphyse et la métaphyse se trouve une zone de jonction, le cartilage de conjugaison, assurant la croissance en longueur de l'os. Ce cartilage de croissance disparaît chez l'Homme à l'âge adulte. D'un point de vue macroscopique, chaque os est constitué à l'extérieur d'une couche dense et lisse, l'os cortical, à l'intérieur de laquelle se trouve une couche poreuse, l'os trabéculaire.

Les os sont pourvus de vaisseaux sanguins qui les nourrissent. Ils possèdent également des nerfs, en plus de l'innervation du périoste.

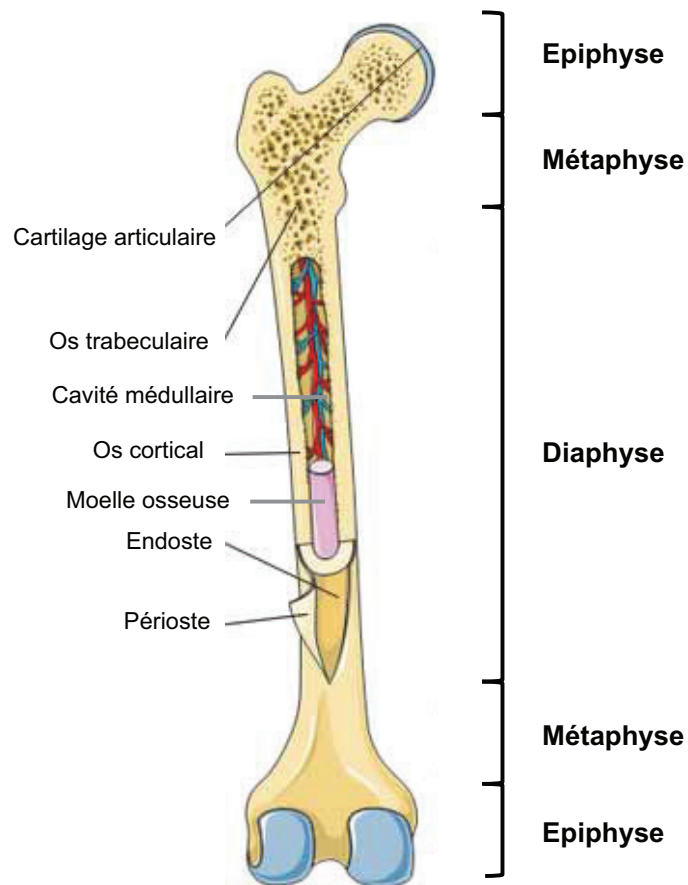


Figure 9 : Structure d'un os long humain adulte. Les extrémités (épiphyses) sont constituées d'os trabéculaire alors que la partie centrale (diaphyse) est constituée d'os cortical.

B. Composition

1) Organisation

Le tissu osseux est une forme spécialisée de tissu conjonctif, d'origine mésenchymateuse, constitué des matières organiques et de sels minéraux inorganiques. La partie organique est constituée de cellules spécialisées et d'une matrice essentiellement constituée de collagène de type 1 et des protéines non collagéniques. Le réseau collagénique fournit élasticité et flexibilité à l'os. La matrice minérale est composée de cristaux d'hydroxyapatite de calcium (ou phosphate tricalcique), de carbonates de calcium et de phosphates de magnésium. Le stockage

des cristaux d'hydroxyapatite entre des fibres de collagène confère à l'os sa résistance à la rupture et à l'étirement.

L'interface entre matrice organique collagénique et matrice minérale est assurée par des protéines non collagéniques. Elles représentent 10 à 15 % du contenu protéique osseux et forment un échafaudage pour la minéralisation de la matrice osseuse qui n'est pas encore calcifiée (ostéoïde). Environ un quart de ces protéines proviennent du sérum, principalement des protéines se liant à la matrice osseuse grâce à leur affinité pour l'hydroxyapatite (albumine et transferrine). Parmi le reste des protéines non collagéniques produites de façon endogène, se distinguent les glycoprotéines, les protéoglycanes et des gla-protéines. La glycoprotéine la plus abondante du tissu osseux est l'ostéonectine. Elle fournit des sites permettant l'ancrage et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite à la matrice osseuse, ainsi que la croissance et la prolifération des ostéoblastes. Il existe aussi des glycoprotéines ou SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N linked Glycoproteins) comme l'ostéopontine, la thrombospondine, la fibronectine, la vitronectine, et la sialoprotéine osseuse, possédant une séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD) essentielle à la reconnaissance par les récepteurs membranaires de type intégrine [100]. Ces protéines sont impliquées dans la maturation des ostéoblastes et pour certaines dans l'attachement des ostéoclastes aux molécules de la matrice osseuse. Les protéoglycanes, comme le biglycan et la décorine interagissent avec le facteur de croissance TGF- β et sont impliquées dans l'agencement des fibres de collagène. Enfin, parmi les gla-protéines identifiées, l'ostéocalcine, sécrétée par les ostéoblastes, favorise la fixation du calcium à la matrice minérale.

2) Les cellules osseuses

L'os est un tissu dynamique qui se renouvelle constamment tout au long de la vie adulte. Il contient quatre types cellulaires : les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes qui sont impliqués dans la formation et le maintien de la matrice osseuse, et les ostéoclastes, qui font l'objet de notre étude et qui sont responsables de la résorption osseuse.

a) Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (50 à 100 μm), plurinucléées (2 à 50 noyaux) dont la fonction principale est la résorption osseuse. Ils possèdent un nombre important de mitochondries et de nombreuses vacuoles chargées d'enzymes lysosomiales nécessaires à l'activation de la résorption. Les ostéoclastes reposent sur le tissu osseux calcifié et fonctionnent de façon cyclique, alternant les phases de migration le long de la surface osseuse et des phases de résorption active créant des lacunes osseuses.

Les précurseurs des ostéoclastes sont les cellules souches hématopoïétiques communes aux cellules de la lignée monocyte-macrophage. Le CFU-GM (Granulocyte Macrophage Colony Forming Unit) est le premier précurseur connu de la lignée ostéoclastique [101]. Les cellules ayant débuté leur processus de différenciation quittent la moelle osseuse et migrent vers les surfaces osseuses où elles fusionnent pour générer des cellules multinucléées (figure 9). L'ostéoclastogénèse est contrôlée par des facteurs locaux, des hormones circulantes mais également des interactions avec les cellules présentes dans le microenvironnement osseux. La spécification des pro-monocytes en ostéoclastes réside sous le contrôle de trois principaux facteurs : le M-CSF (macrophage colony stimulating factor), le RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) et son antagoniste l'OPG (ostéoprotégérine) [102–104]. Le M-CSF est sécrété par les précurseurs ostéoblastiques et est indispensable à la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques. Il se fixe sur son récepteur, le CSF1R/cfms (colony stimulating factor 1 receptor) et induit la production du récepteur RANK, protéine membranaire appartenant à la famille des récepteurs du TNF. RANKL, synthétisé dans l'os par les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire et par les ostéoblastes, se fixe sur son récepteur RANK et induit une cascade de signalisation impliquant NF κ B et le facteur de transcription NFATc1. RANKL stimule la fusion des précurseurs ostéoclastiques et la synthèse des protéines essentielles à l'activation de la résorption osseuse (intégrine $\alpha\beta 3$, récepteur à la calcitonine, cathepsine K) [105]. L'OPG, membre de la famille des récepteurs du TNF, est un récepteur leurre, inhibiteur naturel de RANKL. Elle se lie à RANKL et empêche son interaction avec RANK. Synthétisée sous forme soluble par les cellules de la lignée ostéoblastique, elle permet la modulation de l'ostéoclastogénèse. En effet, sa sécrétion augmente

d'autant plus que le degré de différenciation des cellules est élevé. Elle inhibe donc la différenciation, la survie et la fusion des précurseurs ostéoclastiques et le rapport de sécrétion OPG/RANKL par les ostéoblastes régit le processus de résorption osseuse [105]. Récemment, le récepteur LGR4 (aussi appelé GPR48) a été identifié comme un récepteur de RANKL à la surface des ostéoclastes, régulant négativement la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse [106]. La fixation de RANKL sur LGR4 induit la voie de signalisation de la GS3K qui inhibe l'expression et l'activité de NFATc1.

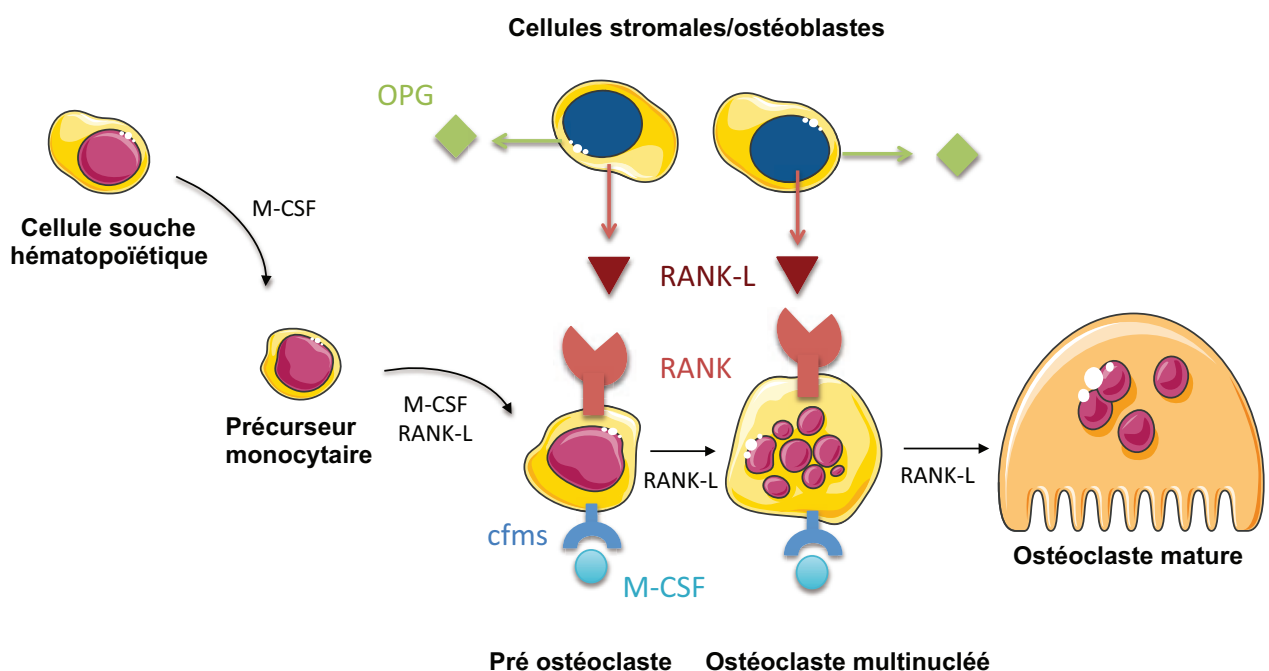


Figure 10 : Etapes de la différenciation ostéoclastique. Sous l'action des facteurs M-CSF et RANK-L, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en ostéoclastes matures capables de résorber la matrice osseuse.

En plus de RANK, les ostéoclastes expriment d'autres récepteurs de l'immunité : l'osteoclast-associated receptor (OSCAR) et le triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). OSCAR a été décrit dans la survie, la maturation et l'activation de la lignée myéloïde: macrophages, cellules dendritiques, ostéoclastes [107]. Sa structure est similaire à un récepteur IgG (immunoglobuline G). OSCAR participe à l'ostéoclastogénèse et dépend de l'activation en amont de NFATc1, RANKL et RANK. OSCAR active le Fc receptor gamma chain (FcR γ), entraînant une

boucle de régulation positive d'OSCAR sur NFATc1. L'expression importante d'OSCAR marque ainsi la phase tardive de l'ostéoclastogenèse [108,109]. Cette signalisation passe par l'immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) qui a donné son nom à l'ensemble de cette voie de signalisation [110] (figure 10). TREM2 possède le même effet via la DNAX-associated protein 12 kDA (DAP12). Des peptides capables de se lier à TREM2 ou OSCAR ont été identifiés à la surface de cellules myéloïdes, des ostéoblastes et dans la matrice extracellulaire osseuse [111]. Les voies RANKL et ITAM sont les principales voies de l'ostéoclastogenèse.

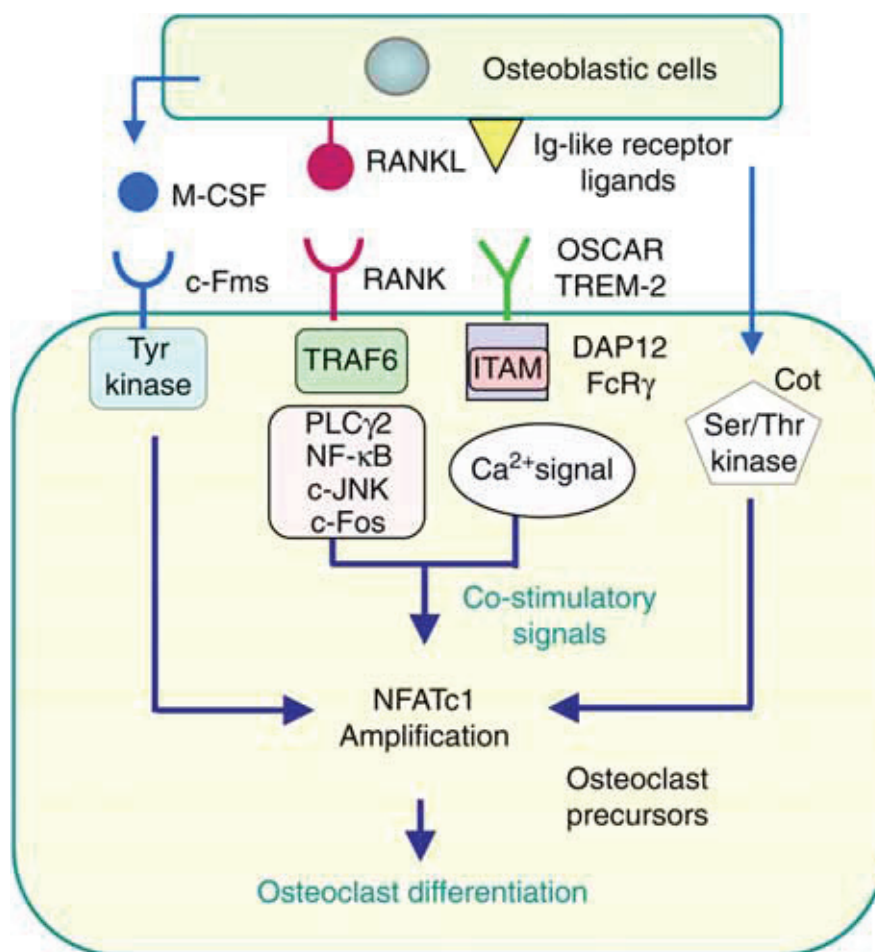


Figure 11 : Signalisation des voies RANKL et ITAM d'après Takahashi, 2014 [112]. NFATc1 : nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1, RANK : receptor activator of NFκB, RANKL : RANK ligand, OSCAR : osteoclast associated receptor, TREM2 : triggering receptor expressed on myeloid cells-2, DAP12 : DNAX-associated protein 12, FcRγ : Fc receptor gamma-chain, ITAM : immunoreceptor tyrosine based activation motif, Cot : cot kinase.

L'ostéoclaste mature est une cellule polarisée. Au contact de l'os, la membrane plasmique se différencie en deux domaines séparés par un anneau de jonction entre la cellule et la matrice extracellulaire (figure 11). Le pôle apical, au contact de la matrice osseuse comprend deux zones distinctes : la bordure en brosse et la sealing zone, une structure dynamique complexe constituée d'un anneau d'actine, permettant l'isolement d'une chambre de résorption étanche, la lacune de Howship. La bordure en brosse est l'organite de résorption de l'ostéoclaste. Sa fonction est d'acidifier la lacune de résorption en dissolvant la phase minérale de l'os et de délivrer des enzymes lysosomales qui vont dégrader la matrice organique [113]. Cette bordure en brosse se forme via le transport actif et direct de vésicules qui fusionnent avec la membrane plasmique, face à la matrice osseuse [114]. Les lysosomes tardifs sont acidifiés par des V-ATPases qui pompent des protons dans la lumière des vésicules. Parallèlement à cette acidification, des canaux chloriques transportent des ions chlorides vers la lumière afin de maintenir l'électroneutralité des vésicules [115]. Les lysosomes sont aussi à l'origine du trafficking des enzymes protéolytiques dans la lacune de résorption. La cathepsine K, cystéine protéase spécifique des ostéoclastes et enzyme la plus efficace pour dégrader le collagène de type I, est également délivrée via ces lysosomes. MMP-9 contribue également à la dégradation osseuse médiée par les lysosomes. Ce transport dynamique de vésicules aboutit à leur libération dans la région périphérique de la bordure en brosse à proximité de la sealing zone. Le contenu acide de ces vésicules permet la libération de protons qui induisent la dégradation de la phase minérale et maintiennent également un pH acide, optimal pour l'activité de la cathepsine K [116]. Cette dernière est d'ailleurs responsable de l'activation d'une autre protéase ostéoclastique, la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP).

Le pôle baso-latéral a pour fonction essentielle le maintien de l'équilibre électrochimique de l'ostéoclaste via des excréteurs basiques qui acidifient le cytoplasme. La motilité des ostéoclastes et leur attachement à la matrice osseuse via la sealing zone sont contrôlés par la réorganisation du cytosquelette d'actine et par la distribution des podosomes. Ces structures d'adhérence sont constituées de protéines membranaires de type intégrine ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha2\beta1$), qui interagissent avec les protéines adhésives (ostéopontine, fibronectine et sialoprotéine osseuse) et permettent l'adhésion des ostéoclastes à la matrice [117]. Les podosomes sont contrôlés par de nombreux facteurs de transduction du signal tels que c-Src, FAK

(focal adhesion kinase), et la PI3K (phosphoinositide 3 phosphate) qui sont essentiels pour l'assemblage et le désassemblage des structures d'adhérence [113].

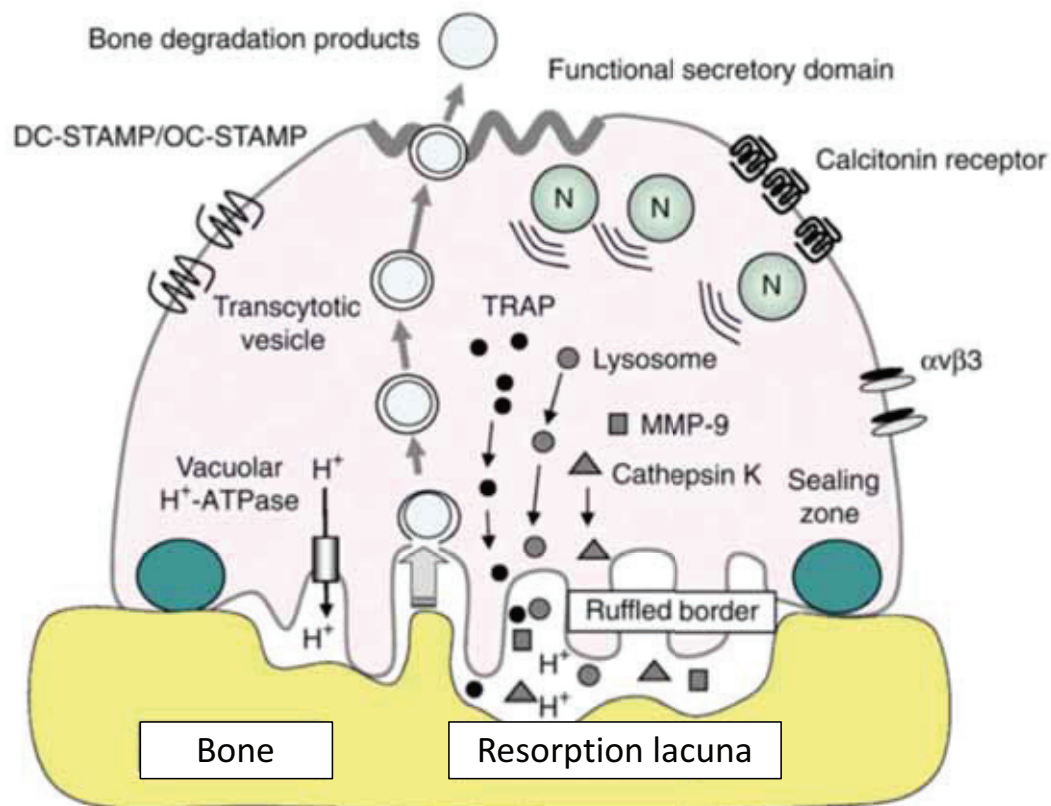


Figure 12 : Ultrastructure et fonction des ostéoclastes d'après Takahashi, 2014 [112].

b) LPA et ostéoclastes

Une étude réalisée par notre laboratoire a récemment démontré que les ostéoclastes expriment tous les récepteurs au LPA (sauf LPA₆) et que leur expression augmente au cours de la différenciation, avec un pic d'expression en fin de différenciation [63]. Le récepteur le plus exprimé au cours de l'ostéoclastogenèse est LPA₁, bien que LPA₂, LPA₄ et LPA₅ soient exprimés selon un profil similaire mais en quantité moindre. Les précurseurs monocytaires issus de la moelle osseuse des souris *lpar1*^{-/-} présentent une diminution de la capacité à se différencier en ostéoclastes, contrairement aux monocytes issus des souris sauvages, *lpar2*^{-/-} ou *lpar3*^{-/-}. Par ailleurs, il a été démontré que le traitement des ostéoclastes par le LPA stimulait leur différenciation, la fusion des progéniteurs entre eux et la capacité de résorption des

ostéoclastes matures via une augmentation du calcium intracellulaire, entraînant des changements morphologiques en remaniant les fibres d'actine et l'activation du facteur de transcription NFATc1 [118]. La taille de la ceinture de podosomes et de la lacune de résorption sont fortement diminuées chez les ostéoclastes matures traités au Ki16425 ainsi que chez les ostéoclastes matures des souris *lpar1*^{-/-} [63]. L'inhibition de LPA₁ affecte également la mobilité des précurseurs ostéoclastiques et la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes matures. L'ensemble de ces résultats indique que LPA₁ est essentiel pour l'ostéoclastogénèse et l'activité ostéoclastique *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'expression de LPA₁ augmente au niveau des ostéoclastes des souris ovariectomisées, et le traitement systémique de ces animaux par le Débio0719 (stéréoisomère du Ki16425), prévient la perte osseuse induite par l'ovariectomie [63]. A l'heure actuelle, l'expression et le rôle de l'ATX sur les ostéoclastes n'ont jamais été étudiés et font l'objet de ce manuscrit.

c) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes matures sont des cellules mononucléées, cuboïdes de 20 à 30 µm, ostéoformatrices disposées en monocouche cellulaire à la surface de l'os en croissance [119]. Le cytoplasme des ostéoblastes est riche en organites dont un important réticulum endoplasmique granuleux, responsable d'une importante basophilie du cytoplasme associée à une forte réactivité pour la phosphatase alcaline. Leur cytoplasme contient également de nombreuses mitochondries et un appareil de Golgi développé, témoins d'une forte activité de synthèse protéique, ainsi que des vésicules de sécrétion. Les ostéoblastes possèdent des prolongements cytoplasmiques leur donnant la possibilité de contact avec d'autres ostéoblastes ou ostéocytes via des jonctions communicantes. Les différentes étapes de la différenciation ostéoblastique sont marquées par l'expression des protéines associées à la synthèse de la matrice organique ou matrice ostéoïde immature (phosphatase alcaline, collagène de type I) puis par l'expression de marqueurs tardifs associés à la minéralisation osseuse (ostéocalcine, ostéopontine, sialoprotéine osseuse). A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes meurent par apoptose (65 %). Le reste des ostéoblastes devient des cellules bordantes ou subit une différenciation terminale en ostéocytes.

Les progéniteurs ostéoblastiques sont issus de la division des cellules souches mésenchymateuses localisées essentiellement chez l'adulte dans le périoste et dans le stroma de la moelle osseuse [120]. Ces cellules se caractérisent par une capacité proliférative élevée et une aptitude à se différencier en différents types cellulaires dont les ostéoblastes, les adipocytes et les chondrocytes, tout ceci sous l'effet de facteurs de transcription spécifiques, d'interactions cellulaires et de facteurs systémiques locaux.

La voie WNT/ β -caténine est une voie de signalisation impliquée notamment dans le développement embryonnaire et dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes [121]. La famille WNT (Wingless Integration site), est composée de 19 glycoprotéines très conservées et capables de se lier à leur récepteur Frz (Frizzled). En absence de la liaison Wnt à son récepteur Frz, le complexe Axine/APC/GSK3 β induit la dégradation de la β -caténine par le processus d'ubiquitination. Lorsque Wnt se fixe à Frz couplé aux corécepteurs LPR5/6 (Low density Receptor related Protein 5/6), la protéine Dvl (dishevelled) est recrutée et inhibe la dégradation de la β -caténine dont l'accumulation entraîne sa translocation nucléaire. En se liant à TCF/LEF, ce complexe forme un facteur de transcription pour les gènes cibles (Figure 12).

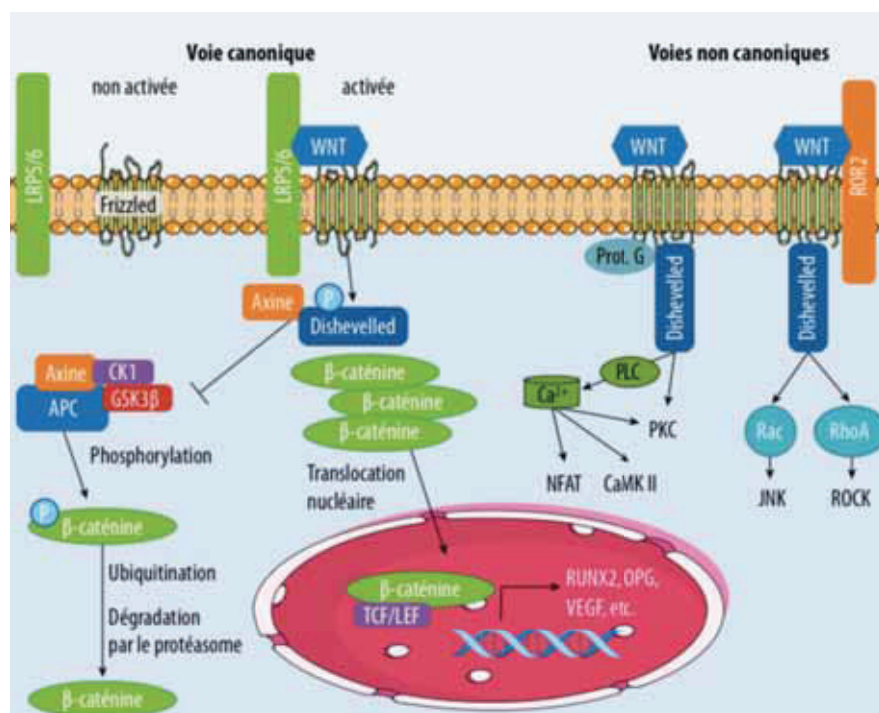


Figure 13 : Les voies de signalisation Wnt dans l'ostéoblaste (d'après Funck-Bretano et al., 2017 [122]).

Il existe des inhibiteurs naturels de la voie Wnt. Par exemple, les protéines sFRP (soluble Frz Related protein) et WIF-1 (Wnt inhibitory factor 1) sont des récepteurs leurres pour Wnt dont l'interaction inhibe la fixation de Wnt à Frz. D'autres inhibiteurs se lient directement sur LRP5/6 comme la protéine DKK1 (dickkopf 1) et la sclérostine exprimée principalement par les ostéocytes et les ostéoblastes et dont l'expression est régulée par les contraintes mécaniques. Ces inhibiteurs naturels représentent des cibles thérapeutiques dans le contrôle de la formation osseuse pathologique notamment observée dans la spondylarthrite ankylosante.

L'expression du facteur Runx2 (runt related transcription factor) guide la différenciation des cellules souches dans la voie ostéoblastique [123] (figure 13).

Le facteur de transcription Ostérix, sous le contrôle de Runx2, permet de passage du stade de pré-ostéoblaste à ostéoblaste immature [124]. D'autres facteurs de transcription jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'ostéoblastogenèse : Dlx5 (distal-less homeobox) [125] et Msx2 (Msh homeobox) [126] régulent positivement l'engagement des ostéoblastes dans le processus de différenciation.

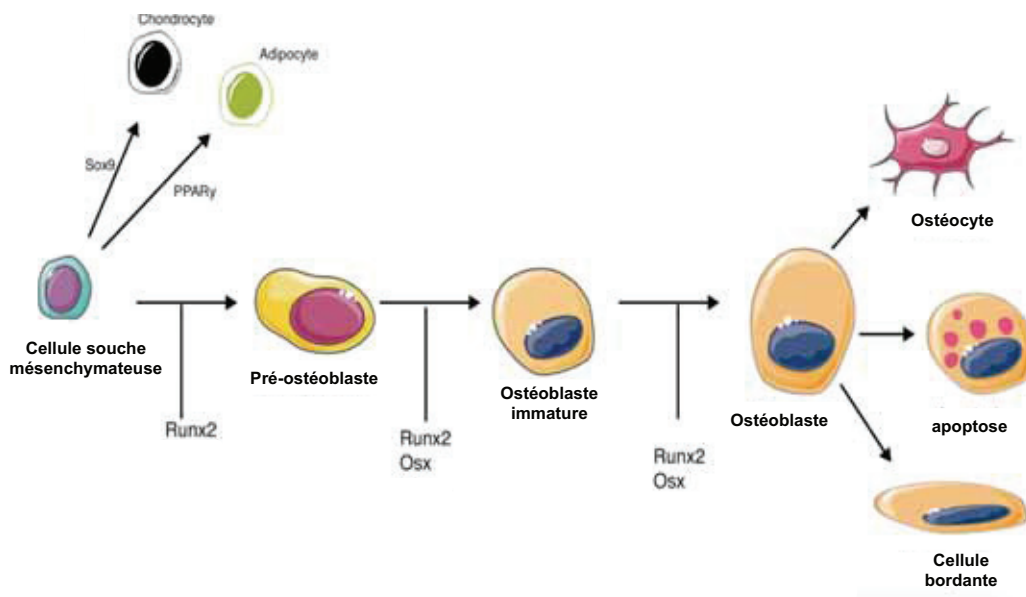


Figure 14 : La différenciation ostéoblastique. L'action conjointe de différents facteurs tels que Runx2 et ostérix sur les cellules ostéoprogénitrices induit la différenciation d'ostéoblastes matures capables de synthétiser de l'os.

Plusieurs types d'interactions cellulaires ont un rôle inducteur ou permissif sur la différenciation ostéoblastique. La N-cadhérine, par exemple, est impliqué dans l'induction des gènes de différenciation, dont Runx2 [127]. Enfin, plusieurs facteurs locaux sont d'importants régulateurs de la différenciation de la fonction ostéoblastique. Le TGF- β , qui stimule la prolifération des ostéoblastes et inhibe la minéralisation, et les BMPs (bone morphogenic proteins) sont fondamentaux dans le contrôle de l'ostéogenèse en agissant notamment sur l'expression de Runx2 [128]. Lors du remodelage osseux, la sclérostine est exprimée principalement par les ostéocytes et exerce un contrôle négatif sur la formation osseuse, induisant un état de quiescence des ostéoblastes [129]. L'expression de la sclérostine est inhibée par la PTH (hormone parathyroïdienne), ainsi que par la stimulation mécanique de l'os. L'inhibition de la sclérostine chez l'animal à l'aide d'un anticorps spécifique, induit une augmentation de la masse osseuse [130], suggérant que la sclérostine pourrait être une cible intéressante dans le traitement de la fragilité osseuse. Des anticorps humains neutralisants sont actuellement testés en essais cliniques dans l'ostéoporose post-ménopausique [131] mais la demande d'autorisation de mise sur le marché a été rejetée en raison d'accidents cardiovasculaires observés dans certaines études [132].

d) LPA et ostéoblastes

LPA₁ est exprimée de façon constante par les cellules ostéoblastiques murines et humaines, quel que soit leur stade de différenciation [133]. Il en est de même pour les lignées cellulaires ostéoblastiques telles que UMR 106-1, G292, MC3T3E1 ou les cellules d'ostéosarcome humain MG-63. Ces cellules expriment plus faiblement LPA₂ et LPA₃ et on ne retrouve l'expression de LPA₄ que chez les ostéoblastes matures différenciés [133]. L'expression des récepteurs du LPA suggère donc que les ostéoblastes sont sensibles au LPA. Une étude a d'ailleurs démontré que ces cellules étaient capables de stimuler la production de LPA via l'activation du récepteur aux nucléotides P2X7 afin de promouvoir l'ostéogenèse [134]. Les réponses des ostéoblastes au LPA sont multiples et semblent dépendre essentiellement de LPA₁. En effet, il stimule la prolifération des ostéoblastes primaires [135], exerce une activité chimio-attractante, et agit en synergie avec la vitamine D3 pour favoriser leur différenciation [136]. L'utilisation du Ki16425, conduit

à une diminution de l'activité phosphatase alcaline et à une diminution de la prolifération et de la maturation des ostéoblastes, suggérant l'implication de LPA₁ dans ces mécanismes [137]. Par ailleurs, l'analyse phénotypique des souris invalidées pour le récepteur LPA₁ confirme son rôle dans l'ostéogénèse : les souris présentent des défauts d'ossification du sternum et des côtes et une diminution du volume osseux [138]. En effet, les analyses tomographiques et histologiques révèlent également une ostéoporose trabéculaire et corticale. Enfin, les cellules souches mésenchymateuses issues de ces souris présentent une vitesse de prolifération et une faculté de minéralisation diminuée. LPA₄, exprimé seulement par les ostéoblastes matures contrôle la différenciation ostéoblastique tardive [133]. En effet, les souris *lpa4*^{-/-} présentent une augmentation du volume osseux trabéculaire ainsi que du nombre de travées. Les récepteurs LPA₁ et LPA₄ semblent avoir une action coordonnée dans le temps : LPA₁ serait impliqué dans la prolifération et la différenciation alors que LPA₄ permettrait l'arrêt de l'ostéoblastogénèse et de la minéralisation. Toutefois, les mécanismes contrôlant l'expression différentielle des ces récepteurs restent encore inconnus. De même, le rôle de l'ATX sur l'ostéoblaste ainsi que son expression restent encore à déterminer.

e) Cellules bordantes et ostéocytes

Chez l'Homme, les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés ou quiescents, susceptibles, s'ils sont sollicités, de redevenir des ostéoblastes actifs [139]. Elles revêtent les surfaces osseuses qui, à un moment donné, ne sont soumises ni à la formation ni à la résorption osseuse. Ce sont des cellules aplaties et allongées, possédant peu d'organites et reliées entre elles et avec les ostéocytes voisins par des jonctions communicantes. Elles ont pour principale fonction d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse.

Certains ostéoblastes (environ 10 %) qui ne meurent pas par apoptose se transforment en ostéocytes. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os, espacées régulièrement dans la matrice et formant un réseau de communication. Ces cellules, sensibles aux stimuli mécaniques, détectent le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse dans le processus d'adaptation fonctionnelle ou en cas de micro-fracture. Un fin réseau de canalicules

affère à l'ostéoplaste, cavité qui contient l'ostéocyte. Les stimuli mécaniques sont transmis à l'ostéocyte via des flux liquidiens contenus dans ces canalicules. Par ailleurs, les ostéocytes régulent la formation osseuse via la sécrétion de sclérostine, antagoniste de la voie Wnt. Enfin, il semblerait que l'apoptose des ostéocytes soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent, la mise en place du processus de résorption [140].

C. Le remodelage osseux

Qu'il soit trabéculaire ou cortical, l'os est un tissu en constant renouvellement. A l'âge adulte, environ 10 % du tissu osseux est renouvelé chaque année. Le remodelage osseux permet la substitution de l'os primaire infantile en os adulte résistant, la réparation des fractures, prévient la dégénérescence, et le maintien de l'homéostasie calcique. Au cours du remodelage osseux, l'os ancien est résorbé par les ostéoclastes et remplacé par de l'os nouveau par les ostéoblastes. Ce remodelage permanent s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage appelées BMU (Basic Multicellular Unit) [141]. Les activités métaboliques des ostéoclastes et des ostéoblastes sont couplées dans l'espace et dans le temps afin d'adapter la quantité et l'architecture de l'os, en fonction des facteurs systémiques (PTH, vitamine D) et locaux. Le remodelage osseux s'organise en cinq phases distinctes : l'activation des ostéoclastes, la résorption osseuse, la phase d'inversion, la formation osseuse et la quiescence (figure 14).

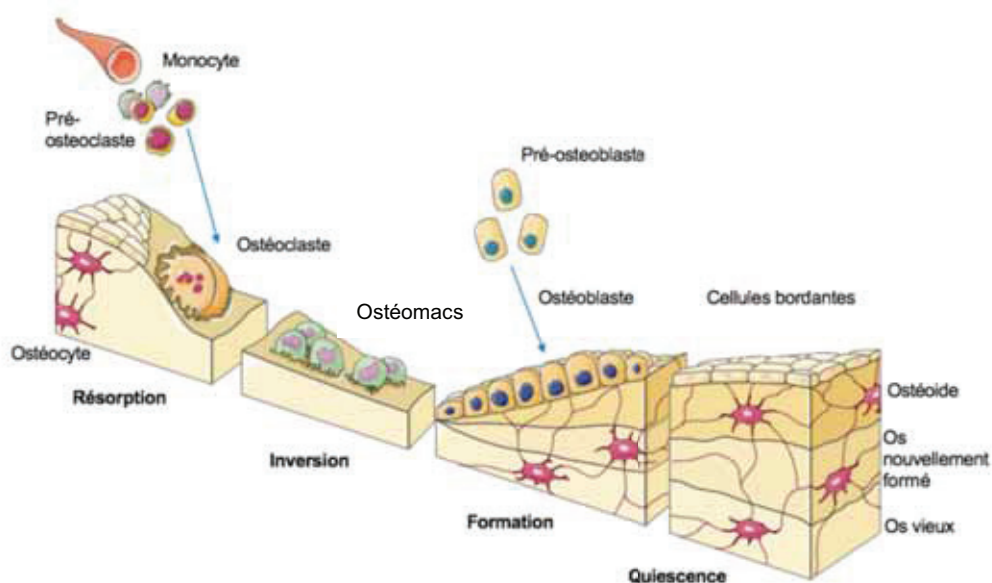


Figure 15 : Représentation schématique du processus de remodelage osseux humain.

La phase d'activation est initiée par la détection de signaux qui peuvent être mécaniques (fracture, prise de poids), hormonaux (oestrogènes, PTH) ou nerveux [142]. Ces changements sont détectés par les ostéocytes qui sécrètent de façon basale du TGF β , inhibiteur de la résorption osseuse [143]. Des dommages de la matrice osseuse entraînent l'apoptose des ostéocytes, accompagnée d'une diminution de la sécrétion de TGF β , stimulant le début de l'ostéoclastogénèse [144]. Les ostéocytes sécrètent également des protéines comme la sclérostine ou des protéines de la famille DKK, capables d'inhiber les ostéoblastes [145]. La surface osseuse est recouverte de cellules bordantes chez l'Homme ou d'ostéoblastes chez la souris, qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la matrice extracellulaire. Sous l'action de facteurs ostéorésorbants (PTH, Vitamine D3 et prostaglandine E2), les cellules bordantes se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes qui peuvent alors adhérer à la matrice osseuse.

Les ostéoblastes sont indispensables à la phase de résorption osseuse. Ils stimulent la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures via la production de cytokines telles que l'IL-6, l'IL-11, le M-CSF et le RANK-L. Ces facteurs pro-ostéoclastiques sont également sous le contrôle de la PTH qui diminue l'expression d'OPG et favorise la production de M-CSF et de RANK-L. Une fois ancré à la matrice osseuse, l'ostéoclaste mature libère des enzymes protéolytiques fonctionnelles à pH acide (collagénases, cathépsine K, MMPs) [146]. Ces enzymes détruisent la matrice organique, libérant des produits de dégradation du collagène CTX et NTX (fragments du télopeptide C terminal et N terminal) dont le dosage est utilisé en clinique afin d'évaluer le degré de résorption osseuse et la réponse aux anti-résorbeurs. Les mécanismes initiateurs de la phase d'inversion sont encore mal connus. La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du niveau de calcium intracellulaire des ostéoclastes. Une désorganisation des podosomes s'organise, suivie d'un détachement des ostéoclastes qui entrent finalement en apoptose. Chez l'Homme, des cellules de réversion, appelés ostéomacs et appartenant au lignage ostéoblastique (positives pour la phosphatase alcaline et négatives pour le marqueur monocyte-macrophage MOMA-2 (monocyte macrophage antibody 2)), remplacent les ostéoclastes et éliminent les derniers débris de matrice au fond de la lacune de Howship [147]. Lors du processus de résorption, des facteurs de croissance sont libérés tels que les IGFs (insulin-like growth factor), des FGFs, des BMPs ou le TGF β

qui vont activer la différenciation des ostéoblastes [148]. A leur tour, ces derniers vont produire de l'OPG qui va inhiber l'ostéoclastogenèse. Les cellules ostéoprogénitrices présentes à la surface de la matrice résorbée, au fond de la lacune de Howship, se divisent et se différencient en ostéoblastes. Les ostéoblastes matures synthétisent et déposent une nouvelle matrice, l'ostéoïde, comblant la lacune de résorption. Plusieurs hormones, dont les oestrogènes, les androgènes et la vitamine D stimulent la production de la matrice osseuse. Après un délai de quinze jours, la matrice se minéralise à la jonction entre tissus ostéoïde et tissu minéralisé. Une fois la phase de formation terminée, la majorité des ostéoblastes meurt par apoptose. Certains se différencient en ostéocytes et d'autres en cellules bordantes. Le signal de terminaison du remodelage de la matrice osseuse est encore mal connu, même si l'idée d'un rôle des ostéocytes semble émerger.

III. Les rhumatismes inflammatoires

A. Les articulations

Les articulations assurent la connexion entre les os du squelette. Elles ont pour fonction de relier les os entre eux et confèrent à la fois la liberté, l'orientation et l'intégrité du mouvement. Il existe plusieurs types d'articulations. La classification fonctionnelle distingue les articulations mobiles ou diarthroses, les articulations semi-mobiles ou amphiarthroses, et les articulations immobiles ou synarthroses.

Les synarthroses sont essentiellement fibreuses (collagène) et ne permettent pas de mouvement. Les articulations sacro-iliaques sont des amphi-diarthroses car on considère deux types articulaires : une amphiarthrose (partie postérieure) et une diarthrose (partie antérieure). Les diarthroses sont des articulations synoviales qui permettent une grande liberté de mouvement. Ces articulations sont retrouvées par exemple au niveau des genoux, des épaules ou des hanches.

Dans la diarthrose, une couche de cartilage articulaire hyalin, un tissu souple, extensible et compressible, recouvre chaque épiphyse osseuse. Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif constitué de cellules, les chondrocytes, hébergées dans des loges, les chondroplastes. La matrice extracellulaire, composée de collagène de type II, XI et de glycosaminoglycanes [149], est richement connectée. Le cartilage articulaire est au contact direct du périoste, il évite le frottement des os et prévient l'érosion osseuse. Il doit rester mécaniquement souple et résistant pour garder son intégrité et remplir sa fonction. Le cartilage n'est pas vascularisé mais ne constitue pas un tissu amorphe. De la même manière que dans la matrice osseuse, les chondrocytes sont immergés dans la matrice d'un tissu ayant des fonctions mécaniques essentielles et ne sont donc pas isolées. En effet, ils expriment de nombreux récepteurs aux cytokines et aux hormones et sont eux-même d'importants sécréteurs dans la signalisation cellulaire [150]. Une capsule prend racine en continuité du périoste et entoure la surface péri-articulaire (figure 15).

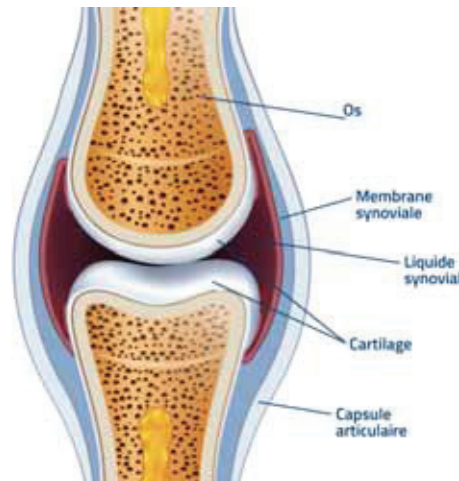


Figure 16: Représentation schématique d'une articulation synoviale.

La membrane synoviale (partie interne de la capsule) est un tissu connectif qui se structure en une membrane monocouche dont les cellules sont appelées synoviocytes. On distingue les synoviocytes macrophagiques, issus de la lignée monocytes-macrophages, et les synoviocytes fibroblastiques, issus de la lignée fibroblastique. Les synoviocytes macrophagiques présentent une activité de régulation cellulaire en phagocytant les débris et les corps étrangers. Les synoviocytes fibroblastiques structurent et organisent la membrane synoviale. Ils synthétisent les molécules extracellulaires du liquide synovial comme le hyaluronane [151]. Ces cellules prolifèrent sous contrôle strict : un procédé d'inhibition de contact évite l'épaississement de la membrane synoviale dans des conditions physiologiques. Synthétisé par la membrane synoviale, le liquide synovial joue un rôle lubrificateur dans l'articulation, il absorbe les chocs et évite les frottements grâce à sa nature visqueuse liée à sa forte teneur en acide hyaluronique. La fraction liquide est composée de protéines sécrétées par les synoviocytes, de régulateurs tels que OPG et l'IL-1RA (IL-1 récepteur antagoniste) mais peu de RANK-L, et de cellules immunitaires [152,153]. L'enthèse désigne la zone d'ancrage dans l'os de différentes structures fibreuses (ligaments, tendons, capsules articulaires). L'atteinte inflammatoire des enthèses est un phénomène central au cours des spondyloarthrites.

B. La polyarthrite rhumatoïde

1) Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme inflammatoire chronique. Il s'agit d'une inflammation persistante en lien avec un dérèglement du système immunitaire. La PR, touchant 0,3 % de la population française, est la maladie la plus fréquente des rhumatismes chroniques. Elle touche majoritairement les femmes avec un ratio moyen de 3 :1 (femme/homme) [154]. Son évolution se manifeste par des poussées inflammatoires de durée et d'intensité variable, entraînant un épaissement de la membrane synoviale, touchant préférentiellement les mains, les poignets et les avant-pieds et provoquant gonflements et douleurs au niveau des articulations [155,156]. La PR est une maladie inflammatoire chronique et systémique induisant une hyperplasie et une inflammation des articulations synoviales, des érosions osseuses locales et une perte osseuse systémique. Dans les phases plus avancées, les articulations se déforment en raison de la généralisation de la perte osseuse et d'un pincement articulaire, entraînant chez les patients atteints, une déformation et une destruction articulaire irréversible générant une incapacité fonctionnelle et un handicap quotidien [157] (figure 16). C'est une affection multifactorielle relevant de facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux, neuropsychologiques et immunologiques.



Figure 17 : Photographie et radiographie de mains de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.

2) Physiopathologie

Parmi les facteurs génétiques, plusieurs SNP (single nucleotide polymorphism) sont associés à l'étiologie de la PR. Certains d'entre eux concernent le gène HLA-DRB1 [158]. Ce gène code pour la chaîne β 1 de la sous-unité du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II. Le CMH II est présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques, les macrophages, les ostéoclastes et les lymphocytes B [159]. Certains allèles du gène HLA-DRB1 sont associés de façon significative et possèdent une séquence commune sur le troisième segment hypervariable appelé épitope partagé. Un autre SNP a été découvert sur le gène PTPN22 qui code pour la protéine tyrosine phosphatase (non récepteur type 22) qui affecte le fonctionnement des récepteurs des lymphocytes T et B [160]. D'autres gènes sont associés à la PR comme les membres de la superfamille du TNF, des molécules impliquées dans la différenciation des lymphocytes T, une autre tyrosine phosphatase non fonctionnelle et un membre de la famille des enzymes peptidyl arginine déiminase (PAD), PAD4 [161–163].

Les facteurs d'environnementaux restent mal connus. Le premier est le tabac, en particulier pour les PR avec facteurs rhumatoïdes et anticorps anti- protéines citrullinées (ACPA) [164].

Il existe une interaction gène-environnement assez forte, notamment entre HLA-DRB1 portant l'épitope partagé et le tabac chez les PR avec ACPA. Plusieurs agents infectieux joueraient également un rôle déclenchant, dérégulant le microbiote buccal, gastro-intestinal et pulmonaire (*Porphyromonas gingivalis*, le virus d'Epstein-Barr ou le cytomégalovirus) [165–167]. Le tabac et les agents infectieux tels que *P. gingivalis* induiraient un stress oxydatif, stimulant la citrullination par la PAD et la production d'ACPA (figure 17).

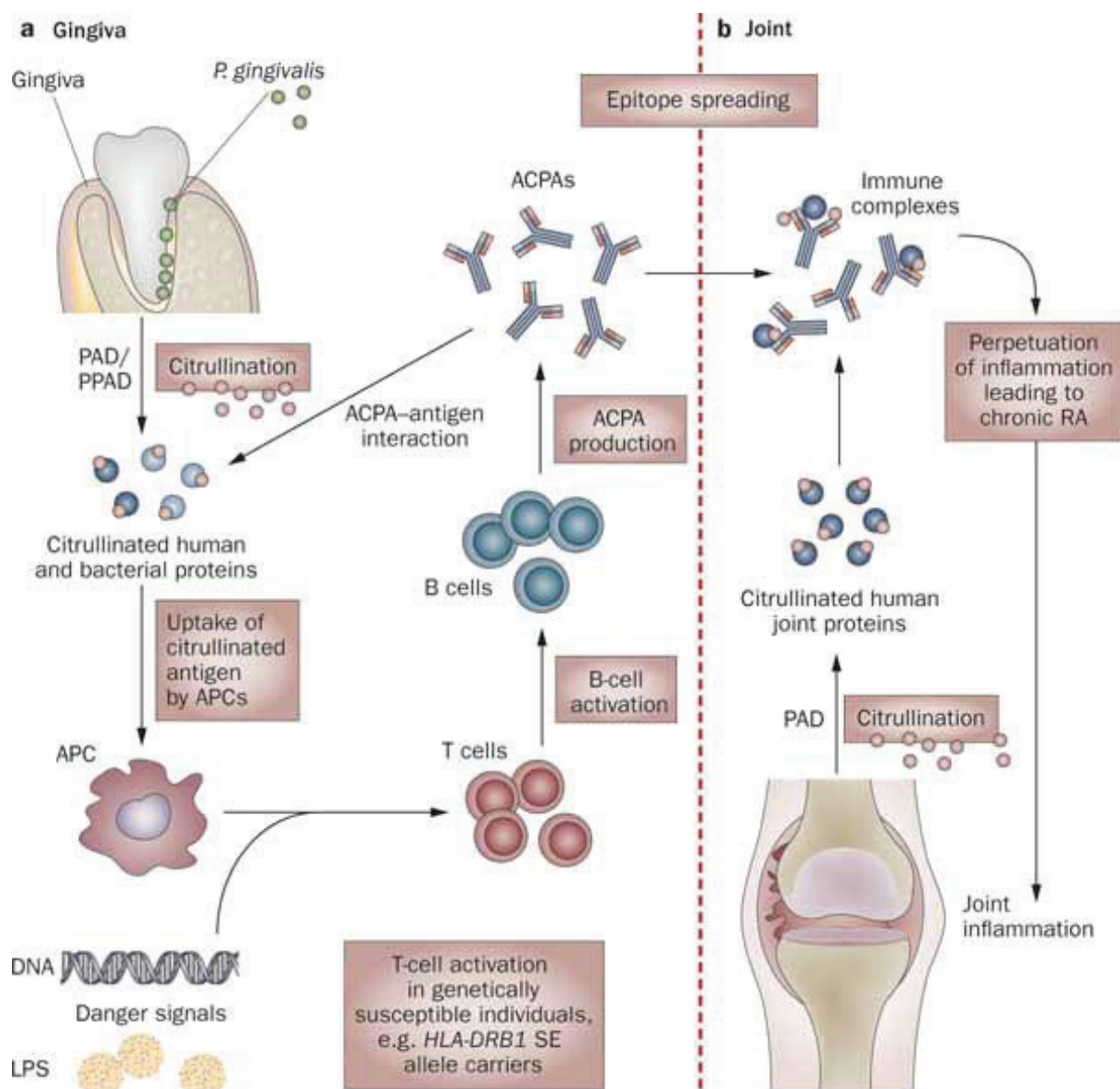


Figure 18 : *P. gingivalis* et citrullination. D'après Lundberg, K. et al. (2010) [168]. L'infection par *P. gingivalis* induit une citrullination des protéines humaines et/bactériennes (par les PAD humaines ou bactériennes). Les lymphocytes T sont activés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) ou par des antigènes citrullinés dans le contexte d'épitope partagé. De l'activation les lymphocytes B pathogéniques par les lymphocytes T résulte la production d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA). Un deuxième événement inflammatoire a lieu dans l'articulation, induisant la citrullination des protéines et la formation de complexes immuns. La perpétuation de ce processus inflammatoire induit la chronicité de la PR.

Le mécanisme de déclenchement de la maladie reste inconnu. Le premier événement pourrait être une réponse inflammatoire « non spécifique » à un antigène encore non identifié, avec accumulation locale de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (cellules dendritiques, macrophages) à l'origine de l'activation des

lymphocytes T CD4+, en particulier les Th17. Une réponse pro-inflammatoire Th1 a tout d'abord été proposée dans la PR [169], puis précisée en Th17 [170] dans la mesure où les Th1 sont des cellules productrices d'IFN γ , inhibiteur de l'ostéoclastogenèse. Les lymphocytes Th17, via l'IL-17, activent les macrophages et les neutrophiles à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-6, et l'IL-1. La présence de ces cytokines dans la synovie entraîne le recrutement de cellules immunitaires supplémentaires et la polarisation pro-inflammatoire de la réponse immunitaire. Les lymphocytes Th17 et les cellules dendritiques participent au recrutement des lymphocytes B, entraînant une réponse immunitaire de type humorale par la production d'autoanticorps, entretenant la chronicité de l'inflammation. Au niveau de l'articulation, les synoviocytes fibroblastiques deviennent résistants au TNF, à l'apoptose et perdent leur inhibition de contact, ce qui entraîne leur prolifération massive et incontrôlée ainsi que l'épaississement de la membrane synoviale qui forme alors le pannus. [171,172]. Les Th17 sécrètent de l'IL-17 qui stimule la production de RANKL par les synoviocytes fibroblastiques, stimulant l'ostéoclastogenèse. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF, IL-1 sont également à l'origine d'une augmentation de l'expression de RANKL par les synoviocytes fibroblastiques. RANKL est donc surexprimé au sein de l'articulation inflammatoire, accélère la différenciation ostéoclastique à l'origine de la dégradation osseuse induisant une destruction osseuse sévère (figure 18). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néoangiogenèse) est capitale dans le développement de l'inflammation synoviale. La vascularisation de la synoviale et du site osseux sous chondral favorise la pénétration de cellules inflammatoires. La membrane synoviale est alors envahie par des lymphocytes, des macrophages et des polynucléaires neutrophiles qui sécrètent de nombreux médiateurs inflammatoires. On parle alors de synovite. Enfin, cette vascularisation favorise l'évolution systémique de l'inflammation.

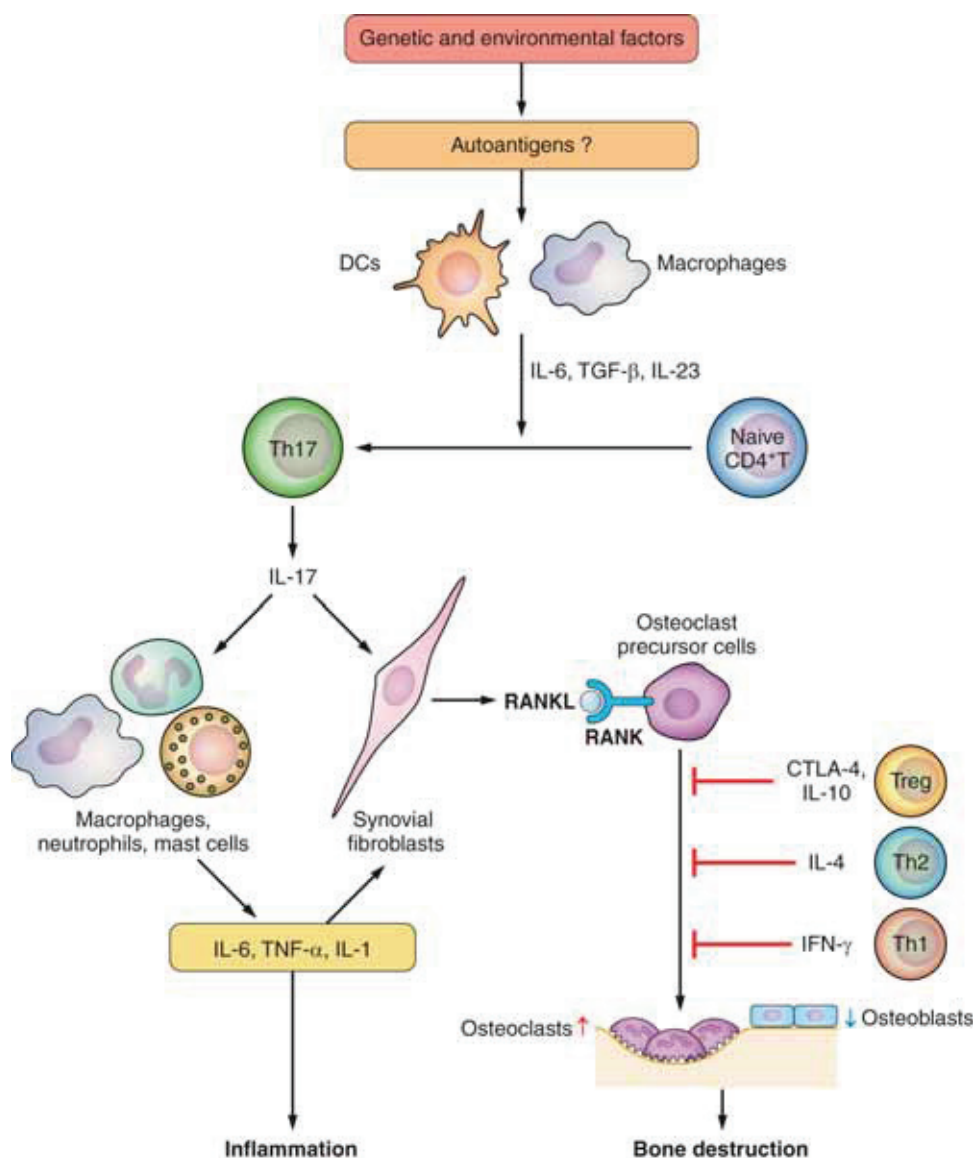


Figure 19 : La destruction osseuse au cours de la polyarthrite rhumatoïde, d'après Okamoto, 2017 [173].

Théorie Inside-Outside

Dans la physiopathologie de la PR, le modèle Outside-Inside a été proposé, où l'outside représente l'articulation synoviale et l'inside l'os [174]. D'après la littérature actuelle, la théorie majeure de l'étiologie de la PR est l'Outside-In, débutant avec une inflammation dans l'articulation qui active ensuite les ostéoclastes et la résorption osseuse. L'observation clinique d'articulations enflées et douloureuses est établie dès le diagnostic de la maladie, alors que les déformations liées à la perte osseuse sont constatées tardivement, en faveur de la théorie Outside-In. A cela s'ajoute la

littérature démontrant l'effet des synoviocytes sur le tissu osseux. Toutefois, la possibilité d'une action Inside-Out de l'os sur l'articulation est envisagée [175]. En effet, des résultats récents décrivent une perte osseuse précoce, chez certains patients en début de PR [176–178], ou sur des patients ACPA positifs sans œdème articulaire [179,180]. Des études récentes ont montré que les ACPA stimulaient la résorption osseuse via des interactions directes avec les ostéoclastes et leurs précurseurs. En effet, les ACPA se fixeraient sur des protéines citrullinées exprimées à la surface des pré-ostéoclastes [181]. Cette fixation entraîne une augmentation de la différenciation ostéoclastique et une augmentation de la résorption *in vitro* et *in vivo*. De façon intéressante, les ACPA apparaissent près de dix ans avant le début de la maladie [182] et même les patients sans synovite présentent des érosions osseuses s'ils sont positifs aux ACPA [179]. Ceci suggère donc une valeur pronostique des ACPA dans la PR. Ces éléments sont donc en faveur d'une action Inside-Out.

C. Les spondyloarthrites

1) Généralités

Les spondyloarthrites (SpA) regroupent des rhumatismes inflammatoires chroniques qui partagent un terrain génétique et certaines de leurs manifestations cliniques (spondylarthrite ankylosante, rhumatisme psoriasique, arthrites réactionnelles, arthrites associées aux entérocopathies inflammatoires et spondylarthropathies indifférenciées). La prévalence des spondyloarthrites est de 0,35 % en France et le sex-ratio de 1,5 (hommes/femmes). La majorité des cas débute chez l'adulte jeune (avant 35 ans). Les SpA atteignent notamment la colonne vertébrale et les articulations sacro-iliaques. L'inflammation des enthèses est également une caractéristique majeure des SpA, très souvent constatée au niveau du talon. On distingue des formes périphériques (pSpA) des formes axiales (axSpA). En effet, l'atteinte inflammatoire débute au niveau de l'enthèse et peut gagner secondairement la synoviale et cicatriser par une ossification expliquant l'ankylose. Même si l'atteinte axiale reste la caractéristique dominante [183], les patients présentent souvent également des dactylites, des uvéites [184,185], une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) ou du psoriasis ce qui rend les SpA très hétérogènes.

2) Physiopathologie

a) HLA-B27

L'incidence et la prévalence de la SpA dans le monde suivent la prévalence de HLA-B27. En effet, dans la population générale caucasienne, la prévalence du HLA-B27 est d'environ 8%, alors que dans la SpA, elle est d'environ 90%. Sachant que le HLA-B27 est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et que la SpA est une maladie inflammatoire, plusieurs hypothèses ont été soulevées quant à la contribution de HLA-B27 dans la physiopathologie de la maladie.

La première suggère que HLA-B27 présenterait un « peptide arthrogénique » aux lymphocytes T CD8, idée particulièrement intéressante étant donné l'association de la SpA avec les MICI et les infections des muqueuses [186]. Cependant, un rôle central, reproductible et universel de HLA-B27 dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD8 n'a toujours pas été démontré suggérant qu'il ne s'agirait pas de l'unique mécanisme responsable d'une prédisposition à la SA. Bien que l'expression de HLA-B27 chez des rats transgéniques induit un phénotype de SpA (associant arthrites périphériques, colite inflammatoire, conjonctivite, lésions cutanées et quelques signes articulaires axiaux) il n'a cependant pas été associé avec la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD8 [187]. De plus, la déplétion génétique en cellules T CD8 n'améliore pas la maladie chez ces animaux [188].

Une autre théorie suggère que les molécules de classe I auraient une tendance à adopter un mauvais repliement lors de leur assemblage. HLA-27 pourrait rester intracellulaire et induire un stress du réticulum endoplasmique. Ce stress, dû au mauvais repliement de HLA-B27, a été décrit chez les rats transgéniques exprimant HLA-B27. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse de ces animaux présentent les caractéristiques typiques de « la réponse à l'accumulation de protéines mal repliées » (Unfolded protein response, UPR), avec une surexpression de BiP (binding protein) qui se fixe sur HLA-B27 [189]. Ainsi HLA-27 induirait une UPR chez les macrophages, associée à une augmentation de la production d'IL-23 [190]. Le mécanisme de l'induction de l'expression d'IL-23 a été démontré et suggère l'activation du facteur de transcription CHOP (C/EBP homologous protein) suivant le stress du RE, qui se lie ensuite au promoteur d'*IL23p19* et induit l'expression d'IL-23 [191]. HLA-B27 induit non seulement la production d'IL-23 mais est également associé avec une expansion des cellules qui répondent à cette cytokine. En effet,

HLA-27 induit non seulement une UPR à l'intérieur de la cellule mais est également présent à la surface des cellules sous des formes anormales comme des homodimères. La présence de ces homodimères a été identifiée chez modèles de rongeurs transgéniques HLA-B27 ainsi que chez les patients atteints de SpA [192,193]. La présence de ces homodimères à la surface des cellules entraînerait une prolifération des lymphocytes T CD4, très sensibles à l'IL-23, et induirait la production de cytokines comme l'IL-17 par ces lymphocytes.

b) Réponse IL-23/Th17

L'IL-23 semble jouer un rôle particulier dans l'auto-immunité [194]. L'IL-23 appartient à la famille de l'IL-12, ainsi que l'IL-25 et l'IL-37 [195]. Comme l'ensemble des membres de ce groupe, c'est une cytokine hétérodimérique constituée de deux sous unités p19 (codée par l'IL23A et propre à l'IL-23) et p40 (codée par le gène *il12b* et commune à l'IL12).

La susceptibilité à la SpA a été associée avec des SNPs incluant le récepteur à l'IL-23 (*IL23R*), suggérant un rôle majeur de l'IL-23 au cours de la pathogénèse de la SpA [196]. Ce polymorphisme a également été décrit dans des maladies associées à la SpA comme les MICI et les rhumatismes psoriasiques [197]. De plus l'IL-23 est également produite en réponse au stress du réticulum endoplasmique engendré par *Chlamydia thrachomatis*, une bactérie associée à un sous type d'arthrite réactionnelle [191]. Ces observations suggèrent donc le rôle central de l'IL-23 dans la pathogénèse des SpA. De plus, d'importants taux d'IL-17 et d'IL-23 ont été mesurés dans le sérum de patients atteints de SpA [198].

L'IL-23 est produite par les cellules présentatrices d'antigènes : monocytes, macrophages et cellules dendritiques [199]. L'IL-23 induit l'expression d'IFN- γ , d'IL-10 et d'IL-17 par les lymphocytes T naïfs et les lymphocytes T mémoires CD45RO [200]. Il a été démontré que les souris déficientes en IL-23 (IL-23p19^{-/-}) sont résistantes à l'arthrite induite par injection de collagène et que l'IL-23 est nécessaire à l'induction des cytokines proinflammatoires telles que le TNF et l'IL-17[201]. Au sein des cellules immunitaires humaines, l'IL23R est exprimé par les cellules T mémoires, les cellules NK (Natural Killer), les cellules dendritiques et les macrophages [202]. De plus, plusieurs études ont démontré que l'IL-23R était un marqueur spécifique des cellules Th17 [203,204] et que l'IL23 était nécessaire au maintien de la pathogénicité des Th17 [205]. L'IL-23 stimule l'expression d'IL-23R

sur les cellules lymphocytes Th mémoires et induit une importante production d'IL-17 [206]. Au sein des facettes articulaires issues de patients atteints de SA, il a été démontré que le nombre de cellules produisant de l'IL-17 était augmenté [207]. De plus, l'association entre les fortes productions d'IL-23 et l'inflammation spécifique des enthèses a été démontrée. En effet, l'IL-23 stimule l'inflammation spécifique des enthèses en agissant directement sur une population de lymphocytes T résidents (CD3⁺CD4⁺CD8⁻RORγt⁺) stimulant la sécrétion de cytokines comme l'IL-17 et l'IL-22. En effet, dans un modèle d'arthrite induit par l'injection d'anticorps anti-collagène, l'IL-22 induirait la formation osseuse par les ostéoblastes au niveau de la zone d'attachement entre les tendons et l'os suggérant que la dérégulation de l'IL-23 induit à la fois l'inflammation des enthèses et la formation osseuse dans cette zone. En conclusion, l'expression d'IL-23 seule, en absence d'autres signaux inflammatoires, est donc suffisante pour reproduire les signes de la SA [208].

c) Les micro-organismes et le microbiote intestinal

Le rôle des micro-organismes a été souligné dans la physiopathogénie des spondylarthrites. Ainsi, les arthrites réactionnelles sont déclenchées par une infection bactérienne muqueuse, essentiellement uro-génitale ou digestive. Or, un certain nombre de ces arthrites réactionnelles évoluent vers une spondylarthrite ankylosante ou vers une autre forme chronique de spondyloarthrite. Il est donc possible qu'une stimulation bactérienne, survenant à distance de l'appareil locomoteur, intervienne à bas bruit dans la physiopathogénie de toute spondyloarthrite. Les expériences menées dans le modèle animal du rat transgénique HLA B27 viennent renforcer ces hypothèses vis à vis des bactéries. Ainsi, il a été montré que les rats transgéniques élevés en atmosphère stérile ne développent pas la maladie alors qu'ils débutent l'affection lorsqu'ils sont remis en milieu usuel [209].

Le rôle possible du microbiote de la muqueuse intestinale dans cette physiopathogénie a été souligné. Ainsi, plusieurs équipes ont mis en évidence une inflammation de la muqueuse intestinale de patients atteints de spondyloarthrite et ce en dehors de tout symptôme digestif [210]. Il semble donc exister à bas bruit une entéocolite histologique chez une majorité de patients atteints de spondylarthropathies. Venant corroborer ces données, le modèle animal du rat transgénique HLA B27 met en évidence la précession des symptômes articulaires par les symptômes digestifs.

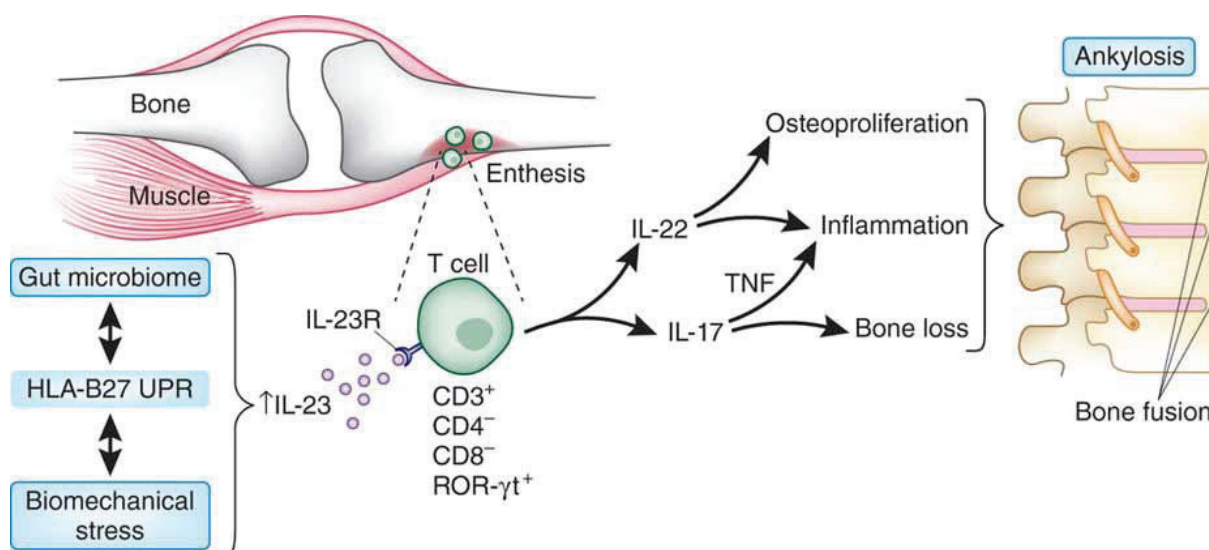


Figure 20 : L'IL-23 et les cellules T résidentes de l'enthèse favorisent l'enthésite et l'ostéoprolifération dans la spondylarthrite ankylosante (Lories et al., 2012 [211]).

D. L'atteinte osseuse au cours des rhumatismes inflammatoires

Dans la PR, l'atteinte osseuse majeure est la résorption. A l'inverse, la SpA débute également par une phase de résorption avec des érosions osseuses mais évolue ensuite en une phase d'activation pathologique de la formation osseuse. Ceci résulte en une ossification intervertébrale, formant des syndesmophytes [212,213] qui au stade ultime peut aboutir à une ankylose sévère en « colonne de bambou » au cours de l'axSpA, autrefois dénommée spondylarthrite ankylosante (SA) et conduit à une impotence fonctionnelle majeure.

1) Ostéoimmunologie

L'os et le système immunitaires partagent un grand nombre de molécules, dont des cytokines, des chimiokines, des hormones, des récepteurs et des facteurs de transcription. Les cellules osseuses interagissent avec les cellules immunitaires aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques. En effet, les

cellules osseuses et les cellules hématopoïétiques possèdent le même micro-environnement dans la moelle osseuse et interagissent ensemble pour accomplir les activités fonctionnelles du système osseux dont l'hématopoïèse et le contrôle du métabolisme minéral. L'étroite relation entre le système immunitaire et l'os a été découverte dans les années 1970 avec les études pionnières portant sur des facteurs dérivés de cellules immunitaires capables d'activer les ostéoclastes [214,215]. Ce parallèle de structure et de fonction a donné naissance à une nouvelle discipline : l'ostéoinmunologie. Les ostéoclastes proviennent de la fusion des cellules mononuclées dérivant de la lignée myéloïde et le M-CSF, essentiel dans le maintien de cette lignée, est indispensable pour la différenciation ostéoclastique ainsi que le RANKL. Les ostéoclastes sont issus de la différenciation des monocytes périphériques mais il a également été démontré qu'ils pouvaient également être issus de la transdifférenciation des cellules dendritiques humaines et murines *in vitro* [216]. Cette transdifférenciation *in vitro* a été confirmée *in vivo* par le transfert de cellules dendritiques dans les souris NOD/SCID après co-culture avec des lymphocytes T CD4+ [217]. Les cellules du système immunitaire supportent la différenciation des cellules osseuses comme l'ostéoclaste. Les lymphocytes T influencent l'ostéoclastogénèse via la sécrétion de différentes cytokines et la perte osseuse médiée par les ostéoclastes dans la PR est le meilleur exemple du lien entre ces deux systèmes. L'interaction entre les lymphocytes T et les ostéoclastes est observée au cours de l'activation anormale du système immunitaire au cours de la PR. Le RANKL a, en premier lieu, été identifié comme un membre de la superfamille du TNF, exprimé par les lymphocytes T et les cellules dendritiques [218,219]. Il a ensuite été identifié comme facteur essentiel à la différenciation ostéoclastique [220]. RANKL est non seulement exprimé par les ostéoblastes qui supportent l'ostéoclastogénèse dans le tissu osseux, mais est également par les lymphocytes T activés, suggérant que la résorption ostéoclastique est influencée par les lymphocytes T. Cependant, un certain nombre de cytokines dérivées des lymphocytes T telles que l'IL-4, l'interféron gamma (IFN γ) et l'IL-10 inhibent l'ostéoclastogénèse [221]. L'équipe de Takayanagi a identifié une population de lymphocytes T helper (Th) 17 produisant de l'IL-17 comme étant la sous-population de lymphocytes T exclusivement ostéoclastogénique [222]. En effet, les lymphocytes T induisent la production de RANKL, notamment les Th17, via le facteur de transcription NFATc1 [223]. Les Th17 ont été décrits comme stimulant

l'ostéoclastogenèse, pas uniquement en produisant du RANKL mais aussi en stimulant directement la production de RANKL par les synoviocytes fibroblastique via IL-17 [222]. L'IL-17 stimule également l'inflammation locale ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent la production de RANKL par les synoviocytes fibroblastiques et par extension l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse [224].

2) La dégradation osseuse

Les rhumatismes inflammatoires sont associés à différents types de perte osseuse :

- Une ostéoporose systémique
- Une perte osseuse péri-articulaire
- Des érosions osseuses articulaires localisées

L'ostéoporose systémique contribue à la sévérité de ces maladies. Cette ostéoporose possède des origines multifactorielles et apparaît en réponse à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, à l'inactivité physique due à la douleur ou à la malabsorption en cas des maladies intestinales inflammatoires associées. La diminution de la densité osseuse observée chez les patients souffrants de rhumatismes inflammatoires engendre une augmentation du risque de fracture [225] et est à l'origine d'une activation des ostéoclastes, comme le décrivent des études basées sur le dosage des biomarqueurs [226]. De façon intéressante, un important taux de résorption osseuse est associé à des formes sévères de la maladie. De même, des données obtenues à l'aide de modèles animaux indiquent que la perte osseuse systémique observée au cours de l'arthrite inflammatoire est due à une résorption osseuse exacerbée médiée par les ostéoclastes [227,228]. De plus, dans des modèles animaux d'arthrite, l'administration de bisphosphonate protège de la perte osseuse systémique [229,230].

La perte osseuse périarticulaire apparaît très précocément et avant même l'apparition des premiers signes cliniques [231]. Cette forme de perte osseuse apparaît dans l'os trabéculaire adjacent aux articulations enflammées et est associée à une augmentation de la résorption osseuse. Cependant, les mécanismes à l'origine de cette perte osseuse n'ont pas encore été identifiés.

Les érosions osseuses sont la caractéristique majeure des rhumatismes inflammatoires. Au sein des articulations inflammées, ils sont observés à l'interface entre le pannus et l'os, où le pannus envahit l'os cortical et sous chondral. Le mécanisme à l'origine des érosions osseuses a été décrit assez récemment. En effet, le rôle des ostéoclastes dans les érosions osseuses a été étudié car ce sont les seules cellules capables de résorber l'os. Leur rôle était suspecté sur la base de preuves indirectes dont l'identification de cellules multinuclées et TRAP positives au niveau des sites d'érosion sur des échantillons humains de PR et la mise en évidence de la capacité des synoviocytes à sécréter la cytokine pro-ostéoclastique RANKL [232]. Le plus, le rôle des ostéoclastes au cours de la dégradation osseuse a été décrit avec l'utilisation des modèles animaux déficients en ostéoclastes en conditions arthritiques [227,233]. Dans ces deux études, les souris présentaient tous les symptômes associés à la maladie à l'exception des érosions osseuses. Les érosions osseuses sont une conséquence de l'inflammation synoviale avec la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF, IL-17) qui stimulent la résorption osseuse via l'induction de l'expression de RANKL par les synoviocytes fibroblastiques. De plus, il a été démontré que les synoviocytes fibroblastiques isolés de patients atteints de PR étaient capables de stimuler la différenciation de monocytes en ostéoclastes en présence de M-CSF [234]. L'utilisation de souris KO conditionnelles pour RANKL spécifiquement dans les lymphocytes T ou les synoviocytes fibroblastiques a permis de mettre en évidence que ces fibroblastes sont les contributeurs majeurs l'érosion osseuse médiée par les ostéoclastes dans des modèles murins arthritiques [235]. Plus récemment, les ACPA ont également été décrits pour stimuler la différenciation ostéoclastique et l'activité de résorption osseuse ostéoclastique au cours de la PR.

De façon générale, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF, IL-17) stimulent la résorption osseuse alors que les cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-13) la freinent [236].

Le TNF est la cytokine clé impliquée dans l'inflammation et la destruction osseuse. Au sein du pannus, le TNF est produit par les macrophages activés et les synoviocytes fibroblastiques. Le pôle prédominant du TNF au cours de l'inflammation en a fait une des premières cibles de traitement. Il régule la différenciation et la

résorption ostéoclastique. Il stimule l'ostéoclastogénèse indirectement en induisant l'expression de RANKL par les ostéoblastes et les cellules mésenchymateuses. Il est capable de stimuler directement l'ostéoclastogénèse en synergie avec RANKL. En effet, le TNF et RANKL appartiennent tous les deux à la superfamille du TNF et sont de puissants activateurs de la voie NF κ B et NFATc1 (190). Enfin, un autre mécanisme de perte osseuse stimulée par le TNF serait une altération du lignage hématopoïétique en réponse à une surexpression systémique du TNF qui induirait une augmentation du nombre de précurseurs ostéoclastiques circulants dans des modèles murins arthritiques [239]. L'effet du TNF est donc médié via son action directe sur les ostéoclastes, par le recrutement des précurseurs ostéoclastiques et par l'expression de RANKL par ostéoblastes et les synoviocytes.

La cytokine phare de la réponse Th17 est l'IL-17, ou IL-17A depuis l'identification de plusieurs sous membres, répertoriés d'IL-17A à IL-17F. Cette cytokine de 20-30 kDa (kiloDalton) est un polypeptide homodimérique glycosylé, sécrété par les lymphocytes T mémoire CD4⁺ activés. Dans des conditions arthritiques, l'IL-17 exerce son effet pro-ostéoclastique en stimulant l'expression de RANKL par les synoviocytes fibroblastiques et les ostéoblastes, et en stimulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée dont le TNF, l'IL-1 β et l'IL-6. Ces cytokines stimulent également l'ostéoclastogénèse en activant la signalisation RANK chez les précurseurs ostéoclastiques et en stimulant l'expression de RANKL par les synoviocytes. Ces effets synergiques stimulent l'inflammation au sein du compartiment synovial ainsi que la résorption osseuse ostéoclastique et donc l'apparition et la progression des érosions osseuses. Enfin, les souris déficientes en IL-17 sont résistantes à l'arthrite induite par injection de collagène ce qui renforce le rôle central de cette cytokine dans la physiopathologie de la PR [240].

L'IL-6 constitue également une cytokine importante dans la physiopathologie de la PR. Elle est majoritairement produite par les synoviocytes fibroblastiques, les macrophages et les lymphocytes T [241]. *In vivo*, l'IL-6 contribuerait à la perte osseuse en stimulant l'expression de RANKL par les ostéoblastes et les synoviocytes fibroblastiques [242]. De plus, des études *in vitro* ont démontré que le TNF et l'IL-1 stimulent l'expression constitutive de l'IL-6 par les synoviocytes fibroblastiques. Dans un modèle murin d'arthrite induite par antigène, les souris déficientes en IL-6

présentent une réduction de la synovite, du nombre d'ostéoclastes et de lésions structurales par rapport aux souris sauvages [243]. Enfin, chez les patients atteints de PR, les taux sériques d'IL-6 et du récepteur soluble de l'IL-6 sont corrélés avec la perte osseuse et le nombre d'érosions articulaires radiographiques [244].

La signalisation de l'IL-1 *in vivo* est un processus complexe. Elle est médiée par l'interaction de l'IL-1 avec son récepteur IL-1R1 et est inhibée en présence de l'inhibiteur compétitif soluble IL-1Ra. Les patients présentent des taux d'IL-1 β supérieur au l'IL-1Ra dans leur liquide synovial. L'IL-1 est produite par les macrophages et les synoviocytes fibroblastiques. Le rôle de l'IL-1 au cours de l'arthrite inflammatoire a été démontré avec l'utilisation de lignées transgéniques. En effet, la surexpression de l'IL-1 [245] et la délétion de l'IL-1Ra [246] induisent le développement d'une arthrite associée avec une destruction osseuse. L'IL-1 joue également un rôle clé dans la progression de la destruction osseuse. En effet, la stimulation des ostéoclastes par le TNF induit une augmentation de l'expression d'IL-1 et d'IL-R1 par les précurseurs ostéoclastiques et l'IL-1 stimule la différenciation ostéoclastique médiée par RANKL. En effet IL-1 agit en synergie avec RANKL pour induire la différenciation et la résorption ostéoclastique. Enfin, l'IL-1 stimule également indirectement l'ostéoclastogenèse en induisant l'expression de RANKL par les ostéoblastes. L'utilisation de la forme recombinante de l'IL-1Ra a prouvé son efficacité dans le traitement de l'arthrite inflammatoire avec une diminution de la progression des érosion focales chez un nombre significatif de patients [247].

a) Cas des autoanticorps dans la PR

Bien que les cytokines proinflammatoires contribuent fortement à la stimulation de l'ostéoclastogenèse au cours de la PR, l'érosion osseuse est également stimulée par des autoanticorps. Plusieurs groupes d'autoanticorps ont été décrits dans le cadre de la PR. Le premier décrit est le facteur rhumatoïde (FR) qui est dirigé contre la région constante des IgG et qui induit donc la formation de complexes immuns dans le sérum. Le FR est associé avec la sévérité de la PR [248].

Plus récemment, des autoanticorps contre les protéines citrullinées (ACPA) ont été décrits (anticorps anti-vimentine citrullinée et anti-fibrine citrullinée notamment). La

citrullination est une modification post traductionnelle des protéines, au cours de laquelle les acides aminés arginine sont convertis en acide aminé citrulline. Cette modification est réalisée par un groupe d'enzymes, les peptidylarginine deiminases (PAD), impliquées dans divers processus biologiques tels que l'apoptose, la kératinisation de la peau et la formation de pièges extracellulaires [249]. Le remplacement de l'arginine par la citrulline altère la charge de la protéine et peut donc mener à la formation de néo-épitopes et induire le développement d'autoanticorps comme c'est le cas au cours de la PR. Les ACPA sont très spécifiques de la PR et possèdent une valeur prédictive dans la progression de la maladie. Les patients positifs pour les ACPA (environ deux tiers des patients atteints de PR) présentent un développement de la maladie plus agressif et plus d'érosions osseuses [250]. Le pannus des patients atteints de PR renferme un grand nombre de peptides et de protéines citrullinées qui servent d'antigènes pour les ACPA et induisent la formation de complexes immuns [251,252]. Les ACPA appartiennent au type IgG et sont capables d'activer les récepteurs Fcγ (FcγR) à la surface des cellules immunitaires. Plusieurs études décrivent une augmentation de la production de TNF par les macrophages stimulés par des complexes immuns issus de liquides synoviaux de patients atteints de PR [252], par des ACPA isolés de sérum ou par des protéines citrullinées [253]. Le TNF étant un stimulateur de l'ostéoclastogénèse et de la résorption, la contribution des ACPA dans la perte osseuse était attribuée à la sécrétion de cytokines proinflammatoires. Cette hypothèse est supportée par une étude récente démontrant que les complexes d'IgG non spécifiques dont le fragment Fc est désialylé sont capables de stimuler l'ostéoclastogénèse en se fixant sur les FcγR des pré-ostéoclastes [254]. Les ostéoclastes expriment FcγR qui leur permet de fixer les complexes immuns contenant des IgG. Il a d'ailleurs été récemment démontré que l'expression de FcγR est stimulée au cours de l'ostéoclastogénèse et que le cross link de ces récepteurs stimule la différenciation des ostéoclastes. De plus, les souris déficientes en FcγRIV spécifiquement dans les ostéoclastes sont en partie protégées de la perte osseuse dans un modèle d'arthrite induite par transfert de sérum [255]. Il est donc fortement probable que les ACPA activent les ostéoclastes via FcγR. Il semble évident que les ACPA contribuent aux lésions observées au cours de la PR.

b) Inhibition de la formation osseuse dans la PR

Un des obstacles pour le traitement de la PR est que l'os ayant subi des érosions osseuses ne se répare pas, d'où l'intérêt d'un diagnostic précoce. Un des inhibiteurs potentiels de l'ostéoblastogenèse au cours de la PR est le TNF. En effet, le TNF induit une augmentation de l'expression de DKK-1 par les synoviocytes fibroblastiques induisant l'inhibition de la voie Wnt. Le niveau d'expression de DKK-1 est augmenté dans le sérum des patients atteints de PR ainsi que dans des modèles animaux et son blocage réduirait la perte osseuse sans modifier la synovite [256–259]. L'IL-1 et l'IL-17 ont également été décrits comme inhibiteurs de la différenciation ostéoblastique et de la formation osseuse *in vitro* et dans des modèles murins arthritiques [240,260].

3) La formation osseuse dans la SA

Les sites les plus importants de l'atteinte osseuse dans la SA sont les articulations sacroiliaques et la colonne vertébrale. Dans la plupart des cas, des érosions osseuses apparaissent avec un élargissement de l'espace articulaire, suivies par une formation osseuse aboutissant à une ankylose totale de l'articulation. Au niveau de la colonne vertébrale, ce phénomène débute par une érosion locale des coins vertébraux qui s'étend et aboutit à des érosions sur l'ensemble du plateau vertébral. Puis, des protrusions osseuses (syndesmophytes) se forment au niveau des enthèses, menant parfois à une ankylose totale de la colonne alors appelée « colonne de bambou ». Les articulations périphériques subissent le même phénomène d'ostéoformation au niveau des enthèses. Les protrusions osseuses de la colonne et des articulations périphériques sont respectivement nommées syndesmophytes et enthésophytes. Outre cette ostéoformation, une perte osseuse au niveau de colonne et du bassin est également impliquée au cours de la SA. Cette ostéoporose possède une origine multifactorielle due à l'augmentation des taux de cytokines proinflammatoires et à l'inactivité physique due à la douleur elle-même liée à l'ankylose vertébrale.

Le remodelage osseux est clairement pathologique au cours de la SA, avec une formation osseuse locale exagérée mais également une perte osseuse trabéculaire induisant une ostéoporose et un risque de fracture [261]. Les BMP et la voie Wnt, requis dans les processus de formation osseuse physiologique, sont également

impliqués dans l'ostéoformation pathologique de la SA. L'implication des BMPs dans l'ankylose des enthèses a été décrite dans un modèle de souris DBA/1 vieillissantes [262]. Ces souris développent une arthrite spontanée périphérique au niveau des pattes arrière, en particulier aux orteils, avec un remodelage osseux accru débutant au niveau de l'enthèse. Différentes BMP sont présentes aux différents stades de la maladie et l'inhibiteur de BMPs, Noggin, est capable d'inhiber le processus d'ankylose de façon préventive et thérapeutique. Bien que l'implication des BMPs dans la SA chez l'homme soit peu décrite, l'activation de leur voie de signalisation a été démontrée dans les enthèses de patients atteints de SpA et deux polymorphismes de BMP6 ont été associés avec la sévérité de la SA [263]. Récemment, il a été démontré que les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse de patients atteints de SA possédaient une capacité de différenciation ostéogénique supérieure aux cellules de donneurs sains, effet attribué à un déséquilibre entre BMP2 et Noggin, résultant en une augmentation de la voie ERK1/2 MAPK [264]. Une autre voie de signalisation importante au cours de l'ostéoformation est la voie Wnt. Cette voie semble également jouer un rôle dans la formation osseuse pathologique, qui a été décrit dans le modèle arthritique de souris transgéniques *hTNF*. Dans ce modèle, surtout utilisé comme modèle de PR et caractérisé par des érosions osseuses, un anticorps anti-DKK1, inhibiteur de la voie Wnt, modifie le phénotype des animaux, d'une arthrite destructive en une formation osseuse de type arthrose avec la présence d'ostéophytes [256].

E. Axe ATX/ LPA et arthrite

L'implication de l'ATX dans la PR a été décrite pour la première fois dans une étude décrivant la présence d'ARNm d'ATX dans les synoviocytes fibroblastiques de patients atteints de PR et la diminution de son expression par l'IFN- γ [265]. Le même groupe a également mis en évidence que le taux d'ATX dans les synoviocytes fibroblastiques de PR était cinq fois plus élevé que chez les sujets contrôles [266]. Une étude récente a confirmé la présence de l'ATX dans les synoviocytes fibroblastiques de patients atteints de PR en particulier dans les synoviocytes fibroblastiques adjacents au cartilage lésé [267]. Il a également été démontré que l'expression de l'ATX était plus élevée dans la membrane synoviale des patients atteints de PR que dans celle de patients atteints d'arthrose [268]. De plus, deux

études ont démontré la présence de la protéine de l'ATX dans les fluides synoviaux de patients atteints de PR [269,270]. De plus, les cellules endothéliales de la paroi des veinules expriment de l'ATX, qui serait impliquée dans le trafficking des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires ou vers le site inflammatoire dans le cas d'une inflammation chronique [34]. L'ensemble de ces études suggère donc l'implication de l'ATX dans la PR, induisant la production locale de LPA au sein de la synoviale et du liquide synovial. Plusieurs études ont analysé le rôle du LPA et de ses récepteurs dans la pathogenèse de la PR. L'expression des récepteurs LPA₁, LPA₂ et LPA₃ a été décrite dans les synoviocytes fibroblastiques de patients atteints de PR [270]. LPA₁ est le récepteur le plus exprimé suivi par LPA₃ et LPA₂. De plus, l'expression de LPA₁ a été décrite comme significativement plus élevée au sein des synoviocytes fibroblastiques de patients atteints de PR que chez les patients atteints d'arthrose [268]. L'inhibition génétique et pharmacologique de LPA₁ protège les souris du développement de la maladie en inhibant la différenciation des lymphocytes Th17, des ostéoclastes et en réduisant l'infiltration des lymphocytes B. Très récemment, l'expression des récepteurs LPA₄₋₆ a été décrite dans les synoviocytes fibroblastiques de PR [271]. Le rôle de la signalisation fonctionnelle du LPA dans la réponse inflammatoire des synoviocytes fibroblastiques de PR a été très étudié. Il a été démontré que le LPA se lie à ses récepteurs à la surface des synoviocytes fibroblastiques et, via les protéines G_{i/o} et G_{12/13} induit l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et Rho. Ces voies de signalisation induisent l'activation du facteur de transcription NFκB qui régule la production de cytokines. L'utilisation des antagonistes des récepteurs LPA_{1/3} a démontré le rôle du LPA dans la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 et la synergie entre le LPA et le TNF dans la production de ces cytokines [270]. Le LPA a également été décrit comme ayant un rôle dans la production de COX-2 dans les synoviocytes fibroblastiques de PR ainsi que son rôle synergique avec IL-1β [269]. Cet effet est inhibé par l'utilisation du Ki16425, inhibiteur spécifique de LPA_{1/3}. D'autres effets ont également été démontrés dont la stimulation de la migration des synoviocytes fibroblastiques de PR [270,271]. Une équipe a également mis en évidence l'inhibition de LPA₁ dans les synoviocytes fibroblastiques abroge leur prolifération induite par le TNF et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le TNF [272]. Ceci suggère une communication croisée entre le TNF et le LPA au cours de la PR.

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour analyser l'implication de l'axe ATX-LPA dans des modèles d'arthrite. Les modèles ayant été les plus utilisés sont les modèles d'arthrite induite par le collagène (CIA) [273], le modèle de transfert de sérum, K/BxN [274], et les souris transgéniques *hTNF* surexprimant le TNF humain [275] (tableau 3).

Tableau 3 : Modèles expérimentaux démontrant l'implication de l'axe ATX-LPA dans la PR.

Modèle d'arthrite	Traitement	Approche génétique	Résultats
CIA	BrP-LPA (antagoniste LPAR et inhibiteur ATX)		Diminution incidence maladie [276]
K/BxN	Ki16425 (antagoniste LPA1/3)		Augmentation apoptose synoviocytes fibroblastiques et différenciation ostéoblastique, réduction inflammation synoviale, de la destruction du cartilage et des érosions osseuses (diminution différenciation et fonction ostéoclastique) [277]
CIA	LA-01 (antagoniste LPA1)		Réduction différenciation des ostéoclastes et diminution des cellules TH17 [268]
CIA		KO LPA1	Protection totale contre l'arthrite, suppression différenciation Th17 et des ostéoclastes [268]
<i>hTNF</i>/CIA		Délétion spécifique ATX dans les cellules mésenchymateuses	Diminution incidence maladie [267]

L'ensemble de ces résultats pointe l'axe ATX-LPA comme cible thérapeutique dans la PR. Le blocage de cet axe pourrait impliquer des réels bénéfices thérapeutiques dont la diminution de la prolifération des synoviocytes fibroblastiques et de leur résistance à l'apoptose, la diminution de l'infiltration cellulaire (lymphocytes T et B), la réduction de la différenciation des lymphocytes Th17 et l'inhibition de la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes, réduisant ainsi la physiopathologie de la maladie.

Objectifs

Le principal objectif de ce travail consistait à étudier l'implication de l'autotaxine dérivant des ostéoclastes dans la destruction osseuse observée en conditions inflammatoires.

La PR est une maladie chronique caractérisée par une inflammation synoviale (synovite), une destruction du cartilage articulaire et une dégradation osseuse locale et systémique. L'érosion osseuse est caractéristique de la PR et est directement associée à la sévérité et à la détérioration fonctionnelle. Ainsi, les traitements se sont concentrés sur l'inhibition de l'inflammation afin de ralentir la synovite et la progression des érosions. Cependant, ces érosions persistent chez certains patients en rémission [278,279].

Les ostéoclastes sont responsables des érosions focales, de la perte osseuse articulaire et de l'ostéoporose systémique [280,281]. La présence des ostéoclastes au niveau des érosions focales à l'interface pannus-os a été démontrée [227,233,282]. Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées issues de la fusion de cellules mononucléées de la lignée myéloïde sous la stimulation du M-CSF et du RANK-L [220]. Le dénosumab, un anticorps neutralisant se fixant au RANK-L et inhibant l'ostéoclastogénèse, ralentit la progression des érosions chez les patients atteints de PR, sans affecter l'inflammation synoviale. Ceci démontre qu'il est possible de diminuer la formation des érosions osseuses en ciblant les ostéoclastes [283,284].

L'autotaxine, aussi connue comme ecto-nucléotidase pyrophosphatase/PDE-2 (ENPP2), est une protéine sécrétée, produite par de nombreux tissus dont le cerveau, le foie et le tissu adipeux. L'ATX possède une activité lysophospholipase D, responsable du clivage du LPC en LPA. Le LPA est un phospholipide aux activités pléiotropiques comme la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration, via sa fixation à ses récepteurs couplés aux protéines G (LPA1-6). L'effet biologique du LPA serait une conséquence directe d'une production locale d'ATX dans un tissu donné. De plus, notre équipe a récemment démontré que le LPA contrôlait à la fois l'ostéoclastogénèse et l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes, via LPA₁ [63,96]. Les souris LPA₁^{-/-} semblent être protégées de l'arthrite induite par le

collagène (CIA) et présentent une réduction de la destruction osseuse au niveau articulaire. En parallèle, le traitement des animaux avec un inhibiteur de LPA₁ diminue les signes arthritiques [268]. Des taux élevés de LPA et d'ATX induits par le TNF ont été détectés dans les liquides synoviaux et les synoviocytes fibroblastiques de patients atteints de PR [265–268,270]. La concentration sérique d'ATX est augmentée chez les souris transgéniques *hTNF*^{+/-} et l'ablation conditionnelle de l'ATX dans les cellules mésenchymateuses, dont les synoviocytes fibroblastiques, induit une atténuation du développement arthritique [267].

Ces données soulignent l'importance de l'axe ATX/LPA dans la pathogénèse de la PR. Pourtant, l'implication potentielle de l'ATX dans l'ostéoclastogénèse et la dégradation osseuse au cours de l'arthrite n'a pas été explorée. De plus, la validation pharmacologique de l'axe ATX/LPA comme cible thérapeutique dans la PR reste à démontrer.

Au cours de ce travail, nous avons étudié le rôle de l'ATX au cours de l'ostéoclastogénèse et le contrôle de la masse osseuse, ainsi que le ciblage de l'ATX dans la perte osseuse inflammatoire et la formation des érosions.

A l'aide de modèles génétiques et pharmacologiques, nous avons pu démontrer que l'inhibition de l'ATX prévient la perte osseuse systémique ainsi que les érosions osseuses dans des conditions inflammatoires. Nous démontrons également que l'ATX est un facteur autocrine produit par les ostéoclastes, indispensable pour leur activité de résorption osseuse. Ainsi, l'ATX pourrait être une cible thérapeutique pour la prévention de l'ostéoporose associée à l'inflammation et la formation d'érosions osseuses au cours de la PR.

Dans une deuxième étude, effectuée en collaboration avec le laboratoire SAINBIOSE Inserm 1059 de Saint-Etienne, l'objectif était d'étudier le phénotype osseux vertébral dans le modèle de souris arthritiques *hTNF* et la présence éventuelle de syndesmophytes. Mon travail a consisté à étudier de la microarchitecture vertébrale des animaux par μ -CT.

Au cours de l'inflammation, l'homéostasie osseuse est déséquilibrée avec une diminution de la formation osseuse et une augmentation de la résorption, en particulier au cours de la PR. *In vitro*, le TNF inhibe la différenciation ostéoblastique

et la minéralisation en induisant l'apoptose des ostéoblastes [285]. A l'inverse, le TNF induit l'expression de RANKL et l'ostéoclastogénèse. Le TNF est impliqué dans les rhumatismes inflammatoires comme la spondylarthrite ankylosante (SA) et la polyarthrite rhumatoïde (PR). La principale différence entre la SA et la PR est la présence d'ossification ectopique au cours de la SA, associée à une perte osseuse systémique. Au niveau articulaire, la perte osseuse sous-chondrale induite par l'inflammation est principalement due à la surexpression de cytokines proinflammatoires dont le TNF, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-17 qui stimulent la résorption osseuse via l'activation des ostéoclastes. Dans la SA, l'inflammation des articulations sacro-iliaques induit une destruction osseuse suivie par une fusion. En parallèle, au niveau de la colonne vertébrale, l'inflammation locale est associée à une phase de formation osseuse retardée conduisant à une ossification irréversible appelée syndesmophyte. Malgré la prolifération osseuse à l'extérieur de l'os, un risque de fracture vertébrale et non vertébrale a été décrit chez les patients présentant des syndesmophytes [286]. La tomodensitométrie s'est récemment révélée être un outil puissant pour étudier l'apparition et l'évolution des syndesmophytes chez les patients atteints de SA [213].

La surexpression du TNF observée dans plusieurs modèles arthritiques était la preuve de concept pour l'utilisation d'inhibiteurs de TNF dans le but de diminuer les signes cliniques de l'arthrite [287–290]. Malgré la capacité des inhibiteurs du TNF à bloquer la destruction osseuse dans la PR, aucune prévention de la formation de syndesmophyte n'a été observée dans la SA [291–293]. Le rôle du TNF dans la formation de syndesmophytes au cours de la SA reste donc à élucider.

Les souris transgéniques surexprimant le TNF humain (*hTNF*) ont été utilisées comme modèle arthritique. Le transgène est modifié dans la région 3' régulatrice du TNF, et associé à un promoteur constitutif. Ainsi, les souris hTNF surexpriment le TNF [294]. Ces souris présentent un retard de croissance, une inflammation articulaire périphérique et une érosion osseuse agressive. Ce phénotype est induit par l'expression constitutive du TNF et de ses effets proinflammatoires via l'IL-1 sur l'os et le cartilage. Le gonflement articulaire débute 4 semaines après la naissance et la perte de fonction des membres inférieurs apparaît à l'âge de 10 semaines. L'apparition d'une sacroiliite et d'érosions osseuses au niveau sacroiliaque ont été décrites autour de la onzième semaine [295]. Cependant, l'étude de la colonne vertébrale n'avait jamais été réalisée dans ce modèle.

Afin de mieux comprendre la différence entre l'inflammation et la prolifération osseuse ectopique associée à la perte vertébrale, nous avons étudié la présence de syndesmophytes et la perte osseuse vertébrale chez les souris *hTNF* à différents âges. Dans ce but, nous avons réalisé une analyse approfondie de l'os vertébral et de l'espace intervertébral afin de mesurer l'occurrence des syndesmophytes dans la colonne vertébrale et de mesurer l'impact de la surexpression du TNF sur la résorption et la formation osseuse dans cette zone.

MATERIEL ET METHODES

A. Expérimentation animale

1) Animaux

Les souris *Enpp2^{fl/fl}* ont gracieusement été fournies par le Dr Moolenaar (NKI, Amsterdam) [55]. L'allèle *Enpp2^{fl}* a été délété spécifiquement dans les ostéoclastes en croisant cette lignée avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la cathepsine K, lignée gracieusement fournie par le Dr Kato (Université de Tokyo, Japon) [296]. Les souris *hTNF^{+/-}* ont été obtenues via le Dr Kollias (Alexander Fleming Biomedical Sciences Center, Athènes, Grèce).

Les souris *Enpp2^{fl/fl}* et *Ctsk Cre^{+/-}* possèdent un fond génétique BalB/c alors que les souris *hTNF^{+/-}* sont C57/Bl6. Les animaux ont été élevés et maintenus en condition SPF (Specific pathogen free), en conditions normales de luminosité 12/12 jour/nuit, avec accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Un délai d'une semaine avant le début des expérimentations a été observé. Les animaux ont été habitués à leur environnement, à la contention et aux principaux gestes expérimentaux avant le début des protocoles pour éviter les biais dus au cadre et à l'expérimentateur. Les animaux ont été sacrifiés en fin de protocole selon les lignes directrices ARRIVE. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique de l'université Claude Bernard Lyon (DR2014-72).

2) Modèles animaux d'arthrite

Des modèles animaux arthritiques spontanés (*hTNF*) et inductibles (K/BxN) et ont été utilisés.

Pour l'étude de l'apparition de syndesmophytes au niveau vertébral, des femelles *hTNF^{+/-}* et *hTNF^{-/-}* de 2, 4, 6, 8 et 10 semaines (n=5 par groupe) et des mâles de 6, 8 et 10 semaines (n=3 par groupe) ont été utilisées.

Concernant l'étude de l'implication de l'ATX dans la résorption osseuse, des souris femelles *hTNF^{+/-}* âgées de 23 jours ont été traitées quotidiennement avec du BMP22 (inhibiteur de l'ATX) (1mg/kg/jour) ou le véhicule (PBS) par injection intra péritonéale pendant 14 jours et ont été euthanasiées au quatorzième jour après la première

injection. Le BMP22, inhibiteur de l'ATX, a été gracieusement fourni par le Pr Tigyi (Université du Tennessee, USA).

Le modèle arthritique de transfert de sérum K/BxN a été induit chez des souris mâles de sept semaines par l'injection intra péritonéale d'un pool de sérum de souris arthritiques K/BxN (7 µl/g) les jours 0, 2, 7 et 12. Les souris ont été euthanasiées le dix-septième jour après l'injection initiale [297].

La sévérité de la maladie et la perte de poids ont été évaluées tous les 2 jours. Le score clinique a été établi en utilisant le système suivant :

0 : normal,

1 : légère rougeur ou gonflement des doigts, du pied ou de la cheville,

2 : inflammation modérée des doigts, du pied ou de la cheville,

3 : inflammation modérée à sévère comprenant les doigts,

4 : inflammation sévère et complète de la patte induisant une ankylose.

Chaque patte arrière a été évaluée et scorée, donnant un maximum de 8 par animal.

Le gonflement des pattes a été évalué à l'aide d'un pied à coulisse micrométrique en mesurant l'épaisseur de la cheville [235].

3) Inflammation induite par le LPS

Des souris mâles de six semaines *Enpp2^{fl/fl} Ctsk Cre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} Ctsk Cre^{-/-}* ont été injectées en intra péritonéal avec une solution de LPS (5mg/kg) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) ou de véhicule (PBS) les jours 0 et 4, et ont été euthanasiées au jour 8.

4) Ovariectomie

Des souris femelles BALB/c sauvages et *Enpp2^{fl/fl} Ctsk Cre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} Ctsk Cre^{-/-}* de 9 semaines ont été injectées avec une solution de Buprénorphine puis anesthésiées sous isofluorane. Après incision dorsale de la paroi abdominale, les ovaires ont été isolés du tissu adipeux environnant et retirés (ovariectomie (OVX)) ou remplacés sans créer de dommages (sham). Les souris BALB/c sauvages ont été réparties en quatre groupes et traitées quotidiennement en fonction des conditions : les souris Sham traitées avec le véhicule (100 µl de sérum physiologique), les souris OVX traitées avec le véhicule, les souris OVX traitées avec le zolédronate (ZOL)

(100µg/kg) (contrôle positif) et les souris OVX traitées avec le BMP22 (1mg/kg/j) (inhibiteur de l'ATX). Les souris *Enpp2^{fl/fl} Ctsk Cre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} Ctsk Cre^{-/-}* ont été réparties en deux groupes : sham vs OVX. Les animaux ont été euthanasiés 30 jours après OVX. Pour confirmer l'efficacité de l'OVX, les utérus ont été retirés et pesés à la fin des protocoles. Les os ont été disséqués et collectés pour des analyses histologiques et micro-tomographiques.

B. Micro-tomographie

Les analyses µ-CT des colonnes vertébrales des souris ont été réalisées sur un scanner VivaCT40 (Scanco). La résolution spatiale était de 10,5 µm et le voltage de 55 kV. La microarchitecture de l'os trabéculaire a été analysée au niveau de la vertèbre lombaire 3 (LV3) et la région d'intérêt couvrait tout le réseau trabéculaire de la cavité médullaire (100 coupes) et excluait le contenu des apophyse et l'os primaire (plaque de croissance) aux extrémités supérieures et inférieures de la vertèbre.

Après reconstruction tridimensionnelle, les paramètres généraux ont été calculés dont le BV/TV (bone volume/tissue volume), représentant le volume osseux et le BS/BV (bone surface/bone volume), représentant la surface osseuse. La microarchitecture trabéculaire a été caractérisée par le nombre de travées (Tb.N, trabecular number), l'épaisseur des travées (Tb.Th, trabecular thickness) et l'espacement entre les travées (Tb.Sp, trabecular separation). La densité de connection (Conn. D., connectivity density) représente le degré d'interconnection du réseau trabéculaire. Chez les souris âgées de deux semaines, l'os trabéculaire était extrêmement faible et les données obtenues pour certains paramètres étaient non pertinentes, elles ne seront donc pas présentées dans ce manuscrit.

Les analyses de micro-tomographie sur les talus, calcaneums et fémurs des souris ont été réalisées avec un scanner-µCT Skyscan 1176 avec un voltage de 50 kV et une intensité de 500 mA. Un filtre aluminium de 0,5mm a été utilisé pour réduire les artefacts de beamhardening. Les échantillons ont été scannés dans de l'éthanol 70% avec une résolution de 9,08 µm (distance entre deux coupes sur l'axe z). Pour les fémurs, la zone d'analyse se situait à 0,5 mm de la plaque de croissance et comprenait 167 coupes soit 1,5 mm. L'ensemble de cette zone a été reconstruite à l'aide du logiciel NRecon (version 1.6.1.8, skyscan). Pour les talus et les calcaneums, l'ensemble de la pièce osseuse a été analysé. Les analyses

tridimensionnelles des paramètres de microarchitecture (Bone Surface/Bone Volume (BS/BV), Bone Volume/Tissue Volume (BV/TV), nombre de travées (Tb.N), espacement des travées (Tb.Sp) et épaisseur des travées (Tb.Th)) ont été réalisées avec les logiciels CTAn (version 1.9, skyscan) et CTVol (Version 2.0, Skyscan).

C. Ostéodensitométrie

La densité minérale osseuse (BMD, bone mineral density) de la colonne vertébrale a été évaluée par absorptiométrie biénergétique à rayons X (DXA) et mesurée par le PIXImus (Lunar). A nouveau, les résultats étant très faibles chez les animaux de deux semaines, ils ne seront pas présentés.

D. Histologie

Après l'imagerie, les colonnes vertébrales déshydratées et non-décalcifiées, ont été imprégnées et incluses dans une résine plastique de méthyl méthacrylate. Des coupes de 9 µm ont été réalisées sur le microtome SM2500E (Leica) et ont été colorées avec de la safranine O et du vert lumière pour marquer le cartilage en rouge orangé et l'os minéralisé en turquoise. La coloration TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) a été réalisée pour marquer les ostéoclastes en violet alors que l'os a été contre coloré en bleu avec du bleu d'aniline. L'analyse à l'aveugle des paramètres structuraux BV/TV, Tb.Th et BS a permis le calcul de du nombre d'ostéoclastes par périmètre osseux (N.OC/B.Pm, nombre d'ostéoclastes/bone perimeter), le ratio de la surface ostéoclastique sur la surface osseuse (OC.S/BS) et la longueur des ostéoclastes (OC.Le, osteoclast length) représentant la longueur moyenne d'un pit de résorption. Une coloration trichrome de Goldner modifié a été réalisée avec de l'acide picrique, de la fushine, de l'acide phosphomolybdique et du vert lumière, marquant la fraction minérale en vert, la moelle osseuse en jaune et les surfaces ostéoïdes en rouge le long des travées minéralisées. La surface ostéoïde par surface osseuse a été évaluée par le paramètre OS.S/BS (osteoid surface/bone surface). Enfin, l'augmentation de OS/BS et OC.S/BS a été évaluée par delta, par la soustraction des valeurs obtenues pour les animaux contrôles (WT, sauvages) aux valeurs obtenues pour les animaux *hTNF^{+/-}*. La proportion relative de ces surfaces chez les souris *hTNF^{+/-}* a été calculée en utilisant le ratio OS/OC.S.

Les tibias et les articulations des souris ont été placés immédiatement après la dissection dans une solution de paraformaldéhyde 4% et fixés à 4°C pendant 24h. Les os ont ensuite été décalcifiés pendant environ 15 jours dans une solution d'Ostéosoft (Merk) à température ambiante, renouvelée quotidiennement, jusqu'à ce qu'ils soient flexibles. Les échantillons ont ensuite été inclus en paraffine et des coupes de 6 µm ont été réalisées au microtome. Ces coupes ont été utilisées pour la détection cytochimique des ostéoclastes positifs au TRAP à l'aide du kit Leucognost (Merk) et pour le marquage de l'ATX par immunohistochimie (Anticorps polyclonal Anti-ATX, Cayman). La surface résorbée (Oc.S/BS) a été calculée par le ratio de la surface trabéculaire TRAP-positive (Oc.S) sur la surface totale trabéculaire (BS) à l'aide du logiciel Image J. L'inflammation et l'érosion osseuse ont été analysées sur des coupes sagittales de pieds colorées à l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS) à l'aide du scoring semi-quantitatif suivant allant de 0 à 5 pour l'inflammation et de 0 à 5 pour la résorption osseuse.

- Score de 0 à 5 pour l'inflammation :

0 : normal

1 : infiltration minime des cellules inflammatoires dans le tissu péri-articulaire,

2 : infiltration modérée,

3 : infiltration modérée avec œdème modéré

4 : infiltration marquée avec œdème marqué

5 : infiltration sévère avec œdème sévère

- Score de 0 à 5 pour la résorption :

0 : normale,

1 : minimale (petites zones de résorption)

2 : légère (zones de résorption plus nombreuses)

3 : modérée (résorption évidente de l'os trabéculaire et cortical dans la zone médullaire sans défauts sur toute l'épaisseur de l'os cortical, disparition de certaines travées)

4 : marquée (défauts sur toute l'épaisseur de l'os cortical, avec distorsion du profil de la surface corticale restante, perte marquée de l'os médullaire du tibia distal, pas de résorption sur les petits os du tarse)

5 : sévère (défauts sur toute l'épaisseur de l'os cortical, avec distorsion du profil de la surface corticale restante, perte marquée de l'os médullaire du tibia distal, résorption sur les petits os du tarse).

E. Analyses *in vitro*

1) Ostéoclastogénèse murine

Les cellules issues de la moelle osseuse des pattes arrière des souris ont été collectées et isolées par centrifugation (20 minutes 650g) sur gradient de densité Ficoll (Eurobio). La fraction de faible densité a été récupérée dans du milieu α -MEM (Invitrogen) et les cellules ont été ensemencées dans des puits de plaque p96 à raison de 2×10^4 cellules par puits dans du milieu α -MEM supplémenté de 10% v/v de sérum de veau fœtal (SVF), et de 1% de pénicilline-streptomycine (Lifetechnology), 1% L-glutamine (Sigma), 0,2% de M-CSF (R&D Systems), et 25 ng/ml de RANKL. Le lendemain, les cellules ont été rincées dans du milieu α -MEM seul. Le milieu de culture a ensuite été modifié en fonction des conditions : milieu α -MEM supplémenté soit de 10% v/v de sérum de veau fœtal (SVF) ou de SVF délipidé au charbon actif, et de 1% de pénicilline-streptomycine (Lifetechnology), 1% L-glutamine (Sigma), 0,2% ng/ml de M-CSF (R&D Systems), et 25 ng/ml de RANKL. Au milieu de culture a ensuite été ajouté, en fonction des conditions, du LPC (1 μ M) (Avanti polar lipids), de l'ATX recombinante (0,3nM), du Ki16425 (10 μ M) (Interchim) (inhibiteur des récepteurs 1 et 3 du LPA) ou du PF8380 (10 nM) (Cayman) (inhibiteur de l'ATX). Le milieu de culture a été renouvelé quotidiennement et après 5 jours de différenciation, les ostéoclastes matures ont été fixés dans du PFA 4% 10 min à température ambiante, et dénombrés sur la base du nombre de noyaux (>3) et de leur activité TRAP (Sigma). Les résultats sont exprimés en nombre d'ostéoclastes par puits. La stimulation des ostéoclastes *in vitro* a été réalisée après 1h de starvation sans sérum. Les ostéoclastes ont ensuite été stimulés pendant 6h avec du TNF recombinant murin (R&D Systems) ou du LPS (Sigma).

2) Ostéoclastogénèse humaine

Les monocytes humains circulants ont été isolés à partir de sang périphérique de donneurs volontaires sains obtenu via l'Établissement Français du Sang (Lyon). Les

cellules sanguines mononucléées ont été isolées par centrifugation (20 minutes à 650g) avec un gradient de densité Ficoll (Eurobio) : la fraction de faible densité a été récupérée puis ces cellules ont été centrifugées (20 minutes à 800g) au travers d'un gradient de densité Percoll (Life Sciences, GE Healthcare) et la fraction de faible densité a été prélevée. Une déplétion immunomagnétique des lymphocytes T et B, des cellules NK et des globules rouges résiduels, a ensuite été réalisée. Les cellules ont été marquées pendant 30 minutes avec des anticorps murins anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56 et anti-CD235/glycophorineA, puis après deux rinçages, incubées avec des anticorps de chèvre anti-souris couplés avec des microbilles magnétiques (Invitrogen, Life Technologies). A l'aide d'un aimant, le surnageant contenant les monocytes a alors été récupéré et les cellules ont été ensemencées à raison de $7,5 \times 10^4$ cellules par puits de plaque p96 dans du milieu α -MEM supplémenté de 10% v/v de sérum de veau fœtal (SVF), de 1% de pénicilline-streptomycine (Lifetechnology), 1% L-glutamine (Sigma), 20 ng/ml de M-CSF (R&D Systems), et 40 ng/ml de RANKL. Après trois jours de différenciation, les cellules ont été rincées dans du milieu α -MEM seul. Le milieu de culture a ensuite été modifié en fonction des conditions : milieu α -MEM supplémenté soit de 10% v/v de sérum de veau fœtal (SVF) ou de SVF délipidé au charbon actif, et de 1% de pénicilline-streptomycine (Lifetechnology), 1% L-glutamine (Sigma), 20 ng/ml de M-CSF (R&D Systems), et 40 ng/ml de RANKL. Au milieu de culture a ensuite été ajouté, en fonction des conditions, du LPC (1 μ M) (Avanti polar lipids), de l'ATX recombinante (0,3nM), du Ki16425 (10 μ M) (Interchim) ou du PF8380 (10 nM) (Cayman). Le milieu de culture a été renouvelé quotidiennement et après 5 jours de différenciation, les ostéoclastes matures ont été fixés dans du PFA 4% 10 min à température ambiante, et dénombrés sur la base du nombre de noyaux (>3) et de leur activité TRAP (Sigma). Les résultats sont exprimés en nombres d'ostéoclastes par puits.

3) Analyses de résorption

La surface résorbée a été quantifiée sur des puits « Ostéo-Assay » recouverts d'hydroxyapatite, mimant la surface osseuse (3988; Corning, Tewksbury, MA). Après 3-4 jours de différenciation, les pré-ostéoclastes murins et humains ont été décollés après incubation et « flush » des cellules dans des solutions de PBS-EDTA 0,25 mM (ostéoclastes murins) et d'acutase (ostéoclastes humains). Les pré-ostéoclastes ont été dénombrés et ensemencés sur ces puits à raison de 2×10^4 cellules par puits

(p96) dans du milieu α -MEM complet. Le lendemain, le milieu a été modifié comme pour l'ostéoclastogénèse. Les cellules ont été cultivées 72h et le milieu a été renouvelé quotidiennement. Afin de mesurer la surface résorbée, les ostéoclastes ont été lysés avec de l'eau distillée et la matrice a été colorée au nitrate d'argent 5%. Les puits ont ensuite été numérisés avec un scanner Epsilon Perfection V750 et les surfaces résorbées ont été quantifiées manuellement avec le logiciel Image J. (National Institute of Health, Bethesda, MD)

4) Western Blot

La concentration en protéines des lysats cellulaires a été déterminée avec le kit Protein Assay (Biorad). Les lysats cellulaires d'ostéoclastes ont été séparés par SDS-PAGE 8% et transférés sur membrane de transfert immobilon (Millipore). Les membranes ont ensuite été saturées dans un tampon TBS-TX (Tris 20mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,4) supplémenté avec du lait écrémé 5%, 1h à température ambiante. Elles ont ensuite été incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps anti-ATX (Cayman) ou l'anticorps anti- β actine (Sigma). L'ATX et la β actine ont été visualisées à l'aide un anticorps secondaire Anti IgG de lapin ou anti IgG de souris couplés à la peroxydase (Jackson, PA, USA) et révélées par radiographie avec le kit de révélation de chimioluminescence (Amersham).

5) PCR quantitative

Les ARNs totaux des ostéoclastes et des broyats des os longs des souris ont été extraits avec le Trizol (Invitrogen AB, Stockholm, Sweden) et les kits Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). L'ADN complémentaire a ensuite été synthétisé avec le kit iScript cDNA Synthesis kit (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). L'expression des gènes d'intérêts a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel sur l'automate BIORAD avec le kit BIORAD et les primers spécifiques (tableau 3). Les quantifications ont été normalisées aux valeurs correspondantes de l'ARN L32 et exprimées en expression relative avec la méthode $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$.

Tableau 4 : Amorces utilisées dans cette étude

Gène cible	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')
<i>L32</i>	CAAGGAGCTGGAGGTGCTGC	CTGCTCTTTCTACAATGGC
<i>Enpp2</i>	GCCCTGATGTCCGTGTATCT	CGTTTGAAGGCAGGGTACAT
<i>IL-6</i>	GCACTAGGTTTGCCGAGT	GCCAGAGTCCTTCAGAGA
<i>Ctsk</i>	GAGGGCCAACTCAAGAAGAA	GCCGTGGCGTTATACATACA
<i>Acp5</i>	CAGCAGCCCCAAAATGCCT	TTTTGAGCCAGGACAGCTGA

6) Dosage de l'activité lysoPLD de l'ATX plasmatique

Des puits en triplicat ont été chargés avec 60 µl d'un cocktail réactionnel « ATX assay buffer » (50 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 µM fatty acid free BSA, pH 8.0), avec une concentration finale de 2 µM de FS-3 à laquelle 20 µl de plasma de souris ont été ajoutés comme source d'ATX. La fluorescence a été mesurée toutes les deux minutes pendant 4 heures aux longueurs d'ondes 485/538 nm (excitation/émission). Les résultats (fluorescence relative) ont été reportés pour chaque échantillon en fonction du temps. Des courbes de tendances ont ensuite été ajoutées avec le logiciel GraphPad Prism afin de déterminer le taux de réaction (RFU/min) ± SEM.

F. Analyses statistiques

Des tests non paramétriques de Mann-Whitney ont été réalisés pour les comparaisons simples. Les différences statistiques entre plusieurs groupes ont été déterminées par ANOVA suivi par un post test de Bonferroni avec le logiciel GraphPad Prism v5.0c. Les valeurs de $p < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

RESULTATS

A. L'autotaxine est un nouveau facteur autocrine contrôlant l'activité ostéoclastique et la perte osseuse induite par l'inflammation

1) Le TNF et l'inflammation stimulent l'expression d'ATX par les ostéoclastes

La PR est une maladie inflammatoire chronique et systémique induisant une hyperplasie et une inflammation des articulations synoviales, des érosions osseuses locales et une perte osseuse systémique. Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 et l'IL-6 jouent un rôle important dans l'initiation et le maintien des processus inflammatoires et destructifs au cours de la PR. L'ATX fait également partie des différents facteurs qui ont été découverts comme participant à la pathogenèse de la maladie [267]. L'ATX appartient à la famille des phosphodiesterases, mais en raison de son unique fonction de phospholipase D, elle convertit le LPC en LPA. Une fonction directe de l'ATX dans l'adhésion cellulaire a été proposée mais reste toujours une question en suspens [298]. Cependant, il a été bien établi que les fonctions biologiques de l'ATX sont médiées via la production de LPA et l'activation en aval de ses récepteurs apparentés [40]. Plusieurs études ont démontré que l'ATX est régulée par le TNF dans les synoviocytes fibroblastiques et des niveaux importants d'ATX ont été détectés dans le liquide synovial de patients atteints de PR [12,265–268,270]. De plus, l'ablation conditionnelle de l'ATX dans les cellules mésenchymateuses, incluant les synoviocytes fibroblastiques, protège de l'arthrite [267]. D'ailleurs, les synoviocytes fibroblastiques inflammatoires sont la source majeure de RANKL qui induit l'ostéoclastogenèse au sein des articulations arthritiques [235]. L'activité ostéoclastique induit la résorption au cours de l'arthrite, qui se déroule à l'interface entre synoviale et os.

Nous avons précédemment démontré que le LPA est un facteur présent dans le sérum et requis pour l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse médiée par RANKL *in vitro* [63,96]. Cependant, l'origine du LPA fonctionnellement actif dans l'environnement ostéoarticulaire est encore inconnue. De plus, la production locale

de LPA au sein des articulations arthritiques coopère avec le RANKL pour stimuler la dégradation osseuse. Des coupes histologiques issues de patients atteints de PR ou d'animaux arthritiques ont mis en évidence la présence d'ostéoclastes à proximité des zones d'érosions [299].

Nos résultats indiquent que ces ostéoclastes, présents au niveau des zones d'érosions, expriment l'ATX. En effet, l'analyse de coupes histologiques sériées issues de chevilles de souris *hTNF^{+/-}* a révélé la présence d'ostéoclastes TRAP positifs et exprimant l'ATX au niveau des sites d'érosion, à proximité de la synovite (figure 20a). Afin de déterminer la capacité des ostéoclastes à produire de l'ATX, nous avons généré des ostéoclastes *in vitro*, en cultivant des progéniteurs mononucléés issus de la moelle osseuse de souris WT, en présence de M-CSF et de RANKL. Nous avons alors pu observer une augmentation de l'expression du gène *Enpp2* ainsi que de la protéine ATX au cours de l'ostéoclastogenèse, atteignant un pic d'expression en fin de différenciation (jour 5, ostéoclastes matures) (figure 20b et encart). Pour voir si l'environnement inflammatoire pouvait affecter l'expression de *Enpp2* dans les ostéoclastes, les ostéoclastes matures ont été traités avec du TNF ou du LPS. Ces deux traitements ont stimulé l'expression du transcrit *Enpp2*, ainsi que la cytokine pro-ostéoclastique *IL-6*, utilisée comme contrôle (figure 20c).

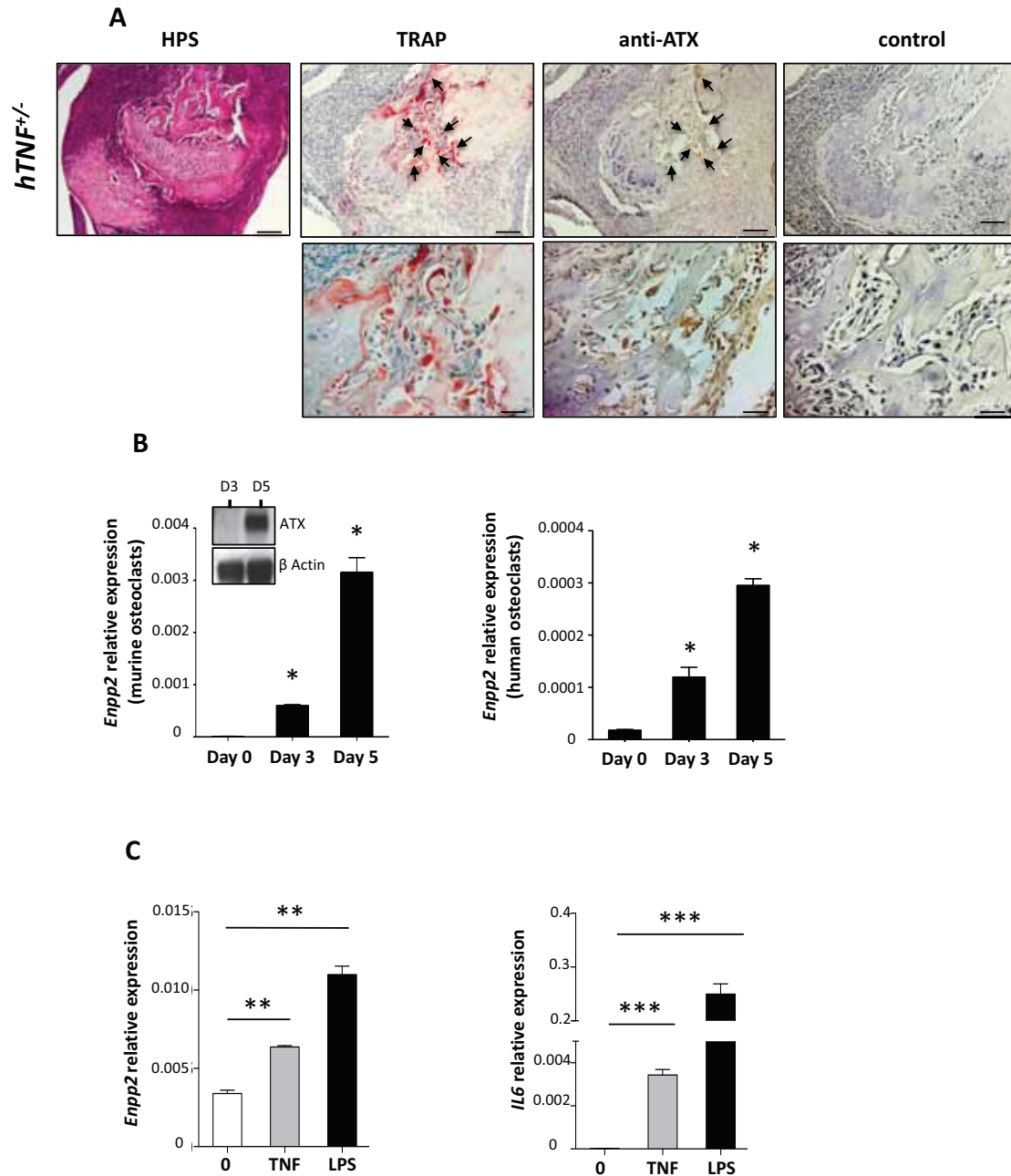


Figure 21 : Le TNF et l'inflammation stimulent l'expression de *Enpp2* par les ostéoclastes. (A) Colorations HPS (gauche), TRAP (milieu gauche) et immunohistochimie contre ATX (milieu droite) et contrôle (droite) des chevilles de souris hTNF^{-/-}. Echelle panel haut : 100 μm, panel bas : 50 μm. Les flèches indiquent les cellules multinuclées TRAP positives (milieu) et ATX positives (droite). (B) Analyse par qRT-PCR de l'expression de *Enpp2* au cours de la différenciation d'ostéoclastes issus de progéniteurs de moelle osseuse de souris sauvages (gauche) et de monocytes humains (droite) cultivés en présence de M-CSF et RANKL. Les résultats sont représentés en moyenne ± SEM. *p<0,05, réalisé par test ANOVA. Encart : lysats cellulaires d'ostéoclastes murins analysés par western blot avec un anticorps anti ATX. L'actine a été utilisée comme témoin de charge. (C) Analyse par qRT-PCR de l'expression de *Enpp2* (gauche) et *IL-6* (droite) dans les ostéoclastes murins matures non traités (NT), stimulés 6h avec du TNF (10 ng/ml) ou du LPS (1 μg/ml). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. **p<0,01, ***p<0,001, réalisé par test ANOVA.

L'ATX, ainsi que la cytokine pro-ostéoclastique IL-6 sont surexprimés au niveau transcriptionnel dans les ostéoclastes dérivés de monocytes murins traités au TNF, soulignant la similitude des ostéoclastes et des synoviocytes fibroblastiques en réponse au TNF [267]. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les ostéoclastes exprimant l'ATX sont les acteurs cellulaires majeurs impliqués dans la pathologie articulaire observée au cours de la PR, en association avec les synoviocytes fibroblastiques et les cellules immunitaires.

2) L'ATX issue des ostéoclastes et fonctionnellement active au cours de la résorption

Sur la base de ces observations, nous avons analysé le rôle de l'ATX exprimée par les ostéoclastes dans leur fonction. Nous avons d'abord analysé l'implication de l'ATX au cours de l'ostéoclastogénèse *in vitro*, en utilisant un sérum délipidé au charbon actif (charc-serum) afin de retirer le LPA et ses précurseurs (LPC). En utilisant des progéniteurs issus de moelle osseuse (souris, figure 21a) ou de sang (humain, figure 21b), aucune augmentation significative du nombre d'ostéoclastes mature n'a été observée en présence de LPC seul, indiquant que l'ATX issue des ostéoclastes n'affecte pas directement l'ostéoclastogénèse. Néanmoins, l'addition de LPC et d'ATX recombinante exogène (rATX) a permis de restaurer de près de 80% l'ostéoclastogénèse, totalement inhibée en présence du PF8380 (inhibiteur de l'ATX) ou du KI16425 (inhibiteur de LPA₁), indiquant que l'ATX présente dans l'environnement ostéoclastique est capable de dégrader du LPC pour générer du LPA fonctionnellement actif sur l'ostéoclastogénèse.

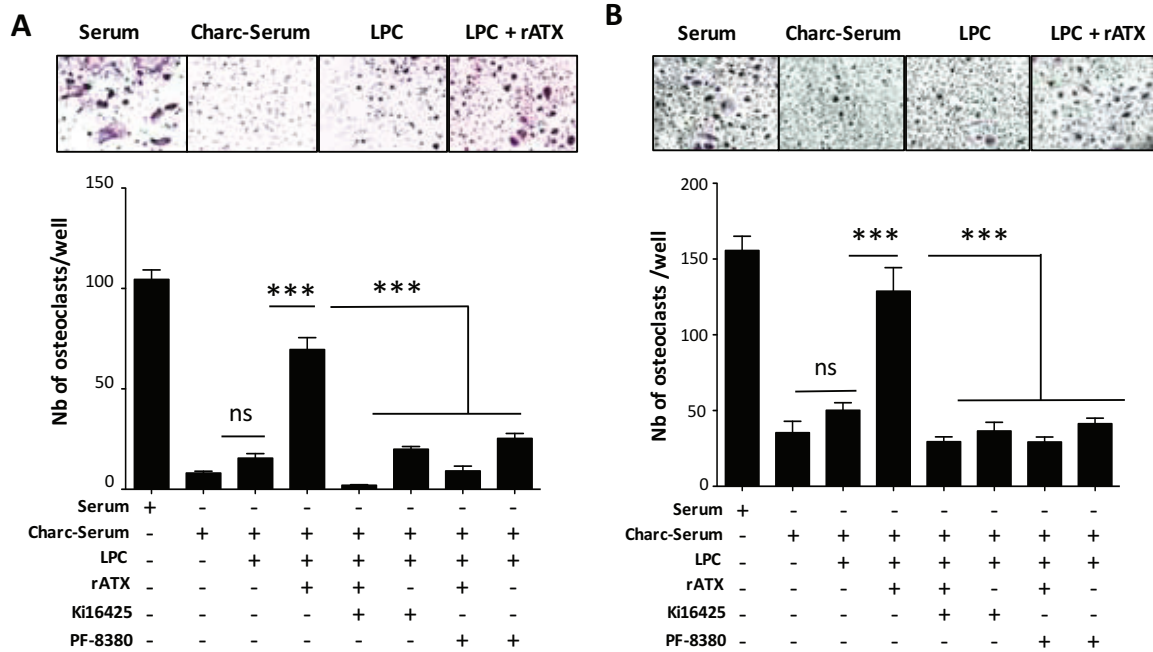


Figure 22 : L'ATX issue des ostéoclastes n'affecte pas directement l'ostéoclastogénèse. Quantification des ostéoclastes générés à partir de (A) progéniteurs de moelle osseuse de souris sauvages ou (B) de sang de donneur humain sain, cultivés en présence de M-CSF et RANKL, en sérum ou sérum délipidé (charc-sérum) supplémenté avec du LPC seul ou en association avec du l'ATX recombinante, du Ki16425 ou du PF8380. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$, réalisé par test ANOVA.

Avec l'utilisation de monocytes murins issus de moelle osseuse et de monocytes humains *in vitro*, nous avons mis en évidence que l'ATX est principalement exprimée par les ostéoclastes matures à la fois chez la souris et chez l'homme. Ceci explique pourquoi les l'ATX dérivée des ostéoclastes n'affecte pas directement l'ostéoclastogénèse, n'étant pas exprimée aux stades précoces de la différenciation. Cependant, en présence de LPC, l'ATX exogène est capable de stimuler l'ostéoclastogénèse aux étapes précoces suggérant que l'augmentation du niveau d'ATX à proximité des précurseurs ostéoclastiques pourrait contribuer à leur différenciation.

Puis, nous avons cherché à savoir si l'ATX exprimée par les ostéoclastes matures pouvait contrôler l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes. Pour cela, nous avons réalisé des tests de résorption avec des ostéoclastes matures murins (figure 22a) et humains (figure 22b), cultivés en conditions standards puis décollés,

réensemencés sur une matrice minérale d'hydroxyapatite mimant l'os et soumis aux mêmes conditions de culture utilisées pour la différenciation (charc-serum). Dans ces conditions, comme observé en présence de LPC + rATX, le LPC seul permet de restaurer la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes murins et humains. A nouveau, le PF8380 et le Ki16425 abolissent totalement l'effet observé en présence de LPC + rATX et de LPC seul. Ceci indique que l'ATX exogène, mais également l'ATX endogène dérivée des ostéoclastes, est capable de dégrader le LPC pour générer du LPA fonctionnellement actif sur l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes.

Afin de démontrer *in vivo* que l'ATX dérivée des ostéoclastes est active sur la résorption osseuse, nous avons généré des souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes matures, en croisant des souris *Enpp2^{fl/fl}* avec des souris *CtskCre^{+/-}*. Pour confirmer la délétion spécifique de *Enpp2* dans les cellules cibles, nous avons généré des ostéoclastes *in vitro* à partir de progéniteurs mononucléés issus de la moelle osseuse de ces souris. L'analyse de l'expression du transcrit *Enpp2* et de la protéine ATX ont montré une diminution de 50% et 80% dans les ostéoclastes respectivement (figure 22c). *In vitro*, les ostéoclastes déficients en ATX étaient incapables de résorber la matrice d'hydroxyapatite en présence de LPC seul alors que l'addition de rATX a permis de restaurer le phénotype (figure 22d).

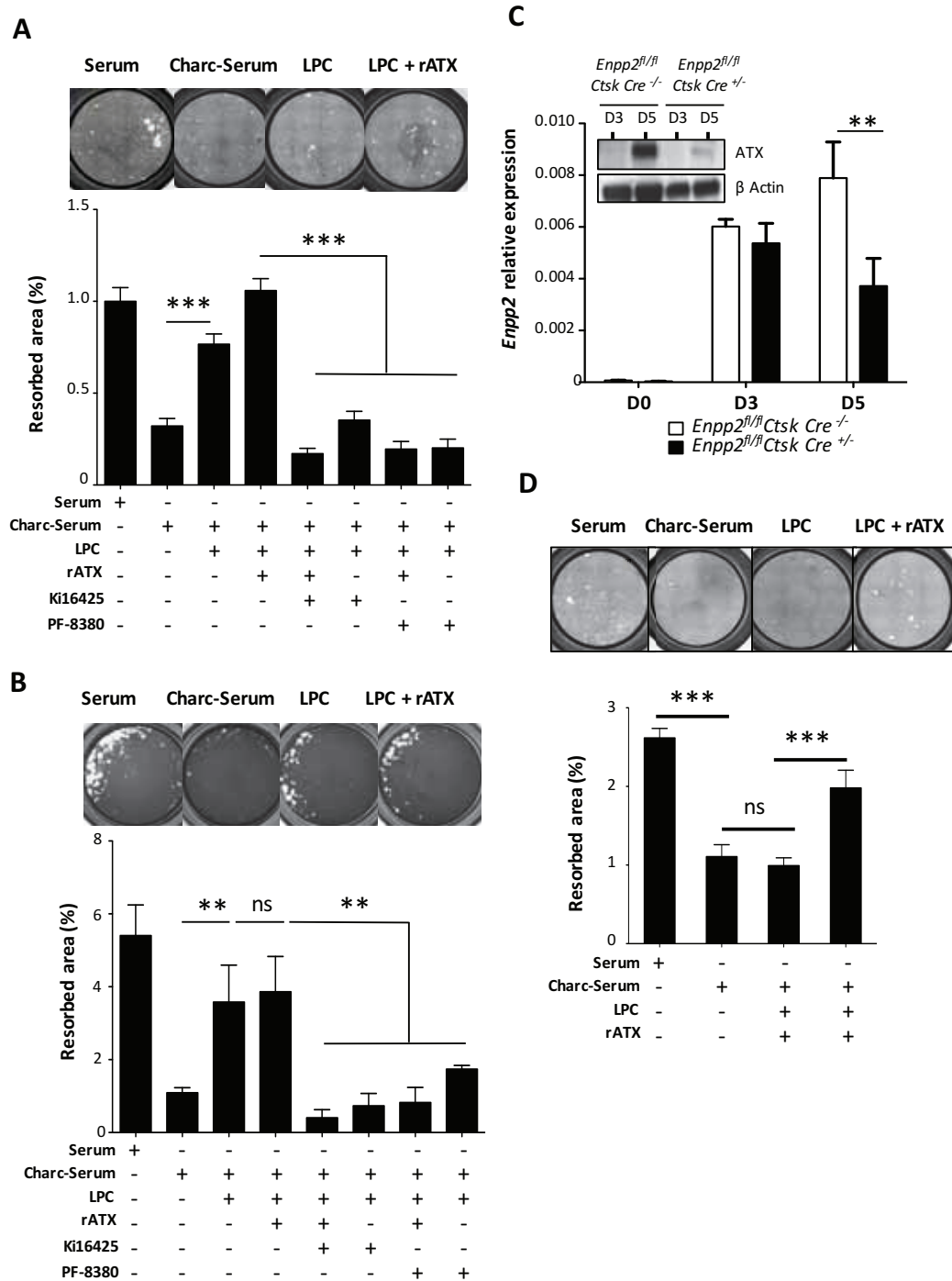


Figure 23 : L'ATX issue des ostéoclastes est fonctionnellement impliquée au cours de la résorption. Quantification de la surface de matrice minéralisée résorbée par les ostéoclastes (A) murins et (B) humains, cultivés en présence de M-CSF et RANKL, en sérum ou sérum délipidé (charc-sérum) supplémenté avec du LPC seul ou en association avec de l'ATX recombinante, du Ki16425 ou du PF8380 pendant 48h. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, réalisé par test ANOVA. (C) Analyse par qRT-PCR de l'expression de *Enpp2* au cours de la différenciation d'ostéoclastes issus de progéniteurs de moelle osseuse de souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* cultivés en présence de M-CSF et RANKL. Les résultats sont représentés en moyenne $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, réalisé par test ANOVA. Encart : lysats cellulaires d'ostéoclastes murins *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* analysés par western blot avec un anticorps anti ATX. L'actine a été utilisée comme témoin de charge. (D) Quantification de la surface de matrice minéralisée

résorbée par les ostéoclastes de souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}*, cultivés en présence de M-CSF et RANKL, en sérum ou sérum délipidé (charc-serum) supplémenté avec du LPC seul ou en association avec de l'ATX recombinante pendant 48h. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$, réalisé par test ANOVA.

L'utilisation d'ostéoclastes issus de souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* a permis d'apporter la preuve directe que l'ATX dérivée des ostéoclastes était fonctionnellement impliquée dans leur l'activité de résorption osseuse *in vitro*. Nous avons précédemment démontré que le LPA était indispensable pour l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse [63]. Ici, nous démontrons en plus que l'ATX dérivée des ostéoclastes n'est pas indispensable dans les premières étapes de la différenciation ostéoclastique mais est à l'origine de la production de LPA qui stimule la résorption osseuse des ostéoclastes matures.

Parallèlement à ces tests *in vitro*, nous avons réalisé des analyses μ -CT sur les fémurs des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* (contrôles) femelles de deux mois. Des valeurs similaires ont été obtenues pour les deux génotypes concernant le BV/TV (figure 23a et b), et la quantification du nombre d'ostéoclastes par surface osseuse sur des coupes histologiques (OC.S/BS) n'a également pas révélé de différences entre les génotypes (figure 23c et d). De plus, des niveaux comparables d'activité lysoPLD/ATX plasmatiques ont été mesurés dans les deux groupes d'animaux (figure 23 e).

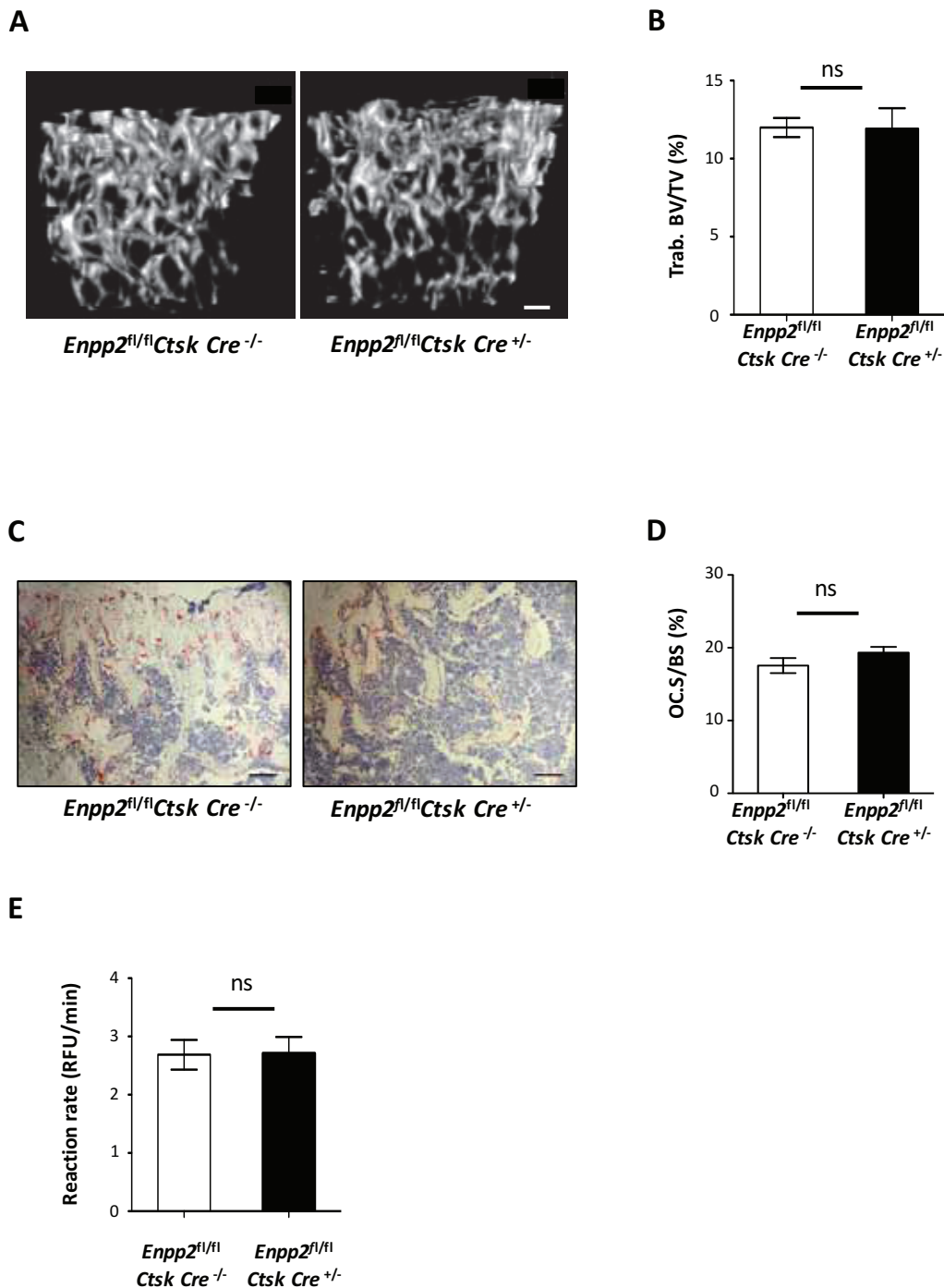


Figure 24 : Les souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes ne présentent pas de phénotype osseux. (A) Images représentatives des reconstructions tridimensionnelles de μ -CT et (B) graphiques correspondant à la quantification de la masse osseuse trabéculaire (BV/TV) des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}*. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=5 par groupe). (C) Colorations TRAP de coupes de tibias des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}*. Echelle : 100 μ m. (D) Quantification des surfaces TRAP positives par surface osseuse (OC.S/BS en %) des coupes de tibias des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}*. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=5 par groupe). (E) Quantification de l'activité lysoPLD de l'ATX dans le plasma des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}*. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=5 par groupe).

Les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* ne présentent pas de phénotype osseux notable, ce qui indique qu'en conditions physiologiques, la délétion spécifique de l'ATX dans les ostéoclastes n'impacte pas la masse osseuse. Une des explications possibles pourrait venir de la méthodologie employée qui ne permet pas la délétion conditionnelle complète des allèles de *Enpp2*. Les souris déficientes en ATX (*Enpp2^{-/-}*) présentent un phénotype léthal à l'état embryonnaire, mais les souris hétérozygotes (*Enpp2^{+/-}*) présentent une diminution de 50% des taux d'ATX et de LPA dans le plasma, paraissent saines et ne présentent aucun phénotype global apparent [13,55]. De façon remarquable, la caractérisation récente des souris ATX^{fl/-} possédant environ 35 % du taux normal d'ATX plasmatique, a révélé un rôle éminent de l'axe ATX/LPA/LPA₁ au cours de l'ossification endochondrale [300]. De plus, les souris déficientes en ATX dans la lignée mésenchymateuse ne présentent pas non plus de phénotype délétaire dans des conditions non pathologiques [267].

Au cours de la PR, la perte osseuse est due à une resorption osseuse excessive et à une inhibition de la formation osseuse [301]. Afin d'appliquer nos résultats à un contexte de résorption osseuse, médiée par les ostéoclastes et dépendante de l'inflammation, nous avons soumis nos souris contrôles et mutées à un challenge inflammatoire via le LPS.

3) L'inhibition sélective de l'ATX dérivée des ostéoclastes prévient de la perte osseuse induite par le LPS

Etant donnés les taux importants d'ATX mesurés dans les liquides synoviaux des patients atteints de PR, l'implication de l'ATX produite par les cellules mésenchymateuses dans le développement de l'arthrite, et la forte induction par le LPS de l'expression de l'ATX dans les ostéoclastes, nous avons testé l'implication potentielle de l'ATX issue des ostéoclastes dans un modèle de perte osseuse systémique induite par le LPS [302]. Les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* ont été traitées avec un bolus de LPS les jours 0 et 4 et sacrifiées au jour 8. Les fémurs ont été analysés par μ -CT. Comme attendu pour les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}*, le traitement par le LPS a induit une perte osseuse drastique (réduction de 40% du BV/TV) par rapport aux souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées avec le véhicule

(figure 24a). A l'inverse, le traitement des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* avec le LPS n'a pas induit de perte osseuse par rapport aux souris du même génotype traitées avec le véhicule (figure 24a). En accord avec ces résultats, l'analyse des coupes histologiques des tibias de souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées par le LPS a révélé une augmentation de la surface ostéoclastique par surface osseuse (OC.S/BS) par rapport aux souris du même génotype traitées avec le véhicule alors que les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* traitées aux LPS ne présentaient pas d'augmentation du nombre d'ostéoclastes par rapport aux souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* traitées par le véhicule (figure 24b). Les marqueurs ostéoclastiques ont été quantifiés par qRT-PCR à partir des ARN issus des os longs des animaux traités au LPS ou au PBS. Contrairement aux souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}*, le traitement des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* n'a pas induit d'augmentation des marqueurs *Acp5* et *Ctsk*, confirmant la réduction de l'activité ostéoclastique chez les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* traitées au LPS et leur protection de la perte osseuse induite par le LPS (figure 24c et d). En accord avec les résultats précédents (figure 20c), le LPS n'induit pas l'expression de *Enpp2* dans les ostéoclastes matures issus de souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* contrairement aux ostéoclastes issus de souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* (figure 24e).

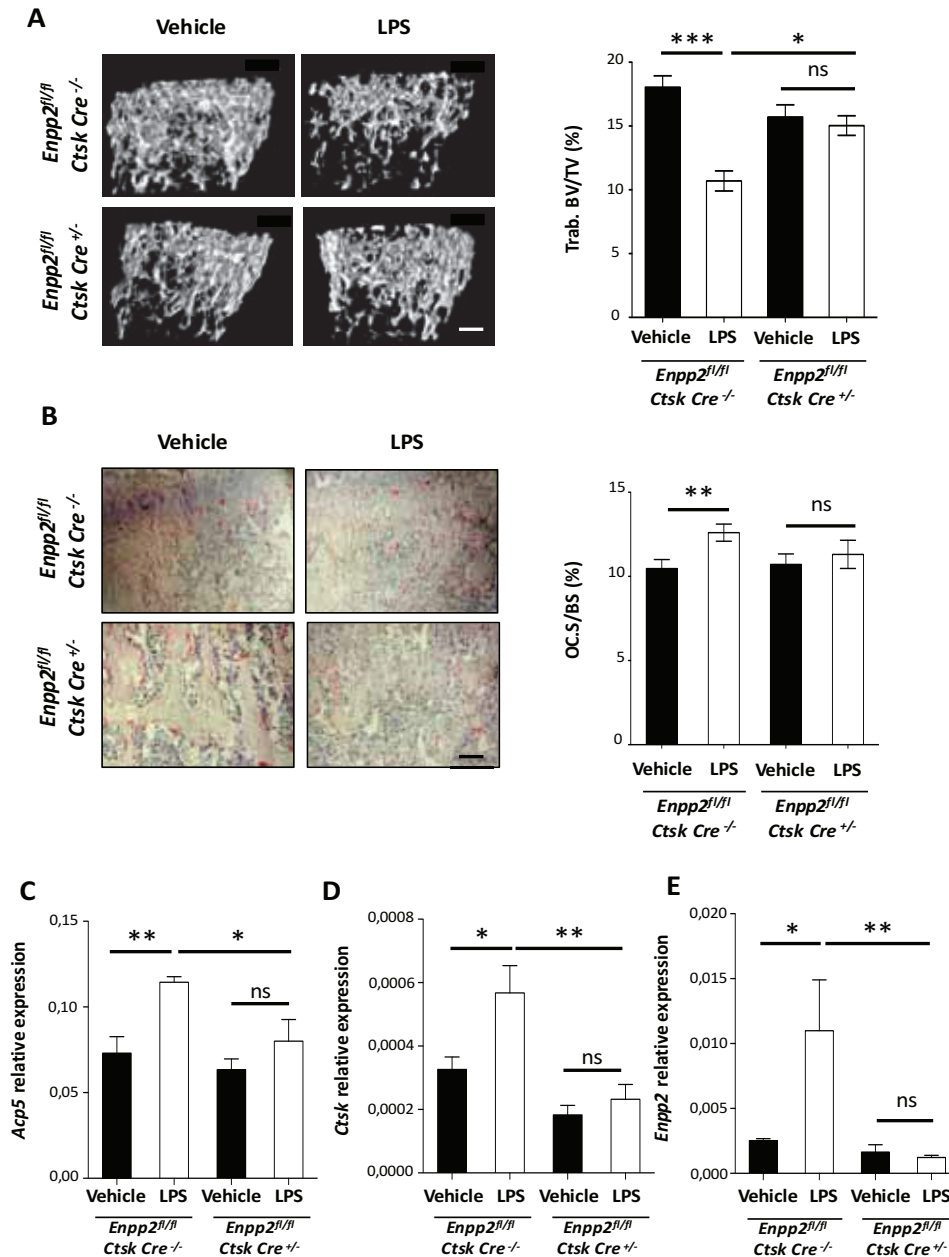


Figure 25 : Les souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes sont protégées de la perte osseuse induite par le LPS. (A) Images représentatives des reconstructions tridimensionnelles de μ -CT et graphiques correspondant à la quantification de la masse osseuse trabéculaire (BV/TV) des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées avec le LPS ou le véhicule. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=6 par groupe). *p<0,05, ***p<0,001 réalisé par ANOVA. (B) Colorations TRAP et quantification des surfaces TRAP positives par surface osseuse (OC.S/BS en %) de coupes de tibias des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées avec le LPS ou le véhicule. Echelle : 100 μ m. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=6 par groupe) **p<0,01, réalisé par ANOVA. (C) Analyse par qRT-PCR de l'expression de *Acp5*, (D) *Ctsk*, (E) *Enpp2* dans les os longs des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées avec le LPS ou le véhicule. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=6 par groupe). *p<0,05, **p<0,01, réalisé par ANOVA.

Les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées au LPS ont montré une perte osseuse systémique drastique par rapport aux souris traitées au véhicule, ainsi qu'une augmentation du nombre d'ostéoclastes par surface osseuse. De plus, les marqueurs de résorption comme *Acp5* (TRAP) et *Ctsk* sont surexprimés dans les fémurs, de la même façon que *Enpp2*, reflétant une résorption osseuse, médiée par les ostéoclastes, exacerbée *in vivo*. Il a été démontré que le LPS induit l'expression du TNF dans les monocytes [303] et que le LPS et le TNF partagent une voie de transduction avec TRAF6 (TNF Receptor Activated Factor 6) comme effecteur commun induisant l'activation de la voie de signalisation NF-κB [304]. Nos résultats indiquent que le LPS stimule l'expression de *Enpp2* ainsi que le TNF. Renforçant la signalisation convergente proposée du LPS et du TNF sur le promoteur de *Enpp2*, des sites de liaison à l'ADN de NFAT1 et NF-κB ont été identifiés sur les séquences régulatrices proximales et distales en amont de *Enpp2* [94,305]. Les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* sont entièrement protégées de la perte osseuse induite par le LPS et présentent une abrogation de l'induction des marqueurs de résorption. Ceci indique que dans un contexte pathologique inflammatoire, l'ATX dérivée des ostéoclastes est cruciale pour la résorption osseuse. Nos résultats suggèrent également que les importants taux de TNF observés au cours de la PR peuvent induire la résorption osseuse dépendante de l'axe ATX/LPA et que les inhibiteurs de TNF pourraient avoir un bénéfice additionnel en bloquant la résorption avec une implication importante dans la prévention du développement et de la progression des érosions osseuses dans la PR.

4) La délétion spécifique de l'ATX dérivée des ostéoclastes impacte le volume osseux et le développement des érosions osseuses dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde

Pour confirmer l'effet observé sur la perte osseuse systémique en terme d'érosions osseuses, nous avons soumis les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* au transfert de sérum K/BxN (modèle arthritique). Les deux groupes de souris ont présentés les mêmes gonflements articulaires et scores arthritiques (figure 25a). Les analyses μ -CT et la quantification du volume osseux trabéculaire (BV/TV) ont révélé que le transfert de sérum induisait une perte osseuse drastique de 80 % du volume

osseux trabéculaire chez les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* alors qu'il a induit une perte osseuse moins importante (environ 60%) chez les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* (figure 25b). De la même façon que dans le protocole de perte osseuse induite par le LPS, ce résultat indique que les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* sont significativement protégées de la perte osseuse systémique induite par le sérum K/BxN. De plus, nous avons utilisé la μ -CT afin d'étudier les érosions osseuses locales au niveau des chevilles des souris. Les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* présentent une protection presque totale contre le développement des érosions induite par le sérum K/BxN (figure 25c). Nous avons ensuite quantifié ces érosions au niveau du talus des souris en calculant la surface osseuse/volume osseux (BS/BV). Les résultats indiquent une augmentation singificative de 80 % du BS/BV du talus des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées au K/BxN alors que celui des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* n'est pas significativement affecté par le traitement (figure 25 d).

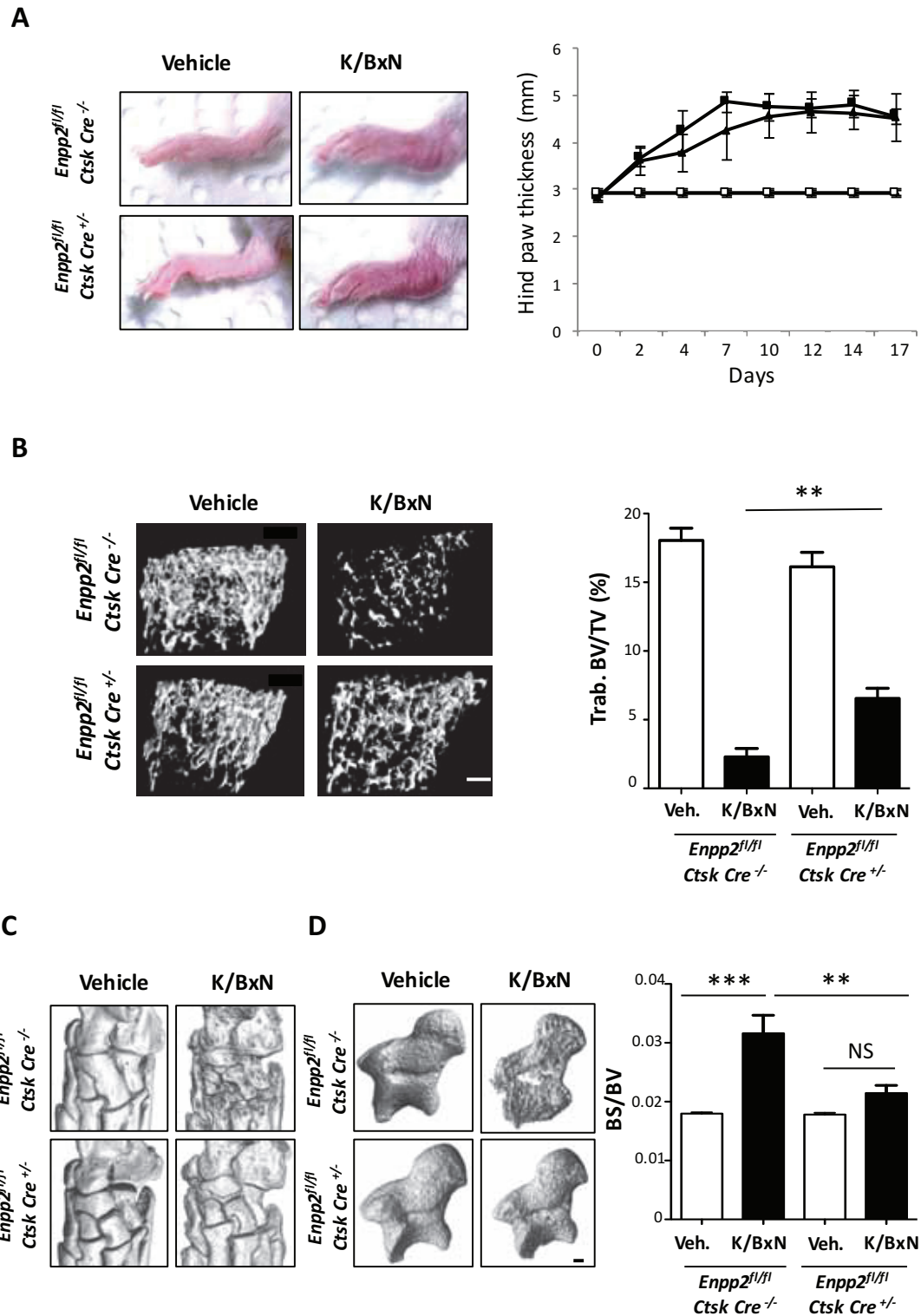


Figure 26 : Les souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes sont protégées de la perte osseuse systémique et des érosions osseuses induites par le transfert de sérum K/BxN. (A) Photographies du gonflement des chevilles 17 jours après l'injection initiale de sérum K/BxN et graphique correspondant aux mesures de gonflement au cours de la période de transfert de sérum chez les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* injectées avec le sérum K/BxN ou le véhicule. Triangles : souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}*, carrés : souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}*. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=6 par groupe). (B) Images représentatives des reconstructions tridimensionnelles de μ -CT et graphiques correspondant à la quantification de la masse osseuse trabéculaire (BV/TV) des

souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées avec le sérum K/BxN ou le véhicule. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=6 par groupe). **p<0,01 réalisé par ANOVA. (C) Images représentatives des reconstructions tridimensionnelles de μ -CT des chevilles des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées avec le sérum K/BxN ou le véhicule. (D) Images représentatives des reconstructions tridimensionnelles de μ -CT et graphiques correspondant à la quantification de la surface osseuse/ volume osseux (BS/BV) des talus des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* et *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{-/-}* traitées avec le sérum K/BxN ou le véhicule. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=6 par groupe). **p<0,01 réalisé par ANOVA.

Les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* ont été soumises au transfert de sérum K/BxN dans le but d'induire une arthrite sévère [297]. En accord avec les résultats obtenus avec le modèle LPS, dans des conditions inflammatoires extrêmes, les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* sont significativement protégées de la perte osseuse systémique induite par le sérum K/BxN. La protection observée dans le cas du transfert de sérum, moins importante que celle observée dans le modèle LPS, pourrait être due à la durée de l'inflammation avant le sacrifice, respectivement de 17 et 8 jours, conduisant à un BV/TV plus bas dans les fémurs des souris soumises au K/BxN (2,5%) que celui des souris traitées au LPS (11%). De façon remarquable, les souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* sont dépourvues d'érosions osseuses, indiquant que l'ATX dérivée des ostéoclastes est déterminante dans la destruction osseuse arthritique, soulignant l'ATX comme potentielle cible thérapeutique.

L'axe ATX/LPA/LPA₁ pourrait être impliqué dans le développement de l'arthrite. Les souris avec une délétion globale du gène *Lpar1* ne développent pas d'arthrite après immunisation avec le collagène de type II en raison d'une infiltration cellulaire réduite [271]. En utilisant des souris déficientes en LPA₁ et des inhibiteurs spécifiques de LPA₁ nous avons démontré que ce récepteur est un effecteur clé dans la résorption médiée par les ostéoclastes [63]. Cependant, la contribution directe de l'axe ATX/LPA/LPA₁ dans la dégradation osseuse médiée par les ostéoclastes dans des conditions inflammatoires et son potentiel thérapeutique n'avait pas encore été démontrés. L'expression d'ATX médiée par le TNF dans les synoviocytes fibroblastiques génère du LPA qui, à terme, les active [267,271]. Ainsi, la signalisation du LPA et du TNF pourrait agir en synergie ou de façon additive pour contribuer à l'inflammation de l'articulation et potentiellement à sa destruction. En effet, le ciblage pharmacologique et génétique de LPA₁, ainsi que la délétion conditionnelle de l'ATX dans les cellules mésenchymateuses induisent une

atténuation de la maladie dans des modèles murins d'arthrite [267,271]. De façon intéressante, le promoteur *Col6a* utilisé pour cibler la Cre recombinaise des synoviocytes fibroblastiques, est également exprimé par les ostéoclastes matures résorbants [306], suggérant que l'ATX dérivant des ostéoclastes participerait au phénotype observé dans le modèle d'arthrite préalablement décrit [267].

5) L'inhibition pharmacologique de l'activité de l'ATX réduit les érosions focales induites par le TNF et la perte osseuse systémique sans intervenir sur la synovite

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique du ciblage de l'ATX dans la perte osseuse inflammatoire, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activité de l'ATX, le BMP22, dans un modèle inflammatoire d'arthrite induit par la surexpression du TNF : les souris transgéniques *hTNF*^{+/-}. Le potentiel thérapeutique du blocage de l'activité de l'ATX par le BMP22 a préalablement été démontré dans des modèles murins non inflammatoires [84,307]. Le traitement par le BMP22 n'a pas affecté l'inflammation, déterminé par le gonflement articulaire, le score arthritique, le poids des souris et l'histologie réalisée sur le chevilles des souris *hTNF*^{+/-} comparées aux souris traitées par le véhicule (figure 26a-f). En revanche, le score histopathologique appliqué à l'érosion osseuse est significativement réduit chez les souris *hTNF*^{+/-} traitées au BMP22 comparées aux souris traitées par le véhicule (figure 26f). En accord avec ces observations, l'analyse par μ -CT et la quantification des érosions osseuses au niveau du calcanéum indique que le traitement avec BMP22 protège les souris *hTNF*^{+/-} des érosions osseuses (figure 27a). De plus, le traitement avec le BMP22 a également diminué la perte osseuse systémique induite par le TNF qui se traduit par une augmentation de 52 % du BV/TV par rapport aux souris traitées avec le véhicule (figure 27b). De plus, le nombre d'ostéoclastes TRAP positifs était significativement réduit dans les os longs des souris *hTNF*^{+/-} traitées au BMP22 par rapport aux souris traitées par le véhicule (figure 27c).

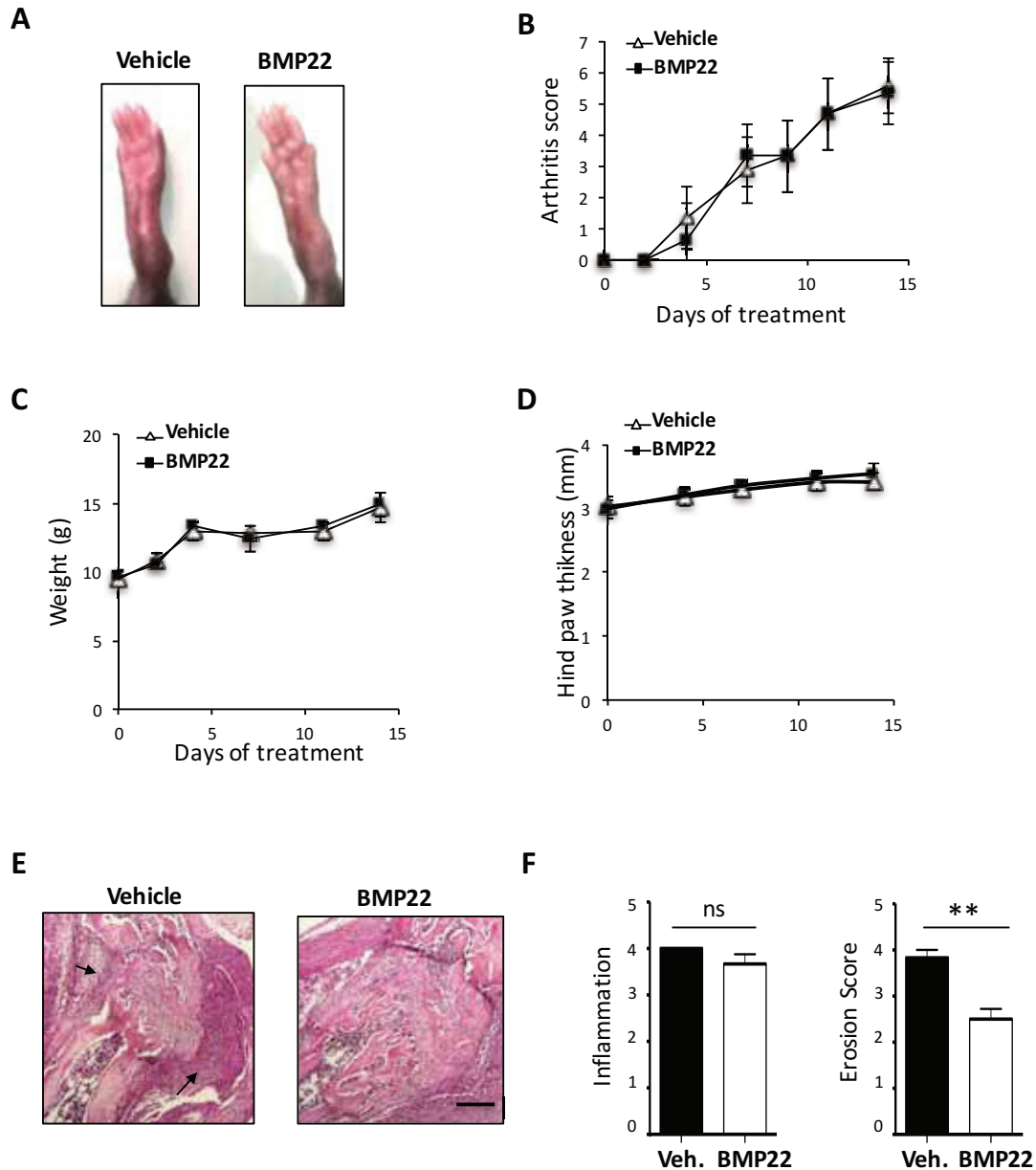


Figure 27 : Le blocage de l'activité de l'ATX n'a pas d'effet sur la synovite induite par le TNF. (A) Photographies du gonflement des chevilles des souris *hTNF*^{+/-} 14 jours après l'initiation du traitement quotidien au BMP22 (B) Score arthritique (C) Poids et (D) gonflement des chevilles au cours de la période de traitement. Triangles : souris *hTNF*^{+/-} traitées avec le véhicule, carrés : souris *hTNF*^{+/-} traitées au BMP22. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=9 par groupe). (E) Colorations HPS des chevilles des souris *hTNF*^{+/-} traitées avec le véhicule (gauche) et le BMP22 (droite). (F) Scores histopathologiques de l'inflammation (gauche) et des érosions osseuses (droite) des chevilles des souris *hTNF*^{+/-} traitées avec le véhicule et le BMP22. Echelle : 100 μ m. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=9 par groupe) **p<0,01 réalisé par Mann Whitney.

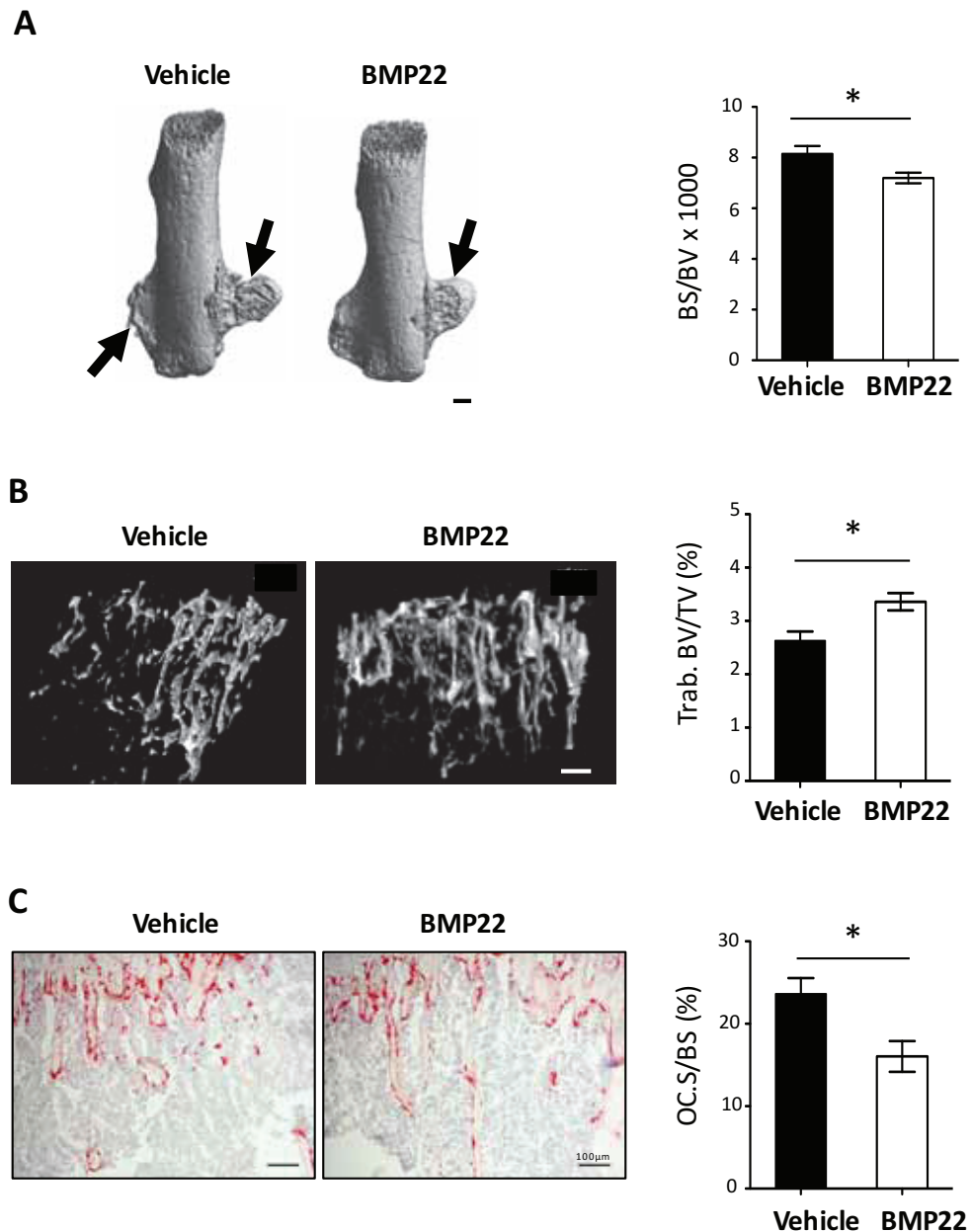


Figure 28 : L'inhibition de l'activité de l'ATX prévient en partie de l'érosion osseuse et de la perte osseuse systémique induite par le TNF. (A) Images représentatives des reconstructions tridimensionnelles de μ -CT et graphiques correspondant à la quantification de la surface osseuse/ volume osseux (BS/BV) des calcaneums des souris $hTNF^{+/-}$ traitées avec le BMP22 ou le véhicule. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=9 par groupe). *p<0,05 réalisé par Mann-Whitney. (B) Images représentatives des reconstructions tridimensionnelles de μ -CT et graphiques correspondant à la quantification de la masse osseuse trabéculaire (BV/TV) des souris $hTNF^{+/-}$ traitées avec le BMP22 ou le véhicule. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=9 par groupe). *p<0,05 réalisé par Mann-Whitney. (C) Colorations TRAP et quantification des surfaces TRAP positives par surface osseuse (OC.S/BS en %) de coupes de tibias des souris $hTNF^{+/-}$ traitées avec le BMP22 ou le véhicule. Echelle : 100 μ m. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (n=9 par groupe) *p<0,05, réalisé par Mann-Whitney.

Notre étude est la première à examiner l'inhibition pharmacologique de l'ATX dans un modèle arthritique. De plus, elle apporte des données supplémentaires par rapport à l'étude de Nikitopoulo *et al.* concernant la délétion conditionnelle de l'ATX dans les cellules mésenchymateuses [267]. Selon les prédictions de cette étude, une atténuation de l'inflammation pourrait être attendue avec le traitement au BMP22. Mais la littérature manque encore de données concernant l'inhibition pharmacologique de l'ATX dans des modèles animaux. Ainsi, nous avons étudié l'impact de l'inhibition pharmacologique de l'activité de l'ATX, avec le BMP22, sur l'os et l'inflammation à l'aide du modèle de souris arthritiques transgéniques *hTNF* [275]. Nos résultats indiquent que les souris transgéniques *hTNF*^{+/-} traitées au BMP22, ne présentent pas de protection vis-à-vis de l'inflammation articulaire mesurée par différents paramètres tels que le gonflement articulaire, le score arthritique ou le score histopathologique. De façon remarquable, les souris *hTNF*^{+/-} traitées au BMP22 présentent une réduction des érosions locales et la perte osseuse systémique est entièrement restaurée par le traitement au BMP22. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de l'ATX par le BMP22 protège les souris *hTNF*^{+/-} de la perte osseuse induite par l'inflammation en diminuant la résorption osseuse ostéoclastique plutôt qu'en affectant la réponse inflammatoire. De plus, ces résultats suggèrent le rôle central de l'ATX dérivée des ostéoclastes, plus important que celui de l'ATX dérivée des synoviocytes fibroblastiques, dans la perte osseuse observée au cours de la PR.

La lignée murine déficiente en ATX étant létale à l'état embryonnaire en raison de défauts vasculaires et neuronaux [53,55], des préoccupations majeures ont été soulevées vis-à-vis de la potentielle toxicité due à l'utilisation d'agents ciblant la voie de l'ATX. Cependant, aucun effet indésirable n'a été observé dans notre étude ni dans des modèles de cancers murins utilisant des inhibiteurs d'ATX [84,308,309]. De plus, GLPG1690, un inhibiteur de l'ATX, est actuellement en cours d'essai clinique de phase II pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique sans que des effets indésirables n'aient été observés [72]. Bien que le traitement par le BMP22 n'ait pas impacté la synovite, son bénéfice potentiel doit être considéré dans le cas de dommages concernant la structure osseuse.

L'ensemble de ces résultats démontrent que l'ATX dérivée des ostéoclastes est un acteur clé dans la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes. L'utilisation d'approches pharmacologiques et génétiques expérimentales de perte osseuse

inflammatoire nous a permis de mettre en évidence que l'ATX est un facteur déterminant contrôlant la destruction osseuse par les ostéoclastes et pourrait être envisagé comme potentielle cible prometteuse dans le ciblage thérapeutique de l'érosion osseuse au cours de la PR.

B. La surexpression du TNF induit principalement l'ostéoclastogenèse au site vertébral mais n'induit pas l'apparition de syndesmophytes

1) Les souris *hTNF^{+/-}* ne présentent pas de syndesmophytes et d'anomalies de l'espace intervertébral

Les principales caractéristiques de la SA chez l'homme sont une synovite périphérique, une sacroiliite et une inflammation de la colonne vertébrale accompagnée de la présence de syndesmophytes. Le modèle de souris transgénique *hTNF^{+/-}* présente des lésions similaires à la SA humaine telles que les érosions osseuses au niveau des articulations périphériques et sacroiliaques [294]. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à la présence de syndesmophytes et plus particulièrement au niveau vertébral. Dans ce but, l'évaluation morphologique de la colonne vertébrale ainsi que de l'occurrence des syndesmophytes a été réalisée sur les vertèbres lombaires (LV) 1 à 4 chez les souris femelles à 2, 4, 6, 8 et 10 semaines (n=5 par groupe). La colonne a également été analysée chez les souris mâles à 6, 8 et 10 semaines. L'analyse histologique de l'espace intervertébral (intervertebral disc space, IDS) n'a révélé aucune différence entre les souris femelles *hTNF^{+/-}* et sauvages (WT). En effet, aucune altération de l'*annus fibrosus disci intervertebralis* ou du *nucleus pulposus* n'a été détectée et aucun syndesmophyte ou formation osseuse ectopique n'ont été observées (figure 28a). Aucune minéralisation des ligaments vertébraux n'a été observée. L'analyse μ -CT a confirmé l'absence d'ossification ectopique entre les LV et d'anomalie des IDS aux différents points de mesures (figure 28b). De plus, la hauteur totale des vertèbres est similaire entre les souris sauvages et *hTNF^{+/-}*. Les résultats obtenus pour les mâles sont identiques (non présentés dans ce manuscrit). De plus, l'analyse des reconstructions tridimensionnelles a révélé une porosité inhérente chez les individus de deux semaines, au niveau de la plaque de croissance vertébrale avec une ossification normale et complète à quatre semaines. Cependant, au niveau de la plaque de croissance, une bande ostéoporotique a été observée chez les souris *hTNF^{+/-}* de six

semaines par rapport aux souris WT (flèches noires, figure 28b). Cette différence s'est accrue aux points de mesure suivants (8 et 10 semaines). Pour confirmer cette perte osseuse, l'os trabéculaire axial des souris *hTNF*^{+/-} a été analysé.

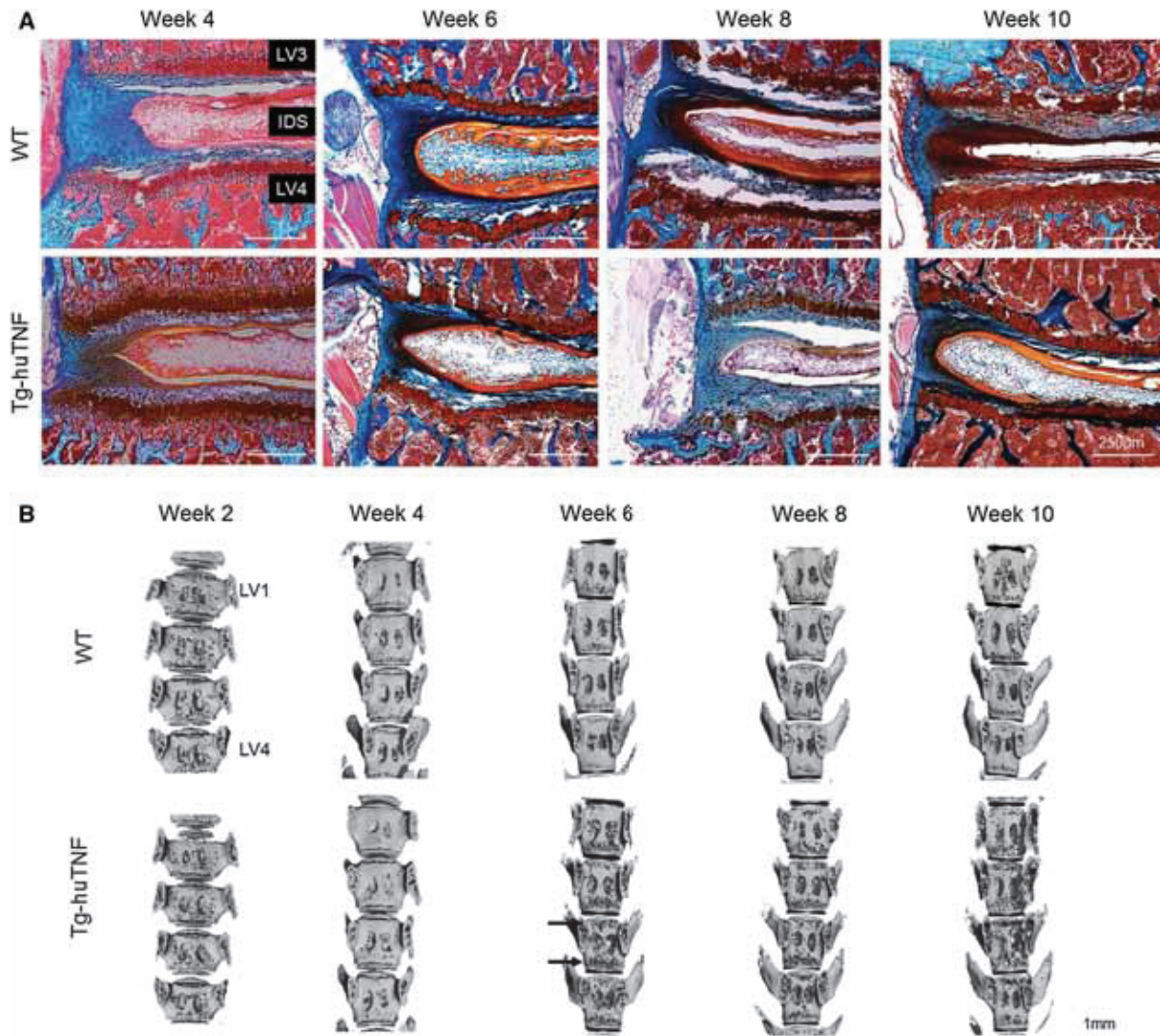


Figure 29 : La morphologie des disques intervertébraux est inchangée chez les souris *hTNF*^{+/-} par rapport aux souris WT. (A) Coupes coronales des disques intervertébraux colorées avec Safranine O/vert lumière, de LV2 à LV3 à 4, 6, 8 et 10 semaines, révélant la préservation de l'intégrité du fibrocartilage et l'absence de syndesmophytes chez les souris *hTNF*^{+/-} et WT. Echelle : 250 µm. LV3 est en haut de chaque figure. (B) Reconstitution tridimensionnelle de la colonne vertébrale (de LV2 en haut à LV4) acquise en µ-CT (résolution : 10,5 µm) à 2, 4, 6, 8 et 10 semaines, montrant l'absence d'anomalie au niveau de l'espace intervertébral des vertèbres LV1 à LV4, mais une augmentation de la porosité osseuse chez les souris *hTNF*^{+/-} après 6 semaines par rapport aux souris WT (flèches). Echelle : 1,0 mm. Les images sont représentatives des 5 souris femelles.

Bien que la destruction quasi complète de l'articulation sacroiliaque ait été décrite dans ce modèle [295], aucune inflammation ni destruction osseuse n'a été observée au niveau du disque intervertébral, même au cours de la période dite « d'arthrite établie » entre les sixième et dixième semaines de vie des animaux. Cette différence pourrait être due à l'organisation spécifique de l'espace intervertébral dépourvu de tissu synovial. L'espace intervertébral est une articulation fibrocartilagineuse organisée autour du *nucleus pulposus* avec une fraction liquide contenant des cellules vacuolées contenue dans l'*annulus fibrosus disci intervertebralis* composé de protéoglycans et de collagène.

2) Les souris *hTNF*^{+/-} présentent une diminution du volume osseux vertébral

La reconstruction tridimensionnelle de l'os trabéculaire de LV3 a montré une altération du réseau trabéculaire dès l'âge de quatre semaines chez les souris *hTNF*^{+/-} comparées aux souris WT (figure 29).

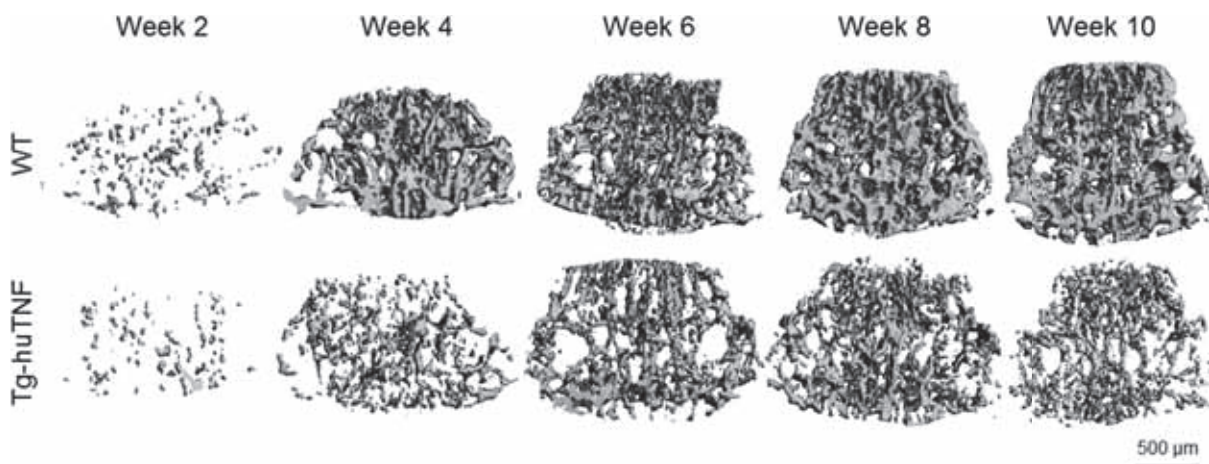


Figure 30 : Les souris *hTNF*^{+/-} présentent une diminution du volume osseux trabéculaire vertébral. Représentation tridimensionnelle de l'os trabéculaire LV en μ -CT (résolution : 10,5 μ m) à 2, 4, 6, 8 et 10 semaines (n=5 par groupe). Echelle : 500 μ m. Le réseau trabéculaire augmente dans les deux groupes de 2 à 8 semaines. L'os minéralisé diminue chez les souris *hTNF*^{+/-} par rapport aux souris WT à chaque point de mesure.

Le volume osseux trabéculaire (BV/TV) (figure 30a) était négligeable à deux semaines et similaire à celui obtenu à quatre semaines pour les souris *hTNF*^{+/-} et WT (3,6% et 3,7 % respectivement). Le BV/TV des souris *hTNF*^{+/-} n'a pas augmenté par

la suite et a même diminué (5,4%) par rapport aux souris WT en croissance (10,4%) à partir de la sixième semaine ($p<0,05$). Le ratio de la surface osseuse/volume osseux (BS/BV) (figure 30b) a diminué et était supérieur chez les souris $hTNF^{+/-}$ par rapport aux souris WT à partir de la sixième semaine ($p<0,05$). Un BV/TV bas associé à un BS/BV haut chez les souris $hTNF^{+/-}$ confirme une perte osseuse au niveau vertébral. Afin d'explorer cette perte osseuse en détail, l'analyse des paramètres microarchitecturaux trabéculaires a été réalisée. Après six semaines, une diminution du nombre de travées et de leur épaisseur a été observée ainsi qu'une augmentation de l'espacement trabéculaire chez les souris $hTNF^{+/-}$ par rapport aux souris WT (figure 20c-e, $p<0,05$). De même, la densité des connections trabéculaires s'est révélée diminuée à partir du même âge (figure 20f, $p<0,05$).

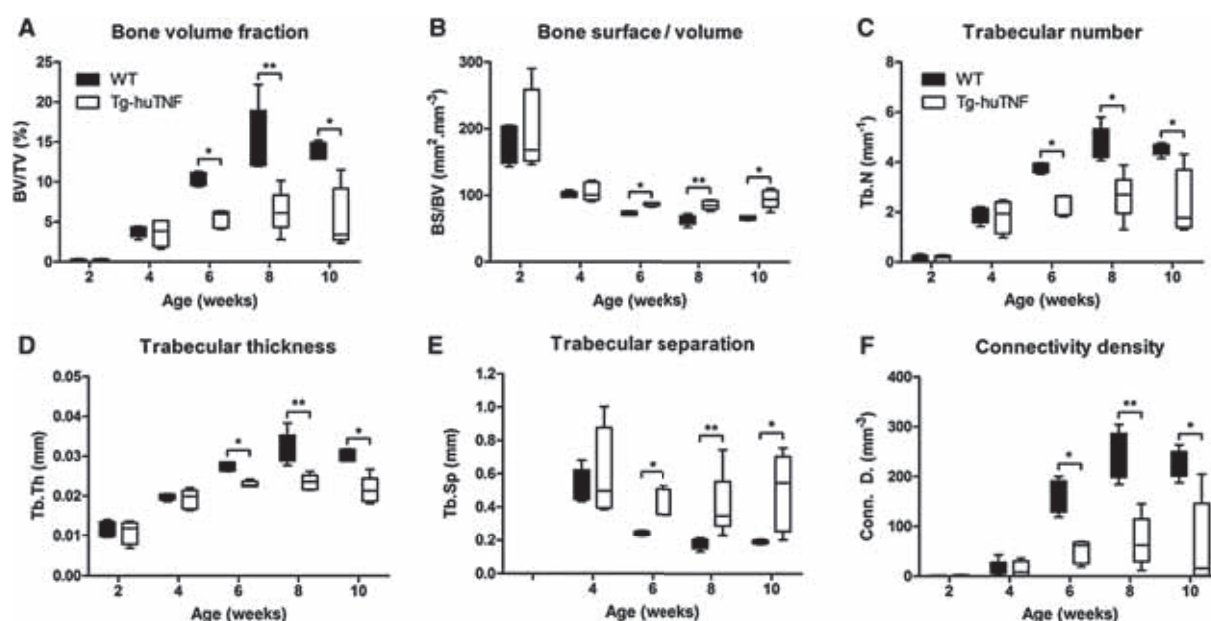


Figure 31 : La quantification des paramètres microarchitecturaux par μ -CT a révélé une faiblesse architecturale de l'os trabéculaire. (A) Le BV/TV diminue après 6 semaines chez les souris $hTNF^{+/-}$ alors que (B) le BS/BV augmente. (C) Le Tb.N et (D) le Tb.th diminuent chez les souris $hTNF^{+/-}$ alors que (E) le Tb.Sp augmente. (F) La densité de connection diminue chez les souris $hTNF^{+/-}$ après 6 semaines. Les valeurs sont représentées en médiane $\pm$ interquartile, * $p<0,05$, ** $p<0,001$.

Nos résultats indiquent une perte osseuse importante au site vertébral. Dans ce modèle murin, le processus débute au niveau de la zone périodisciale avec une ostéoporose en bande constatée dès l'âge de six semaines au niveau de la plaque

de croissance. Une perte osseuse précoce dans la zone de la précédente plaque de croissance n'est pas surprenante car il s'agit d'une zone subissant un remodelage osseux intense avec la présence de nombreux ostéoclastes [310]. Les analyses des vertèbres ont montré une perte osseuse accompagnée d'une altération du réseau trabéculaire. Les premiers changements de la microarchitecture trabéculaire des souris *hTNF* apparaissent au cours de la période dite de « pré-arthrite » (entre 4 et 6 semaines). Ces résultats sont en accord avec les changements de microarchitecture observés au cours de la SA humaine et sont associés à un fort risque de fracture vertébrale [311].

Les résultats indiquent également une augmentation du nombre d'ostéoclastes et de leur surface au site vertébral, confirmant des dommages axiaux dans ce modèle.

3) L'ostéoclastogenèse augmente chez les souris *hTNF*^{+/-}

En accord avec la perte osseuse, la différenciation ostéoclastique augmente au sein des vertèbres des souris *hTNF*^{+/-}. Quelques ostéoclastes positifs à la coloration TRAP ont été détectés dans l'os des LV au cours du remodelage osseux des souris WT (figure 31a). En comparaison, le nombre d'ostéoclastes par périmètre osseux était fortement augmenté chez les souris *hTNF*^{+/-} par rapport aux WT (figure 31a et b). Le ratio de la surface ostéoclastique par surface osseuse (OC.S/BS) était à 9% à 4 semaines et est resté stable chez les souris WT alors qu'il a augmenté chez les souris *hTNF*^{+/-} et était de 42% à 10 semaines (figure 31c). De plus, la taille des ostéoclastes augmente à partir de 8 semaines chez les souris *hTNF*^{+/-} par rapport aux WT (figure 31d).

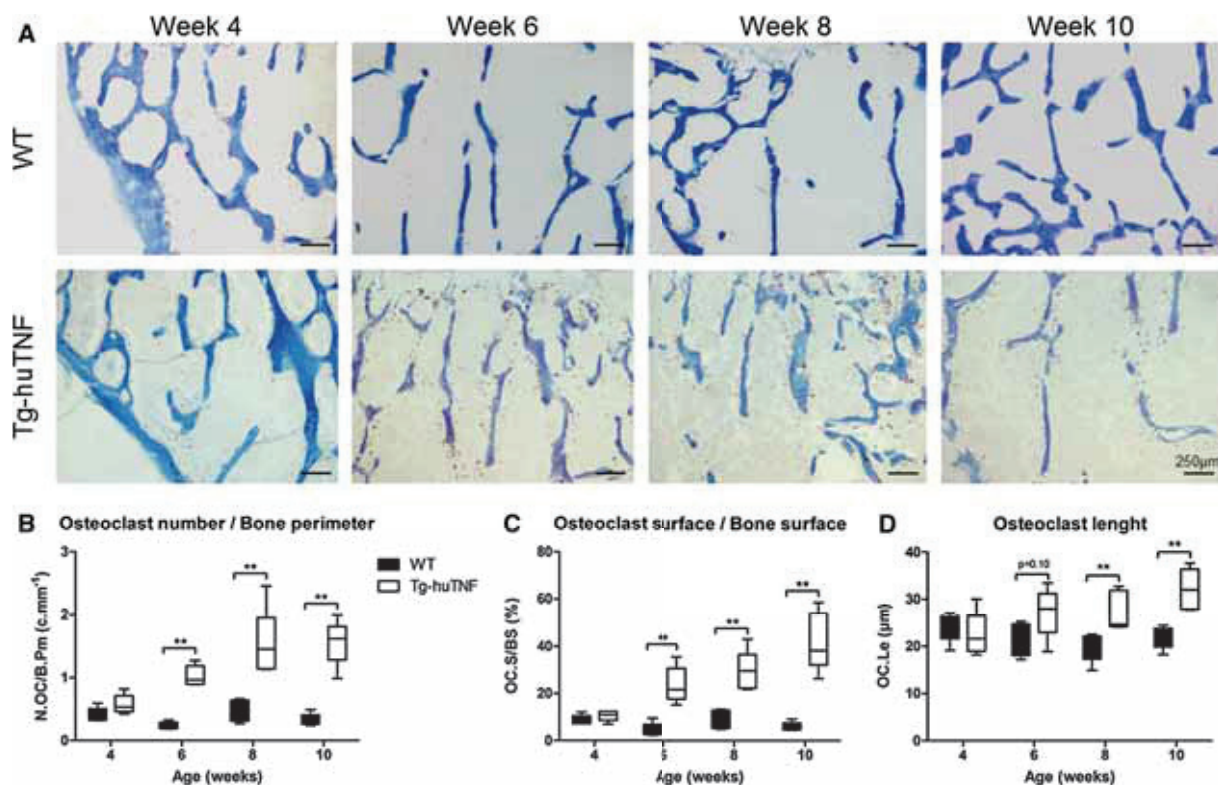


Figure 32 : La différenciation ostéoclastique est augmentée dans l'os trabéculaire. (A) Coloration TRAP avec contre coloration au bleu d'aniline sur des coupes de tissu osseux de 9 μm chez les souris $hTNF^{+/-}$ et WT à 4, 6, 8 et 10 semaines. Echelle : 250 μm . (B) Les comptes ostéoclastiques ont été normalisés par périmètre osseux (N.OC/B.Pm). (C) Surface ostéoclastique par surface osseuse. (D) Longueur ostéoclastique (valeur absolue). N=5 par groupe, ** $p < 0,01$.

4) La surface ostéoïde augmente chez les souris $hTNF^{+/-}$

La diminution du volume osseux trabéculaire est également associée avec une augmentation de la surface ostéoïde (surface non minéralisée) et une diminution la densité osseuse minérale. Avec une coloration au trichrome de Goldner modifié, marquant la fraction minérale en vert, la moelle osseuse en jaune et les surfaces ostéoïdes en rouge le long des travées minéralisées, nous avons confirmé la diminution du volume osseux trabéculaire minéralisé chez les souris $hTNF^{+/-}$, préalablement observée par $\mu\text{-CT}$ (figure 32a). La surface ostéoïde, estimée par le rapport OS/BS augmente significativement chez les souris $hTNF^{+/-}$ par rapport aux WT après 6 semaines (figure 32b). De plus, une diminution de la BMD (réalisée par DXA) a été observée à partir de 8 semaines (figure 32c).

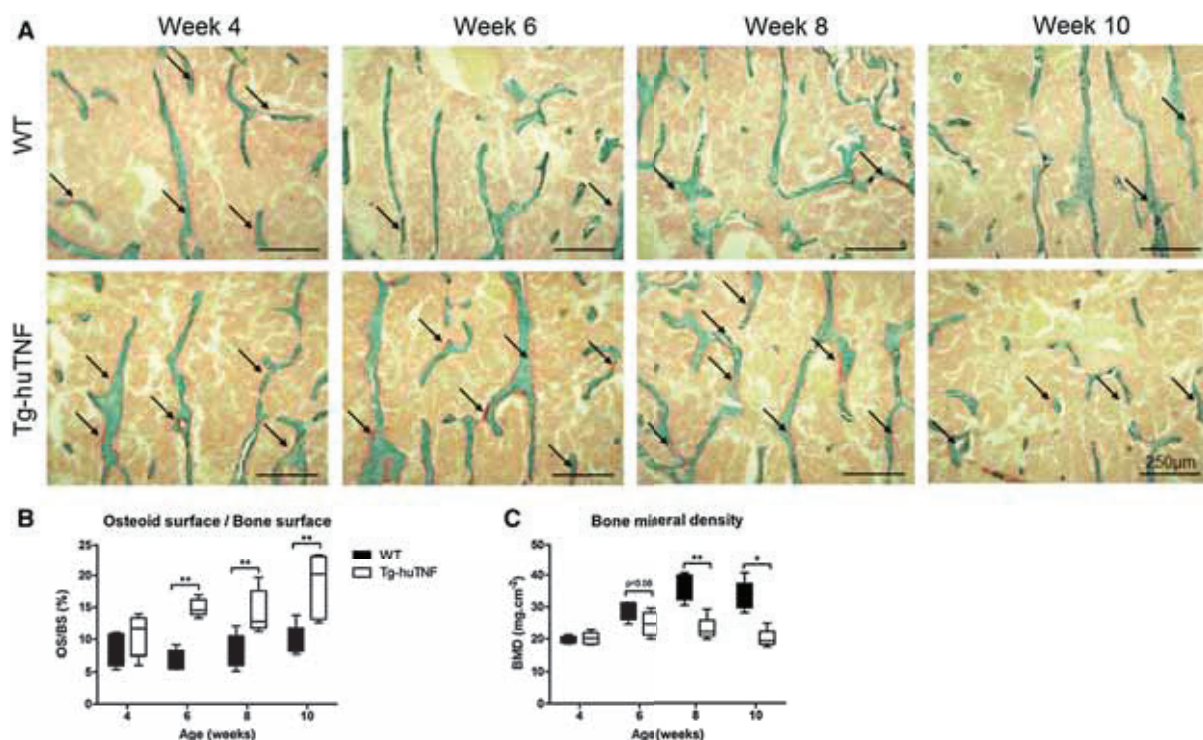


Figure 33 : La surface ostéoïde augmente chez les souris $hTNF^{+/-}$. (A) La surface ostéoïde (rouge) augmente chez les souris $hTNF^{+/-}$ à 6 semaines, comme observé sur les coupes de 9 µm colorées avec une coloration trichrome de Goldner modifiée (acide picrique, fushine, et vert lumière). Les flèches indiquent les marges de l'ostéoïde. (B) Sachant que le contenu osseux diminue avec le temps, la quantification de la surface ostéoïde a été rapportée par surface osseuse (OS/BS). (C) L'ostéodensitométrie a également révélé une diminution de la BMD chez les souris $hTNF^{+/-}$ après 8 semaines. N= 5 par groupe, * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Sur l'autre versant du remodelage osseux, la formation osseuse est également altérée, avec une augmentation de la matrice ostéoïde au niveau de l'os trabéculaire des vertèbres, suggérant une activité des ostéoblastes et/ou une diminution de la minéralisation. De plus, il a déjà été démontré que le TNF réduit la différenciation des ostéoblastes, la minéralisation osseuse et la synthèse de la matrice osseuse induisant l'apoptose des ostéoblastes *in vitro* [285] suggérant que l'augmentation de la matrice ostéoïde observée pourrait résulter d'une réduction de la minéralisation. La formation osseuse pourrait être masquée par une résorption excessive mais reste active même à 10 semaines, en accord avec ce qui a été observé au niveau tibial [228]. De façon suprenante, les cellules souches issues de la moelle osseuse des souris $hTNF$ présentent un défaut de différenciation ostéoblastique *in vitro* [312]. Les études *in vitro* sont en accord avec les caractéristiques de la SA avec une

augmentation de la résorption médiée par les ostéoclastes mais une diminution de la formation par les ostéoblastes [256,313].

Une autre raison expliquant l'absence de syndesmophytes pourrait être que l'activité ostéoclastique reste supérieure à celle des ostéoblastes, sauf à la quatrième semaine de vie. De plus, le TNF est constamment surexprimé chez les souris *hTNF*, ce qui n'est pas le cas pour la SA. En effet, au cours de la maladie, des phases alternant inflammation et rémission sont nécessaires pour la formation des syndesmophytes [314]. Les analyses IRM suggèrent la séquence suivante pour la formation et la progression des syndesmophytes : première inflammation, dépôt de graisse au cours de la rémission, suivi par une formation osseuse ou progression du syndesmophyte au même site [315]. Un blocage transitoire de l'inflammation dans ce modèle pourrait permettre la réactivation de la formation osseuse et le développement de syndesmophytes. La pathogénèse des syndesmophytes, comme celle de tout ossification ectopique est encore peu étudiée. Par exemple, la formation osseuse extérieure au squelette après des traumatismes, brûlures ou opérations chirurgicales orthopédiques fait intervenir le TNF et apparaît seulement après la phase d'inflammation. Ces éléments sont en faveur de nos observations et de l'absence de syndesmophytes en cas d'expression permanente du TNF.

5) Les surfaces ostéoclastiques et surfaces ostéoïdes relatives à la surface osseuse augmentent chez les souris *hTNF*^{+/-}

Afin d'explorer le remodelage osseux chez les souris *hTNF*^{+/-} par rapport à celui des souris WT, nous avons calculé le delta pour les surfaces ostéoclastiques et ostéoïdes obtenues entre les souris *hTNF*^{+/-} et les souris WT ($OC.S/BS_{hTNF^{+/-}} - OC.S/BS_{WT}$ et $OS/BS_{hTNF^{+/-}} - OS/BS_{WT}$) (figure 33a). Le delta entre les souris *hTNF*^{+/-} et les souris WT concernant $OC.S/BS$ augmente avec le temps. En effet, la différence entre les génotypes est de +2% à la semaine 4 et de +36% à la semaine 10) alors qu'elle est relativement constante pour OS/BS (de +2% à la semaine 4 et entre +8% et +9% jusqu'à la semaine 10). Afin d'analyser la participation relative de la diminution de la formation osseuse et l'augmentation de la perte osseuse, nous

avons défini un ratio de la surface ostéoïde/surface ostéoclastique (OS/OC.S). La quatrième semaine, le ratio était légèrement supérieur à 1, en faveur d'une diminution de l'ostéoïde chez les souris *hTNF*^{+/-} par rapport aux souris WT. Pour les mesures suivantes, le ratio diminuait pour atteindre un ratio de 0,24 à la dixième semaine (figure 33b).

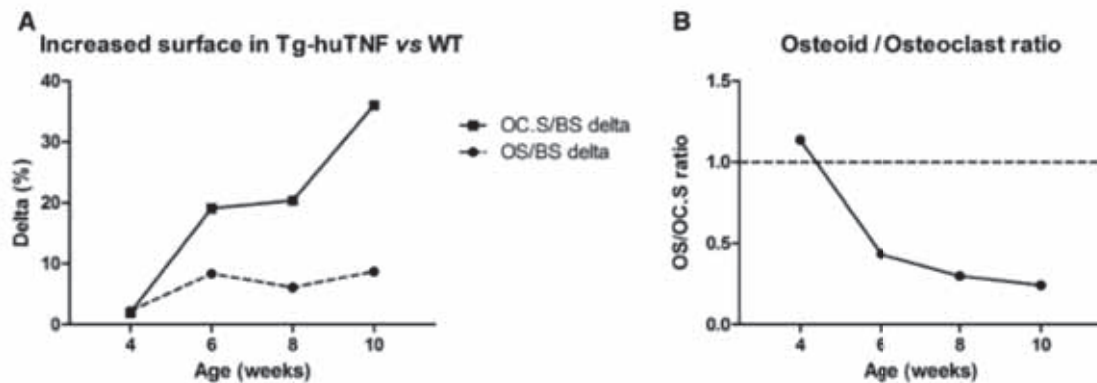


Figure 34 : Les surfaces ostéoclastiques et ostéoïdes relatives à la surface osseuse augmentent chez les souris *hTNF*^{+/-}. (A) Les moyennes des OC.S/BS (carrés) et OS/BS (cercles) des souris *hTNF*^{+/-} ont été calculées en delta par rapport aux valeurs respectives obtenues chez les souris WT (OC.S/BS_{*hTNF*^{+/-}} - OC.S/BS_{WT} et OS/BS_{*hTNF*^{+/-}} - OS/BS_{WT}). (B) Le pourcentage de l'augmentation OS/BS a été divisé par le pourcentage d'augmentation OC.S/BS, donnant un ratio Ostéoïde/ostéoclaste.

Les résultats obtenus ainsi que les études réalisées sur l'arthrite périphérique et la sacroïlite, indiquent que le modèle *hTNF* partage plusieurs caractéristiques avec la SA humaine sauf concernant l'inflammation de l'espace intervertébral et la formation de syndesmophytes. Ceci suggère que le processus initiant la formation des syndesmophytes serait l'altération de l'espace intervertébral [314,315].

En conclusion, la surexpression du TNF induit une diminution du volume osseux trabéculaire axial progressive chez les souris *hTNF*^{+/-} par rapport aux souris WT. De plus, l'absence de syndesmophytes et l'augmentation de la surface ostéoïde suggèrent que l'expression constitutive du TNF pourrait bloquer la minéralisation.

DISCUSSION

A. L'atteinte osseuse dans la spondylarthrite ankylosante

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont très efficaces dans la réduction de la douleur et de la raideur chez les patients atteints de SA et sont donc recommandés comme traitement de première intention chez ces patients. Le traitement des SA avec les inhibiteurs du TNF induit une nette amélioration des manifestations articulaires, et de l'inflammation au niveau des articulations sacroiliaques et de la colonne vertébrale chez les patients pour lesquels un traitement avec des AINS était insuffisant. Cependant ces traitements ne résolvent pas l'ankylose.

En effet, une des problématiques majeures de la SA est le lien entre l'inflammation et la formation osseuse. Des études *in vivo*, en accord avec nos observations sur le modèle *hTNF*, ont montré que la surexpression du TNF dans des modèles arthritiques murins entraîne un phénotype arthritique érosif mais pas de formation osseuse [256,316]. De plus, le traitement par un anti-TNF dans le modèle d'arthrite spontané chez la souris DBA/1 n'affecte pas l'ankylose des articulations suggérant que la formation osseuse au cours de la SA est indépendante de l'inflammation médiée par le TNF [317]. D'autres auteurs ont suggéré que le TNF inhiberait l'ostéoformation via la stimulation de l'inhibiteur de Wnt, DKK-1 [318]. En effet, les souris *hTNF*^{+/-} traitées avec un inhibiteur de DKK-1 présenteraient des syndesmophytes et une inhibition du phénotype érosif classique [256]. Le TNF posséderait des effets contraires sur les ostéoblastes. Des études *in vitro* sur des cellules souches mésenchymateuses ont démontré que le TNF pouvait agir comme inhibiteur ou comme stimulateur de l'ostéoblastogenèse en modulant la signalisation de BMP et Wnt, en fonction de sa concentration [319]. Ceci n'a pas été confirmé chez l'homme. A l'inverse, des études portant sur le suivi de cohortes de patients traités avec des anti-TNF indiquent que ces traitements n'affectent pas ou peu la progression des lésions structurales [291–293].

Le TNF seul ne peut expliquer toutes les caractéristiques de la SA et d'autres cytokines sont impliquées, en particulier l'IL-17. L'IL-17 induit la perte osseuse via différents mécanismes selon le contexte cellulaire et tissulaire. En effet, dans le cas

d'une inflammation osseuse locale comme dans la PR, elle est produite par les synoviocytes fibroblastiques et induit la production de RANKL, qui induit l'ostéoclastogenèse. Cependant, dans le cas d'une source inflammatoire systémique comme dans les spondyloarthrites, l'IL-17 agit sur l'os via l'inhibition de la voie Wnt et donc de l'ostéoblastogenèse [320].

Au cours de la SA, les deux mécanismes interviennent et les effets de l'IL-17 sont paradoxaux sur les cellules osseuses et notamment sur les ostéoblastes en stimulant la prolifération des cellules souches mésenchymateuses et leur différenciation en ostéoblastes [321]. De plus, dans les cellules souches mésenchymateuses et les synoviocytes fibroblastiques *in vitro*, l'IL-17 en coopération avec TNF induit la formation osseuse en réduisant les niveaux de RANKL et de DKK-1 [322][323]. Ceci contraste avec l'augmentation de l'expression de DKK-1 observée dans les synoviocytes fibroblastiques issus de patients atteints de PR par rapport à ceux issus de patients atteints d'arthrose [256]. De plus, des données obtenues dans le modèle murin DBA/1 suggèrent que l'inhibition de l'IL-17 prévient de l'ankylose enthésitique [324]. Depuis, l'anti-IL-17 (secukinumab) s'est montré très efficace chez les patients atteints de SA dans trois essais cliniques de phase III, et a été approuvés en Europe, aux Etats-Unis et ailleurs dans le monde [325]. Une étude portant sur le suivi des patients après deux ans de traitement par sécukinumab a récemment démontré une diminution de la progression de la formation osseuse [326] mais des études sur de plus longs termes sont nécessaires avant de tirer de réelles conclusions.

Si le rôle de l'ATX sur les ostéoblastes et l'ostéoformation est encore inconnu, le LPA semble stimuler l'ostéoblastogenèse *in vitro* via LPA₁ et LPA₄. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée au rôle du LPA sur l'ostéoformation pathologique au cours de la SA. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de l'ATX et du LPA sur les ostéoblastes et sur la minéralisation osseuse dans des conditions inflammatoires. Le rôle S1P, phospholipide très proche du LPA, a également été étudié sur les cellules osseuses. Il a été démontré que le S1P stimule la prolifération et la différenciation des ostéoblastes [327] et inhibe l'ostéoclastogenèse [328] *in vitro*. De plus, d'importants taux de S1P ont été mesurés dans le sérum de patients atteints de SpA [329] et l'inhibition pharmacologique *in vitro* des sphingosines kinases 1 et 2 induit une diminution de la différenciation des chondrocytes ainsi que des ostéoblastes. Le

ciblage thérapeutique de la voie métabolique du S1P semble une piste intéressante dans l'inhibition de la formation osseuse pathologique au cours de la SpA.

B. La perte osseuse dans la PR et ciblage de l'ATX

L'enjeu majeur dans le traitement de la PR, est de réaliser un diagnostic le plus précocément possible afin d'éviter les lésions structurales. En effet, la PR est souvent diagnostiquée après l'apparition des premières érosions osseuses, dont la progression peut être ralentie mais pas inhibée. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la PR a conduit au développement de médicaments ciblant des molécules ou des cellules clés, impliquées dans la pathogenèse complexe de la maladie. Les inhibiteurs du TNF ont été les premières molécules développées et sont toujours les plus prescrits pour le traitement des patients atteints de PR répondant insuffisamment au Méthotrexate. D'autres modes d'action ont été proposés depuis, menant à la mise sur le marché de molécules ciblant l'IL-1 (anakinra), le récepteur de l'IL-6 (tocilizumab), les lymphocytes B (rituximab) et la costimulation des lymphocytes T (abatacept) [330]. Toutes ces thérapies ont grandement amélioré le pronostic de la PR en ciblant la mise en rémission de la maladie, ou à défaut, une faible activité de celle-ci, limitant ainsi la progression des destructions articulaires et l'occurrence des déformations, et diminuant par conséquent le handicap fonctionnel [331]. Cependant, environ 30 % des patients atteints de PR présentent une réponse inadéquate à ces molécules dans les essais cliniques randomisés avec soit un échappement primaire, soit une perte de la bonne réponse initiale ou encore présentant des effets indésirables menant à l'arrêt du traitement [332–335].

Ainsi, des recherches complémentaires doivent être réalisées afin d'offrir des traitements additionnels aux patients atteints de PR. De plus, ces biothérapies ciblent l'inflammation et la réponse immune et, de façon indirecte, la résorption osseuse. Seul le dénosumab (anti-RANK-L) cible directement l'atteinte osseuse via l'ostéoclaste mais ne possède pas l'AMM dans la PR bien que son utilisation en association avec le MTX induisent une inhibition des lésions structurales [284]. Le contrôle de l'inflammation synoviale peut arrêter la progression des érosions osseuses dans la plupart des cas. Cependant, certains patients, pourtant en rémission clinique ou avec une faible activité de la maladie, continuent à aggraver

leurs lésions structurales avec la survenue de nouvelles érosions osseuses probablement en lien avec une inflammation synoviale subclinique possiblement détectable par les techniques d'imagerie IRM ou d'échographie articulaire. De plus, certains patients présentent des synovites chroniques et persistantes responsables de gonflements articulaires mais sans plainte douloureuse [336]. Chez ces patients progressifs sans inflammation significative ou non douloureux, il pourrait être cependant bénéfique d'envisager des thérapies alternatives qui ciblent directement l'érosion osseuse plutôt que l'inflammation, évitant ainsi aussi l'exposition potentielle à des effets indésirables, en particulier infectieux, inhérents au ciblage de l'inflammation par les thérapies biologiques actuellement disponibles.

Les patients atteints de PR souffrent également dans la majorité des cas d'ostéoporose systémique. Cette ostéoporose apparaît dès les premiers stades de la maladie et augmente avec l'intensité de la PR, les thérapies utilisées (corticoïdes) et l'impotence fonctionnelle. Des études ont démontré que l'ostéoporose associée à la PR était indépendante du statut hormonal des patients, dans la mesure où elle touche aussi bien les femmes pré et post-ménopausiques [337]. Sur le plan mécanistique, l'ostéoporose et l'augmentation du risque de fracture sont classiquement considérés comme dus aux cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1, IL-6 et IL-17) surexprimées de façon systémique au cours de la PR. Ces cytokines induisent l'expression de RANK-L qui induit la différenciation et l'activité ostéoclastique à l'origine de l'ostéoporose. En parallèle, ces mêmes cytokines régulent négativement l'ostéoblastogenèse et donc la minéralisation osseuse. Plus récemment les ACPA ont également été associés à une faible densité osseuse chez les patients non traités en début de PR [338].

Etant donné l'importante proportion d'ostéoporose au cours de la PR, un grand nombre de patients reçoivent des thérapies anti-ostéoporotiques dont les bisphosphonates ou le denosumab (anti-RANKL). Les études ont démontré que les patients recevant des bisphosphonates présentent une densité osseuse vertébrale supérieure à celle des patients n'en ayant pas reçu [339]. De même, le denosumab a été démontré comme efficace dans l'ostéoporose associée à la PR, en combinaison avec le MTX mais pas en association avec des bisphosphonates mais ne possède pas l'AMM dans le cadre de la PR.

Nos résultats démontrent que l'ATX dérivée des ostéoclastes est un acteur clé dans la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes. L'utilisation d'approches pharmacologiques et génétiques expérimentales de perte osseuse inflammatoire nous a permis de mettre en évidence que l'ATX est un facteur déterminant contrôlant la destruction osseuse par les ostéoclastes et pourrait être envisagé comme une cible potentielle et prometteuse dans le ciblage thérapeutique de l'érosion osseuse au cours de la PR. Nos résultats indiquent que l'ATX dérivée des ostéoclastes est également un facteur important dans l'ostéoporose systémique. En effet, son inhibition protège de la perte osseuse systémique en conditions inflammatoires et arthritiques. Ceci suggère donc que l'ATX serait une cible intéressante dans l'ostéoporose systémique associée aux rhumatismes inflammatoires.

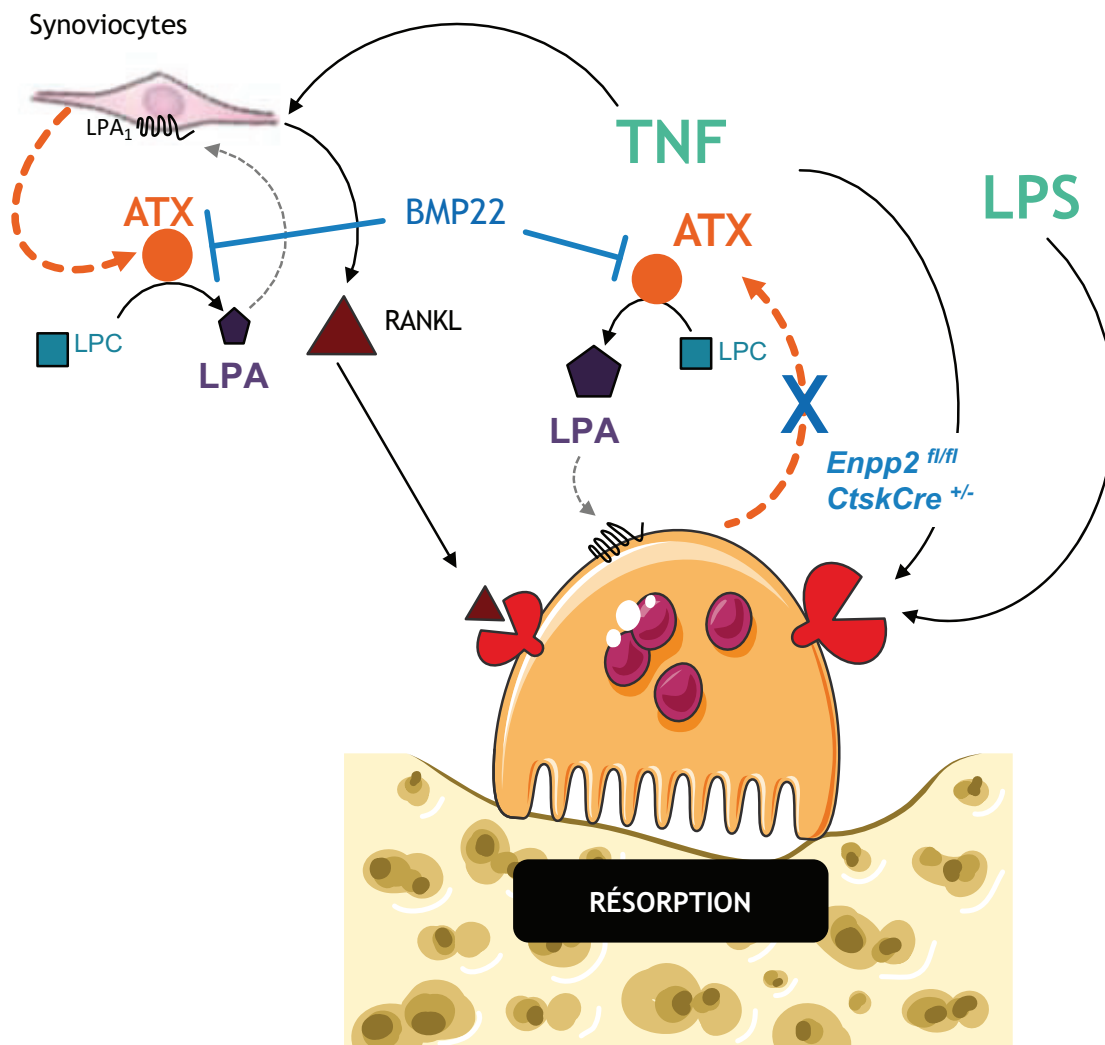


Figure 35: Ciblage de l'ATX issue des ostéoclastes dans la perte osseuse en conditions inflammatoires.

C. Régulation hormonale et sources d'ATX dans l'os

L'inhibition de l'ATX protégerait de la survenue des érosions osseuses et réduirait également la perte osseuse systémique en conditions inflammatoires arthritiques. Ces observations, soulèvent la question de l'implication de l'ATX dans l'ostéoporose post-ménopausique. Pour cela, dans des conditions de déprivation en oestrogènes, nous avons utilisé les mêmes approches génétiques et pharmacologiques. Tout d'abord, nous avons soumis les souris sauvages (WT) à une ovariectomie (OVX), puis nous les avons traitées avec l'inhibiteur de l'ATX, le BMP22. Afin, de comparer l'effet du BMP22 à un contrôle positif, nous avons traité une partie des souris avec zolédronate (bisphosphonate). Comme attendu, les souris OVX présentent une perte osseuse se traduisant par une diminution d'environ 30% de leur BV/TV par rapport aux souris SHAM (contrôles non OVX). Le traitement des souris OVX par le BMP22 pendant 30 jours post OVX n'a pas permis de restaurer le volume osseux trabéculaire des souris. Ces souris présentent le même BV/TV que les souris OVX traitées avec le véhicule (figure 32a) et ce contrairement à l'effet du traitement par zolédronate qui a permis de restaurer ce volume osseux des souris OVX. Il est important de préciser que dans ce modèle une seule dose de BMP22 a été utilisée. Ceci ne permet donc pas de tirer des conclusions définitives sur l'efficacité de cet inhibiteur dans ces conditions. Il serait donc judicieux de reproduire ce test en utilisant plusieurs doses de ce traitement.

Afin d'approfondir ces résultats, nous avons utilisé la même approche en étudiant le volume osseux trabéculaire des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* OVX ou SHAM. De la même façon que les souris WT traitées avec un inhibiteur de l'ATX, les souris déficientes en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes ne semblent pas être protégées de la perte osseuse induite par l'OVX car elles présentent une diminution de 30% du BV/TV, perte similaire aux souris sauvages OVX traitées par le véhicule (figure 32b).

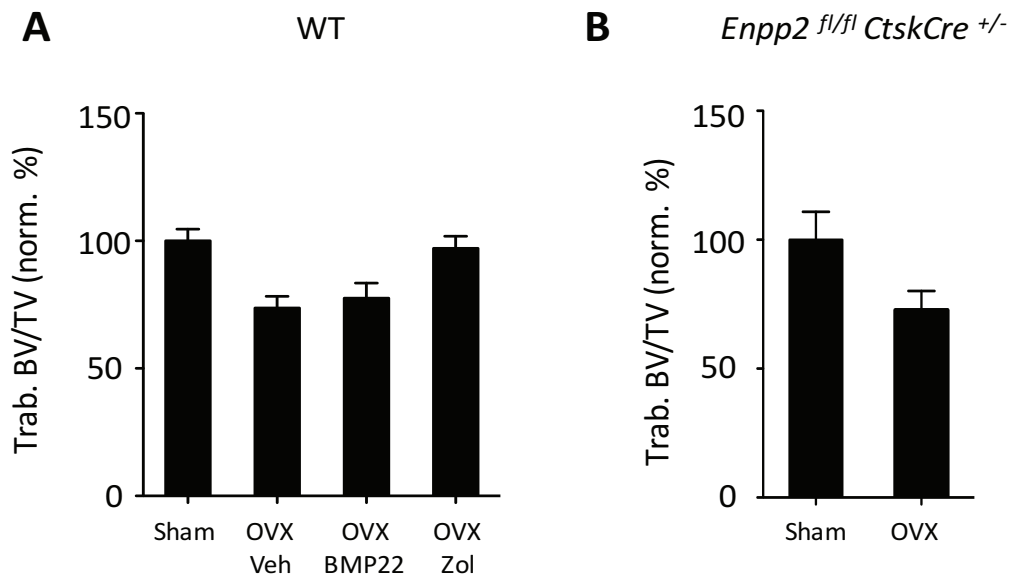


Figure 35 : L'inhibition de l'ATX ne protège pas de la perte osseuse induite par ovariectomie. Graphiques correspondants à la quantification de la masse osseuse trabéculaire (BV/TV) (A) des souris WT ovariectomisées (OVX) ou non (SHAM) traitées avec le véhicule, le BMP22 ou zolédronate et (B) des souris *Enpp2^{fl/fl} CtskCre^{+/-}* ovariectomisées (OVX) ou non (SHAM). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes $\pm$ SEM (n=9 par groupe).

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'ATX (pharmacologique ou génétique) ne protégerait pas de la perte osseuse induite par une déprivation en oestrogènes, suggérant un rétrocontrôle de l'expression de l'ATX par ces hormones. En effet, si les oestrogènes inhibent l'expression de l'ATX, alors la déprivation hormonale telle que l'OVX pourraient stimuler l'expression de l'ATX et contrebalancer la délétion de *Enpp2*. Deux études réalisées sur des rats suggèrent cette hypothèse. La première met en évidence une diminution de l'expression du transcrit de *Enpp2* dans l'utérus de rates traitées aux oestrogènes (17 β -estradiol) [340]. La deuxième étude a été réalisée sur différentes parties du cerveau de rates. Les résultats sont contradictoires par rapport à la première étude car les auteurs observent que l'expression du transcrit de *Enpp2* diminue dans l'hippocampe de rates ovariectomisées et qu'elle est restaurée chez les mêmes animaux traités aux oestrogènes. Cependant, le traitement par les oestrogènes d'une lignée neuronale de rat diminue significativement l'expression de *Enpp2* [341].

Ceci souligne donc la complexité de la régulation de l'ATX par les hormones sexuelles, dépendante probablement de l'organe ou de la lignée cellulaire impliquée. Dans l'os, la présence de plusieurs types cellulaires ayant des origines différentes renforce cette idée et l'absence de phénotype osseux observé dans notre lignée de souris déficiente en ATX spécifiquement dans les ostéoclastes renforce cette hypothèse. En effet, l'os est un organe qui renferme différents types cellulaires ayant des origines différentes dont les ostéoblastes, les ostéocytes mais également les adipocytes. L'absence de phénotype chez nos souris suggère la capacité des autres cellules de l'os à sécréter de l'ATX. Si la capacité des adipocytes à sécréter de l'ATX a déjà été démontrée, il serait intéressant d'étudier son expression dans les différents types cellulaires de l'os et en particulier les ostéoblastes. Il serait également pertinent d'étudier l'impact de l'ATX sur la différenciation et l'activité de minéralisation osseuse des ostéoblastes. Enfin, l'impact des hormones sexuelles sur l'expression de l'ATX dans les différents types cellulaires du tissu osseux serait également à étudier.

ANNEXES

A. Liste des publications et présentations

1) Publications

- Flammier S, Peyruchaud O, Bourguillault F, Duboeuf F, Davignon JL, Norman D, Marotte H, Tigyi G, Machuca-Gayet I, Coury F. **Autotaxin is a new autocrine factor controlling osteoclast activity and inflammation induced bone loss.** Soumis (Janvier 2018).
- Claramunt-Taberner D, Flammier S, Gaillard S, Cochat P, Peyruchaud O, Machuca-Gayet I, Bacchetta J. **Bone disease in nephropathic cystinosis is related to cystinosis-induced osteoclastic dysfunction.** Nephrol Dial Transplant (2018) 1–8 doi: 10.1093/ndt/gfx362
- Courbon G, Flammier S, Laroche N, Vico L, Marotte H, Coury F. **Tumor necrosis factor alpha overexpression induces mainly osteoclastogenesis at the vertebral site.** Calcif Tissue Int. 2017 Mar 13. doi: 10.1007/s00223-017-0237-8.
- Flammier S, Rasigade JP, Badiou C, Henry T, Vandenesch F, Laurent F, Trouillet-Assant S. **Human Monocyte-Derived Osteoclasts Are Targeted by Staphylococcal Pore-Forming Toxins and Superantigens.** PLoS One. 2016 Mar 2;11(3):e0150693. doi: 10.1371/journal.pone.0150693.
- Trouillet-Assant S, Flammier S, Sapin A, Dupieux C, Dumitrescu O, Tristan A, Vandenesch F, Rasigade JP, Laurent F. **Mupirocin Resistance in Isolates of Staphylococcus spp. from Nasal Swabs in a Tertiary Hospital in France.** J Clin Microbiol. 2015 Aug;53(8):2713-5. doi: 10.1128/JCM.00274-15.
- Trouillet-Assant S, Gallet M, Nauroy P, Rasigade JP, Flammier S, Laroche P, Marvel J, Vandenesch F, Jurdic P, Laurent F. **Dual Role of Internalized Live Staphylococcus aureus on Osteoclast Lineage Leading to Increased Bone Resorption.** J Infect Dis. 2015 Feb 15;211(4):571-81. doi: 10.1093/infdis/jiu386.

- Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, Tasse J, Flammier S, Rasigade JP, Chidiac C, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F. **Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic Staphylococcus aureus**. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr;59 (4):2029-36. doi: 10.1128/AAC.04359-14.

2) Présentations orales

- Flammier S, Peyruchaud O, Bourguillault F, Duboeuf F, Marotte H, Norman D, Tigyi G, Machuca-Gayet I, Coury F. **L'autotaxine : un nouveau facteur autocrine contrôlant l'activité ostéoclastique et la perte osseuse en conditions inflammatoires**. Congrès français de Rhumatologie, 2017 (Paris France)
- Flammier S, Bourguillault F, Duboeuf F, Peyruchaud O, Coury F, Machuca-Gayet I. **Autotaxin is a new autocrine factor controlling osteoclast activity and inflammation-induced bone loss**. FASEB, 2017 (Nouvelle Orléans, USA)
- Flammier S, Bourguillault F, Duboeuf F, Peyruchaud O, Coury F, Machuca-Gayet I. **Autotaxin is a new autocrine factor controlling osteoclast activity and lipopolysaccharide-induced bone loss**. JFBTM, 2017 (Lyon, France)
- Flammier S, Peyruchaud O, Machuca-Gayet I, Coury F. **Implications physiopathologiques de l'autotaxine dans la différenciation et la fonction ostéoclastique**. Congrès Français de Rhumatologie, 2016 (Paris, France)
- Flammier S, Gicquel T, Duboeuf F, Peyruchaud O, Coury F, Machuca-Gayet I. **Pathophysiological implication of Autotaxin on osteoclast function**. JFBTM, 2016 (Nancy, France)
- Flammier S, Gicquel T, Duboeuf F, Peyruchaud O, Coury F, Machuca-Gayet I. **Pathophysiological implication of Autotaxin on osteoclast function**. ECTS, 2016 (Rome, Italie)

B. Travaux publiés annexes

Bone disease in nephropathic cystinosis is related to cystinosis-induced osteoclastic dysfunction

Debora Claramunt-Taberner¹, Sacha Flammier², Ségolène Gaillard³, Pierre Cochat^{1,4}, Olivier Peyruchaud², Irma Machuca-Gayet^{2,*} and Justine Bacchetta^{1,2,4,*}

¹Centre de Référence des Maladies Rénales Rares, Hôpital Femme Mère Enfant, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ²INSERM, UMR 1033, Faculté de Médecine Lyon Est, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, ³INSERM CIC 1407, CNRS UMR 5558 and Service de Pharmacotoxicologie Clinique, Hospices Civils de Lyon, Bron, France and ⁴Université de Lyon, Lyon, France

Correspondence and offprint requests to: Justine Bacchetta; E-mail: justine.bacchetta@chu-lyon.fr

*These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Background. Bone impairment is a poorly described complication of nephropathic cystinosis (NC). The objectives of this study were to evaluate *in vitro* effects of cystinosis (CTNS) mutations on bone resorption and of cysteamine treatment on bone cells [namely human osteoclasts (OCs) and murine osteoblasts].

Methods. Human OCs were differentiated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients and healthy donors (HDs). Cells were treated with increasing doses of cysteamine in PBMCs or on mature OCs to evaluate its impact on differentiation and resorption, respectively. Similarly, cysteamine-treated osteoblasts derived from murine mesenchymal stem cells were assessed for differentiation and activity with toxicity and proliferation assays.

Results. CTNS was expressed in human OCs derived from HDs; its expression was regulated during monocyte colony-stimulating factor- and receptor activator of nuclear factor- κ B-dependent osteoclastogenesis and required for efficient bone resorption. Cysteamine had no impact on osteoclastogenesis but inhibited *in vitro* HD osteoclastic resorption; however, NC OC-mediated bone resorption was impaired only at high doses. Only low concentrations of cysteamine (50 μ M) stimulated osteoblastic differentiation and maturation, while this effect was no longer observed at higher concentrations (200 μ M).

Conclusion. CTNS is required for proper osteoclastic activity. *In vitro* low doses of cysteamine have beneficial antiresorptive effects on healthy human-derived OCs and may partly correct the CTNS-induced osteoclastic dysfunction in patients with NC. Moreover, *in vitro* low doses of cysteamine also stimulate osteoblastic differentiation and mineralization, with an inhibitory

effect at higher doses, likely explaining, at least partly, the bone toxicity observed in patients receiving high doses of cysteamine.

Keywords: bone, cysteamine, cystinosis, nephropathic cystinosis, osteoclast

INTRODUCTION

Nephropathic cystinosis (NC; 1/200 000 live births) is a rare autosomal recessive lysosomal storage disease characterized by a deficiency of the cystine lysosomal transport protein [i.e. cystinosis (CTNS) encoded by the *CTNS* gene], resulting in systemic accumulation of cystine crystals, thus leading to tissue damage. Patients suffer early from complete proximal tubulopathy; the natural evolution is a progressive chronic interstitial nephritis leading to end-stage renal disease (ESRD) within the first decade of life [1]. The use of cysteamine therapy since the 1980s has postponed ESRD and extrarenal morbidities to the second or third decade of life, at least in developed countries [2].

As patients receive cysteamine and improve survival [1], bone impairment was recently described to be a complication of NC, occurring during teenage or early adulthood [3–6]; even though the exact underlying pathophysiology is unclear, six hypotheses are discussed: copper deficiency [7], consequences of hypophosphatemic rickets together with iatrogenic effects of its supportive treatment, cysteamine toxicity [8], abnormal thyroid metabolism, chronic hypoparathyroidism and/or direct bone effect of the *CTNS* mutation [9].

Significant bone impairment observed in NC patients is partly due to bone formation defects [3–5]. However, bone resorption precedes bone formation, contributing equally to the

sustaining of bone mass integrity, and should also be considered in the context of cystinosis. Osteoclasts mediate bone degradation by forming a sealing zone, which defines a confined lacuna where the ruffle border secretes protons and proteases to acidify and degrade the bone matrix. Although the resorption process highly depends on lysosomal activity and acidification, CTNS involvement has been scarcely studied in osteoclasts (OCs) [10].

Our working hypotheses were that altered OC differentiation and mediated resorption may also contribute to bone impairment and that cysteamine treatment may modify this interplay. The objectives of the present study were therefore to assess the impact of CTNS mutations on OC intrinsic differentiation and function and to evaluate the effect of cysteamine *in vitro* on bone cells [namely human OCs derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and murine osteoblasts derived from mesenchymal stem cells (MSCs)].

MATERIALS AND METHODS

Primary OC culture

Monocytes were purified from 15 mL of peripheral blood. After collection, blood was loaded on a lymphocyte separation medium density gradient (Eurobio, Courtaboeuf, France) to purify mononuclear cells. Monocytes were then plated in 96-well plates at a density of 105 cells/well and cultured in minimum essential medium α (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin (Gibco Life Technologies) and 10% foetal bovine serum (FBS; Dominique Dutscher, Brumath, France) as previously described [11]. OCs were obtained by incubating monocytes with 20 ng/mL monocyte colony-stimulating factor (M-CSF; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and 40 ng/mL of receptor activator of nuclear factor κ -B ligand (RANKL; PeproTech) from Day 1 to Day 5. All PBMCs were treated with a combination of RANKL and M-CSF in order to differentiate them into functioning OCs. From the second day on, osteoclastic precursors were treated with increasing doses of cysteamine (control 50–200 μ M) during differentiation.

OC functional assays

At the end of the osteoclastic differentiation protocol (Day 5), the cells were harvested for real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis or were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and stained with a leucocyte acid phosphatase (TRAP) staining kit according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cells that stained positive (>3 nuclei) were then counted. OC activity was assessed by culturing cells on plates coated with a synthetic inorganic bone mimetic matrix (Osteoassay, Corning, Illkirch, France) after 5 days of differentiation without treatment. Increasing doses of cysteamine (control 50–200 μ M) were added at Day 2 and maintained until the end. At Day 7, to measure the surface of the resorbed matrix, OCs were washed with distilled water and the matrix was stained with a 5% (wt/vol) silver nitrate solution;

the pits produced by OCs appeared as white spots under a light microscope: their surfaces were quantified by ImageJ software.

Isolation and culture of murine MSC-derived osteoblasts

Bone marrow was flushed out of mice long bones, counted, plated at a density of 20×10^6 cells/100-mm diameter flask in MEM supplemented with 15% FBS and expanded for 1 week, supplemented with 2 mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin (all reagents, Gibco Life Technologies). MSCs were harvested, after reaching 80% confluence, using cell dissociation solution (Sigma-Aldrich) and were seeded in 12-well plates at a density of 2×10^5 cells/well; osteogenic media was then added 2 days later [50 μ g/mL L-ascorbic and 10 mM of β -glycerol phosphate (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS]. Subsequently, MSCs were treated with increasing doses of cysteamine (Sigma-Aldrich; control, 10, 50, 100 and 200 μ M) during the differentiation assay. Treatment with cysteamine was added the second day of differentiation and maintained until Day 21. After 3 weeks of culture, cells were washed with phosphate-buffered saline, fixed with 4% PFA and analysed for osteogenic differentiation and DNA content (see below). Alkaline phosphatase (ALP) activity was assessed according to the manufacturer's procedures, whereas calcium deposition was visualized using von Kossa (VK) staining through the use of silver nitrate (both from Sigma-Aldrich). ALP and VK positivity were quantified by ImageJ software.

Reverse transcription and real-time quantitative PCR

RNA isolation and purification were obtained from Trizol Cell Extracts in accordance with the manufacturer's instruction (Life Technologies and Ambion); cDNA synthesis was carried out with the iScript Reverse Transcription for real-time quantitative PCR (qPCR) (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). qPCRs were performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix and amplification run on a CFX connect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories). Systematic controls were generated without iScript and amplified and qPCR was carried out in duplicate for each data point. Primers for the amplification of osteogenic or osteoclastic markers were the following: *mOCN* (osteocalcin), *mCOL1* (collagen type 1), *mOSX* (osterix) and *hcathepsin K*. Expression of these genes was quantified and normalized to corresponding RNA L32 values and expressed as relative expression using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Cysteamine toxicity and effect on proliferation of osteoblasts

Proliferation 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) test. Cysteamine was tested for its impact on osteoblastic proliferation and 25 000 cells were seeded into each well of a 96-well plate in growth medium and incubated under standard conditions for 2 days, adding L-ascorbic and β -glycerol phosphate after the first 24 h. After starving for 48 h, cells were incubated with increasing doses of cysteamine (10, 50, 100 and 200 μ M) in culture medium. After a 24-, 48- and 72-h incubation period, BrdU (100 μ M) was added to each well and cells were allowed to grow for an additional 120 min. The incorporation of BrdU

into DNA was measured according to the supplier's instructions with the Cell Proliferation enzyme-linked immunosorbent assay (chemiluminescence, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Cells not subjected to cysteamine served as a negative control (NC). All measurements were run in quadruplicate and proliferation values were calculated relative to the NC, whose viability was set to 100%. The reading was carried out through the Microplate Manager 5.2 (Bio-Rad) with a wavelength of 450 nm and the results expressed in optical densitometry.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay. To prepare samples for the LDH assay, the same protocol used for isolation and culture of MSC-derived cells was followed; 150 μ L of culture medium was recovered and analysed on Days 0, 2, 7, 9 and 14 of protocol. LDH activity was determined using commercial kits (ABBOTT Diagnostics, Ref. 2P56, Rungis, France) on an Architect C16000 auto-analyser (ABBOTT Diagnostics).

Statistical analyses

Statistical analyses performed using Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Two-group analysis was performed using *t*-tests for parametric data and the Mann–Whitney *U*-test for non-parametric distributions. In all cases, $P < 0.05$ was considered significant. Values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). For the part involving human circulating monocytes differentiated into functional OCs *in vitro*, the study was approved by the local institutional review board (Comité de Protection des Personnes Lyon Sud Est II, 9 July 2016 session). Written informed consent was obtained from all patients and controls (and parents in case of paediatric subjects).

RESULTS

Cystinosis increases osteoclastogenesis but decreases bone resorption activity of OCs derived from human PBMCs

As shown in Figure 1A, CTNS is expressed in human OCs derived from healthy donors (HDs); its expression is regulated along with M-CSF and RANKL-dependent osteoclastogenesis: indeed, a peak of CTNS expression was observed at Day 6 in mature OCs following the same pattern of cathepsin K transcripts. We therefore evaluated OC differentiation of PBMCs from patients and healthy controls using the number of TRAP-positive multinucleated cells at the end of the differentiation process with M-CSF and RANKL. The results are summarized in Table 1. First, when osteoclastogenesis was examined in basic conditions without any treatment, an increase of multinucleated TRAP-positive cells was observed in patients in comparison with controls, despite the fact that they were generated from the same number of monocyte progenitors (Figure 1B and C). These findings clearly indicate that cystinosis favoured osteoclastogenesis and that cystinosis mononuclear progenitors are more prone to generate OCs than controls.

In OCs derived from human PBMCs, cysteamine has no significant effect on differentiation but inhibits bone resorption activity

Cysteamine had no effect on osteoclastic differentiation whatever the origin of the donors and the doses tested (Figure 1B). We therefore evaluated the resorption capacity of these OCs obtained from patients and controls with and without cysteamine exposure. In contrast to what we observed for differentiation, *in vitro* bone resorption (as assessed by the total bone surface resorbed or the resorption index) was clearly decreased in OCs from patients when compared with controls; similarly, we also found that cathepsin K transcript levels were decreased in patients compared with controls (Figure 2A). However, when examining the resorptive activity of cysteamine-treated OCs both in controls and patients, there was a beneficial antiresorptive effect; indeed, in controls, a 50% inhibition of the resorption activity was observed with 50 μ M, although for NC patients the impairment of the OC activity was detectable and significant only at 200 μ M of cysteamine (Table 1 and Figure 2B and C). Because of technical difficulties to obtain enough cells, it was unfortunately not possible to evaluate resorption with 50 μ M in all subjects.

Low doses of cysteamine stimulate osteoblastic differentiation and mineralization, with an inhibitory effect at higher doses

To assess the ability of murine MSCs to differentiate as osteoblasts in the presence of similar cysteamine treatment as above, we monitored the expression level of early, mid- and late osteoblast-specific markers by real-time PCR, as illustrated in Figure 3, including *mOSX* (osterix; Figure 3A), *mCOL1* (collagen type 1; Figure 3B) and *mOCN* (osteocalcin; Figure 3C). All markers were significantly upregulated on Day 21 in the group treated with 50 μ M of cysteamine, however, they were down-regulated in the groups treated with high doses of cysteamine (namely 100/or 200 μ M).

In order to further investigate the impact of cysteamine treatment on MSC-derived osteoblast function, their ability to mineralize matrix and to express ALP, VK and ALP stainings were performed at the end of the differentiation process. As illustrated for the VK staining (Figure 3D), significant increased mineralization in the group treated with 50 μ M of cysteamine was observed. The BrdU labelling showed a significantly lower cell proliferation in the 200- μ M group on Day 3 (Figure 3E); a cytotoxic effect of cysteamine was ruled out since no increased LDH levels were found between groups (Figure 3F). ALP staining showed no significant differences between groups (ranging from 60 to 75% of ALP-positive cells per well), thus suggesting that the difference in proliferation observed at the early stages of the differentiation was no longer found at the endpoint of the experiment (namely the end of the differentiation process) (Figure 3F). This last observation supports the statement that there is no toxicity observed with cysteamine on primary osteoblast culture.

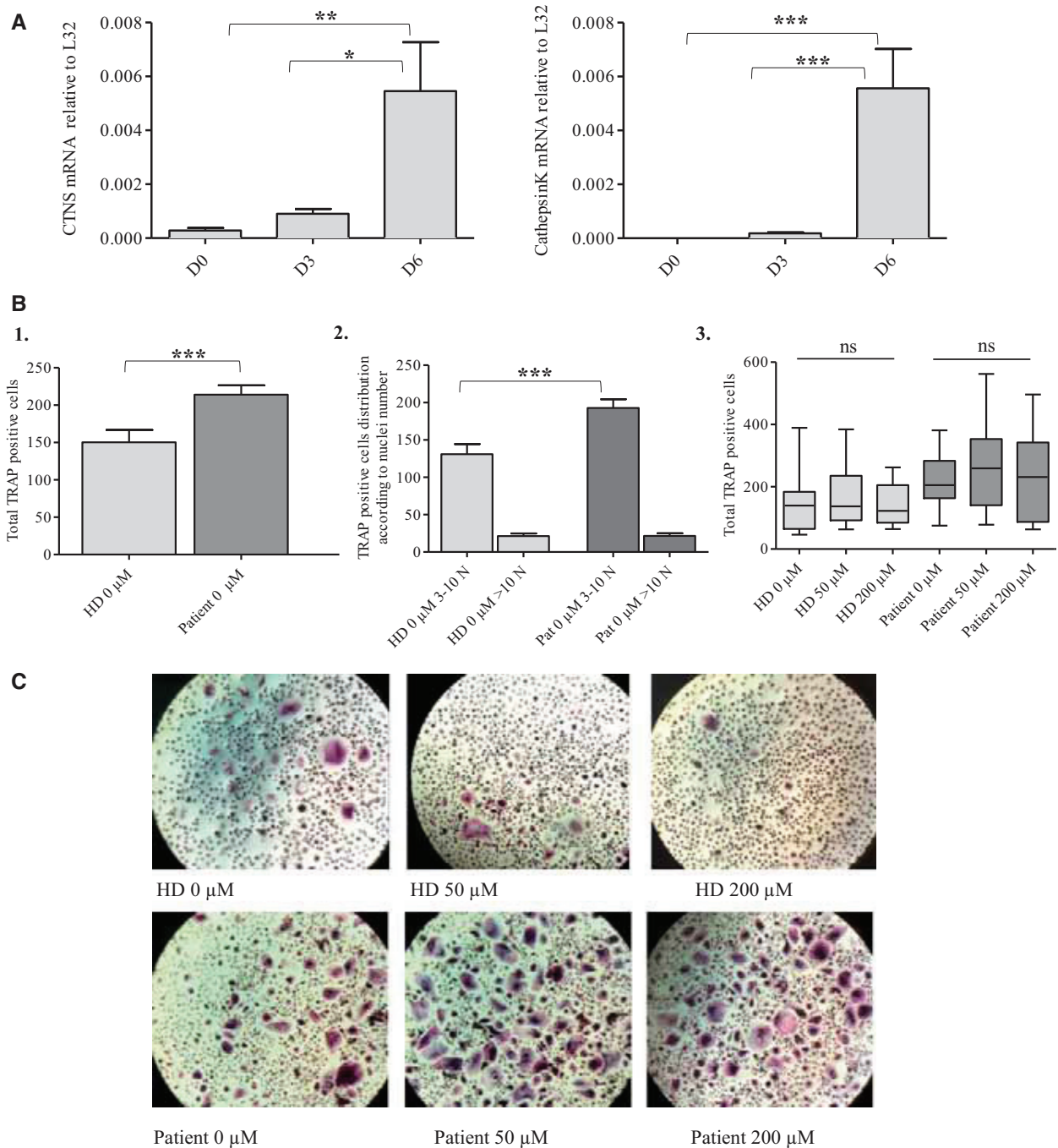


FIGURE 1: *CTNS* defect in OC leads to increased differentiation while cysteamine treatment abrogates it in both HDs and patients. (A) Quantitative real-time PCR analysis of *CTNS* and *Cathepsin K* gene time-course expression in OCs differentiated from PBMCs of HDs on Days 0, 3 and 6 in the presence of M-CSF and RANKL treatment. (B) (1) On Day 6, total Trap-positive cells, obtained from differentiated PBMCs of HDs and patients were quantified. (2) Distribution of TRAP-positive OCs according to nuclei number (3–10 nuclei or ≥ 10 nuclei) obtained for HDs and patients. (3) Cysteamine dose response on osteoclastogenesis, TRAP-positive cells (≥ 3 nuclei) were numbered for HDs and for patients. (C) Representative images of untreated and 50- or 200- μ M cysteamine-treated cells obtained for HDs and patients. After TRAP staining, multinucleated purple cells correspond to OCs at the end of the differentiation process. All results are presented as the mean for 5–7 wells $\pm$ SEM of two experiments; six HDs and seven patients were tested. ANOVA and Bonferroni post-tests were performed and considered significant if $P \leq 0.05$. For a single comparison, Mann-Whitney *U*-test was used and considered significant if $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ or $***P \leq 0.001$.

Table 1. The effects of cysteamine on OC biology (differentiation and activity) in the seven patients with cystinosis and their matched healthy controls

		Dose cysteamine (μM)	Pair 1	Pair 2	Pair 3	Pair 4	Pair 5	Pair 6	Pair 7
Differentiation	Healthy controls	0	141 $\pm$ 6	164 $\pm$ 9	NP	79 $\pm$ 5	53 $\pm$ 3	315 $\pm$ 17	152 $\pm$ 10
		50	146 $\pm$ 6	150 $\pm$ 13	NP	105 $\pm$ 8	80 $\pm$ 4	327 $\pm$ 15	184 $\pm$ 26
		200	122 $\pm$ 8	124 $\pm$ 4	NP	98 $\pm$ 8	69 $\pm$ 2	208 $\pm$ 4	234 $\pm$ 14
	Cystinosis patients	0	218 $\pm$ 19	154 $\pm$ 8	338 $\pm$ 12	216 $\pm$ 5	83 $\pm$ 4	179 $\pm$ 7	267 $\pm$ 24
		50	235 $\pm$ 17	115 $\pm$ 5	460 $\pm$ 29	325 $\pm$ 19	85 $\pm$ 2	169 $\pm$ 9	306 $\pm$ 16
		200	312 $\pm$ 21	75 $\pm$ 4	450 $\pm$ 13	251 $\pm$ 13	78 $\pm$ 4	197 $\pm$ 10	310 $\pm$ 12
	Resorption activity	0	13.3 $\pm$ 4.1	NP	NP	9.2 $\pm$ 1.2	1.8 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 2.4	1.4 $\pm$ 0.2
		50	7.1 $\pm$ 1.0	NP	NP	2.8 $\pm$ 0.6 a	1.1 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 1.1	1.6 $\pm$ 0.1
		200	9.3 $\pm$ 1.1	NP	NP	0.3 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1
	Cystinosis patients	0	0.45 $\pm$ 0.05	1.72 $\pm$ 0.4	22.01 $\pm$ 2.84	1.25 $\pm$ 0.35	NP	0.17 $\pm$ 0.02	1.62 $\pm$ 0.20
		50	0.46 $\pm$ 0.02	NP	NP	1.63 $\pm$ 0.39	NP	0.16 $\pm$ 0.05	4.94 $\pm$ 0.6
		200	0.10 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.2	22.04 $\pm$ 0.24	0.19 $\pm$ 0.03	NP	0.04 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.12

OCs [count of TRAP-positive cells (≥ 3 nuclei)] generated from peripheral blood monocytes were treated with increasing doses of cysteamine (untreated, 50 and 200 μM). Resorption pits (presented as withdrawn surface in μm) are visualized following silver nitrate staining. The results are shown both for differentiation and resorption of the nephropathic cystinosis and their controls. NP, not performed, because of a failure of differentiation/resorption. Results are presented as means for 5–7 wells $\pm$ SEM of two experiments.

DISCUSSION

Bone impairment in NC has a potential impact on quality of life and should be known by physicians. However, its pathophysiology remains unclear and this study is the first to provide new insights into the underlying mechanisms. First, CTNS is required for proper osteoclastic activity, suggesting an involvement of bone resorption in the outcome of cystinosis-derived bone lesions. *In vitro* low doses of cysteamine have beneficial antiresorptive effects only on healthy human-derived OCs and thus may partly correct the CTNS-induced osteoclastic dysfunction in patients with NC. Second, *in vitro* low doses of cysteamine stimulate osteoblastic differentiation and mineralization, with an inhibitory effect at higher doses, likely explaining, at least partly, the bone toxicity observed in patients receiving high doses of cysteamine.

In animal models, invalidation of the CTNS gene is not associated with either renal phosphate wasting or with renal failure, but causes severe osteopenia and growth retardation, thus raising the hypothesis of a specific underlying bone defect in cystinosis [9]. CTNS mutations also affect human osteoblast differentiation and function [12]. In the present study we show that CTNS gene expression is regulated during human osteoclastogenesis, under the control of M-CSF and RANKL, the two major cytokines driving OC differentiation and function. We also provide evidence that CTNS is necessary for proper bone resorption mediated by human OCs: OCs derived from patients display intrinsic altered differentiation and restrained resorption activity. Surprisingly, monocytes isolated from patients are more prone to generate multinucleated OCs, as if functional CTNS is a tuner of OC differentiation. Conversely, mature OCs from patients display a decreased resorption index even though they are not devoid of resorptive activity. We may then speculate that bones of NC patients have more OCs that are less active compared with those of healthy volunteers: in that setting, we previously reported extended and unusual areas of osteoclastogenesis in the patients who underwent bone biopsies [5]. In addition to the formation defects observed in patients, the altered balance of OC number and defective OC function may contribute to the specific bone defect in NC. This is not

unexpected since lysosomes, vesicular trafficking and exocytosis are essential and tightly regulated in mature OCs in order to achieve efficient resorption [13]. Among human lysosomal storage diseases, some have been reported to induce a bone phenotype secondary to gene mutations involved in both lysosomal metabolism and in OCs, all of them leading to an osteopetrotic/sclerotic bone phenotype with increased bone mineral density due to impaired OC-mediated resorption [10]. However, none of these lysosomal storage diseases target both bone formation and resorption, as cystinosis does, affecting both OC and osteoblast biology.

Cysteamine is an amino-thiol and an intercalating agent; it induces a disulphide exchange and a connection of cysteine to cysteamine, thus allowing lysosomal clearance and transport of this complex. The use of cysteamine has dramatically improved the long-term prognosis of cystinosis, but cysteamine toxicity (notably bony, cutaneous, vascular, neurological and muscular side effects) has nevertheless been discussed, occurring in cases of cysteamine overdose, affecting 1.5% of treated patients and improving with decreased daily doses of cysteamine [8].

In bone, osteoblastic abnormalities can be reverted after cysteamine treatment, demonstrating beneficial effects of cysteamine on osteoblastic cells [12]. In our bone cell study we have used the range of cysteamine doses reported by published experimental studies in osteoblasts and fibroblasts [12, 14]. Murine MSCs differentiated into osteoblastic cells were submitted to cysteamine treatment. *In vitro* low doses of cysteamine stimulated osteoblastic differentiation and mineralization, providing evidence for a rather ‘osteogenic’ effect of cysteamine, while osteoclastic resorption was inhibited in HDs. These observations could lead to the conclusion that overall cysteamine has a beneficial dual effect on bone cells, restoring bone formation and inhibiting bone resorption. However, it is interesting to note that a ‘resistance’ to cysteamine appears in resorbing OCs from patients, whereas the inhibitory effect on bone resorption is already observed with ‘low doses’ of cysteamine in cells differentiated from HDs.

Lastly, using high doses of cysteamine in murine osteoblasts led to decreased differentiation and mineralization, because of

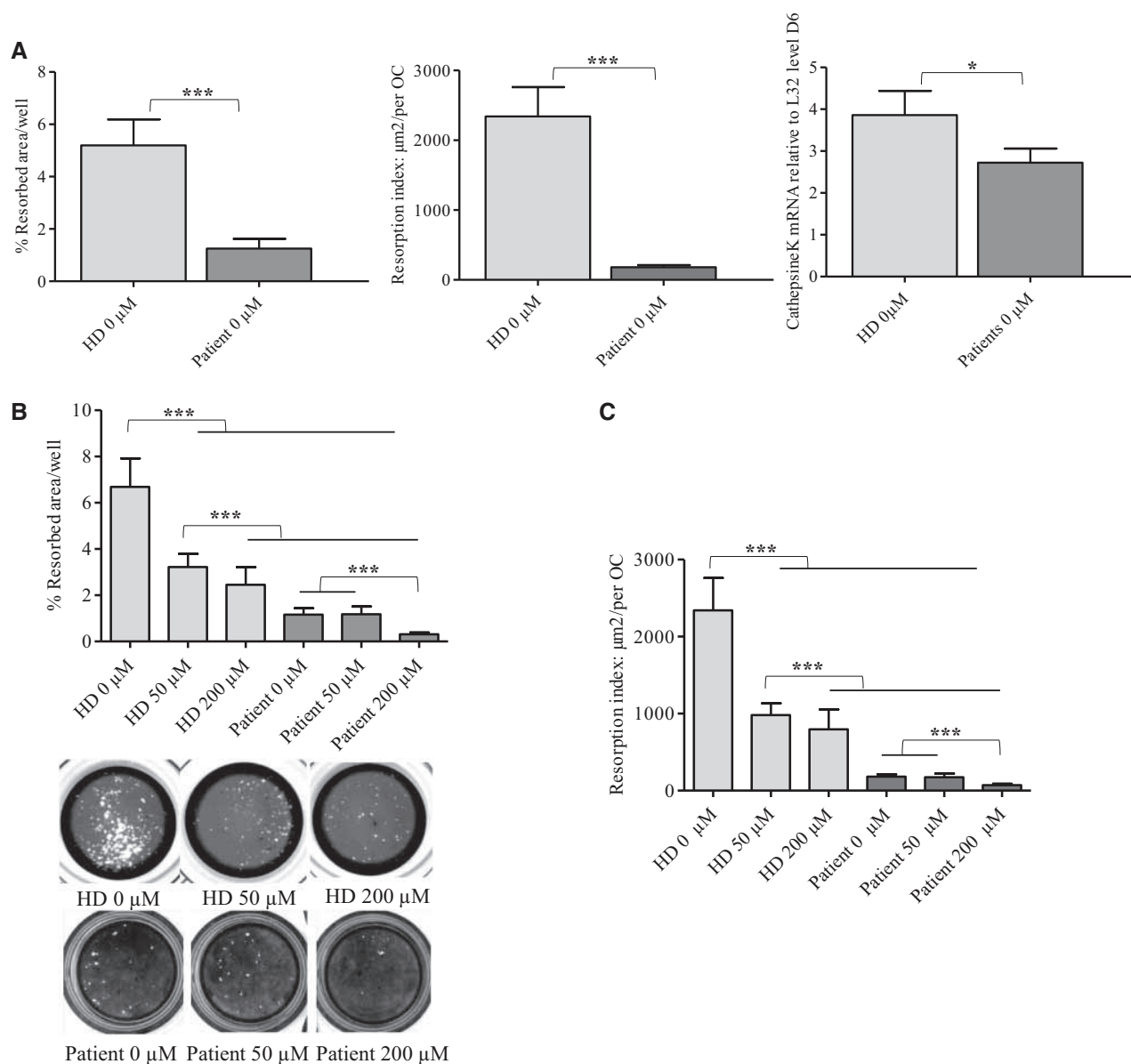


FIGURE 2: *CTNS* deficiency and cysteamine treatment decrease human mature OC-mediated resorption. (A) Bone resorption in cells differentiated from HDs and patients was quantified as the percentage resorbed area per well and as a resorption index: μm^2 per OC. Cathepsin K transcript levels were compared between HDs and patients at the end of the osteoclastic differentiation process. (B) Percentage of resorbed area per well for cells obtained from HDs and patients and subjected to increasing doses of cysteamine. A representative image of each condition is shown. (C) Resorption index is shown as μm^2 of resorption per OC number. Results are presented as the mean for 5 wells $\pm$ SEM from two experiments; five HDs and six patients were tested. * $P \leq 0.05$ and *** $P \leq 0.001$ compared between indicated groups.

decreased proliferation (and not cytotoxicity). These data correspond to the bone phenotype observed in patients with cysteamine toxicity [8] and are the first to try to explain these clinical observations, but without providing the exact mechanistic profile. Indeed, these data suggest a shift from a favourable balance between inhibited resorption and stimulated osteoblastic mineralization using low doses of cysteamine towards an imbalance between inhibited resorption and decreased mineralization (thus favouring resorption and consequently inducing clinical bone symptoms) when using higher doses of cysteamine. In this specific setting of cystinosis, the distinction between bone

lesions due to chronic kidney disease, renal osteodystrophy and therapies on the one hand and bone lesions due to cystinosis itself (whatever the exact underlying pathophysiology) or to secondary endocrine complications (e.g. hypothyroidism or hypogonadism) on the other hand remain challenging in clinical practice. However, we believe that our data in these cellular models provide interesting data on the dual effects of cysteamine on bone cells and may explain, at least partly, the bone toxicity observed in patients receiving high doses of cysteamine. In the future, the management of patients may rely on cysteamine through levels, but this hypothesis deserves more study.

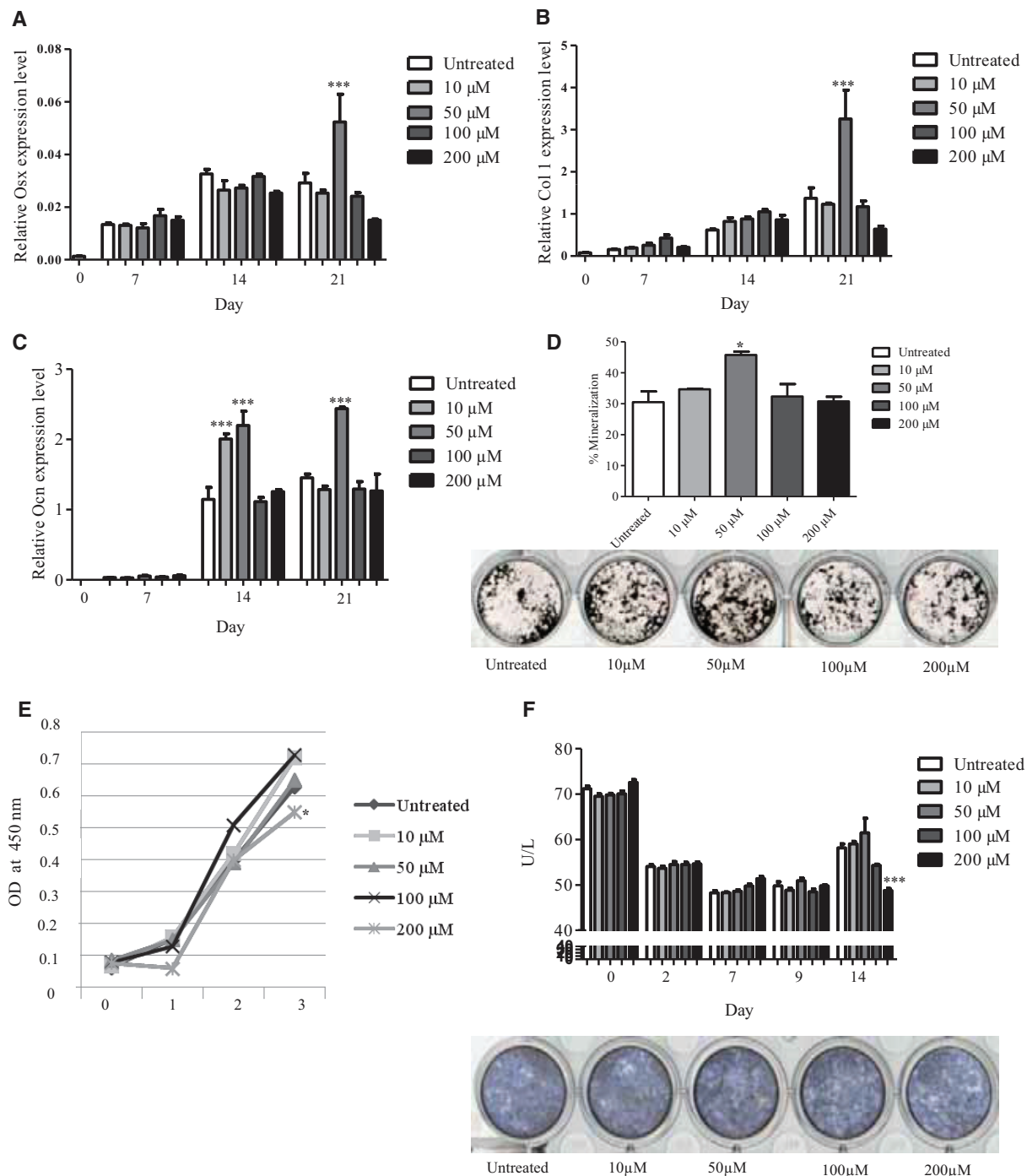


FIGURE 3: Cysteamine effects on murine MSCs/osteoblasts. To assess the ability of murine MSCs to differentiate as osteoblasts in the presence of cysteamine, we monitored the expression level of early, mid- and late osteoblast-specific markers by real-time PCR, including *mOSX* (osterix; **A**), *mCOL1* (collagen type 1; **B**) and *mOCN* (osteocalcin; **C**), on Days 0, 7, 14 and 21 after cysteamine treatment and induction of osteogenic differentiation. Both markers were significantly upregulated on Day 21 in the group treated with 50 μM of cysteamine; however, they were downregulated in the groups treated with high doses of cysteamine (namely 100 or 200 μM). In order to investigate the impact of cysteamine treatment on MSC-derived osteoblast function, their ability to mineralize matrix and to express ALP, VK and ALP stainings were performed at the end of the differentiation process. As illustrated for the VK staining (**D**), significant increased mineralization in the group treated with 50 μM of cysteamine was observed. Similar (albeit non-significant) results were obtained with the ALP staining. The luminescence captured from the BrdU-positive cells on Days 0, 1, 2 and 3 of treatment with cysteamine was expressed as optical density (OD) so as to evaluate cellular proliferation, showing a significantly lower cell proliferation in the 200-μM group on Day 3 (* $P < 0.05$; **E**). To rule out a potential cytotoxic effect of cysteamine, LDH levels were measured in the medium: the graph represents the mean LDH values of three measurements on Days 0, 2, 7, 9 and 14 after cysteamine treatment. No increased LDH levels were found between groups. Representative micrographs of ALP staining of osteoblast endpoint cultures used for LDH measurements are shown (**F**). Values are presented as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with untreated group.

The evaluation of *in vitro* OC biology directly from patients' cells is a new promising technique, allowing us to evaluate OC biology with only 15 mL of circulating blood (instead of 250 mL previously) [11]. It opens promising perspectives, and despite the fact that it is a time-consuming procedure, we were able to perform the study in seven patients and seven controls with consistent results on resorption activity, thus allowing us to conclude a partial inhibitory effect of cysteamine on patient bone resorption as opposed to HDs.

In conclusion, bone impairment is a reality in teenagers and young adults with NC. Even though its pathophysiology remains largely unknown, we showed that CTNS is regulated during osteoclastogenesis and involved in bone-mediated resorption. From our study it appears that cysteamine treatment may have dual effects on bone cells. A better understanding of the underlying mechanisms of cysteamine activity in OCs and osteoblasts may improve the clinical management of patients with NC.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Eurielle Bodenan (clinical research associate, CIC1407, Bron, France) for her help in data collection. They also would like to thank the patients and their families for being involved in clinical studies aimed at improving outcomes in NC.

FUNDING

The study was sponsored by an educational grant from the Fondation du Rein (Prix Jeune Chercheur 2013 to J.B.). S.F., O.P. and I.M.-G. received funding from INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1 and an ANR grant LYSBONE (ANR-15-CE14-0010-01).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

J.B. reports grants from the Fondation du Rein during the conduct of the study and has received a travel grant from

Raptor Pharmaceuticals and an educational research grant for a clinical study on bone impairment in NC. P.C. is a medical expert for Raptor Pharmaceuticals and co-investigator for the RP 103-3, 103-4 and 103-7 studies.

REFERENCES

1. Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. *Pediatr Nephrol* 2013; 28: 51–59
2. Bertholet-Thomas A, Bacchetta J, Tasic V *et al*. Nephropathic cystinosis—a gap between developing and developed nations. *N Engl J Med* 2014; 370: 1366–1367
3. Klusmann M, van't Hoff W, Monsell F *et al*. Progressive destructive bone changes in patients with cystinosis. *Skeletal Radiol* 2014; 43: 387–391
4. Sirrs S, Munk P, Mallinson PI *et al*. Cystinosis with sclerotic bone lesions. *JIMD Rep* 2014; 13: 27–31
5. Bacchetta J, Greco M, Bertholet-Thomas A *et al*. Skeletal implications and management of cystinosis: three case reports and literature review. *Bonekey Rep* 2016; 5: 828
6. Langman CB. Bone complications of cystinosis. *J Pediatr* 2017; 183S: S2–S4
7. Besouw MTP, Schneider J, Janssen MC *et al*. Copper deficiency in patients with cystinosis with cysteamine toxicity. *J Pediatr* 2013; 163: 754–760
8. Besouw MTP, Bowker R, Dutertre J-P *et al*. Cysteamine toxicity in patients with cystinosis. *J Pediatr* 2011; 159: 1004–1011
9. Cherqui S, Sevin C, Hamard G *et al*. Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosis, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7622–7632
10. Lacombe J, Karsenty G, Ferron M. Regulation of lysosome biogenesis and functions in osteoclasts. *Cell Cycle* 2013; 12: 2744–2752
11. Allard L, Demoncheaux N, Machuca-Gayet I *et al*. Biphasic effects of vitamin D and FGF23 on human osteoclast biology. *Calcif Tissue Int* 2015; 97: 69–79
12. Conforti A, Taranta A, Biagini S *et al*. Cysteamine treatment restores the *in vitro* ability to differentiate along the osteoblastic lineage of mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of a cystinotic patient. *J Transl Med* 2015; 13: 143
13. Georgess D, Mazzorana M, Terrado J *et al*. Comparative transcriptomics reveals RhoE as a novel regulator of actin dynamics in bone-resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 380–396
14. Besouw M, van den Heuvel L, van Eijdsden R *et al*. Increased human dermal microvascular endothelial cell survival induced by cysteamine. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 1073–1077

Received: 12.9.2017; Editorial decision: 5.12.2017

ORIGINAL RESEARCH

Tumor Necrosis Factor Alpha Overexpression Induces Mainly Osteoclastogenesis at the Vertebral Site

Guillaume Courbon^{1,2} · Sacha Flammier^{3,4} · Norbert Laroche^{1,2} · Laurence Vico^{1,2} · Hubert Marotte^{1,2,5} · Fabienne Coury^{3,4,6,7}

Received: 5 September 2016 / Accepted: 10 January 2017 / Published online: 13 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Syndesmophyte occurrence and axial bone loss were investigated in the heterozygous Tg187 tumor necrosis factor (TNF) transgenic mouse model (Tg-huTNF) of arthritis. Female and male Tg-huTNF mice were compared to wild-type mice (WT) at 2, 4, 6, 8, and 10 weeks. Syndesmophytes, intervertebral disc space, osteoclasts, osteoid surface, and vertebra microarchitecture were assessed by histomorphometry and microcomputed tomography. No spontaneous syndesmophyte formation was detected in Tg-huTNF compared to WT mice. However, increased porosity was observed mainly in peridiscal lumbar vertebra. Accordingly, bone microarchitecture parameters were altered in Tg-huTNF mice, with decrease in bone volume

fraction, and trabecular number and thickness after 6 weeks compared to WT ($p < 0.05$). Osteoclast count and surface were increased ($p < 0.01$). Moreover, the non-mineralized (osteoid) surface was also increased in Tg-huTNF after 6 weeks ($p < 0.01$). Despite increased osteoclast and osteoid surfaces, an imbalance between both was observed in favour of osteoid surface at the early phase and then to osteoclast surface. These results demonstrated an axial bone loss in the Tg-huTNF model, additional to the common limb arthritis, related to overexpression of TNF. However, the absence of syndesmophyte and the increase of osteoid surface suggested that chronic inflammation might block bone mineralisation. Finally, the relative increased osteoid surface was not enough to compensate the high osteoclast activity.

Hubert Marotte and Fabienne Coury have contributed equally to this work.

✉ Hubert Marotte
hubert.marotte@chu-st-etienne.fr

✉ Fabienne Coury
fabienne.coury@free.fr

¹ SAINBIOSE, INSERM, U1059, LBTO, 42023 Saint-Etienne, France

² University of Lyon, Saint-Etienne, France

³ INSERM, UMR1033, University Claude Bernard Lyon 1, UFR de Médecine Lyon Est, Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France

⁴ University of Lyon I, Lyon, France

⁵ Department of Rheumatology, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne, France

⁶ Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, UMR 5242 CNRS/Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

⁷ Department of Rheumatology, Lyon Sud Hospital, Lyon, France

Keywords Axial spondylitis · Bone remodelling · TNF · Bone microarchitecture

Introduction

Tumor necrosis factor alpha (TNF) is a pro-inflammatory cytokine produced mainly not only by macrophages, but also by T lymphocytes, neutrophils, fibroblasts, or endothelial cells [1, 2], while its receptors are expressed by most of eukaryotic cell types [3]. TNF is involved in inflammatory arthritis, such as axial spondyloarthritis (axSpA) [4–6] or rheumatoid arthritis (RA) [7, 8]. AxSpA is a chronic inflammatory disease predominantly affecting the axial skeleton [9]. In axSpA, inflammation at sacroiliac joints induced destruction of the bone followed by fusion. In parallel to the spine, local inflammation was associated with delayed bone pro-formation phase with irreversible ossification called syndesmophyte [10]. Despite bone

proliferation outside the bone, an increased vertebral and non-vertebral fracture risk was described in patients with spine syndesmophytes at the stage of ankylosing spondylitis [11]. Recently, computed tomography scan was described as a powerful tool to assess syndesmophyte occurrence and changes in ankylosing spondylitis patients [10, 12].

The heterozygous Tg187 TNF transgenic mouse model (Tg-huTNF) carrying a 3' modified hTNF transgene to avoid constitutive degradation was proposed as an arthritis mouse model [13–15]. In this model, mice expressed high levels of both membrane and soluble TNF. At the peripheral joint, exacerbated and aggressive arthritis occurred with synovitis and joint swelling starting around week 4 until a loss of limb function at week 10, setting pre-arthritis period in “2–6 weeks” and established arthritis commonly in “6–10 weeks” [13, 15, 16]. Sacroiliitis was already described with erosion at the sacroiliac site at week 11 [17]. However, no data at this time were recorded at the spine site to our knowledge.

During inflammation, bone homeostasis is unbalanced with reduced bone formation and increased bone resorption especially in RA [18]. In vitro, TNF downregulated osteoblast differentiation, bone mineralisation, and matrix synthesis with induction of osteoblast apoptosis [19]. On the other side, TNF induced RANKL expression with induction of osteoclast formation [20]. The main difference in SpA compared to RA is the presence of ectopic ossification leading to syndesmophyte formation combined with systemic bone loss. At the joint level, subchondral bone loss induced by inflammation is mainly related to overexpression of pro-inflammatory cytokines including TNF, interleukin 1 beta (IL-1 β), IL-6, and IL-17 [21]. These cytokines are known to strongly stimulate bone resorption by osteoclast activation [22, 23]. All these cytokines were overexpressed during arthritis phase in the Tg-huTNF model [24, 25].

Overexpression of TNF observed in several arthritis models was the proof of concept to use TNF inhibitors to reduce arthritis signs [26–29]. Then, TNF blockade by monoclonal antibodies or receptor fusion protein succeeded to improve arthritis signs in RA [30] as well as in axSpA [31]. Despite the ability of TNF inhibitors to block joint destruction in RA, no prevention of syndesmophyte formation was observed by TNF inhibitors in axSpA [32–34]. Therefore, the TNF role on syndesmophyte formation remained unclear in axSpA.

To improve knowledge on the discrepancy between inflammation and bone ectopic proliferation associated with vertebral bone loss, we investigated the presence of syndesmophytes and vertebral bone loss in Tg-huTNF mice at various time points. Accordingly, we conducted an extensive analysis of axial bone and intervertebral disc

space (IDS) (i) to address the occurrence of syndesmophyte in the spine and (ii) to assess resorption and formation impacted by TNF overexpression at the vertebral site.

Methods

Animals Study

C57/BL6 Tg-huTNF and C57/BL6 wild-type (WT) littermate mice were used in this study. Animals were housed with 12/12 h light/dark cycles and ad libitum water and food access without restriction in calcium. Animals were sacrificed according to the ARRIVE guideline. Both female and male mice were used from 2 to 10 weeks. Lumbar vertebrae were harvested at necropsy, fixed in paraformaldehyde, dehydrated in acetone, and stored in ethanol. Morphologic evaluation of the spine with syndesmophyte occurrence was recorded from the 1st to the 4th lumbar vertebra (LV1–4) in female mice (aged 2, 4, 6, 8, and 10 weeks old, $n=5$ per group), and in male mice (aged 6, 8, and 10 weeks old, $n=2–3$ per group). Tg-huTNF mice were obtained from Kollias (Fleming Research Center, Greece) [13]. All experimental procedures were approved by our local animal experimentation ethics committee (CECCAPP; permit number for animal experimentation 69387429 Lyon, France).

μ -CT Imaging

Collected mouse spine went under μ -CT acquisition by the vivaCT40 (SCANCO, Bruttisellen, Switzerland). The spatial resolution was 10.5 μ m, and the maximal voltage was 55 kVp (peak kilovoltage). The microarchitecture of the bone trabecular network was evaluated at the LV3: the region of interest included all trabecular network (100 slices) in the marrow cavity excluding the potential content in the apophyses and the primary network (growth plate) found at the top and the bottom of the vertebra. The image segmentation parameters were 1.2/2/240 for the Gauss sigma/Gauss support/lower threshold, respectively.

Microarchitecture Evaluation

After three-dimensional (3D) reconstruction, general parameters were calculated, as BV/TV (bone volume/tissue volume), representing the bone volume fraction and BS/BV (bone surface/bone volume) for the bone surface/volume ratio. Trabeculae microarchitecture was characterized with trabecular number (Tb.N), thickness (Tb.Th), and separation (Tb.Sp). The connectivity density (Conn. D.) represented the degree of interconnection of the trabeculae. As the trabecular bone at 2 weeks was

very weak, some parameters assessed were not pertinent and consequently not shown in the figures.

Osteodensitometry

The bone mineral density (BMD) of the spine was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) measured by the PIXImus (Lunar, Madison, WI, US). Low values were observed in WT and Tg-huTNF mice at 2 weeks, near the threshold of the osteodensitometer; therefore, they will not be presented.

Histology

After imaging, dehydrated and undecalcified samples were impregnated and then included in methyl methacrylate plastic resin. Nine microns slices were cut by SM2500E microtome (Leica, Wetzlar, Germany). Slices were stained with Safranin O and fast green to dye the cartilage in red–orange and the mineral bone in turquoise, respectively. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was stained by enzymatic reaction, marking the osteoclast activity in purple, while the bone was counter-stained in blue by Aniline Blue. Blinded histological assessment of bone structure parameters BV/TV, Tb.Th, and bone surface (BS) allowed the calculation of the osteoclast number by bone perimeter (N.OC/B.Pm), the ratio of osteoclastic surface to bone surface (OC.S/BS), and the osteoclast length (OC.Le) representing the mean length of a resorption pit. Finally, modified Goldner trichrome staining was performed with picric acid, fuchsin, phosphomolybdic acid, and light green, staining the mineral in green, the bone marrow in yellow, and the osteoid surface appeared as red layers along the mineralized trabeculae. The osteoid surface by bone surface was evaluated by the OS/BS parameter. Finally, the increase of OS/BS and OC.S/BS was evaluated using deltas by the subtraction of the values of these parameters in the WT group to the values in the Tg-huTNF group. Relative proportion of these surfaces in Tg-huTNF mice was calculated using the ratio OS/OC.S.

Statistical Analysis

The data were presented as median $\pm$ interquartile range (IQR). The values for histological parameters for each individual are derived of four fields on five representative slides in microscopy. Non-parametrical Mann–Whitney tests were used to compare WT and Tg-huTNF groups together. *p* values under 0.05 were considered statistically significant.

Results

No intervertebral disc space alteration and in particular no syndesmophyte formation was observed in Tg-huTNF mice despite an increased LV porosity after 6 weeks.

Morphologic evaluation of the spine with syndesmophyte occurrence was recorded from LV1 to LV4 in female mice at 2, 4, 6, 8, and 10 weeks (*n* = 5 per group). Spine was also analysed for male mice at 6, 8, and 10 weeks. The histological assessment of the IDS was similar in Tg-huTNF or WT female mice without alteration of the *annulus fibrosus disci intervertebralis* or the *nucleus pulposus* and without syndesmophyte formation or bone erosion (Fig. 1a). No mineralisation of the vertebral ligaments was recorded. The μ -CT analysis confirmed the absence of ectopic ossification between LV and IDS abnormality at the different time points (Fig. 1b). Furthermore, total vertebra height was the same between Tg-huTNF or WT mice. The results were similar in the male mice (data not shown). Additionally, in 3D reconstruction we observed an inherent bone porosity in the young 2-week-old individuals, in the vertebral growth plate with a natural cortical sealing at week 4. However, at the location of the growth plate, an osteoporosis band was observed at week 6 in Tg-huTNF compared to WT (arrows in Fig. 1b). Then, this difference enhanced at the followed time points. To confirm this bone loss, we then investigated axial trabecular bone in Tg-huTNF.

LV Trabecular Bone was Altered with Rarefaction of the Trabeculae

To avoid sex effect, we then focused only in female mice for the following analysis. Three-dimensional reconstruction of the LV3 trabecular bone showed the alteration of trabecular network since week 4 in Tg-huTNF mice compared to WT mice (Fig. 2). The inner bone volume fraction BV/TV (Fig. 3a) was negligible at 2 weeks and similar at 4 weeks in both Tg-huTNF and WT mice (3.6 and 3.7%, respectively). BV/TV of Tg-huTNF mice did not further increase and was diminished (5.4%) when compared to growing WT (10.4%) from week 6 (*p* < 0.05). The inner bone surface/volume-BS/BV ratio (Fig. 3b) was decreased, but was higher in Tg-huTNF mice in comparison to WT mice from week 6 (*p* < 0.05). The low BV/TV associated with high BS/BV in Tg-huTNF mice confirmed bone loss at the spine level.

To further explore this vertebral bone loss, trabeculae microarchitecture parameters were then extensively assessed. After week 6, the number of trabeculae and their thickness were decreased with an increased trabecular separation in Tg-huTNF mice compared to WT mice (Fig. 3c–e, respectively, *p* < 0.05 for each). Similarly, the density of trabecular connection was decreased from the same time

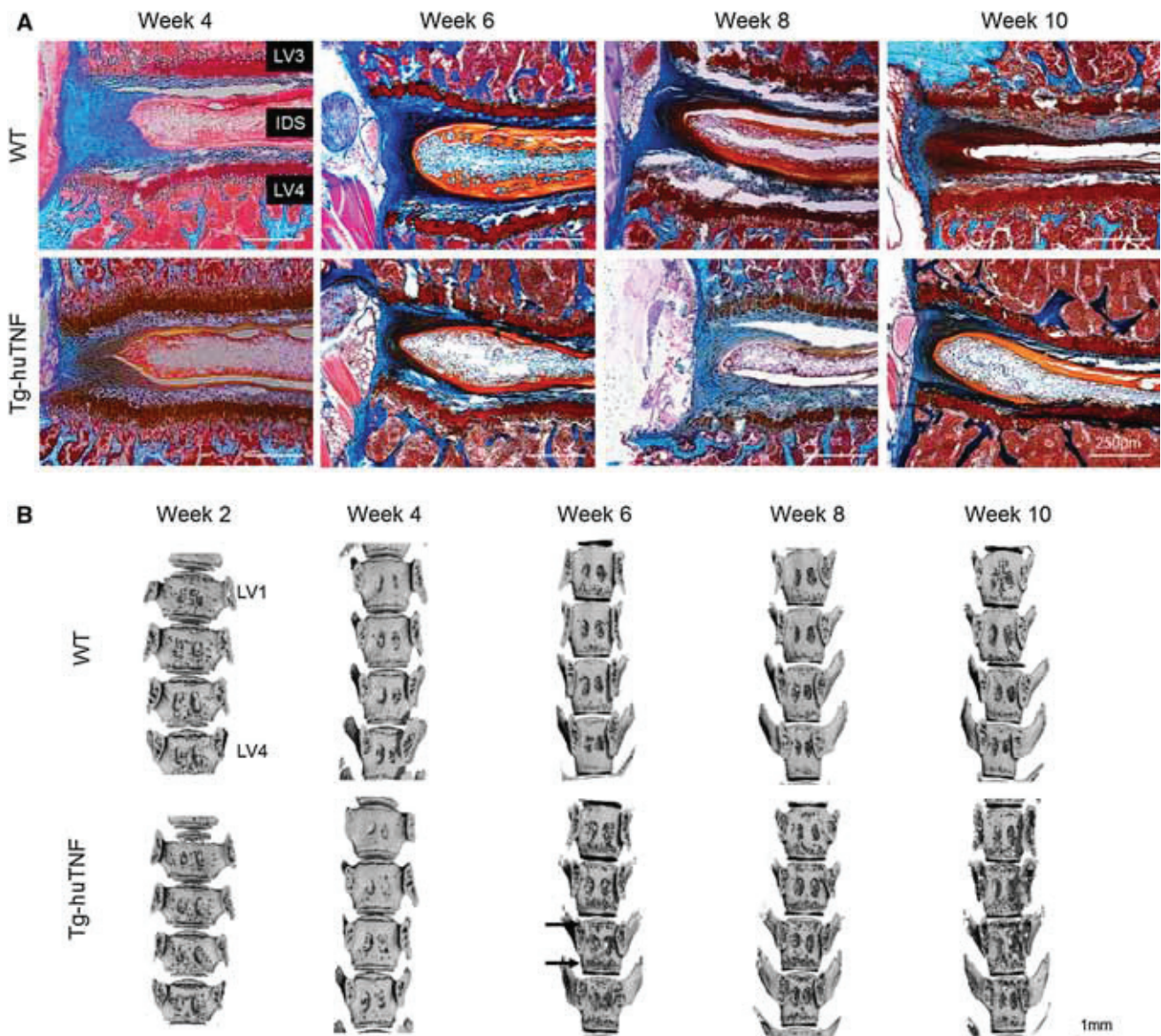


Fig. 1 Intervertebral disc space morphology was unchanged in Tg-huTNF mice compared to WT mice. **(a)** Safranin O/fast green 9 μm sections in the coronal plane of the intervertebral disc space from LV2 to LV4 at 4, 6, 8, and 10 weeks showed preserved fibrocartilage integrity and the absence of syndesmophyte in Tg-huTNF or WT. Scale bar 250 μm. LV3 are on the top of each figure. **(b)** Tridimensional reconstruction of the spine (from LV2, on the top, to LV4) in

μ-CT (resolution: 10.5 μm) at 2, 4, 6, 8, and 10 weeks, showed the absence of abnormality in the intervertebral disc space of the vertebrae LV1 to LV4, but an increased bone porosity in the Tg-huTNF group after 6 weeks compared to WT mice (arrows). Scale bar 1.0 mm. Pictures presented are representative of five female mice. WT wild type, Tg-huTNF transgenic for human TNF, LV lumbar vertebra, IDS intervertebral disc space

(Fig. 3f, $p < 0.05$). Additionally, bone cellular activity was then assessed.

In accordance with bone loss, osteoclast activity was increased in the LV of Tg-huTNF mice

A few TRAP positive osteoclasts were detectable on the LV bone during the regular bone remodelling of WT mice (Fig. 4a). In comparison, the number of osteoclast per bone perimeter was strongly increased in Tg-huTNF mice compared to WT mice (Fig. 4a, b, $p < 0.01$). The

ratio of osteoclast surface per bone surface OC.S/BS was 9% at baseline and remained stable over time in WT, while it increased to 42% at week 10 in Tg-huTNF (Fig. 4c, $p < 0.01$). The length of the TRAP positive osteoclasts was significantly increased after 8 weeks in Tg-huTNF mice compared to WT mice (Fig. 4d, $p < 0.01$).

The trabecular bone loss was also associated with an increased non-mineralized osteoid surface, but with a decreased bone mineral density.

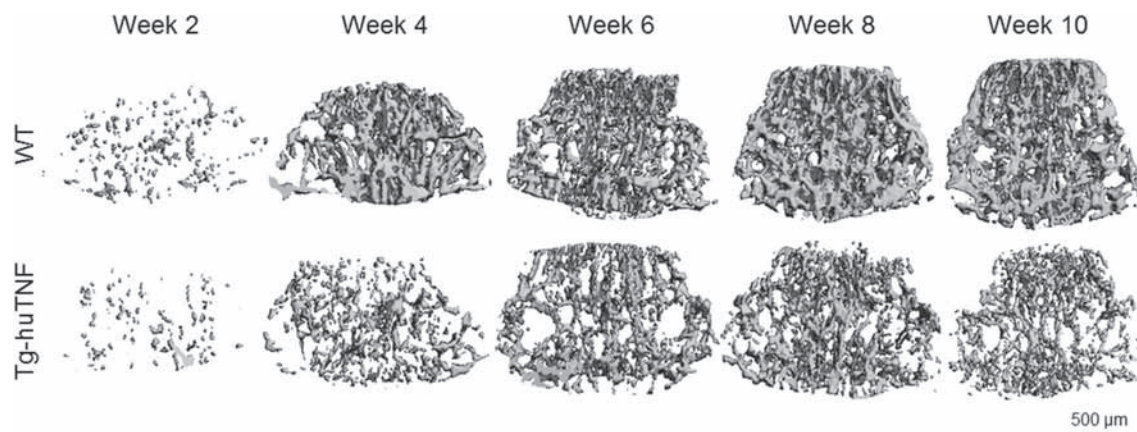


Fig. 2 Vertebral trabecular bone loss in Tg-huTNF. Representative tridimensional reconstruction of the LV trabecular bone in μ -CT (resolution: 10.5 μ m) at 2, 4, 6, 8, and 10 weeks ($n=5$ per group) are presented at the same scale; scale bar 500 μ m. Trabecular bone

network increased in both groups from week 2 to 8. Mineralized bone was decreased in Tg-huTNF mice compared to WT mice at each time point. WT wild type, Tg-huTNF transgenic for human TNF

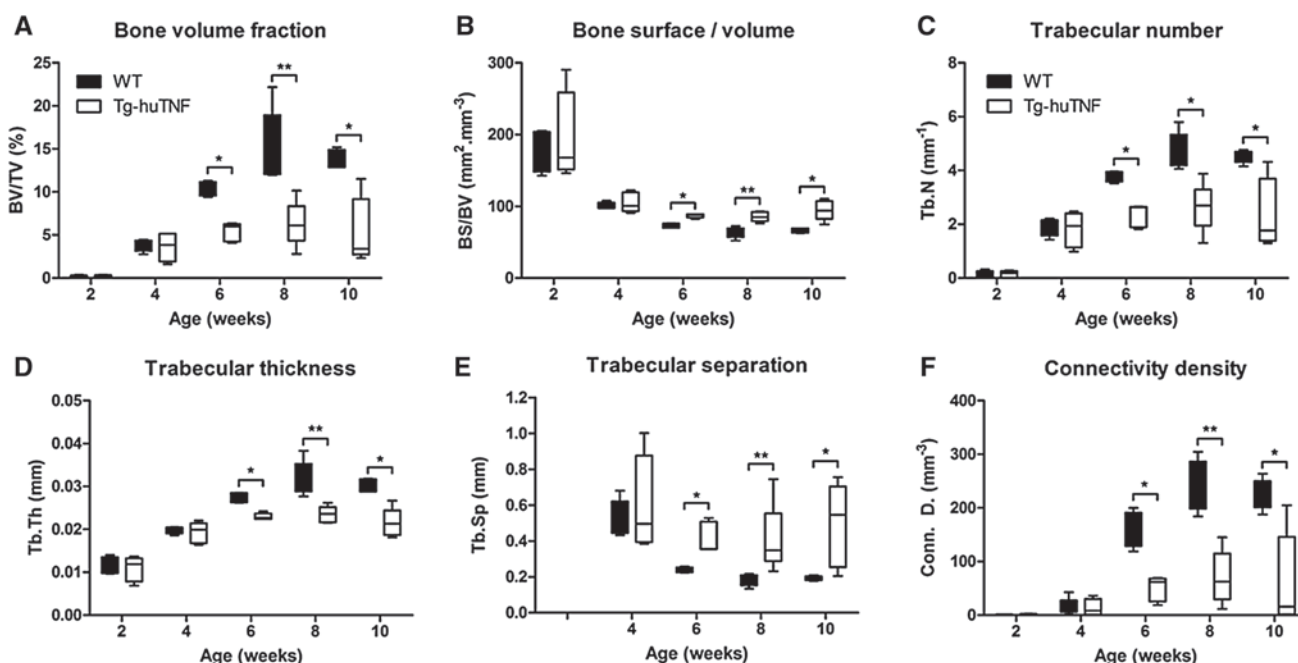


Fig. 3 Bone microarchitecture parameters quantification by μ -CT analysis ($n=5$ per group), on the LV2 revealed architectural weakness of the bone trabeculae. BV/TV (a) was reduced after 6 weeks in Tg-huTNF while BS/BV (b) was enhanced. Tb.N (c) and Tb.Th (d) were decreased in Tg-huTNF, while Tb.Sp (e) was increased. Conn. D. was reduced in Tg-huTNF after 6 weeks (f). Box and whiskers

are median $\pm$ interquartile range. BV/TV bone volume fraction, BS/BV bone surface fraction, Tb.N trabecular number, Tb.Th trabecular thickness, Tb.Sp trabecular separation, Conn. D. connectivity density, WT wild type, Tg-huTNF transgenic for human TNF. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

With modified Goldner trichrome stain, we confirmed a decrease in mineralized trabeculae in Tg-huTNF as previously observed with BV/TV on microCT (Fig. 5a). The osteoid surface, estimated by OS/BS, was significantly increased after week 6 in Tg-huTNF mice compared to WT mice (Fig. 5b, $p < 0.01$). Moreover, there was a trend for a

reduction in BMD assessed by DXA at week 6 ($p=0.08$) with a significant reduction from week 8 (Fig. 5c, $p < 0.01$).

Overexpression of TNF induced an imbalance in osteoid/osteoclast surfaces ratio.

To explore the relative bone remodelling in Tg-huTNF versus WT, we defined a ratio between their surface values

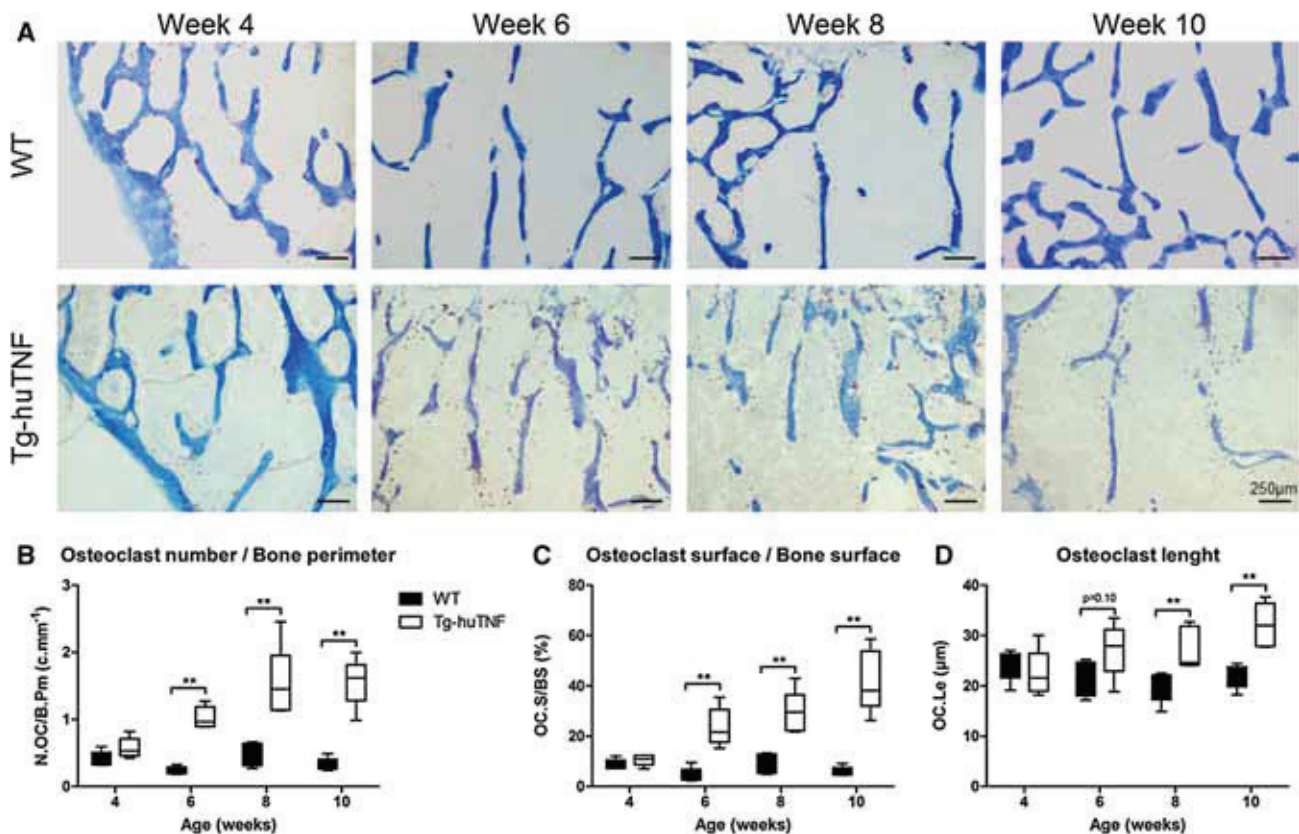


Fig. 4 Osteoclast activity was increased in the trabecular bone. **a** TRAP staining with aniline blue counter-staining on the bone tissue in 9 μm slices, in WT and Tg-huTNF at 4, 6, 8, and 10 weeks. Scale bar: 250 μm . **b** Osteoclast count was normalized by bone perimeter

(N.Oc/B.Pm), **c** while osteoclast surface was reported by bone surface (OC.S/BS). Finally, the osteoclast length was reported in absolute value (OC.Le) (**d**). WT wild type, Tg-huTNF transgenic for human TNF ($n=5$ per group). ** $P < 0.01$

in Tg-huTNF and WT (Fig. 6a). Both ratios OC.S/BS and OS/BS were increased. Comparatively, OC.S/BS increased more overtime than OS/BS (increase from +2% at week 4 to +36% at week 10), while it remained constantly higher for OS/BS (from +2% at week 4, and then between +8 and +9% until week 10). To explore the relative participation of decreased bone formation and increased bone resorption, we defined the ratio osteoid surface by osteoclast surface (OC.S/OS). At week 4, this ratio was slightly higher than 1 in favour of osteoid decreased in Tg-huTNF mice compared to WT. Then gradually it decreased with a ratio at 0.24 at week 10 (Fig. 6b).

Discussion

Peripheral synovitis, sacroiliitis, and spine inflammation with syndesmophyte are the main features of SpA in humans. As previously described, the Tg-huTNF mouse model shared at least peripheral [13, 35] and sacroiliac joint lesions similar to human SpA [17, 36], but analysis of the spine was still missing.

Although full sacroiliac destruction was observed in the Tg-huTNF model [17, 36], no inflammation or bone destruction was observed around the IDS even in the “6–10 weeks period” of established arthritis. This difference with peripheral and sacroiliac joint lesions could be due to the specific organization of IDS without synovial tissue. IDS is a fibrocartilaginous joint mainly organized around a *nucleus pulposus* with a liquid fraction containing vacuolated cells enclosed in the *annulus fibrosus disci intervertebralis* containing matrix with proteoglycan and collagen. Another explanation for the lack of syndesmophyte formation could be that osteoclast activity remained higher than osteoblast activity except at week 4. Furthermore, TNF is overexpressed all the time without remission in Tg-huTNF mice in contrast to AxSpA. However, serum hTNF level in Tg-huTNF mice was previously described to be low [13, 37]. In axSpA, alternate phases with inflammation and remission are required for syndesmophyte formation [38, 39]. In fact, magnetic resonance imaging (MRI) analysis suggested the following sequence for syndesmophyte formation or progression: first inflammation, then fat deposition during remission followed by new bone

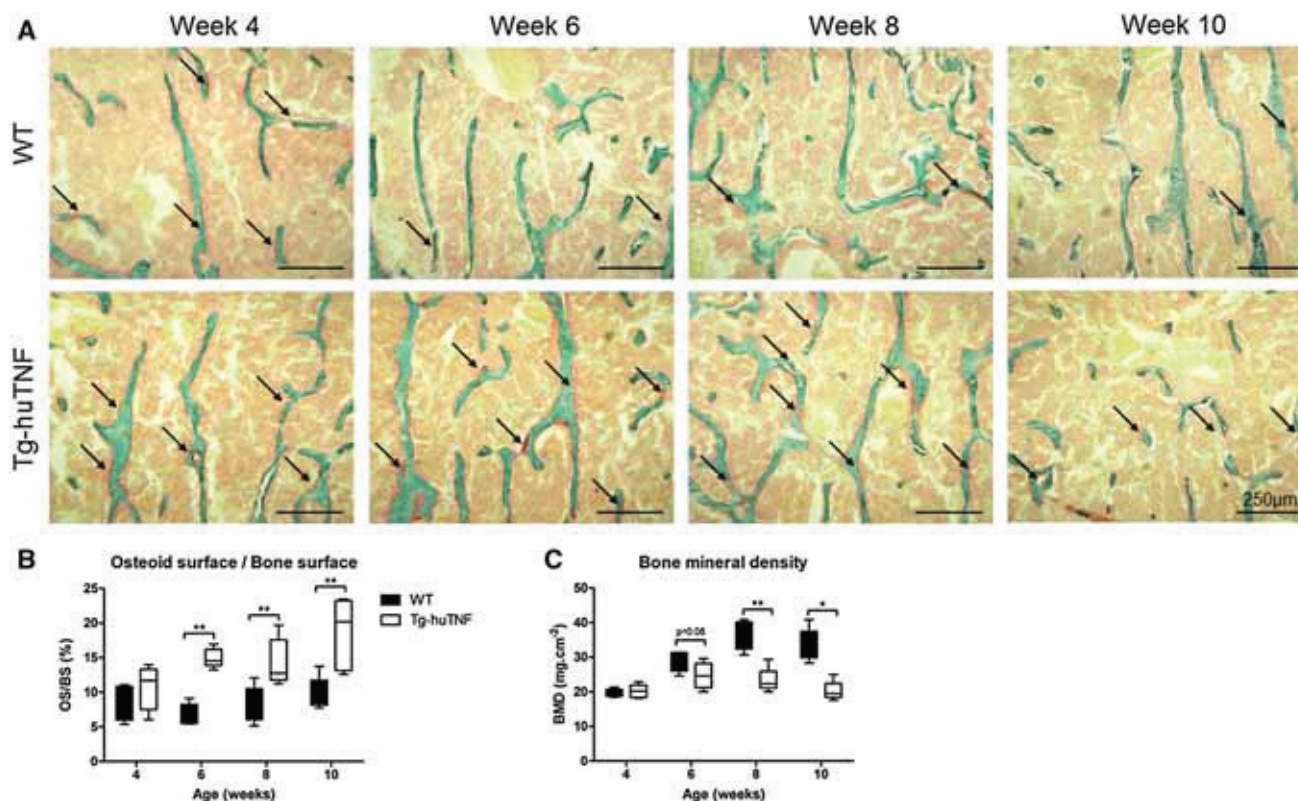


Fig. 5 Osteoid was increased in Tg-huTNF mice. **a** Osteoid surface (red) was increased in Tg-huTNF at 6 weeks, as observed in 9 μm slices with modified Goldner trichrome staining (picric acid, fuchsin, phosphomolybdic acid, and light green). The arrows indicate osteoid margins. **b** As the bone content decreased with time, the

quantification of the osteoid surface was reported as a ratio to bone surface (OS/BS). **c** The osteodensitometry also revealed a decreased (TMD) in Tg-huTNF after 8 weeks. WT wild type, Tg-huTNF transgenic for human TNF ($n=5$ per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

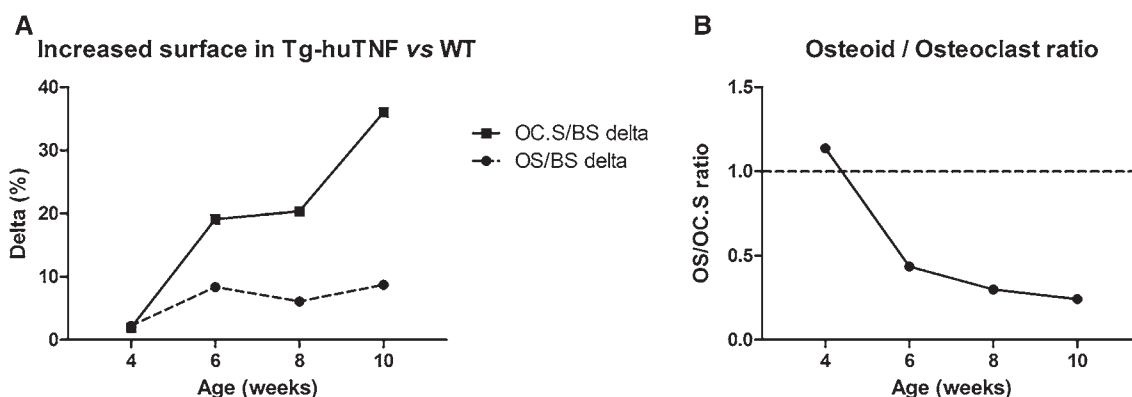


Fig. 6 Both osteoclast surface and osteoid surface relative to bone surface were increased with predominance of OC.S. **a** The mean OC.S/BS (squares) and OS/BS (circles) in Tg-huTNF were calculated as a delta of increase compared to their respective values in WT ($OC.S/BS_{Tg-huTNF} - OC.S/BS_{WT}$ and $OS/BS_{Tg-huTNF} - OS/BS_{WT}$). **b** Then the percentage of increase OS/BS was divided by the percentage of increase OC.S/BS, giving a ratio: Osteoid/Osteoclast ratio.

BS parameter was calculated once for each animal and was the same in OC.S/BS and in OS/BS. OC.S/BS and OS/BS original data were presented in Figs. 4c and 5b, respectively. BS bone surface, OC.S/BS osteoclast surface by bone surface (%), OS/BS osteoid surface by bone surface (%), OS/OC.S osteoid surface by osteoclast surface ratio, WT wild type, Tg-huTNF transgenic for human TNF

or syndesmophyte progression at the same site [38, 39]. Transient blockade of inflammation in this model may be a way to allow reactivation of formation and syndesmophyte development since osteoformation was still observed. Physiopathogenesis of syndesmophyte, as of all heterotopic ossification, is still underinvestigated. For instance, bone formation outside the skeleton after trauma, burn injuries, or orthopaedic surgical procedures involved TNF and appeared only after phase of inflammation. In all these processes, we thought that ectopic and unsuitable bone formation peak could happen only after inflammation remission, as previously reported in the brain [40]. These elements were also in accordance with our report of no syndesmophyte with continuous chronic TNF expression.

From our results, a strong bone loss was described at the vertebral site. In this mouse model, the process started in the peridiscal area with an osteoporosis band detected at week 6 at the same location than growth plate, which is also the time of clinical arthritis onset in the paws of these mice [13, 15]. It was not surprising to detect early bone loss at the site of the previous growth plate due to its high remodelling level and the presence of osteoclasts until sealing [41]. Further investigations inside the vertebra showed a trabecular bone loss with alterations of its network. When compared to WT, the first changes in Tg-huTNF trabeculae microarchitecture occurred during the pre-arthritis period (week 4–6). These results are in accordance with microarchitecture changes observed in human axSpA disease [42] and high vertebral fracture risk [11]. We further demonstrated at the vertebrae site an upregulation of osteoclasts number and surface, confirming axial damages in this model. On the other side of bone remodelling, bone formation was also altered, with an increase of osteoid matrix in the trabecular bone of the spine, suggesting that osteoblast activity was still ongoing and/or mineralisation was reduced. Furthermore, as previously described, TNF down-regulated osteoblast differentiation, bone mineralisation, and matrix synthesis with induction of osteoblast apoptosis *in vitro* [19], suggesting that increase of osteoid matrix is mainly related to reduction of mineralisation. However, due to the study design, we were not able to assess the mineral apposition rate. Such bone formation activity was eventually covered by extensive resorption but remained present even at week 10, consistently with previous data at the tibial site [43]. Surprisingly, *in vitro* differentiation of bone marrow from Tg-huTNF was decreased with impaired osteoblast differentiation [44]. So *in vitro* study was in accordance to RA disease with enhanced resorption mediated by osteoclasts activity, but decreased bone formation by osteoblast activity [45, 46].

Considering our results together with studies on peripheral arthritis and sacroiliitis [13, 17, 35, 36], Tg-huTNF model shared many SpA features except IDS inflammation

and syndesmophyte formation. This reinforced that the starting process of syndesmophyte formation would be IDS alteration [38, 39].

However, in the spontaneous arthritis model in mature male DBA/1 mice, anti-TNF treatment did not affect the joint ankylosis suggesting that new bone formation in SpA was largely independent of inflammation mediated by TNF [47]. As TNF alone could not recapitulate all axSpA features, action of other cytokine candidates may be investigated, especially IL-17 which possessed paradoxical effects on bone cells, especially osteoblasts [48–50], including unexpected regulatory functions [51]. Bone formation was already investigated during inflammation in the HLA-B27 transgenic rat model with a similar level of bone formation marker compared to WT rats [52]. In the HLA-B27/human beta-2 microglobulin model, hypertrophic chondrocytes were described at the periphery of the intervertebral discs, and such osteoproliferation correlated to axial bone destruction, showing the possibility of these two events simultaneously at different sites [53].

In conclusion, TNF induced axial bone loss with progressive bone uncoupling in favour of resorption under TNF control. The absence of syndesmophyte and the increase of osteoid surface suggested that chronic TNF exposure might block bone mineralisation.

Acknowledgements We thank Dr Georg Kollias (Fleming Research Center, Greece) for kindly providing Tg-huTNF mice. This work was supported by a grant Passerelle from Pfizer to FC.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest Guillaume Courbon, Sacha Flammier, Norbert Laroche, Laurence Vico, Hubert Marotte, and Fabienne Coury declare that they have no conflict of interest.

Human and Animal Rights and Informed Consent All experimental procedures were approved by our local animal experimentation ethics committee (CECCAPP; permit number for animal experimentation 69387429 Lyon, France).

References

1. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45–65. doi:[10.1038/sj.cdd.4401189](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189)
2. Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214:149–160. doi:[10.1002/path.2287](https://doi.org/10.1002/path.2287)
3. Chan FK, Chun HJ, Zheng L et al (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351–2354
4. Rios Rodriguez V, Poddubnyy D (2016) Etanercept for the treatment of non-radiographic axial spondyloarthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 12:493–500. doi:[10.1586/1744666X.2016.1144472](https://doi.org/10.1586/1744666X.2016.1144472)

5. Corbett M, Soares M, Jhuti G, et al (2016) Tumour necrosis factor- α inhibitors for ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess Winch Engl* 20:1–334(v–vi). doi:[10.3310/hta20090](https://doi.org/10.3310/hta20090)
6. Toussiot E, Vauchy C, Binda D, Michel F (2016) Golimumab in radiographic and nonradiographic axial spondyloarthritis: a review of clinical trials. *Drug Des Dev Ther* 10:2087–2094. doi:[10.2147/DDDT.S107587](https://doi.org/10.2147/DDDT.S107587)
7. Nakazawa M, Aratani S, Hatta M et al (2002) TNF α induces acetylation of p53 but attenuates its transcriptional activation in rheumatoid synoviocytes. *Int J Mol Med* 10:269–275
8. Fujisawa K, Aono H, Hasunuma T et al (1996) Activation of transcription factor NF-kappa B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 39:197–203
9. Rudwaleit M, Landewé R, van der Heijde D et al (2009) The development of assessment of spondyloarthritis international society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis* 68:770–776. doi:[10.1136/ard.2009.108217](https://doi.org/10.1136/ard.2009.108217)
10. Tan S, Yao J, Flynn JA et al (2015) Quantitative syndesmophyte measurement in ankylosing spondylitis using CT: longitudinal validity and sensitivity to change over 2 years. *Ann Rheum Dis* 74:437–443. doi:[10.1136/annrheumdis-2013-203946](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203946)
11. Muñoz-Ortego J, Vestergaard P, Rubio JB et al (2014) Ankylosing spondylitis is associated with an increased risk of vertebral and nonvertebral clinical fractures: a population-based cohort study. *J Bone Miner Res* 29:1770–1776. doi:[10.1002/jbmr.2217](https://doi.org/10.1002/jbmr.2217)
12. Tan S, Yao J, Flynn JA et al (2015) Dynamics of syndesmophyte growth in AS as measured by quantitative CT: heterogeneity within and among vertebral disc spaces. *Rheumatol Oxf Engl* 54:972–980. doi:[10.1093/rheumatology/keu423](https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu423)
13. Keffer J, Probert L, Cazlaris H et al (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10:4025–4031
14. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F et al (2011) Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis* 70:1357–1362. doi:[10.1136/ard.2010.148551](https://doi.org/10.1136/ard.2010.148551)
15. Li P, Schwarz EM (2003) The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 25:19–33. doi:[10.1007/s00281-003-0125-3](https://doi.org/10.1007/s00281-003-0125-3)
16. Kollias G (2005) TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 34:3–6. doi:[10.1016/j.semarthrit.2005.01.002](https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2005.01.002)
17. Redlich K, Görtz B, Hayer S et al (2004) Overexpression of tumor necrosis factor causes bilateral sacroiliitis. *Arthritis Rheum* 50:1001–1005. doi:[10.1002/art.20194](https://doi.org/10.1002/art.20194)
18. Garnerio P, Jovenne P, Buchs N et al (1999) Uncoupling of bone metabolism in rheumatoid arthritis patients with or without joint destruction: assessment with serum type I collagen breakdown products. *Bone* 24:381–385
19. Marotte H, Miossec P (2008) Prevention of bone mineral density loss in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF α therapy. *Biologics* 2:663–669
20. Marotte H, Miossec P (2008) Prevention of bone mineral density loss in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF α therapy. *Biol Targets Ther* 2:663–669
21. Benedetti G, Miossec P (2014) Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 44:339–347. doi:[10.1002/eji.201344184](https://doi.org/10.1002/eji.201344184)
22. Guerrini MM, Takayanagi H (2014) The immune system, bone and RANKL. *Arch Biochem Biophys*. doi:[10.1016/j.abb.2014.06.003](https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.003)
23. Komatsu N, Takayanagi H (2012) Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Adv Immunol* 115:45–71. doi:[10.1016/B978-0-12-394299-9.00002-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394299-9.00002-3)
24. Zwerina J, Redlich K, Polzer K et al (2007) TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11742–11747. doi:[10.1073/pnas.0610812104](https://doi.org/10.1073/pnas.0610812104)
25. Zwerina K, Koenders M, Hueber A et al (2012) Anti IL-17A therapy inhibits bone loss in TNF- α -mediated murine arthritis by modulation of the T-cell balance. *Eur J Immunol* 42:413–423. doi:[10.1002/eji.201141871](https://doi.org/10.1002/eji.201141871)
26. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH et al (1992) Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7375–7379
27. Piguet PF, Grau GE, Vesin C et al (1992) Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 77:510–514
28. Williams RO, Feldmann M, Maini RN (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9784–9788
29. Shealy DJ, Wooley PH, Emmell E et al (2002) Anti-TNF- α antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res* 4:R7. doi:[10.1186/ar430](https://doi.org/10.1186/ar430)
30. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE et al (2003) Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 48:35–45. doi:[10.1002/art.10697](https://doi.org/10.1002/art.10697)
31. Arends S, Spoorenberg A, Brouwer E, van der Veer E (2014) Clinical studies on bone-related outcome and the effect of TNF- α blocking therapy in ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 26:259–268. doi:[10.1097/BOR.0000000000000053](https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000053)
32. van der Heijde D, Landewé R, Einstein S et al (2008) Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 58:1324–1331. doi:[10.1002/art.23471](https://doi.org/10.1002/art.23471)
33. van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X et al (2008) Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 58:3063–3070. doi:[10.1002/art.23901](https://doi.org/10.1002/art.23901)
34. van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN et al (2009) Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res Ther* 11:R127. doi:[10.1186/ar2794](https://doi.org/10.1186/ar2794)
35. Hayer S, Redlich K, Korb A et al (2007) Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 56:79–88. doi:[10.1002/art.22313](https://doi.org/10.1002/art.22313)
36. Hayer S, Niederreiter B, Nagelreiter I et al (2010) Interleukin 6 is not a crucial regulator in an animal model of tumour necrosis factor-mediated bilateral sacroiliitis. *Ann Rheum Dis* 69:1403–1406. doi:[10.1136/ard.2010.129148](https://doi.org/10.1136/ard.2010.129148)
37. Hayward MD, Jones BK, Saparov A et al (2007) An extensive phenotypic characterization of the hTNF α transgenic mice. *BMC Physiol* 7:13. doi:[10.1186/1472-6793-7-13](https://doi.org/10.1186/1472-6793-7-13)
38. Baraliakos X, Heldmann F, Callhoff J et al (2014) Which spinal lesions are associated with new bone formation in patients with ankylosing spondylitis treated with anti-TNF agents? A long-term observational study using MRI and conventional radiography. *Ann Rheum Dis* 73:1819–1825. doi:[10.1136/annrheumdis-2013-203425](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203425)
39. Machado PM, Baraliakos X, van der Heijde D et al (2016) MRI vertebral corner inflammation followed by fat deposition is the strongest contributor to the development of new bone at the same vertebral corner: a multilevel longitudinal analysis in patients

- with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 75:1486–1493. doi:[10.1136/annrheumdis-2015-208011](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208011)
40. Filloux V, Marotte H, Miossec P (2003) Cerebral calcifications in an elderly lupus patient. *Ann Rheum Dis* 62:283–284
 41. Sawae Y, Sahara T, Sasaki T (2003) Osteoclast differentiation at growth plate cartilage-trabecular bone junction in newborn rat femur. *J Electron Microsc* 52:493–502.
 42. Klingberg E, Lorentzon M, Göthlin J et al (2013) Bone micro-architecture in ankylosing spondylitis and the association with bone mineral density, fractures, and syndesmophytes. *Arthritis Res Ther* 15:R179. doi:[10.1186/ar4368](https://doi.org/10.1186/ar4368)
 43. Schett G, Redlich K, Hayer S et al (2003) Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 48:2042–2051. doi:[10.1002/art.11150](https://doi.org/10.1002/art.11150)
 44. Redlich K, Görtz B, Hayer S et al (2004) Repair of local bone erosions and reversal of systemic bone loss upon therapy with anti-tumor necrosis factor in combination with osteoprotegerin or parathyroid hormone in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Am J Pathol* 164:543–555. doi:[10.1016/S0002-9440\(10\)63144-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63144-6)
 45. Diarra D, Stolina M, Polzer K et al (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 13:156–163. doi:[10.1038/nm1538](https://doi.org/10.1038/nm1538)
 46. Walsh NC, Reinwald S, Manning CA et al (2009) Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 24:1572–1585. doi:[10.1359/jbmr.090320](https://doi.org/10.1359/jbmr.090320)
 47. Lories RJU, Derese I, de Bari C, Luyten FP (2007) Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodeling in a mouse model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 56:489–497. doi:[10.1002/art.22372](https://doi.org/10.1002/art.22372)
 48. Osta B, Lavocat F, Eljaafari A, Miossec P (2014) Effects of interleukin-17A on osteogenic differentiation of isolated human mesenchymal stem cells. *Front Immunol* 5:425. doi:[10.3389/fimmu.2014.00425](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00425)
 49. Osta B, Benedetti G, Miossec P (2014) Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis. *Front Immunol* 5:48. doi:[10.3389/fimmu.2014.00048](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048)
 50. Shaw AT, Maeda Y, Gravallese EM (2016) IL-17A deficiency promotes periosteal bone formation in a model of inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 18:104. doi:[10.1186/s13075-016-0998-x](https://doi.org/10.1186/s13075-016-0998-x)
 51. Ono T, Okamoto K, Nakashima T et al (2016) IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun* 7:10928. doi:[10.1038/ncomms10928](https://doi.org/10.1038/ncomms10928)
 52. Papet I, El Yousfi M, Godin JP et al (2008) HLA-B27 rats develop osteopaenia through increased bone resorption without any change in bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8:251–256
 53. van Duivenvoorde LM, Dorris ML, Satumtira N et al (2012) Relationship between inflammation, bone destruction, and osteoproliferation in spondyloarthritis in HLA-B27/Hu β 2m transgenic rats. *Arthritis Rheum* 64:3210–3219. doi:[10.1002/art.34600](https://doi.org/10.1002/art.34600)

RESEARCH ARTICLE

Human Monocyte-Derived Osteoclasts Are Targeted by Staphylococcal Pore-Forming Toxins and Superantigens

Sacha Flammier^{1*}, Jean-Philippe Rasigade¹, Cédric Badiou¹, Thomas Henry², François Vandenesch¹, Frédéric Laurent¹, Sophie Trouillet-Assant¹

1 Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Pathogenesis of staphylococcal infections, University of Lyon 1, Department of Clinical Microbiology, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon, 103 grande rue de la Croix Rousse, 69004 Lyon, France, **2** Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Inflammasome, bacterial infections and autoinflammatory diseases, University of Lyon 1, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon cedex 07, France

* sacha.flammier@inserm.fr



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Flammier S, Rasigade J-P, Badiou C, Henry T, Vandenesch F, Laurent F, et al. (2016) Human Monocyte-Derived Osteoclasts Are Targeted by Staphylococcal Pore-Forming Toxins and Superantigens. PLoS ONE 11(3): e0150693. doi:10.1371/journal.pone.0150693

Editor: Dominique Heymann, Faculté de médecine de Nantes, FRANCE

Received: September 9, 2015

Accepted: February 18, 2016

Published: March 2, 2016

Copyright: © 2016 Flammier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by a grant from Fondation Innovation en Infectiologie, Lyon, France (grant AO6) <http://www.finovi.org>. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Staphylococcus aureus is the leading cause of bone and joint infections (BJIs). Staphylococcal pathogenesis involves numerous virulence factors including secreted toxins such as pore-forming toxins (PFTs) and superantigens. The role of these toxins on BJI outcome is largely unknown. In particular, few studies have examined how osteoclasts, the bone-resorbing cells, respond to exposure to staphylococcal PFTs and superantigens. We investigated the direct impact of recombinant staphylococcal toxins on human primary mature monocyte-derived osteoclasts, in terms of cytotoxicity and cell activation with cell death and bone resorption assays, using macrophages of the corresponding donors as a reference. Monocyte-derived osteoclasts displayed similar toxin susceptibility profiles compared to macrophages. Specifically, we demonstrated that the Pantone-Valentine leukocidin, known as one of the most powerful PFT which lyses myeloid cells after binding to the C5a receptor, was able to induce the death of osteoclasts. The archetypal superantigen TSST-1 was not cytotoxic but enhanced the bone resorption activity of osteoclasts, suggesting a novel mechanism by which superantigen-producing *S. aureus* can accelerate the destruction of bone tissue during BJI. Altogether, our data indicate that the diverse clinical presentations of BJIs could be related, at least partly, to the toxin profiles of *S. aureus* isolates involved in these severe infections.

Introduction

Bone is a mineralized tissue in a constant renewal process called bone remodelling, provided by the coordinated action of two main cell types, osteoblasts, the bone-forming cells, and osteoclasts, the bone-resorbing cells [1]. « Osteoblasts derive from mesenchymal stems, while osteoclasts have a myeloid origin and share common features with macrophages including a phagocytic activity [2]. Osteoclast maturation involves the fusion of several mononucleated

osteoclast precursors into giant multinucleated-cells endowed with the bone-matrix resorption ability. In a physiological context, bone integrity is maintained by a balance between osteoblastic and osteoclastic activities throughout life. During bone and joint infections (BJIs), including osteomyelitis and orthopaedic device infections, this process is impaired by the interaction of bacteria with bone tissue, leading to bone destruction [3]. Indeed, *Staphylococcus aureus*, the leading cause of BJIs, is responsible for bone infections marked by progressive bone loss [4].

Numerous studies have investigated the direct impact of *S. aureus* on osteoblasts [5],[6]. It is well-known that this pathogen is able to adhere to osteoblasts, become internalized and survive intracellularly and/or induce cell death [7]. Moreover, several studies have demonstrated the ability of live *S. aureus* to inhibit osteoclastogenesis and to increase bone resorption mediated by osteoclasts [2]. These observations suggest that *S. aureus* directly interacts with bone cells, modifying their functions of bone mineralization or bone resorption. Nevertheless, the pathophysiologic mechanisms, responsible for the bone destruction observed in BJI caused by *S. aureus*, remain incompletely understood.

S. aureus is able to act on remote target cells through secreted virulence factors, including toxins. *S. aureus* expresses a large panel of pore-forming toxins (PFTs) that target the host cell membrane including α - (Hla), β - (Hlb), γ - (HlgAB and HlgBC) haemolysins, and leukocidins (LukED, LukGH and the Panton Valentine Leukocidin [PVL]). PFT-induced permeabilization of the cytoplasmic membrane results in the efflux of intracellular metabolites and ultimately cell death [8]. *S. aureus* also expresses superantigenic toxins such as the toxic shock syndrome toxin (TSST-1) or staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, etc.) responsible for a polyclonal activation and a massive proliferation of T cells independent of antigen specificity. Most of these staphylococcal toxins target immune cells derived from the myeloid lineage (monocytes, macrophages and dendritic cells), a characteristic which is thought to help *S. aureus* escape the immune system [9].

Noteworthy, several of the aforementioned toxins exhibit some degree of specificity with respect to immune cells through the specific binding of cell surface receptors [10]. Because osteoclasts derive from progenitors of the myeloid lineage, we hypothesized that their susceptibility to staphylococcal toxins share some similarities with the susceptibility of other myeloid cells such as macrophages, which could be of interest for our understanding of the pathophysiology of *S. aureus* BJIs. We thus tested the direct effect of a panel of recombinant staphylococcal toxins on primary human mature osteoclasts by assessing cell cytotoxicity. We also investigated the impact of the TSST-1 superantigen on the bone resorption activity of osteoclasts.

Materials and Methods

Preparation of osteoclasts

Monocytes were purified from the blood of healthy donors ($n = 3$) purchased from Etablissement Français du Sang (Lyon Gerland, France), as previously described [11]. Donors gave written consent to EFS for the use of blood sample for research purposes at the time of sampling (number of the agreement linking EFS and the research laboratory: 14-1820-69). Briefly, after collection, blood was loaded on a Lymphocyte Separation Medium density gradient (Eurobio, Courtaboeuf, France) to purify mononuclear cells. Cells were then centrifuged through a 50% Percoll density gradient to concentrate monocytes and purified from the light-density fraction by immunomagnetic depletion using magnetic beads (Dynabeads goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Carlsbad, CA) and a cocktail of monoclonal antibodies (mAbs): anti-CD19, anti-CD3, anti-CD56 and anti-glycophorin A (Beckman-Coulter, Miami, FL), ensuring purification rates $\geq 95\%$. Monocytes were then plated in 96-well plates at a density of 10^5 cells/well and

cultured in α -MEM medium (Gibco Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin (Gibco Life Technologies), and 10% foetal bovine serum (PAN Biotech, Aldenbach, Germany).

Monocytes were differentiated into mature osteoclasts or macrophages as described elsewhere [11]. Briefly, osteoclasts were obtained by incubating monocytes with 50 ng/mL M-CSF (Monocyte Colony-stimulating Factor) (PeproTech, Rocky Hill, NJ) and 30 ng/mL of RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) (PeproTech, Rocky Hill, NJ) from day 1 to day 3, and in presence of 25 ng/mL of M-CSF and 100 ng/mL of RANKL from day 3 to day 6. Macrophages were obtained by incubation of monocytes with 50 ng/mL of M-CSF only from day 0 to day 6.

Toxins production

Recombinant staphylococcal toxins (Hla, Hlb, HlgAB, HlgBC, LukED, LukGH, PVL, TSST-1 and SEA) were purified as described elsewhere [12]. The endotoxin content of the recombinant protein solutions was controlled and confirmed to be less than 0.004 endotoxin units per μ g of protein.

Cytotoxicity assay

Toxin cytotoxicity to osteoclasts and macrophages was quantified by monitoring propidium iodide (PI) incorporation as previously described [13]. Cells were incubated with PI (5 μ g/ml) and variable concentrations of recombinant staphylococcal toxins. Propidium iodide fluorescence was measured over a 3-hour period on a microplate fluorimeter (Tecan, Lyon, France), using untreated cells as control.

Bone resorption assay

Bone resorption was quantified as a means to assess the impact of the TSST-1 superantigen on osteoclast activity. On day 6, mature osteoclasts were detached from plastic wells by flushing after incubation with Accutase (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD) (37°C-30 min), and then seeded at 2.10^4 cells/well on mineralized matrix Osteo Assay Surface 96-well plates (OsteoCorning®, Corning, MA, USA). TSST-1 was added to wells at 0.1, 1, 10, 100 and 1000 ng/ml. Twenty four hours later, osteoclasts were lysed by osmotic shock, and OsteoCorning® Assay plates were stained with PBS/5% silver nitrate (Sigma-Aldrich) to quantify resorption using a Leica 22 DMI6000 microscope (Nanterre, France) and Fiji software (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) as described elsewhere [14]. Results were expressed as the proportion of resorbed area in each condition relative to the resorbed area in untreated cells.

Statistical analyses

Differences in means were analysed using Student's test (t-test) with a threshold of 0.05. Analyses were performed using R software, version 2.14.2 (The R foundation for statistical computing, Vienna, Austria). Results were expressed as means and 95% confidence intervals derived from three independent experiments realized in triplicate. Each experiment was realized with a different blood donor.

Results

We first evaluated the cytotoxic effect of a wide range of staphylococcal toxins on human macrophages by measuring incorporation of PI 3 hours post treatment. Macrophages served as a

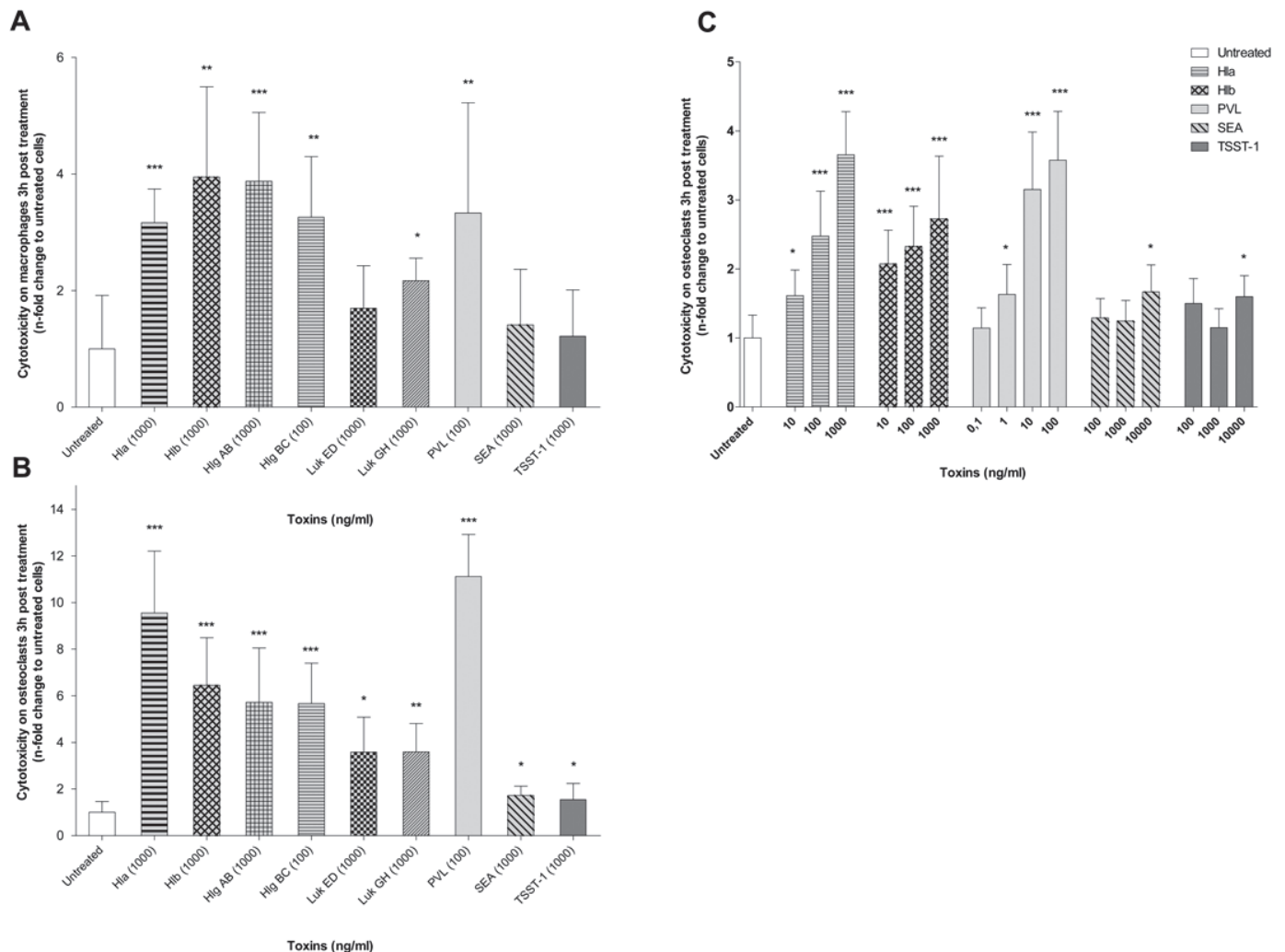


Fig 1. Cytotoxicity of staphylococcal toxins on human macrophages and mature osteoclasts. Human monocytes were differentiated for 6 days into macrophages with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (A) or into mature osteoclasts in the presence of M-CSF and receptor activator of NF- κ -B ligand (RANK-L) (B and C). Staphylococcal toxins were then added to the cell culture medium containing propidium iodide (PI) and cell death was quantified by monitoring PI incorporation over a 3 hours period (A, B and C). Fluorescence in each well was normalised to the fluorescence obtained with untreated cells. Results represent the mean cytotoxicity with 95% confidence interval, of 3 independent experiments performed in triplicate on 3 different donors (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Hla: α haemolysin, Hlb: β haemolysin, Hlg AB and Hlg BC: γ haemolysins AB and BC, Luk ED and Luk GH: leukocidins ED and GH, PVL: Pantone Valentine Leukocidin, TSST-1: toxic shock syndrome toxin, SEA: Staphylococcal enterotoxin A.

doi:10.1371/journal.pone.0150693.g001

reference profile of the different toxins' activities (Fig 1). As expected, we observed a high cytotoxicity of the membrane-damaging toxins (Hla, Hlb, HlgAB, HlgBC, LukGH and PVL) to human macrophages while superantigenic toxins did not cause significant cytotoxicity compared to untreated cells. These results, consistent with those obtained in literature [12], were used to validate our experimental protocol.

Because osteoclasts share a common myeloid origin with macrophages, we hypothesized that staphylococcal toxin cytotoxic activity profiles on osteoclasts could be similar with those observed with macrophages. To confirm this hypothesis, the experimental protocol used with macrophages was tested on mature human osteoclasts (Fig 1). Results indicated that pore-forming toxins induced a significant cytotoxicity on mature human osteoclasts unlike

superantigens. Moreover, cytotoxicity profiles appeared to be superimposable between macrophages and osteoclasts. Toxin-induced cytotoxicity to macrophages and osteoclasts could only be compared qualitatively (cytotoxicity profiles caused by the various toxins), and not quantitatively (Fig 1). Indeed, mature osteoclasts have dozens of nuclei so this increased DNA content per cell leads to higher values of PI incorporation-induced fluorescence as compared to macrophages, which prevented us to compare fluorescence values of macrophages and osteoclasts.

Using increasing concentrations of toxins, we showed that membrane-damaging toxins had a dose-dependent cytotoxic effect on mature human osteoclasts. For example PI incorporation in cells treated with PVL at 0.1, 1, 10 and 100 ng/ml were respectively 14%, 63%, 315% and 358% higher, compared to untreated (Fig 1). In contrast, superantigenic toxins caused significant cytotoxicity on osteoclasts only above 10 000 ng/mL.

Because it has been established that some staphylococcal toxins also have cellular activation effect [15], we tested the impact of the non-cytotoxic toxins on osteoclast activation. We investigated the capacity of TSST-1 to activate mature human osteoclasts by assessing bone resorption assays (Fig 2). Results demonstrated that TSST-1 significantly enhanced osteolytic activity in a dose-dependent manner, resorbed area by cells treated with TSST-1 at 1, 10, 100, 1000 ng/ml were respectively 13%, 17%, 24% and 26% higher, compared to untreated cells ($p < 0.001$ for all). TSST-1 concentrations below 1 ng/mL induced no measurable effect.

Discussion

Using an *in vitro* model, we evaluated the direct, specific, and independent effect of recombinant *S. aureus* toxins on mature human monocyte-derived osteoclasts. Using osteoclasts and macrophages differentiated from the same blood donors, we have shown that human macrophages and mature monocyte-derived osteoclasts exhibit similar susceptibility profiles with respect to staphylococcal toxins. PFTs caused significant dose-dependent cellular cytotoxicity on these two cell types whereas superantigenic toxins were not or poorly cytotoxic. Noteworthy, these results are in agreement with the fact that mature osteoclasts express the complement receptor C5a [16], which has recently been identified as the PVL and HlgBC receptor [17]. Moreover, several studies have demonstrated that human osteoclasts express CCR2, CCR5 and CXCR1 and 2 [18], [19], [20] which have recently been identified as receptors respectively of LukED, HlgBC and both of these PFTs [10]. This suggests that osteoclasts are targeted by PVL, HlgBC and LukED during BJIs. The direct cytotoxic activity of PVL highlighted in this study could play a role, which level remains to be determined, in the severity and outcome of acute BJIs due to PVL-producing *S. aureus*. Indeed, it is known that BJIs caused by *S. aureus* PVL positive strains are more severe and extensively destructive than those caused by *S. aureus* PVL negative ones [21]. The direct effect on osteoclasts could be added to the cytolytic indirect effect related to the release, at the infection site, of the cytoplasmic content of macrophages and neutrophils, which were the only target cells previously identified for PVL. Previous studies have demonstrated that PVL, in addition to targeting neutrophils can target macrophages and to trigger IL-1 β secretion [15] and amplify inflammation. This content has likely a direct cytotoxic effect on osteoblasts, osteoclasts and the bone tissue itself, leading to a local inflammation, tissue necrosis and thus to bone destruction.

As superantigens were not cytotoxic to osteoclasts, the second part of this study aimed to assess the ability of TSST-1, to stimulate mature monocyte-derived osteoclasts. It has been shown that staphylococcal superantigens ensure, in absence of antigen presentation, bridging between the TCR V β chain of T cells and MHC class II of antigen presenting cells and in particular by osteoclasts [22]. Although the presence of these two cell types appears to be required for the synergistic action of superantigens, several studies have reported the ability of

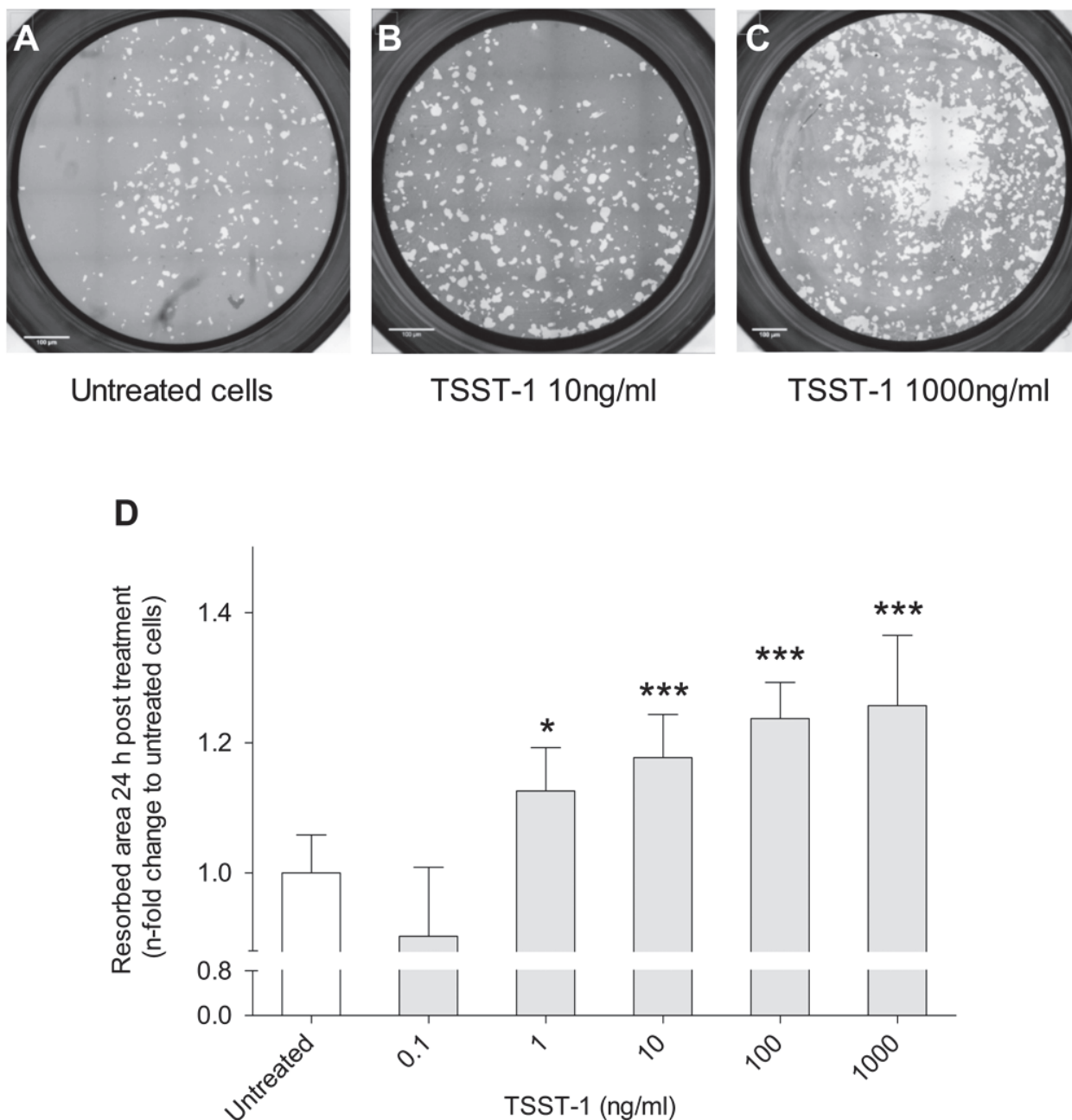


Fig 2. TSST-1 stimulates bone resorption capacity of mature human osteoclasts. For bone resorption assay, mature osteoclasts were detached from plastic on day 6 and seeded at 2×10^4 cells/well on mineralized matrix Osteo Assay Surface 96-well plates. TSST-1 was added to the cell culture medium. After 24 hours of culture, the osteocorning matrices were stained with 5% silver nitrate to measure the resorbed area (white area). The percentages of matrix that were resorbed by untreated (A) or TSST-1-treated osteoclasts (B, C) were measured using the Fiji software. Bars represent 100 μ m. Results of resorption area quantification (D) represent the mean of resorbed area with 95% confidence interval, of 3 independent experiments realised in triplicate on 3 different donors (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). TSST-1: Toxic shock syndrome toxin.

doi:10.1371/journal.pone.0150693.g002

superantigens to stimulate macrophage pro-inflammatory cytokine secretion in the absence of T cells [23]. Our data show that TSST-1 promotes bone resorption by human mature monocyte-derived osteoclasts at concentrations above 1 ng/mL, which are probably relevant in the

context of bone infection *in vivo*. Indeed, plasmatic TSST-1 concentrations of more than 5 ng/mL have been observed in infected patients [24], and it is likely that toxin concentrations at the site of infection are greater than those in circulating blood. Importantly, *S. aureus* strains can harbor other superantigens than TSST-1. Whether these superantigens could trigger osteoclastogenesis similar to TSST-1 remains an open question. Indeed, the osteoclastic stimulation observed in our model might be specific to TSST-1, because this toxin has been shown to interact with several cell surface targets including ADAM17 and EGFR [25] or CD40 [26], which are expressed by osteoclasts [27][28][29]. Further studies are warranted to determine which osteoclastic receptors are involved in TSST-1-induced stimulation, and to determine whether this stimulation involves a canonical superantigen-MCH class II interaction which might be triggered by other superantigens.

Collectively, our results suggest that bone loss during staphylococcal BJIs might not only be driven by non-specific inflammation and local acidity, created by dead cells, but also by the specific targeting and activation of bone resorbing cells by bacterial toxins. The balance between osteoclasts killing by PFTs and the superantigen-mediated increase in osteoclasts' bone resorption activity may control the different clinical expression of BJIs associated with the toxic profile of the different *S. aureus* strains.

Acknowledgments

We acknowledge the contribution of Magali Perret and Pierre Jurdic's team, especially Pierre Jurdic, Irma Machuca-Gayet, Chantal Domenget and Nathalie Demoncheaux, for their helpful advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SF TH FL STA. Performed the experiments: SF STA. Analyzed the data: SF JPR FL STA. Contributed reagents/materials/analysis tools: SF JPR CB TH STA. Wrote the paper: SF JPR FL STA FV.

References

1. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol*. 2004; 19: 1325–1344. PMID: [15375775](#)
2. Trouillet-Assant S, Gallet M, Nauroy P, Rasigade J-P, Flammier S, Parroche P, et al. Dual impact of live *Staphylococcus aureus* on the osteoclast lineage, leading to increased bone resorption. *J Infect Dis*. 2015; 211: 571–581. doi: [10.1093/infdis/jiu386](#) PMID: [25006047](#)
3. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer A-I, Gaborit C, Rosset P, et al. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect*. 2012; 82: 40–48. doi: [10.1016/j.jhin.2012.04.025](#) PMID: [22738613](#)
4. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004; 364: 369–379. doi: [10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](#) PMID: [15276398](#)
5. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2010; 300: 193–204. doi: [10.1016/j.ijmm.2009.10.003](#) PMID: [19889575](#)
6. Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, et al. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PloS One*. 2013; 8: e63176. doi: [10.1371/journal.pone.0063176](#) PMID: [23690994](#)
7. Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis*. 2010; 202: 1031–1040. doi: [10.1086/656047](#) PMID: [20715929](#)
8. Diep BA, Gillet Y, Etienne J, Lina G, Vandenesch F. Pantone-Valentine leucocidin and pneumonia. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13: 566. doi: [10.1016/S1473-3099\(13\)70102-6](#)
9. Alonzo F, Torres VJ. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2014; 78: 199–230. doi: [10.1128/MMBR.00055-13](#) PMID: [24847020](#)

10. Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, et al. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun*. 2014; 5: 5438. doi: [10.1038/ncomms6438](https://doi.org/10.1038/ncomms6438) PMID: [25384670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25384670/)
11. Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivallier P, Rissoan M-C, Liu Y-J, Rabourdin-Combe C. Measles Virus Suppresses Cell-mediated Immunity by Interfering with the Survival and Functions of Dendritic and T Cells. *J Exp Med*. 1997; 186: 813. PMID: [9294136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9294136/)
12. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, et al. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2012; 14: 1019–1036. doi: [10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x) PMID: [22329718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22329718/)
13. Pierini R, Juruj C, Perret M, Jones CL, Mangeot P, Weiss DS, et al. AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in *Francisella*-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell Death Differ*. 2012; 19: 1709–1721. doi: [10.1038/cdd.2012.51](https://doi.org/10.1038/cdd.2012.51) PMID: [22555457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22555457/)
14. Dacquin R, Domenget C, Kumanogoh A, Kikutani H, Jurdic P, Machuca-Gayet I. Control of Bone Resorption by Semaphorin 4D Is Dependent on Ovarian Function. *PLoS ONE*. 2011; 6: e26627. doi: [10.1371/journal.pone.0026627](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026627) PMID: [22046317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22046317/)
15. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, et al. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2012; 14: 1019–1036. doi: [10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x) PMID: [22329718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22329718/)
16. Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, et al. Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1 β . *J Cell Biochem*. 2011; 112: 2594–2605. doi: [10.1002/jcb.23186](https://doi.org/10.1002/jcb.23186) PMID: [21598302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21598302/)
17. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The staphylococcal toxin Pantón-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe*. 2013; 13: 584–594. doi: [10.1016/j.chom.2013.04.006](https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.006) PMID: [23684309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23684309/)
18. Kopesky P, Tiedemann K, Alkekha D, Zechner C, Millard B, Schoeberl B, et al. Autocrine signaling is a key regulatory element during osteoclastogenesis. *Biol Open*. 2014; BIO20148128. doi: [10.1242/bio.20148128](https://doi.org/10.1242/bio.20148128)
19. Khan UA, Hashimi SM, Khan S, Quan J, Bakr MM, Forwood MR, et al. Differential Expression of Chemokines, Chemokine Receptors and Proteinases by Foreign Body Giant Cells (FBGCs) and Osteoclasts. *J Cell Biochem*. 2014; 115: 1290–1298. doi: [10.1002/jcb.24781](https://doi.org/10.1002/jcb.24781) PMID: [24500983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24500983/)
20. Oba Y, Lee JW, Ehrlich LA, Chung HY, Jelinek DF, Callander NS, et al. MIP-1 α utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol*. 2005; 33: 272–278. doi: [10.1016/j.exphem.2004.11.015](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.11.015) PMID: [15730850](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15730850/)
21. Crémieux A-C, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Côté J-F, Muffat-Joly M, et al. Pantón–Valentine Leukocidin Enhances the Severity of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Rabbit Osteomyelitis. Ratner AJ, editor. *PLoS ONE*. 2009; 4: e7204. doi: [10.1371/journal.pone.0007204](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007204) PMID: [19779608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19779608/)
22. Benasciutti E, Mariani E, Oliva L, Scolari M, Perilli E, Barras E, et al. MHC class II transactivator is an in vivo regulator of osteoclast differentiation and bone homeostasis co-opted from adaptive immunity. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2014; 29: 290–303. doi: [10.1002/jbmr.2090](https://doi.org/10.1002/jbmr.2090)
23. Bright JJ, Xin Z, Sriram S. Superantigens augment antigen-specific Th1 responses by inducing IL-12 production in macrophages. *J Leukoc Biol*. 1999; 65: 665–670. PMID: [10331496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331496/)
24. Miwa K, Fukuyama M, Kunitomo T, Igarashi H. Rapid assay for detection of toxic shock syndrome toxin 1 from human sera. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 539–542. PMID: [8150970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8150970/)
25. Breshears LM, Schlievert PM, Peterson ML. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling drive the epithelial response to *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *J Biol Chem*. 2012; 287: 32578–32587. doi: [10.1074/jbc.M112.352534](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.352534) PMID: [22833676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22833676/)
26. Spaulding AR, Lin Y-C, Merriman JA, Brosnahan AJ, Peterson ML, Schlievert PM. Immunity to *Staphylococcus aureus* secreted proteins protects rabbits from serious illnesses. *Vaccine*. 2012; 30: 5099–5109. doi: [10.1016/j.vaccine.2012.05.067](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.067) PMID: [22691432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22691432/)
27. Verrier S, Hogan A, McKie N, Horton M. ADAM gene expression and regulation during human osteoclast formation. *Bone*. 2004; 35: 34–46. doi: [10.1016/j.bone.2003.12.029](https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.029) PMID: [15207739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15207739/)
28. Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells. *Blood*. 2010; 116: 210–217. doi: [10.1182/blood-2009-11-255026](https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-255026) PMID: [20304810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20304810/)

29. Swanson CD, Akama-Garren EH, Stein EA, Petralia JD, Ruiz PJ, Edalati A, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ameliorates collagen-induced arthritis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2012; 188: 3513–3521. doi: [10.4049/jimmunol.1102693](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102693)

Bibliographie

- 1 Vogt W. Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem Pharmacol* 1963;**12**:415–20.
- 2 Fukushima N, Ishii S, Tsujiuchi T, *et al.* Comparative analyses of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling. *Cell Mol Life Sci* 2015;**72**:2377–94. doi:10.1007/s00018-015-1872-8
- 3 Xie Y, Gibbs TC, Meier KE. Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta* 2002;**1582**:270–81.
- 4 Hooks SB, Ragan SP, Hopper DW, *et al.* Characterization of a Receptor Subtype-Selective Lysophosphatidic Acid Mimetic. *Mol Pharmacol* 1998;**53**:188–94. doi:10.1124/mol.53.2.188
- 5 Meerschaert K, Corte VD, Ville YD, *et al.* Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *The EMBO Journal* 1998;**17**:5923–32. doi:10.1093/emboj/17.20.5923
- 6 Tigyi G, Miledi R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1992;**267**:21360–7.
- 7 Valet P, Pagès C, Jeanneton O, *et al.* Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest* 1998;**101**:1431–8. doi:10.1172/JCI806
- 8 Peyruchaud O, Boucharaba A, Saulnier-Blache J-S, *et al.* [Lysophosphatidic acid: a new link between blood platelets and bone metastasis]. *Med Sci (Paris)* 2005;**21**:353–5. doi:10.1051/medsci/2005214353
- 9 Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, *et al.* The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 1993;**291** (Pt 3):677–80.
- 10 Pagès C, Simon MF, Valet P, *et al.* Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001;**64**:1–10.
- 11 Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1781**:513–8. doi:10.1016/j.bbalip.2008.06.005
- 12 Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, *et al.* Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 2002;**158**:227–33. doi:10.1083/jcb.200204026
- 13 Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, *et al.* Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 2006;**281**:25822–30. doi:10.1074/jbc.M605142200

- 14 McKean ML, Smith JB, Silver MJ. Formation of lysophosphatidylcholine by human platelets in response to thrombin. Support for the phospholipase A2 pathway for the liberation of arachidonic acid. *J Biol Chem* 1981;**256**:1522–4.
- 15 Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol* 2004;**15**:477–89. doi:10.1016/j.semcdb.2004.05.001
- 16 Brindley DN, Pilquill C. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res* 2009;**50 Suppl**:S225-230. doi:10.1194/jlr.R800055-JLR200
- 17 Bishop WR, Bell RM. Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol* 1988;**4**:579–610. doi:10.1146/annurev.cb.04.110188.003051
- 18 Ishii I, Contos JJ, Fukushima N, *et al.* Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol* 2000;**58**:895–902.
- 19 Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res* 2014;**55**:1192–214. doi:10.1194/jlr.R046458
- 20 Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;**89**:57–65. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.06.001
- 21 Ohuchi H, Hamada A, Matsuda H, *et al.* Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Dev Dyn* 2008;**237**:3280–94. doi:10.1002/dvdy.21736
- 22 A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/9600933> (accessed 24 Oct 2017).
- 23 Yanagida K, Ishii S, Hamano F, *et al.* LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J Biol Chem* 2007;**282**:5814–24. doi:10.1074/jbc.M610767200
- 24 Lee C-W, Rivera R, Dubin AE, *et al.* LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *J Biol Chem* 2007;**282**:4310–7. doi:10.1074/jbc.M610826200
- 25 Lee C-W, Rivera R, Gardell S, *et al.* GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem* 2006;**281**:23589–97. doi:10.1074/jbc.M603670200
- 26 Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, *et al.* Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem* 2009;**284**:17731–41. doi:10.1074/jbc.M808506200

- 27 Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BNG. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 2004;**26**:870–81. doi:10.1002/bies.20081
- 28 LPAR signaling and functional outcomes. LPAR signaling | Open-i. https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4286743_bt-23-1f1&req=4 (accessed 23 Oct 2017).
- 29 McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, *et al.* Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:131–6. doi:10.1073/pnas.0135855100
- 30 Marrache AM, Gobeil F, Zhu T, *et al.* Intracellular signaling of lipid mediators via cognate nuclear G protein-coupled receptors. *Endothelium* 2005;**12**:63–72. doi:10.1080/10623320590933815
- 31 Tigyi G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 2010;**161**:241–70. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00815.x
- 32 Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, *et al.* Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 1992;**267**:2524–9.
- 33 Lee HY, Murata J, Clair T, *et al.* Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;**218**:714–9. doi:10.1006/bbrc.1996.0127
- 34 Kanda H, Newton R, Klein R, *et al.* Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 2008;**9**:415–23. doi:10.1038/ni1573
- 35 Salous AK, Panchatcharam M, Sunkara M, *et al.* Mechanism of rapid elimination of lysophosphatidic acid and related lipids from the circulation of mice. *J Lipid Res* 2013;**54**:2775–84. doi:10.1194/jlr.M039685
- 36 Clair T, Aoki J, Koh E, *et al.* Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res* 2003;**63**:5446–53.
- 37 Takuwa Y. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2002;**1582**:112–20. doi:10.1016/S1388-1981(02)00145-2
- 38 Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 2005;**30**:542–50. doi:10.1016/j.tibs.2005.08.005
- 39 Koike S, Keino-Masu K, Ohto T, *et al.* The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. *Genes Cells* 2006;**11**:133–42. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00924.x

- 40 Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin—an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* 2010;**148**:13–24. doi:10.1093/jb/mvq052
- 41 Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, *et al.* Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* 2011;**18**:198–204. doi:10.1038/nsmb.1980
- 42 Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, *et al.* Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol* 2011;**18**:205–12. doi:10.1038/nsmb.1998
- 43 Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 2008;**77**:495–520. doi:10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007
- 44 Moolenaar WH, Perrakis A. Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;**12**:674–9. doi:10.1038/nrm3188
- 45 Giganti A, Rodriguez M, Fould B, *et al.* Murine and Human Autotaxin α , β , and γ Isoforms GENE ORGANIZATION, TISSUE DISTRIBUTION, AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION. *J Biol Chem* 2008;**283**:7776–89. doi:10.1074/jbc.M708705200
- 46 Tokuhara Y, Kurano M, Shimamoto S, *et al.* A New Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Classical Autotaxins (ATX α , ATX β , and ATX γ) and Novel Autotaxins (ATX δ and ATX ϵ). *PLOS ONE* 2015;**10**:e0130074. doi:10.1371/journal.pone.0130074
- 47 Tokumura A, Kanaya Y, Miyake M, *et al.* Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. *Biol Reprod* 2002;**67**:1386–92.
- 48 Hashimoto T, Okudaira S, Igarashi K, *et al.* Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATX δ , with a four-amino acid deletion. *J Biochem* 2012;**151**:89–97. doi:10.1093/jb/mvr126
- 49 Fulkerson Z, Wu T, Sunkara M, *et al.* Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *J Biol Chem* 2011;**286**:34654–63. doi:10.1074/jbc.M111.276725
- 50 Pamuklar Z, Federico L, Liu S, *et al.* Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* 2009;**284**:7385–94. doi:10.1074/jbc.M807820200
- 51 Zhang Y, Chen Y-CM, Krummel MF, *et al.* Autotaxin through lysophosphatidic acid stimulates polarization, motility, and transendothelial migration of naive T cells. *J Immunol* 2012;**189**:3914–24. doi:10.4049/jimmunol.1201604
- 52 Houben AJS, van Wijk XMR, van Meeteren LA, *et al.* The polybasic insertion in autotaxin α confers specific binding to heparin and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 2013;**288**:510–9. doi:10.1074/jbc.M112.358416

- 53 Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, *et al.* ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol* 2010;**339**:451–64. doi:10.1016/j.ydbio.2010.01.007
- 54 Ferry G, Giganti A, Cogé F, *et al.* Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS Lett* 2007;**581**:3572–8. doi:10.1016/j.febslet.2007.06.064
- 55 van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, *et al.* Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 2006;**26**:5015–22. doi:10.1128/MCB.02419-05
- 56 Koike S, Keino-Masu K, Masu M. Deficiency of autotaxin/lysophospholipase D results in head cavity formation in mouse embryos through the LPA receptor-Rho-ROCK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;**400**:66–71. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.008
- 57 Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, *et al.* LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 2010;**116**:5060–70. doi:10.1182/blood-2010-03-272443
- 58 Yuelling LW, Waggener CT, Afshari FS, *et al.* Autotaxin/ENPP2 regulates oligodendrocyte differentiation in vivo in the developing zebrafish hindbrain. *Glia* 2012;**60**:1605–18. doi:10.1002/glia.22381
- 59 Cheng H-Y, Dong A, Panchatcharam M, *et al.* Lysophosphatidic acid signaling protects pulmonary vasculature from hypoxia-induced remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;**32**:24–32. doi:10.1161/ATVBAHA.111.234708
- 60 Requirement for the LpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/11087877> (accessed 31 Oct 2017).
- 61 Roberts C, Winter P, Shilliam CS, *et al.* Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice--a putative model of schizophrenia. *Neurochem Res* 2005;**30**:371–7.
- 62 Simon MF, Daviaud D, Pradère JP, *et al.* Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem* 2005;**280**:14656–62. doi:10.1074/jbc.M412585200
- 63 David M, Machuca-Gayet I, Kikuta J, *et al.* Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J Biol Chem* 2014;**289**:6551–64. doi:10.1074/jbc.M113.533232
- 64 Lin S, Wang D, Iyer S, *et al.* The absence of LPA2 attenuates tumor formation in an experimental model of colitis-associated cancer. *Gastroenterology* 2009;**136**:1711–20. doi:10.1053/j.gastro.2009.01.002

- 65 Ye X, Hama K, Contos JJA, *et al.* LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005;**435**:104–8. doi:10.1038/nature03505
- 66 Lee Z, Cheng C-T, Zhang H, *et al.* Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell* 2008;**19**:5435–45. doi:10.1091/mbc.E08-03-0316
- 67 Lin M-E, Rivera RR, Chun J. Targeted deletion of LPA5 identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain. *J Biol Chem* 2012;**287**:17608–17. doi:10.1074/jbc.M111.330183
- 68 Gerrard JM, Robinson P. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1989;**1001**:282–5.
- 69 Tager AM, LaCamera P, Shea BS, *et al.* The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 2008;**14**:45–54. doi:10.1038/nm1685
- 70 Gan L, Xue J-X, Li X, *et al.* Blockade of lysophosphatidic acid receptors LPAR1/3 ameliorates lung fibrosis induced by irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;**409**:7–13. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.084
- 71 Oikonomou N, Mouratis M-A, Tzouveleakis A, *et al.* Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;**47**:566–74. doi:10.1165/rcmb.2012-0004OC
- 72 Desroy N, Housseman C, Bock X, *et al.* Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2-oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Med Chem* 2017;**60**:3580–90. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00032
- 73 Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, *et al.* Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2007;**41**:616–23. doi:10.1097/01.mcg.0000225642.90898.0e
- 74 Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, *et al.* Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life Sci* 2007;**81**:1009–15. doi:10.1016/j.lfs.2007.08.013
- 75 Ikeda H, Yatomi Y. Autotaxin in liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2012;**413**:1817–21. doi:10.1016/j.cca.2012.07.014
- 76 Dusaulcy R, Rancoule C, Grès S, *et al.* Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 2011;**52**:1247–55. doi:10.1194/jlr.M014985

- 77 D'Souza K, Kane DA, Touaibia M, *et al.* Autotaxin Is Regulated by Glucose and Insulin in Adipocytes. *Endocrinology* 2017;**158**:791–803. doi:10.1210/en.2017-00035
- 78 Reeves VL, Trybula JS, Wills RC, *et al.* Serum Autotaxin/ENPP2 correlates with insulin resistance in older humans with obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2015;**23**:2371–6. doi:10.1002/oby.21232
- 79 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685–95. doi:10.1056/NEJMra043430
- 80 Zhou Z, Subramanian P, Sevilmis G, *et al.* Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 2011;**13**:592–600. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.016
- 81 Chen L, Zhang J, Deng X, *et al.* Lysophosphatidic acid directly induces macrophage-derived foam cell formation by blocking the expression of SRBI. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;**491**:587–94. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.159
- 82 Rother E, Brandl R, Baker DL, *et al.* Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2003;**108**:741–7. doi:10.1161/01.CIR.0000083715.37658.C4
- 83 Teo ST, Yung YC, Herr DR, *et al.* Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life* 2009;**61**:791–9. doi:10.1002/iub.220
- 84 Leblanc R, Lee S-C, David M, *et al.* Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin $\alpha V\beta 3$ controls metastasis of breast cancer cells to bone. *Blood* 2014;**124**:3141–50. doi:10.1182/blood-2014-04-568683
- 85 Hozumi H, Hokari R, Kurihara C, *et al.* Involvement of autotaxin/lysophospholipase D expression in intestinal vessels in aggravation of intestinal damage through lymphocyte migration. *Lab Invest* 2013;**93**:508–19. doi:10.1038/labinvest.2013.45
- 86 Kawagoe H, Stracke ML, Nakamura H, *et al.* Expression and transcriptional regulation of the PD-lalpha/autotaxin gene in neuroblastoma. *Cancer Res* 1997;**57**:2516–21.
- 87 Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, *et al.* Gene Expression Profile of Glioblastoma Multiforme Invasive Phenotype Points to New Therapeutic Targets. *Neoplasia* 2005;**7**:7–16. doi:10.1593/neo.04535
- 88 Zhang G, Zhao Z, Xu S, *et al.* Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J* 1999;**112**:330–2.
- 89 Masuda A, Nakamura K, Izutsu K, *et al.* Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2008;**143**:60–70. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07325.x

- 90 Kehlen A, Englert N, Seifert A, *et al.* Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 2004;**109**:833–8. doi:10.1002/ijc.20022
- 91 Stassar MJ, Devitt G, Brosius M, *et al.* Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001;**85**:1372–82. doi:10.1054/bjoc.2001.2074
- 92 Yang SY, Lee J, Park CG, *et al.* Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2002;**19**:603–8.
- 93 Yang Y, Mou L, Liu N, *et al.* Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;**21**:216–22. doi:10.1165/ajrcmb.21.2.3667
- 94 Chen M, O'Connor KL. Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* 2005;**24**:5125–30. doi:10.1038/sj.onc.1208729
- 95 Nam SW, Clair T, Campo CK, *et al.* Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene* 2000;**19**:241–7. doi:10.1038/sj.onc.1203263
- 96 David M, Wannecq E, Descotes F, *et al.* Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS ONE* 2010;**5**:e9741. doi:10.1371/journal.pone.0009741
- 97 Houben AJS, Moolenaar WH. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2011;**30**:557–65. doi:10.1007/s10555-011-9319-7
- 98 Nakai Y, Ikeda H, Nakamura K, *et al.* Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. *Clin Biochem* 2011;**44**:576–81. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.03.128
- 99 Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005;**105**:2631–9. doi:10.1182/blood-2004-06-2480
- 100 Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;**12**:697–715. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
- 101 Baron R, Neff L, Tran Van P, *et al.* Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 1986;**122**:363–78.
- 102 Li J, Sarosi I, Yan XQ, *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:1566–71.

- 103 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, *et al.* Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 1997;**89**:309–19. doi:10.1016/S0092-8674(00)80209-3
- 104 Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;**91**:257–63. doi:10.1172/JCI116179
- 105 Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009;**19**:61–72.
- 106 LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/27064449> (accessed 13 Mar 2018).
- 107 Kim N, Takami M, Rho J, *et al.* A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med* 2002;**195**:201–9.
- 108 Kim K, Kim JH, Lee J, *et al.* Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2005;**280**:35209–16. doi:10.1074/jbc.M505815200
- 109 Crotti TN, Dharmapatni AASSK, Alias E, *et al.* Osteoimmunology: Major and Costimulatory Pathway Expression Associated with Chronic Inflammatory Induced Bone Loss. *J Immunol Res* 2015;**2015**:281287. doi:10.1155/2015/281287
- 110 Crotti TN, Dharmapatni AASSK, Alias E, *et al.* The immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) -related factors are increased in synovial tissue and vasculature of rheumatoid arthritic joints. *Arthritis Res Ther* 2012;**14**:R245. doi:10.1186/ar4088
- 111 Barrow AD, Raynal N, Andersen TL, *et al.* OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J Clin Invest* 2011;**121**:3505–16. doi:10.1172/JCI45913
- 112 Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKEy Rep* 2014;**3**:495. doi:10.1038/bonekey.2013.229
- 113 Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, *et al.* Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* 2006;**85**:195–202. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.008
- 114 Mulari MTK, Zhao H, Lakkakorpi PT, *et al.* Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic* 2003;**4**:113–25.
- 115 Coxon FP, Taylor A. Vesicular trafficking in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 2008;**19**:424–33. doi:10.1016/j.semcdb.2008.08.004

- 116 Zaidi M, Troen B, Moonga BS, *et al.* Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy. *J Bone Miner Res* 2001;**16**:1747–9. doi:10.1359/jbmr.2001.16.10.1747
- 117 Pfaff M, Jurdic P. Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin α V β 3. *J Cell Sci* 2001;**114**:2775–86.
- 118 Lysophosphatidic acid signals through multiple receptors in osteoclasts to elevate cytosolic calcium concentration, evoke retraction, and promote c... - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20551326> (accessed 2 Nov 2017).
- 119 Ilvesaro J, Metsikkö K, Väänänen K, *et al.* Polarity of osteoblasts and osteoblast-like UMR-108 cells. *J Bone Miner Res* 1999;**14**:1338–44. doi:10.1359/jbmr.1999.14.8.1338
- 120 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**:143–7.
- 121 Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;**116**:1202–9. doi:10.1172/JCI28551
- 122 Implication de la voie WNT au cours de l'arthrose. <http://www.edimark.fr/lettre-rhumatologue/implication-voie-wnt-cours-arthrose> (accessed 11 Dec 2017).
- 123 Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000;**219**:461–71. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1074>3.0.CO;2-C
- 124 Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, *et al.* BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2008;**283**:29119–25. doi:10.1074/jbc.M801774200
- 125 Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669617> (accessed 10 Nov 2017).
- 126 Liu YH, Tang Z, Kundu RK, *et al.* Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 1999;**205**:260–74. doi:10.1006/dbio.1998.9114
- 127 Hay E, Lemonnier J, Modrowski D, *et al.* N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Physiol* 2000;**183**:117–28. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<117::AID-JCP14>3.0.CO;2-#
- 128 Wu M, Chen G, Li Y-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016;**4**:16009. doi:10.1038/boneres.2016.9

- 129 Moester MJC, Papapoulos SE, Löwik CWGM, *et al.* Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int* 2010;**87**:99–107. doi:10.1007/s00223-010-9372-1
- 130 Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, *et al.* Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *J Bone Miner Res* 2010;**25**:948–59. doi:10.1002/jbmr.14
- 131 McClung MR, Grauer A, Boonen S, *et al.* Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2014;**370**:412–20. doi:10.1056/NEJMoa1305224
- 132 Saag KG, Petersen J, Brandi ML, *et al.* Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 2017;**377**:1417–27. doi:10.1056/NEJMoa1708322
- 133 Liu Y-B, Kharode Y, Bodine PVN, *et al.* LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem* 2010;**109**:794–800. doi:10.1002/jcb.22471
- 134 P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. - PubMed - NCBI. [https://www.ncbi.nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/18519738](https://www.ncbi.nlm.nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/18519738) (accessed 2 Nov 2017).
- 135 Grey A, Banovic T, Naot D, *et al.* Lysophosphatidic acid is an osteoblast mitogen whose proliferative actions involve G(i) proteins and protein kinase C, but not P42/44 mitogen-activated protein kinases. *Endocrinology* 2001;**142**:1098–106. doi:10.1210/endo.142.3.8011
- 136 Mansell JP, Farrar D, Jones S, *et al.* Cytoskeletal reorganisation, 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 and human MG63 osteoblast maturation. *Mol Cell Endocrinol* 2009;**305**:38–46. doi:10.1016/j.mce.2009.02.032
- 137 Gidley J, Openshaw S, Pring ET, *et al.* Lysophosphatidic acid cooperates with 1alpha,25(OH)2D3 in stimulating human MG63 osteoblast maturation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006;**80**:46–61. doi:10.1016/j.prostaglandins.2006.04.001
- 138 Gennero I, Laurencin-Dalicieux S, Conte-Auriol F, *et al.* Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone* 2011;**49**:395–403. doi:10.1016/j.bone.2011.04.018
- 139 Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, *et al.* Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 1998;**13**:1760–7. doi:10.1359/jbmr.1998.13.11.1760
- 140 Gu G, Mulari M, Peng Z, *et al.* Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**335**:1095–101. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.211
- 141 Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;**30**:5–7.

- 142 Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 1998;**3**:346–55.
- 143 Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2014;**94**:25–34. doi:10.1007/s00223-013-9774-y
- 144 Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem* 2002;**85**:185–97.
- 145 Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;**473**:201–9. doi:10.1016/j.abb.2008.03.027
- 146 Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/9811821> (accessed 15 Nov 2017).
- 147 Everts V, Delaissé JM, Korper W, *et al.* The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 2002;**17**:77–90. doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.77
- 148 Tang Y, Wu X, Lei W, *et al.* TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 2009;**15**:757–65. doi:10.1038/nm.1979
- 149 Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol* 2014;**39**:25–32. doi:10.1016/j.matbio.2014.08.009
- 150 Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 2009;**1**:461–8. doi:10.1177/1941738109350438
- 151 Kehlen A, Pachnio A, Thiele K, *et al.* Gene expression induced by interleukin-17 in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis: upregulation of hyaluronan-binding protein TSG-6. *Arthritis Res Ther* 2003;**5**:R186-192. doi:10.1186/ar762
- 152 Singh JA, Arayssi T, Duray P, *et al.* Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. *Ann Rheum Dis* 2004;**63**:785–90. doi:10.1136/ard.2003.013383
- 153 Smith MD, Barg E, Weedon H, *et al.* Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis* 2003;**62**:303–7.
- 154 Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;**2**:777–80. doi:10.1038/ni0901-777
- 155 Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2003;**2**:119–25.

- 156 McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;**365**:2205–19. doi:10.1056/NEJMr1004965
- 157 Schett G. Joint remodelling in inflammatory disease. *Ann Rheum Dis* 2007;**66** Suppl 3:iii42–44. doi:10.1136/ard.2007.078972
- 158 Toussiro E, Auge B, Tiberghien P, *et al.* HLA-DRB1 alleles and shared amino acid sequences in disease susceptibility and severity in patients from eastern France with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;**26**:1446–51.
- 159 Meyer JM, Evans TI, Small RE, *et al.* HLA-DRB1 genotype influences risk for and severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;**26**:1024–34.
- 160 Raslan HM, Attia HR, Salama I, *et al.* Association of PTPN22 1858C→T polymorphism, HLA-DRB1 shared epitope and autoantibodies with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2016;**36**:1167–75. doi:10.1007/s00296-016-3511-6
- 161 Doody KM, Bussi res-Marmen S, Li A, *et al.* T cell protein tyrosine phosphatase deficiency results in spontaneous synovitis and subchondral bone resorption in mice. *Arthritis Rheum* 2012;**64**:752–61. doi:10.1002/art.33399
- 162 Okada Y, Terao C, Ikari K, *et al.* Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* 2012;**44**:511–6. doi:10.1038/ng.2231
- 163 Suzuki T, Ikari K, Yano K, *et al.* PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PLoS ONE* 2013;**8**:e61045. doi:10.1371/journal.pone.0061045
- 164 Anderson R, Meyer PWA, Ally MMTM, *et al.* Smoking and Air Pollution as Pro-Inflammatory Triggers for the Development of Rheumatoid Arthritis. *Nicotine Tob Res* 2016;**18**:1556–65. doi:10.1093/ntr/ntw030
- 165 Totaro MC, Cattani P, Ria F, *et al.* Porphyromonas gingivalis and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. *Arthritis Res Ther* 2013;**15**:R66. doi:10.1186/ar4243
- 166 Mahabadi M, Faghihiloo E, Alishiri GH, *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Electron Physician* 2016;**8**:2181–6. doi:10.19082/2181
- 167 Mourgues C, Henquell C, Tatar Z, *et al.* Monitoring of Epstein-Barr virus (EBV)/cytomegalovirus (CMV)/varicella-zoster virus (VZV) load in patients receiving tocilizumab for rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2016;**83**:412–5. doi:10.1016/j.jbspin.2015.07.009
- 168 Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, *et al.* Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol* 2010;**6**:727–30. doi:10.1038/nrrheum.2010.139

- 169 Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 1990;**33**:768–73.
- 170 Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995;**155**:5483–6.
- 171 Yamanishi Y, Firestein GS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes. *Rheum Dis Clin North Am* 2001;**27**:355–71.
- 172 Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;**423**:356–61. doi:10.1038/nature01661
- 173 Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, *et al.* Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev* 2017;**97**:1295–349. doi:10.1152/physrev.00036.2016
- 174 Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:787–9. doi:10.1136/ard.2009.121657
- 175 Kleyer A, Schett G. Arthritis and bone loss: a hen and egg story. *Curr Opin Rheumatol* 2014;**26**:80–4. doi:10.1097/BOR.0000000000000007
- 176 Fouque-Aubert A, Boutroy S, Marotte H, *et al.* Assessment of hand bone loss in rheumatoid arthritis by high-resolution peripheral quantitative CT. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:1671–6. doi:10.1136/ard.2009.114512
- 177 Barnabe C, Feehan L, SPECTRA (Study Group for XTrEme-CT in RA). High-resolution peripheral quantitative computed tomography imaging protocol for metacarpophalangeal joints in inflammatory arthritis: the SPECTRA collaboration. *J Rheumatol* 2012;**39**:1494–5. doi:10.3899/jrheum.120218
- 178 Arain SR, Riaz A, Nazir L, *et al.* LOW BONE MINERAL DENSITY AMONG PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED RHEUMATOID ARTHRITIS. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2016;**28**:175–8.
- 179 Kleyer A, Finzel S, Rech J, *et al.* Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;**73**:854–60. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202958
- 180 Kleyer A, Krieter M, Oliveira I, *et al.* High prevalence of tenosynovial inflammation before onset of rheumatoid arthritis and its link to progression to RA-A combined MRI/CT study. *Semin Arthritis Rheum* 2016;**46**:143–50. doi:10.1016/j.semarthrit.2016.05.002
- 181 Harre U, Georgess D, Bang H, *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 2012;**122**:1791–802. doi:10.1172/JCI60975
- 182 van der Woude D, Rantapää-Dahlqvist S, Ioan-Facsinay A, *et al.* Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before

- disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:1554–61. doi:10.1136/ard.2009.124537
- 183 Dougados M, Etcheto A, Molto A, *et al.* Clinical presentation of patients suffering from recent onset chronic inflammatory back pain suggestive of spondyloarthritis: The DESIR cohort. *Joint Bone Spine* 2015;**82**:345–51. doi:10.1016/j.jbspin.2015.02.006
 - 184 Carron P, Van Praet L, Van den Bosch F. Peripheral manifestations in spondyloarthritis: relevance for diagnosis, classification and follow-up. *Curr Opin Rheumatol* 2012;**24**:370–4. doi:10.1097/BOR.0b013e32835448de
 - 185 Sève P, Kodjikian L, Adélaïde L, *et al.* Uveitis in adults: What do rheumatologists need to know? *Joint Bone Spine* 2015;**82**:308–14. doi:10.1016/j.jbspin.2015.06.002
 - 186 Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today* 1990;**11**:137–42.
 - 187 May E, Dorris ML, Satumtira N, *et al.* CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* 2003;**170**:1099–105.
 - 188 Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, *et al.* Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:1977–84. doi:10.1002/art.24599
 - 189 Turner MJ, Sowders DP, DeLay ML, *et al.* HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response. *J Immunol* 2005;**175**:2438–48.
 - 190 DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, *et al.* HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:2633–43. doi:10.1002/art.24763
 - 191 Goodall JC, Wu C, Zhang Y, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:17698–703. doi:10.1073/pnas.1011736107
 - 192 Kollnberger S, Bird L, Sun M-Y, *et al.* Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:2972–82. doi:10.1002/art.10605
 - 193 Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, *et al.* HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J Immunol* 2004;**173**:1699–710.
 - 194 Gaffen SL, Jain R, Garg AV, *et al.* The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:585–600. doi:10.1038/nri3707

- 195 Paradowska-Gorycka A, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, *et al.* IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2010;**71**:134–45. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02361.x
- 196 Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille JD, Sims A-M, *et al.* Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;**42**:123–7. doi:10.1038/ng.513
- 197 Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;**314**:1461–3. doi:10.1126/science.1135245
- 198 Mei Y, Pan F, Gao J, *et al.* Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2011;**30**:269–73. doi:10.1007/s10067-010-1647-4
- 199 Oppmann B, Lesley R, Blom B, *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;**13**:715–25.
- 200 Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, *et al.* Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;**278**:1910–4. doi:10.1074/jbc.M207577200
- 201 Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;**198**:1951–7. doi:10.1084/jem.20030896
- 202 Parham C, Chirica M, Timans J, *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002;**168**:5699–708.
- 203 Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;**8**:950–7. doi:10.1038/ni1497
- 204 Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;**204**:1849–61. doi:10.1084/jem.20070663
- 205 McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, *et al.* TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;**8**:1390–7. doi:10.1038/ni1539
- 206 Chen Z, Tato CM, Muul L, *et al.* Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:2936–46. doi:10.1002/art.22866
- 207 Appel H, Maier R, Wu P, *et al.* Analysis of IL-17(+) cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res Ther* 2011;**13**:R95. doi:10.1186/ar3370

- 208 Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, *et al.* IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ ⁺ CD3⁺CD4⁺CD8[−] enthesal resident T cells. *Nature Medicine* 2012;**18**:1069. doi:10.1038/nm.2817
- 209 Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010;**330**:1768–73. doi:10.1126/science.1195568
- 210 Van Praet L, Van den Bosch FE, Jacques P, *et al.* Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model. *Ann Rheum Dis* 2013;**72**:414–7. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202135
- 211 Lories RJ, McInnes IB. Primed for inflammation: enthesitis-resident T cells. *Nature Medicine* 2012;**18**:1018. doi:10.1038/nm.2854
- 212 Tan S, Yao J, Flynn JA, *et al.* Dynamics of syndesmophyte growth in AS as measured by quantitative CT: heterogeneity within and among vertebral disc spaces. *Rheumatology (Oxford)* 2015;**54**:972–80. doi:10.1093/rheumatology/keu423
- 213 Tan S, Yao J, Flynn JA, *et al.* Quantitative syndesmophyte measurement in ankylosing spondylitis using CT: longitudinal validity and sensitivity to change over 2 years. *Ann Rheum Dis* 2015;**74**:437–43. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203946
- 214 Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, *et al.* Bone Resorbing Activity in Supernatant Fluid from Cultured Human Peripheral Blood Leukocytes. *Science* 1972;**177**:793–5. doi:10.1126/science.177.4051.793
- 215 Mundy GR, Raisz LG, Cooper RA, *et al.* Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma. *N Engl J Med* 1974;**291**:1041–6. doi:10.1056/NEJM197411142912001
- 216 Speziani C, Rivollier A, Gallois A, *et al.* Murine dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts is differentially regulated by innate and adaptive cytokines. *Eur J Immunol* 2007;**37**:747–57. doi:10.1002/eji.200636534
- 217 Alnaeeli M, Penninger JM, Teng Y-TA. Immune interactions with CD4⁺ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c⁺ dendritic cells. *J Immunol* 2006;**177**:3314–26.
- 218 Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;**390**:175–9. doi:10.1038/36593
- 219 Wong BR, Josien R, Lee SY, *et al.* TRANCE (Tumor Necrosis Factor [TNF]-related Activation-induced Cytokine), a New TNF Family Member Predominantly Expressed in T cells, Is a Dendritic Cell-specific Survival Factor. *Journal of Experimental Medicine* 1997;**186**:2075–80. doi:10.1084/jem.186.12.2075

- 220 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *PNAS* 1998;**95**:3597–602.
- 221 Kotake S, Nanke Y, Yago T, *et al.* Human osteoclastogenic T cells and human osteoclastology. *Arthritis & Rheumatism* 2009;**60**:3158–63. doi:10.1002/art.24886
- 222 Sato K, Suematsu A, Okamoto K, *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;**203**:2673–82. doi:10.1084/jem.20061775
- 223 Komatsu N, Takayanagi H. Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Adv Immunol* 2012;**115**:45–71. doi:10.1016/B978-0-12-394299-9.00002-3
- 224 Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford)* 2008;**47**:1635–40. doi:10.1093/rheumatology/ken363
- 225 van Staa TP, Geusens P, Bijlsma JWW, *et al.* Clinical assessment of the long-term risk of fracture in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;**54**:3104–12. doi:10.1002/art.22117
- 226 Garnero P, Landewé R, Boers M, *et al.* Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA study. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:2847–56. doi:10.1002/art.10616
- 227 Redlich K, Hayer S, Maier A, *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:785–92. doi:10.1002/art.10097
- 228 Schett G, Redlich K, Hayer S, *et al.* Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis & Rheumatism* 2003;**48**:2042–51. doi:10.1002/art.11150
- 229 Herrak P, Görtz B, Hayer S, *et al.* Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:2327–37. doi:10.1002/art.20384
- 230 Sims NA, Green JR, Glatt M, *et al.* Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:2338–46. doi:10.1002/art.20382
- 231 Stewart A, Mackenzie LM, Black AJ, *et al.* Predicting erosive disease in rheumatoid arthritis. A longitudinal study of changes in bone density using digital X-ray radiogrammetry: a pilot study. *Rheumatology (Oxford)* 2004;**43**:1561–4. doi:10.1093/rheumatology/keh385

- 232 Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, *et al.* Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000;**43**:250–8. doi:10.1002/1529-0131(200002)43:2<250::AID-ANR3>3.0.CO;2-P
- 233 Pettit AR, Ji H, von Stechow D, *et al.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001;**159**:1689–99. doi:10.1016/S0002-9440(10)63016-7
- 234 Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, *et al.* A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**240**:279–86. doi:10.1006/bbrc.1997.7404
- 235 Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, *et al.* RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 2016;**75**:1187–95. doi:10.1136/annrheumdis-2014-207137
- 236 Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, *et al.* Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**275**:768–75. doi:10.1006/bbrc.2000.3379
- 237 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000;**191**:275–86.
- 238 Lam J, Takeshita S, Barker JE, *et al.* TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000;**106**:1481–8. doi:10.1172/JCI11176
- 239 Yao Z, Li P, Zhang Q, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem* 2006;**281**:11846–55. doi:10.1074/jbc.M512624200
- 240 Shaw AT, Maeda Y, Gravallesse EM. IL-17A deficiency promotes periosteal bone formation in a model of inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016;**18**:104. doi:10.1186/s13075-016-0998-x
- 241 Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;**13**:235. doi:10.1186/ar3380
- 242 Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, *et al.* IL-1 β and TNF α -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol* 2011;**23**:701–12. doi:10.1093/intimm/dxr077
- 243 Wong PKK, Quinn JMW, Sims NA, *et al.* Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives

- inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2006;**54**:158–68. doi:10.1002/art.21537
- 244 Kotake S, Sato K, Kim KJ, *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 1996;**11**:88–95. doi:10.1002/jbmr.5650110113
 - 245 Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, *et al.* Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice. *J Immunol* 2004;**172**:577–84.
 - 246 Horai R, Saijo S, Tanioka H, *et al.* Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 2000;**191**:313–20.
 - 247 Bresnihan B. Anakinra as a new therapeutic option in rheumatoid arthritis: clinical results and perspectives. *Clin Exp Rheumatol* 2002;**20**:S32–34.
 - 248 Bax M, Huizinga TWJ, Toes REM. The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 2014;**36**:313–25. doi:10.1007/s00281-014-0429-5
 - 249 Baka Z, György B, Géher P, *et al.* Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine* 2012;**79**:431–6. doi:10.1016/j.jbspin.2012.01.008
 - 250 Toes REM, Huizinga TJW. Update on autoantibodies to modified proteins. *Curr Opin Rheumatol* 2015;**27**:262–7. doi:10.1097/BOR.0000000000000166
 - 251 Van Steendam K, Tilleman K, De Ceuleneer M, *et al.* Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res Ther* 2010;**12**:R132. doi:10.1186/ar3070
 - 252 Mathsson L, Lampa J, Mullazehi M, *et al.* Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce Fcγ₃ receptor IIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor-α by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res Ther* 2006;**8**:R64. doi:10.1186/ar1926
 - 253 Clavel C, Nogueira L, Laurent L, *et al.* Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor α through Fcγ₃ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:678–88. doi:10.1002/art.23284
 - 254 Harre U, Lang SC, Pfeifle R, *et al.* Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. *Nat Commun* 2015;**6**:6651. doi:10.1038/ncomms7651
 - 255 Seeling M, Hillen hoff U, David JP, *et al.* Inflammatory monocytes and Fcγ receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory

- arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;**110**:10729–34. doi:10.1073/pnas.1301001110
- 256 Diarra D, Stolina M, Polzer K, *et al.* Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;**13**:156–63. doi:10.1038/nm1538
 - 257 Garnero P, Tabassi NC-B, Voorzanger-Rousselot N. Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol* 2008;**35**:2313–5.
 - 258 Seror R, Boudaoud S, Pavy S, *et al.* Increased Dickkopf-1 in Recent-onset Rheumatoid Arthritis is a New Biomarker of Structural Severity. Data from the ESPOIR Cohort. *Sci Rep* 2016;**6**:18421. doi:10.1038/srep18421
 - 259 Juarez M, McGettrick HM, Scheel-Toellner D, *et al.* DKK1 expression by synovial fibroblasts in very early rheumatoid arthritis associates with lymphocyte adhesion in an in vitro flow co-culture system. *Arthritis Res Ther* 2016;**18**:14. doi:10.1186/s13075-016-0915-3
 - 260 Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, *et al.* Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1987;**2**:559–65. doi:10.1002/jbmr.5650020612
 - 261 Lories RJU, Schett G. Pathophysiology of new bone formation and ankylosis in spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2012;**38**:555–67. doi:10.1016/j.rdc.2012.08.003
 - 262 Lories RJU, Derese I, Luyten FP. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest* 2005;**115**:1571–9. doi:10.1172/JCI23738
 - 263 Joo YB, Bang S-Y, Kim T-H, *et al.* Bone morphogenetic protein 6 polymorphisms are associated with radiographic progression in ankylosing spondylitis. *PLoS ONE* 2014;**9**:e104966. doi:10.1371/journal.pone.0104966
 - 264 Xie Z, Wang P, Li Y, *et al.* Imbalance Between Bone Morphogenetic Protein 2 and Noggin Induces Abnormal Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)* 2016;**68**:430–40. doi:10.1002/art.39433
 - 265 Santos AN, Riemann D, Santos AN, *et al.* Treatment of fibroblast-like synoviocytes with IFN-gamma results in the down-regulation of autotaxin mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;**229**:419–24. doi:10.1006/bbrc.1996.1819
 - 266 Kehlen A, Lauterbach R, Santos AN, *et al.* IL-1 beta- and IL-4-induced down-regulation of autotaxin mRNA and PC-1 in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 2001;**123**:147–54.
 - 267 Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, *et al.* Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med* 2012;**209**:925–33. doi:10.1084/jem.20112012

- 268 Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, *et al.* Necessity of lysophosphatidic acid receptor 1 for development of arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;**65**:2037–47. doi:10.1002/art.37991
- 269 Nochi H, Tomura H, Tobo M, *et al.* Stimulatory role of lysophosphatidic acid in cyclooxygenase-2 induction by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in fibroblast-like synovial cells. *J Immunol* 2008;**181**:5111–9.
- 270 Zhao C, Fernandes MJ, Prestwich GD, *et al.* Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synoviocytes: implications for rheumatoid arthritis? *Mol Pharmacol* 2008;**73**:587–600. doi:10.1124/mol.107.038216
- 271 Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, *et al.* Activation of fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis via lysophosphatidic acid-lysophosphatidic acid receptor 1 cascade. *Arthritis Res Ther* 2014;**16**:461. doi:10.1186/s13075-014-0461-9
- 272 Orosa B, González A, Mera A, *et al.* Lysophosphatidic acid receptor 1 suppression sensitizes rheumatoid fibroblast-like synoviocytes to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Arthritis Rheum* 2012;**64**:2460–70. doi:10.1002/art.34443
- 273 Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, *et al.* Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980;**283**:666–8.
- 274 Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, *et al.* A new mouse model of rheumatoid arthritis: organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Ryumachi* 1997;**37**:147.
- 275 Keffer J, Probert L, Cazlaris H, *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;**10**:4025–31.
- 276 Nikitopoulou I, Kaffe E, Sevastou I, *et al.* A metabolically-stabilized phosphonate analog of lysophosphatidic acid attenuates collagen-induced arthritis. *PLoS ONE* 2013;**8**:e70941. doi:10.1371/journal.pone.0070941
- 277 Orosa B, García S, Martínez P, *et al.* Lysophosphatidic acid receptor inhibition as a new multipronged treatment for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;**73**:298–305. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202832
- 278 Cohen G, Gossec L, Dougados M, *et al.* Radiological damage in patients with rheumatoid arthritis on sustained remission. *Ann Rheum Dis* 2007;**66**:358–63. doi:10.1136/ard.2006.057497
- 279 Molenaar ETH, Voskuyl AE, Dinant HJ, *et al.* Progression of radiologic damage in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:36–42. doi:10.1002/art.11481

- 280 Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, *et al.* Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998;**152**:943–51.
- 281 Schett G, Hayer S, Zwerina J, *et al.* Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005;**1**:47–54. doi:10.1038/ncprheum0036
- 282 Bromley M, Woolley DE. Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 1984;**27**:968–75.
- 283 Deodhar A, Dore RK, Mandel D, *et al.* Denosumab-mediated increase in hand bone mineral density associated with decreased progression of bone erosion in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;**62**:569–74. doi:10.1002/acr.20004
- 284 Cohen SB, Dore RK, Lane NE, *et al.* Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:1299–309. doi:10.1002/art.23417
- 285 Marotte H, Miossec P. Prevention of bone mineral density loss in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNFalpha therapy. *Biologics* 2008;**2**:663–9.
- 286 Muñoz-Ortego J, Vestergaard P, Rubio JB, *et al.* Ankylosing spondylitis is associated with an increased risk of vertebral and nonvertebral clinical fractures: a population-based cohort study. *J Bone Miner Res* 2014;**29**:1770–6. doi:10.1002/jbmr.2217
- 287 Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, *et al.* Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:7375–9.
- 288 Piguet PF, Grau GE, Vesin C, *et al.* Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 1992;**77**:510–4.
- 289 Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:9784–8.
- 290 Shealy DJ, Wooley PH, Emmell E, *et al.* Anti-TNF-alpha antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res* 2002;**4**:R7. doi:10.1186/ar430
- 291 van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, *et al.* Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:1324–31. doi:10.1002/art.23471
- 292 van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X, *et al.* Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:3063–70. doi:10.1002/art.23901

- 293 van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, *et al.* Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res Ther* 2009;**11**:R127. doi:10.1186/ar2794
- 294 Kollias G. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 2005;**34**:3–6. doi:10.1016/j.semarthrit.2005.01.002
- 295 Redlich K, Görtz B, Hayer S, *et al.* Overexpression of tumor necrosis factor causes bilateral sacroiliitis. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:1001–5. doi:10.1002/art.20194
- 296 Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, *et al.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 2007;**130**:811–23. doi:10.1016/j.cell.2007.07.025
- 297 Monach PA, Mathis D, Benoist C. The K/BxN arthritis model. *Curr Protoc Immunol* 2008;**Chapter 15**:Unit 15.22. doi:10.1002/0471142735.im1522s81
- 298 Fox MA, Colello RJ, Macklin WB, *et al.* Phosphodiesterase-lalpha/autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol Cell Neurosci* 2003;**23**:507–19.
- 299 Schett G, Gravalles E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 2012;**8**:656–64. doi:10.1038/nrrheum.2012.153
- 300 Nishioka T, Arima N, Kano K, *et al.* ATX-LPA1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation. *Sci Rep* 2016;**6**:23433. doi:10.1038/srep23433
- 301 Goldring SR. Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? *J Rheumatol Suppl* 2002;**65**:44–8.
- 302 Lee J-M, Park H, Noh ALSM, *et al.* 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Immunol* 2012;**189**:5284–92. doi:10.4049/jimmunol.1003738
- 303 van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, *et al.* Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun* 1999;**67**:3824–9.
- 304 Schilling E, Weiss R, Grahnert A, *et al.* Molecular mechanism of LPS-induced TNF- α biosynthesis in polarized human macrophages. *Mol Immunol* 2018;**93**:206–15. doi:10.1016/j.molimm.2017.11.026
- 305 Wu J-M, Xu Y, Skill NJ, *et al.* Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2010;**9**:71. doi:10.1186/1476-4598-9-71

- 306 Georgess D, Mazzorana M, Terrado J, *et al.* Comparative transcriptomics reveals RhoE as a novel regulator of actin dynamics in bone-resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell* 2014;**25**:380–96. doi:10.1091/mbc.E13-07-0363
- 307 Gupte R, Patil R, Liu J, *et al.* Benzyl and naphthalene methylphosphonic acid inhibitors of autotaxin with anti-invasive and anti-metastatic activity. *ChemMedChem* 2011;**6**:922–35. doi:10.1002/cmdc.201000425
- 308 Benesch MGK, Tang X, Maeda T, *et al.* Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. *FASEB J* 2014;**28**:2655–66. doi:10.1096/fj.13-248641
- 309 Benesch MGK, Ko YM, Tang X, *et al.* Autotaxin is an inflammatory mediator and therapeutic target in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015;**22**:593–607. doi:10.1530/ERC-15-0045
- 310 Sawae Y, Sahara T, Sasaki T. Osteoclast differentiation at growth plate cartilage-trabecular bone junction in newborn rat femur. *J Electron Microsc* (Tokyo) 2003;**52**:493–502.
- 311 Klingberg E, Lorentzon M, Göthlin J, *et al.* Bone microarchitecture in ankylosing spondylitis and the association with bone mineral density, fractures, and syndesmophytes. *Arthritis Res Ther* 2013;**15**:R179. doi:10.1186/ar4368
- 312 Redlich K, Görtz B, Hayer S, *et al.* Repair of Local Bone Erosions and Reversal of Systemic Bone Loss Upon Therapy with Anti-Tumor Necrosis Factor in Combination with Osteoprotegerin or Parathyroid Hormone in Tumor Necrosis Factor-Mediated Arthritis. *The American Journal of Pathology* 2004;**164**:543–55. doi:10.1016/S0002-9440(10)63144-6
- 313 Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, *et al.* Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2009;**24**:1572–85. doi:10.1359/jbmr.090320
- 314 Baraliakos X, Heldmann F, Callhoff J, *et al.* Which spinal lesions are associated with new bone formation in patients with ankylosing spondylitis treated with anti-TNF agents? A long-term observational study using MRI and conventional radiography. *Ann Rheum Dis* 2014;**73**:1819–25. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203425
- 315 Machado PM, Baraliakos X, van der Heijde D, *et al.* MRI vertebral corner inflammation followed by fat deposition is the strongest contributor to the development of new bone at the same vertebral corner: a multilevel longitudinal analysis in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2016;**75**:1486–93. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208011
- 316 Jacques P, Lambrecht S, Verheugen E, *et al.* Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells. *Ann Rheum Dis* 2014;**73**:437–45. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203643

- 317 Lories RJU, Derese I, de Bari C, *et al.* Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodeling in a mouse model of spondylarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2007;**56**:489–97. doi:10.1002/art.22372
- 318 Maksymowych WP, Chiowchanwisawakit P, Clare T, *et al.* Inflammatory lesions of the spine on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis: evidence of a relationship between inflammation and new bone formation. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:93–102. doi:10.1002/art.24132
- 319 Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis. *Front Immunol* 2014;**5**:48. doi:10.3389/fimmu.2014.00048
- 320 Uluçkan Ö, Wagner EF. Role of IL-17A signalling in psoriasis and associated bone loss. *Clin Exp Rheumatol* 2016;**34**:17–20.
- 321 Ono T, Okamoto K, Nakashima T, *et al.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nature Communications* 2016;**7**:10928. doi:10.1038/ncomms10928
- 322 Osta B, Lavocat F, Eljaafari A, *et al.* Effects of Interleukin-17A on Osteogenic Differentiation of Isolated Human Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol* 2014;**5**:425. doi:10.3389/fimmu.2014.00425
- 323 Lavocat F, Osta B, Miossec P. Increased sensitivity of rheumatoid synoviocytes to Schnurri-3 expression in TNF- α and IL-17A induced osteoblastic differentiation. *Bone* 2016;**87**:89–96. doi:10.1016/j.bone.2016.04.008
- 324 Ebihara S, Date F, Dong Y, *et al.* Interleukin-17 is a critical target for the treatment of ankylosing enthesitis and psoriasis-like dermatitis in mice. *Autoimmunity* 2015;**48**:259–66. doi:10.3109/08916934.2014.976630
- 325 Baeten D, Sieper J, Braun J, *et al.* Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N Engl J Med* 2015;**373**:2534–48. doi:10.1056/NEJMoa1505066
- 326 Braun J, Baraliakos X, Deodhar A, *et al.* Effect of secukinumab on clinical and radiographic outcomes in ankylosing spondylitis: 2-year results from the randomised phase III MEASURE 1 study. *Ann Rheum Dis* 2017;**76**:1070–7. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209730
- 327 Carpio LC, Stephan E, Kamer A, *et al.* Sphingolipids stimulate cell growth via MAP kinase activation in osteoblastic cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 1999;**61**:267–73. doi:10.1054/plef.1999.0100
- 328 Ryu J, Kim HJ, Chang E-J, *et al.* Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast–osteoblast coupling. *The EMBO Journal* 2006;**25**:5840–51. doi:10.1038/sj.emboj.7601430
- 329 Bougault C, Jamal AE, Briolay A, *et al.* Involvement of sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate metabolic pathway in spondyloarthritis. *Bone* 2017;**103**:150–8. doi:10.1016/j.bone.2017.07.002

- 330 Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis* 2017;**76**:960–77. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210715
- 331 Heller JE, Shadick NA. Outcomes in rheumatoid arthritis: incorporating the patient perspective. *Curr Opin Rheumatol* 2007;**19**:101–5. doi:10.1097/BOR.0b013e32802bf79d
- 332 Kremer JM, Genant HK, Moreland LW, *et al.* Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;**144**:865–76.
- 333 Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, *et al.* Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 2008;**371**:987–97. doi:10.1016/S0140-6736(08)60453-5
- 334 Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, *et al.* A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 1999;**340**:253–9. doi:10.1056/NEJM199901283400401
- 335 Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, *et al.* Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003;**48**:35–45. doi:10.1002/art.10697
- 336 Brown AK, Conaghan PG, Karim Z, *et al.* An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:2958–67. doi:10.1002/art.23945
- 337 Hwang J, Lee E-K, Ahn JK, *et al.* Bone-density testing interval and transition to osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int* 2017;**28**:231–7. doi:10.1007/s00198-016-3703-7
- 338 Bugatti S, Bogliolo L, Vitolo B, *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies and high levels of rheumatoid factor are associated with systemic bone loss in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016;**18**:226. doi:10.1186/s13075-016-1116-9
- 339 Tada M, Inui K, Sugioka Y, *et al.* Use of bisphosphonate might be important to improve bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis even under tight control: the TOMORROW study. *Rheumatol Int* 2017;**37**:999–1005. doi:10.1007/s00296-017-3720-7
- 340 Ahn H-J, Yang H, An B-S, *et al.* Expression and regulation of Enpp2 in rat uterus during the estrous cycle. *J Vet Sci* 2011;**12**:379–85.
- 341 Takeo C, Ikeda K, Horie-Inoue K, *et al.* Identification of Igf2, Igfbp2 and Enpp2 as estrogen-responsive genes in rat hippocampus. *Endocr J* 2009;**56**:113–20.

