



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité :
IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue par

Myriam HAYDER

Le Vendredi 2 Septembre 2011

Titre :

Utilisation d'un Dendrimère Phosphoré comme une Nouvelle Approche Thérapeutique de la Polyarthrite Rhumatoïde

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

INSERM U1043

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Jean-Luc DAVIGNON

Pr. Rémy POUPOT

Rapporteurs :

Pr. Cem GABAY

Dr. Claudine BLIN

Membre(s) du jury :

Pr. Roland LIBLAU (Toulouse) : Président du Jury

Pr. Cem GABAY (Genève) : Rapporteur

Dr. Claudine BLIN (Nice) : Rapporteur

Pr. Jacques-Eric GOTTENBERG (Strasbourg): Examineur

Dr. Jean-Luc DAVIGNON / Pr. Rémy POUPOT (Toulouse) : Co-Directeurs de Thèse

Dr. Mary POUPOT (Toulouse) : Membre invité

“As in all arts, the enjoyment increases with the knowledge of the art”

Ernest Hemingway

*Je dédie ce travail
à Farès, l’amour de ma vie
à Nour, mon trésor
à ceux qui me soutiennent tous les jours*

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr. Roland Liblau qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également le Pr. Cem Gabay et le Dr. Claudine Blin, en tant que rapporteurs, ainsi que le Pr. Jacques-Eric Gottenberg, en tant qu'examinateur, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Jean-Luc Davignon, pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour l'environnement de travail qu'il m'a offert et surtout pour m'avoir appris le métier de chercheur.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, Rémy Poupot, pour m'avoir fait découvrir le monde des dendrimères, pour sa franchise, pour sa pédagogie et surtout pour le pragmatisme dont il a fait preuve durant ces quatre années.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mary Poupot pour sa disponibilité, pour sa grande patience et surtout pour tout ce qu'elle m'a appris. Bien qu'elle ne soit ma directrice de thèse de façon officielle, je considère qu'elle l'a été tout autant que Jean-Luc Davignon et Rémy Poupot.

Mes remerciements s'adressent également au Dr. Jean-Jacques Fournié pour m'avoir accueilli dans son labo, pour m'avoir encouragé tout au long de cette thèse et surtout pour ses idées, que je considérais parfois extravagantes, mais qui ont été essentielles pour publier mon article.

Je tiens à remercier aussi le Pr. Alain Cantagrel pour tout le soutien qu'il m'a apporté, notamment au niveau de la Société Française de Rhumatologie, mais aussi pour ses critiques constructives qui m'ont permis d'avancer.

Je remercie aussi Michel Baron pour toute l'aide qu'il m'a apportée et pour avoir su m'écouter et me conseiller.

Je tiens à remercier également le Dr. Arnaud Constantin et le Dr. Jean-Frédéric Boyer pour leurs encouragements.

Je remercie Delphine Nigon pour toute l'aide qu'elle m'a apportée sur les tests statistiques.

Je remercie Eric Clottes pour m'avoir donné l'opportunité de faire des vacances de Biochimie. C'était une expérience très enrichissante.

Je tiens à remercier Claude Maranges, mon directeur d'études à l'INSA, pour tout le soutien qu'il m'a apporté depuis mon arrivée en France.

Je remercie aussi Pascal Swider du Laboratoire de Biomécanique et Manuel Marcoux de l'Institut de Mécanique des Fluides pour m'avoir initié au Scan micro-CT.

Je remercie tous les membres de l'équipe Jean-Jacques Fournié, les anciens (Nico, Aude-Hélène, Séverine, Emilie D, Yovan, Emilie-Fleur...) ainsi que les nouveaux arrivants (Caro, Marie T, Fred, ...).

Je remercie les membres de l'équipe Jean-Pierre Salles et plus particulièrement Sana, Isabelle et Fabienne.

Je remercie également toutes les personnes travaillant au Bâtiment C et plus particulièrement Michel Nauze pour m'avoir appris les prélèvements sanguins chez la souris.

Je tiens à remercier également tout le personnel des plateformes de zootechnie (Maryline, Pierre, Patrick, Audrey, Cindy, Aline), d'histopathologie (Florence et Talal), d'imagerie (Sophie et Daniel) et de cytométrie (Fatima) de Purpan.

Résumé

Les dendrimères sont des molécules de synthèse qui trouvent leurs applications dans plusieurs domaines, notamment biomédical. Il a été montré que le dendrimère phosphoré ABP a la propriété de se fixer aux monocytes. Il s'ensuit une internalisation du dendrimère et une activation des monocytes vers une voie anti-inflammatoire. Nous avons exploité cette propriété anti-inflammatoire pour évaluer le potentiel thérapeutique du dendrimère ABP dans la Polyarthrite Rhumatoïde, une maladie inflammatoire auto-immune au cours de laquelle les monocytes jouent un rôle majeur. Nous avons montré que l'injection intraveineuse du dendrimère ABP de façon hebdomadaire à une dose de 10 mg/kg supprime totalement l'arthrite développée par les souris IL-1ra^{-/-} au bout de 6 semaines de traitement. Nous avons observé chez les souris IL-1ra^{-/-} traitées par ABP une diminution de l'expression des médiateurs de l'inflammation jusqu'au niveau de celui des souris non arthritiques. Ces observations ont été confirmées sur un autre modèle d'arthrite induite par le transfert de sérum de souris K/BxN. Nous avons également montré que le dendrimère ABP possède des propriétés anti-ostéoclastiques *in vivo*. Nous avons déterminé *in vitro* le mécanisme par lequel le dendrimère ABP inhibe la différenciation des monocytes en ostéoclastes. En effet, nous avons montré que le dendrimère ABP affecte la différenciation des monocytes murins et humains en ostéoclastes en inhibant l'expression du récepteur du M-CSF, c-FMS. Cette étude pré-clinique suggère que le dendrimère ABP pourrait être considéré comme un médicament candidat pour le traitement de la PR.

Mots clés : Arthrite – Dendrimère – Nanothérapie – Souris IL-1ra^{-/-} – Ostéoclaste

Abstract

Dendrimers are synthetic molecules with layered architectures which show promise in several fields, particularly in the biomedical field. It has been reported that an azabisphosphonate (ABP)-capped dendrimer selectively targets monocytes and directs them towards anti-inflammatory activation. We explored this anti-inflammatory property to assess the therapeutic potential of dendrimer ABP in the treatment of Rheumatoid Arthritis, an auto-immune inflammatory disease in which monocytes play an important role. We have shown that weekly intravenous injections of dendrimer ABP at a dose of 10 mg/kg totally inhibited the development of inflammatory arthritis in IL-1ra^{-/-} mice, a model of RA, within 6 weeks. We have shown that the levels of inflammatory cytokines were reduced in ABP-treated IL-1ra^{-/-} mice and reached that of normal mice. These observations were also made in the K/BxN serum-induced arthritis model. We also have shown that dendrimer ABP exhibited anti-osteoclastic properties *in vivo*. We have demonstrated *in vitro* that dendrimer ABP inhibited the differentiation of mice and human monocytes into osteoclasts, by inhibiting the expression of c-FMS, (the M-CSF receptor). This pre-clinical study suggests that dendrimer ABP should be considered as a potential nanotherapeutic for Rheumatoid Arthritis.

Keywords : Arthritis – Dendrimer – Nanotherapy –IL-1ra^{-/-} Mice – Osteoclast

Table des Matières

Liste des abréviations	13
Liste des Figures	17
Liste des Tableaux	18
Avant-Propos	19
INTRODUCTION	21
I. L'inflammation au cours la Polyarthrite Rhumatoïde	23
<i>I.1 Les cellules de la réponse immunitaire innée</i>	<i>25</i>
I.1.1 Les granulocytes	25
I.1.2 Les mastocytes	26
I.1.3 Les plaquettes	28
I.1.4 Les monocytes / macrophages	29
I.1.5 Les cellules dendritiques	30
I.1.6 Les cellules Natural Killer	32
I.1.7 Les cellules NKT	32
<i>I.2 Les cellules de la réponse immunitaire adaptative</i>	<i>33</i>
I.2.1 Les Lymphocytes B	33
I.2.2 Les Lymphocytes T	34
<i>I.3 Les médiateurs de l'inflammation</i>	<i>36</i>
I.3.1 Les auto-anticorps	37
I.3.2 Les cytokines et chimiokines	38
I.3.2.1 Les cytokines pro-inflammatoires	38
I.3.2.2 Les cytokines anti-inflammatoires	42
I.3.2.3 Les chimiokines	43
I.3.3 Les enzymes métalloprotéases	44
<i>I.4 Conclusion</i>	<i>44</i>
II. La résorption osseuse au cours de la Polyarthrite Rhumatoïde	45
<i>II.1 Mécanisme cellulaire de différenciation des ostéoclastes</i>	<i>45</i>
<i>II.2 Mécanisme moléculaire de différenciation des ostéoclastes</i>	<i>47</i>
II.2.1 La prolifération des précurseurs d'ostéoclastes	47
II.2.2 La fusion des précurseurs d'ostéoclastes	48
II.2.2.1 Activation de NF- κ B	51
II.2.2.2 Activation des MAPKs	51

II.2.2.3 Activation de la voie c-Fos/AP-1	51
II.2.2.4 Activation de NFATc1	52
II.3 Mécanisme de destruction cartilagineuse et osseuse	53
II.3.1 La destruction cartilagineuse	53
II.3.2 La destruction osseuse	54
II.4 Conclusion	55
III. Les thérapies de la Polyarthrite Rhumatoïde	56
III.1 Les traitements de fond	57
III.1.1 Le Méthotrexate	57
III.1.2 Le Léflunomide	57
III.1.3 La Sulfasalazine	58
III.2 Les Biothérapies	58
III.2.1 Les biothérapies ciblant des cytokines	59
III.2.1.1 Les anti-TNF- α	59
III.2.1.2 L'IL-1Ra : Anakinra	61
III.2.1.3 L'anti-IL-6R : Tocilizumab	61
III.2.1.4 L'anti-IL-17	62
III.2.1.5 Les anti-CSF	62
III.2.2 Les biothérapies ciblant des cellules	62
III.2.2.1 Le CTLA4-IgG : Abatacept	62
III.2.2.2 L'anti-CD20 : Rituximab	63
III.3 Les nouveaux DMARDs	63
III.3.1 Les inhibiteurs des Spleen Tyrosine Kinases (Syk)	63
III.3.2 Les inhibiteurs des Janus Kinases (JAKs)	63
III.3.3 Les inhibiteurs de p38 MAPK	64
III.4 Conclusion	64
IV. Les modèles murins d'arthrite	65
IV.1 Les modèles d'arthrite induite	65
IV.1.1 Modèle d'arthrite induite au collagène (CIA)	66
IV.1.1.1 Importance du collagène de type II	66
IV.1.1.2 Induction de l'immunité anti-CII	67
IV.1.2 Les modèles de transfert passif	68
IV.1.2.1 Arthrite induite à l'anti-CII	68
IV.1.2.2 Arthrite induite au sérum de souris K/BxN	69
IV.1.3 Les modèles d'arthrite induite à l'antigène	70
IV.1.3.1 Arthrite induite à la BSA	70
IV.1.3.2 Arthrite induite aux adjuvants (pristane ou adjuvant complet de Freund)	71
IV.1.3.3 Arthrite induite au protéoglycane	71
IV.1.3.4 Arthrite induite aux Streptocoques ou modèle SCW (Streptococcal Cell Wall)	71
IV.2 Les modèles d'arthrite spontanée	71

IV.2.1 Le modèle TNF-Tg	72
IV.2.2 Le modèle SKG	73
IV.2.3 Le modèle HLA-Tg	74
IV.2.3.1 Implication du CMH de classe II dans la PR humaine	74
IV.2.3.2 Physiopathologie de l'arthrite chez les souris HLA-Tg	75
IV.2.4 Le modèle K/BxN	76
IV.2.5 Le modèle IL-1ra ^{-/-}	78
IV.2.5.1 Importance de l'IL-1Ra	78
IV.2.5.2 Caractéristiques des souris IL-1ra ^{-/-}	80
IV.2.5.3 Le syndrome auto-inflammatoire DIRA	82
IV.3 Conclusion	82
V. Les dendrimères	83
V.1 Structure et synthèse des dendrimères	83
V.1.1 Structure générale des dendrimères	83
V.1.2 Synthèse des dendrimères	84
V.2 Propriétés des dendrimères	85
V.2.1 La plurivalence	85
V.2.2 La bio-compatibilité	85
V.2.2.1 La Toxicité	86
V.2.2.2 La Dégradation	87
V.3 Applications biomédicales des dendrimères	87
V.3.1 La délivrance d'agents thérapeutiques	87
V.3.2 L'imagerie médicale	88
V.3.3 Les dendrimères bio-capteurs	89
V.3.4 Les thérapies basées sur les dendrimères	89
V.4 Les dendrimères phosphorés	90
V.4.1 Particularités des dendrimères phosphorés	90
V.4.2 Le dendrimère phosphoré à surface acide azabisphosphonique ABP	91
V.5 Conclusion	93

Hayder, M. et al. Anti-Inflammatory Properties of Dendrimers per se. Scientific World Journal, 11, 1367-1382 (2011)

OBJECTIFS DU TRAVAIL **111**

RESULTATS **115**

Hayder, M. et al. A Phosphorus-based Dendrimer Targets Inflammation and Osteoclastogenesis in Experimental Arthritis. Science Translational Medicine 3, 81ra35 (2011)

RESULTATS COMPLEMENTAIRES	147
I. Exploration du potentiel anti-arthritique et anti-inflammatoire du dendrimère ABP	149
I.1 Résultats	150
I.1.1 Paramètres d'administration du dendrimère ABP	150
I.1.1.1 Fréquence d'injection du dendrimère ABP	150
I.1.1.2 Administration du dendrimère ABP par voie orale	151
I.1.2 Exploration du potentiel anti-arthritique du dendrimère ABP	152
I.1.2.1 Inhibition de l'infiltrat inflammatoire	152
I.1.2.2 Inhibition de l'inflammation dans le modèle induit	154
I.2 Matériels & Méthodes	156
I.2.1 Le dendrimère ABP	156
I.2.2 Expérimentation animale	156
I.2.3 Immunohistochimie	156
I.2.4 Dosage des cytokines sériques	157
I.2.5 Analyse statistique	157
II. Réponses cellulaires au dendrimère ABP	159
II.1 Résultats	161
Réponse des DCs au dendrimère ABP	161
II.2 Matériels & Méthodes	163
II.2.1 Le dendrimère ABP	163
II.2.2 Isolement des monocytes humains	163
II.2.3 Génération des DCs immatures	163
II.2.4 Culture d'ostéoclastes à partir de monocytes humains	163
II.2.5 Culture d'ostéoclastes à partir de DCs immatures	164
II.2.6 Evaluation de la résorption osseuse	164
II.2.7 Analyse statistique	164
DISCUSSION & CONCLUSION GENERALE	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171

Liste des abréviations

ACPA : Anti-citrullinated Protein Antibody
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
 α -GalCer : α -galactosylcéramide
AIA : Antigen-Induced Arthritis
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AKT : Serine / Threonine Protein Kinase
 α -MEM medium : Minimum Essential Media α
ANA : Anti-Nuclear Antibodies
AP-1 : Activator Protein -1
ARN (m) : Acide RiboNucléique (messenger)
ATF (a, 2, 3, 4, B-) : Activating Transcription Factor
BAFF : B cell Activating Factor belonging to the TNF family
Bcl-2 : B cell lymphoma –2
BSA : Bovine Serum Albumin
C/EBP α : CCAAT/Enhancer-binding Protein α
CCP : Cyclic Citrullinated Peptide
Cbf β : Core-binding factor β
c-FMS : cellular - Feline McDonough Strain sarcoma virus oncogene homolog
CFU-M : Macrophage-Colony Forming Unit
CIA : Collagen Induced Arthritis
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène
CTAP-3 : Connective Tissue-Activating Protein
CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CT-scan : Computed Tomography-scanner
DAP12 : ITAM-Adapter Protein
DBA/1 : Dilute Brown, non-Agouti mice
DC : Dendritic Cell ou cellule dentritique (p : plasmacytoïde ; m : myéloïde)
DC-STAMP : Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein
DIRA : Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist
DDA : Diméthyl-DioctadecylAmmonium Bromide
DMARDs : Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs

ABREVIATIONS

ECL : ElectroChimioLuminescence
ENA-78 : Epithelial Neutrophil-Activating Protein
ERK : Extracellular Signal-regulated kinase
Fab : Fragment antigen binding
Fc : Fragment constant
Flt3 : FMS-Like Tyrosine kinase 3
Foxp3 : Forkhead box p3
FR : Facteur Rhumatoïde
Fra (-1, -2) : Fos-related antigen
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
GCCM : Glial Cell-conditioned Medium
G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GITR : Glucocorticoïd-induced TNFR-related Receptor
GM-CSF : Granulocyte / Monocyte Colony-Stimulating Factor
gp39 : glycoprotein 39
GPI : Glucose-6-Phosphate Isomérase
Gro ($-\alpha$, $-\beta$) : Growth-regulated oncogene
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HLA : Human Leukocyte Antigen
HSP : heat shock protein
ICAM-1 : IntraCellular Adhesion Molecule -1/3
IFN ($-\gamma$, $-\alpha$) : Interféron
Ig (-A, -E, -M, -G) : Immunoglobuline
 $\text{I}\kappa\text{B}$: Inhibitor of NF- κB
IL (-1, -2, -3, -4, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -15, -17, -18, -21, -23) : Interleukin
IL-1Ra : Interleukin-1 Receptor antagonist
IPC : Interferon Producing Cells
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based activation Motif
JAK : Janus Kinases
LAF-3 : Lymphocyte Activating Factor -3
LB : Lymphocyte B
LED : Lupus Erythémateux Disséminé (ou SLE : Systemic Lupus erythematosus)
LPS : LipoPolySaccharide
LT : Lymphocyte T

ABREVIATIONS

MAPKs : Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein -1
M-CSF : Monocyte Colony-Stimulating Factor
MDP : Muramyl Di-Peptide
MIP-1 : Macrophage Inflammatory Protein -1
MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor
MMPs (-1, -2, -3, -8, -9) : Matrix Metalloproteinases
MSC : Mesenchymal Stem Cells ou Cellules Souches Mésenchymateuses
NFATc1 : Nuclear Factor of activated-T cells, cytoplasmic 1
NF- κ B : Nuclear Factor of κ B
NK cells : Natural Killer cells
NKR : Natural Killer Receptors
NKT cells : Natural Killer T cells
NO : Nitric Oxide
NOD : Non-Obese-Diabetic
ODF : Osteoclast Differentiation Factor
OPG : Osteoprotégérine
OSCAR : Osteoclast Associated Receptor
PAD : Peptidyl-Arginine Désiminase
PAMAM : Poly(Amido)Amines
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PGPS : PeptidoGlycane-PolySaccharide
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PLC γ : PhosphoLipase C γ
PMMH : PhénoxyMéthyl(MéthylHydrazone)
PPI : PolyPropylèneImines
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
RA33 : Ribonucleoprotein A2/B1
RANK / RANKL : Receptor Activator of NF- κ B / Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
ROS : Reactive Oxygen Species
RPMI medium : Roswell Park Memorial Institute medium
SCF : Stem Cell Factor

ABREVIATIONS

SCW : Streptococcal Cell Wall
STAT-6 : Signal Transducer and Activator of Transcription -6
Syk : Spleen tyrosine Kinases
TCR : T Cell Receptor
TGF- β : Transforming Growth Factor - β
Th (-1, -2, -17) : T helper
TIMP : Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases
TLR-2 : Toll-Like Receptor -2
TNF- α : Tumor Necrosis Factor - α
TNFR (I / II) : Tumor Necrosis Factor Receptor (I / II)
TRAF-6 : TNF Receptor-Associated Factor -6
TRAP : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
Treg : regulatory T cells (i : inducible ; n : natural)
UDPGDH : Uridine Di-PhosphoGlucose DiHydrogenase
UMP : Uridine MonoPhosphate
UTR : UnTranslated Region
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule -1
VLA : Very Late Antigen
ZAP-70 : ζ -chain Associated Protein kinase of 70kDa

Liste des Figures

- Figure 1 :** L'inflammation de la membrane synoviale
- Figure 2 :** Rôle des neutrophiles dans l'inflammation articulaire
- Figure 3 :** Illustration simplifiée du rôle des mastocytes dans l'arthrite
- Figure 4 :** Activation des plaquettes au cours de la PR
- Figure 5 :** Rôle des DCs dans la réponse inflammatoire au cours de la PR
- Figure 6 :** Rôle des LB dans la pathogénie de la PR
- Figure 7 :** Rôle des LT dans la pathogénie de la PR
- Figure 8 :** Importance du TNF- α dans la pathogénie de la PR
- Figure 9 :** Différenciation des ostéoclastes à partir des cellules souches hématopoïétiques
- Figure 10 :** Différenciation séquentielle des précurseurs FIt3+ en macrophages, ostéoclastes, DCs, et cellules microgliales
- Figure 11 :** Résumé des mécanismes moléculaires liés à l'activation du récepteur c-Fms
- Figure 12 :** Interactions entre les systèmes immunitaires et osseux à travers RANKL
- Figure 13 :** Mécanisme moléculaire de différenciation des ostéoclastes
- Figure 14 :** Evolution de la PR au cours du temps
- Figure 15 :** Mode d'action des différents traitements de la PR
- Figure 16 :** Actions du TNF- α
- Figure 17 :** Schéma de l'inflammation et de la résorption osseuse développée dans le modèle CIA
- Figure 18 :** Le système du complément est un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative
- Figure 19 :** Modèle de transfert de sérum KRN
- Figure 20 :** Activation des LT CD4+ par la présentation d'antigène dans un contexte HLA de classe II
- Figure 21 :** Mécanisme d'induction de l'arthrite dans le modèle K/BxN
- Figure 22 :** Voies de signalisation activées par les auto-anticorps arthritogéniques anti-GPI
- Figure 23 :** Le système IL-1
- Figure 24 :** Dérégulation de la balance IL-1 / IL-1Ra au cours de la PR
- Figure 25 :** Représentation schématique de la structure d'un dendrimère
- Figure 26 :** Méthodes de synthèse d'un dendrimère
- Figure 27 :** Structure d'un dendrimère PAMAM
- Figure 28 :** Structure d'un dendrimère PPI
- Figure 29 :** Illustration de l'effet des dendrimères conjugués aux glucosamines
- Figure 30 :** Structure du dendrimère bio-actif ABP
- Figure 31 :** Illustration de l'amplification des cellules NK du sang périphérique

Figure 32 : Fréquence d'injection du dendrimère ABP

Figure 33 : Inhibition de l'arthrite par le dendrimère ABP administré par voie orale

Figure 34 : Suppression de l'infiltrat inflammatoire par le dendrimère ABP

Figure 35 : Le dendrimère ABP prévient l'arthrite induite par des transferts répétés de sérum arthritogène

Figure 36 : Le dendrimère ABP inhibe l'inflammation induite par des transferts répétés de sérum arthritogène

Figure 37 : Phénotype des DCs immatures

Figure 38 : Inhibition dose-dépendante de la formation et de l'activité des ostéoclastes par le dendrimère ABP

Liste des Tableaux

Table 1 : Molécules régulant l'expression de RANKL et de l'OPG

Table 2 : Stratégies thérapeutiques ciblant M-CSF et GM-CSF

Table 3 : Similitudes et différences entre le modèle K/BxN et la PR humaine

Table 4 : Incidence de l'arthrite chez les souris *IL-1ra*^{-/-} en fonction du fond génétique

Avant-Propos

Le remodelage osseux est un processus continu tout au long de la vie des vertébrés. Dans ce processus, la moelle osseuse constitue un réservoir compartimenté qui permet aux cellules immunitaires et aux cellules osseuses d'interagir et de s'influencer mutuellement. Par conséquent, l'homéostasie osseuse se trouve souvent influencée par les réponses immunitaires, particulièrement quand le système immunitaire est activé ou dérégulé.

Dans les conditions pathologiques comme la Polyarthrite Rhumatoïde, les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative apportent plusieurs facteurs pro-inflammatoires qui influencent le métabolisme osseux et contribue au déséquilibre de la balance entre les cellules formant l'os et les cellules résorbant l'os. L'introduction de ce travail de recherche sera donc consacrée à la description de ce processus inflammatoire et des mécanismes de destruction articulaire observés au cours de la PR. Nous tenterons dans cette description de faire converger les composantes du système immunitaire et du métabolisme osseux.

Durant les deux dernières décennies, la convergence de ces deux systèmes sous la bannière de l'ostéoinnecologie a permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques de la PR. Nous détaillerons l'ensemble de ces approches avec leurs avantages et leurs inconvénients. Nous décrirons par la suite les modèles expérimentaux qui ont contribué aux avancées réalisées dans la compréhension de la pathogénie de la PR mais nous nous limiterons aux modèles murins d'arthrite.

Dans ce travail de recherche, nous présentons une nanostructure, appelée « dendrimère ABP » comme une nouvelle approche thérapeutique de la PR. En effet, nous avons mis en évidence le potentiel thérapeutique de cette molécule dans un modèle expérimental d'arthrite et nous avons caractérisé les réponses cellulaires qui régissent son action. Nous présenterons donc les dendrimères en général et nous nous attarderons sur le dendrimère ABP pour lequel nous décrirons l'ensemble des travaux antérieurs à ce travail et qui nous ont amené à tester ce nouvel outil nano-technologique sur une maladie inflammatoire chronique comme la PR.

Les résultats obtenus font l'objet d'un article qui sera également présenté en plus de certaines expériences supplémentaires organisées en deux parties : une partie réalisée *in vivo* qui concerne l'exploitation des effets anti-arthritiques et anti-inflammatoires du dendrimère ABP et une partie réalisée *in vitro* relative aux réponses cellulaires à cette molécule.

Enfin, nous discuterons des retombées de ces travaux de recherche sur le développement de la nanomédecine et des perspectives qu'offre la prise en compte du dendrimère ABP comme un médicament candidat pour le traitement de la PR.

INTRODUCTION

I. L'inflammation au cours la Polyarthrite Rhumatoïde

La Polyarthrite Rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires. Sa prévalence est d'environ 0,4% en Europe et est estimée entre 0,5 et 1% en France. Il s'agit d'une inflammation chronique évoluant par poussées, qui affecte principalement les femmes âgées de 30 à 50 ans (3 femmes pour 1 homme) mais qui peut également se déclarer aux extrêmes de la vie. L'atteinte est poly-articulaire, symétrique et touche particulièrement les articulations des mains, des genoux et des pieds mais elle peut être aussi systémique entraînant des manifestations extra-articulaires qui compromettent le pronostic vital. Elle se traduit par une hypertrophie de la membrane synoviale, tissu recouvrant la face interne des articulations, qui se trouve infiltrée par les différents acteurs cellulaires de l'inflammation. En effet, bien que l'étiologie et la pathogénie de la PR soient encore mal connues à ce jour, il est établi que la membrane synoviale devient le siège d'une réaction inflammatoire impliquant des interactions entre les différents types cellulaires et les facteurs pro-inflammatoires responsables de la destruction ostéo-cartilagineuse.

Habituellement, la membrane synoviale est constituée de 1 à 4 assises de cellules synoviales qui fusionnent à leur partie profonde avec une zone de tissu fibreux lâche contenant des adipocytes, des fibroblastes, des mastocytes et des macrophages. Cette couche profonde se confond avec le tissu fibreux plus dense de la capsule articulaire.

Les cellules synoviales ont une structure variable : elles peuvent être plates, d'allure mésothéliale, fusiformes, polyédriques ou cubiques. Sur le plan histologique, il existe 2 types de cellules synoviales¹:

- Les synoviocytes de type A ou « **macrophage-like** » : ils représentent 20 à 30% des cellules synoviales et ont un aspect macrophagique. Ce sont des cellules phagocytaires d'origine hématopoïétique avec un appareil lysosomal très riche, un réticulum endoplasmique réduit, un noyau riche en hétérochromatine et des extensions digitiformes. Elles expriment des marqueurs macrophagiques, notamment CD14 et CD68, et sont caractérisées par une augmentation de l'expression de diverses molécules d'adhésion : l'intégrine $\beta 2$, CD11a, CD11b, CD11c, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM-1 et 3 (IntraCellular Adhesion Molecule), E-sélectine, LAF-3 (Lymphocyte Activating Factor)². Des études immunohistologiques ont montré que la prolifération synoviale, dans la PR, était largement liée à l'activation et au recrutement des macrophages³.
- Les synoviocytes de type B ou « **fibroblaste-like** » représentent 70 à 80% des cellules synoviales. Leur aspect suggère une nature fibroblastique avec un réticulum

endoplasmique rugueux abondant et un appareil de Golgi très développé. Ces cellules dériveraient des fibroblastes du tissu sous-synovial, dont ils se distinguent par l'expression d'UDPGDH (Uridine Di-PhosphoGlucose DiHydrogénase) et de VCAM-1. Des modifications morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes synoviaux ont été observées chez les patients atteints de PR⁴.

Ces deux types cellulaires expriment des marqueurs d'activation (CD25, VLA-1, transferrine) et produisent des cytokines pro-inflammatoires retrouvées dans le liquide synovial des patients atteints de PR (IL-1, TNF- α , IL-6 et IL-17). L'expression de ces cytokines est régie par un système de communication paracrine / autocrine complexe entre ces deux types cellulaires⁵.

En somme, au cours de la PR, la membrane synoviale devient hyperplasique avec un épaissement de la couche cellulaire bordante (intima), un infiltrat de cellules inflammatoires périvasculaires, un œdème interstitiel et une néo-angiogénèse (Figure 1).

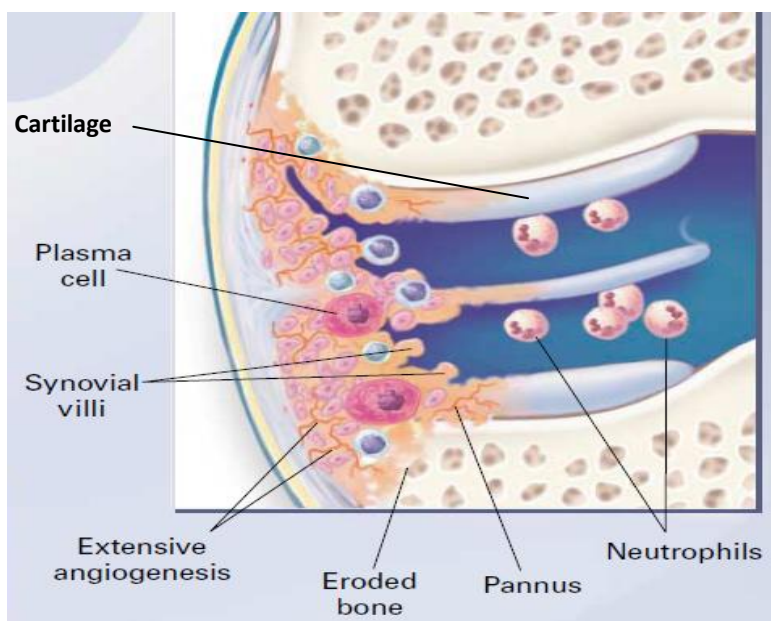


Figure 1 : L'inflammation de la membrane synoviale (Adaptée de Choy et al. *N Engl J Med*, 2001)⁶

L'épaississement de l'intima est probablement le résultat d'une prolifération des synoviocytes de type B aboutissant à un pannus synovial responsable de la destruction cartilagineuse et osseuse⁷. En effet, le recrutement important de macrophages conduit à la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et à l'augmentation de la production des métalloprotéases (MMPs)⁸. Il s'ensuit un état inflammatoire chronique caractérisé par une infiltration cellulaire où prédominent les monocytes / macrophages, les lymphocytes B et les Lymphocytes T. Ces cellules infiltrant l'espace synovial sont soit dans un état diffus sans structure spécifique, soit organisées en microstructures.

On trouve également des cellules dendritiques, des mastocytes et des plasmocytes qui s'accumulent sous la couche bordante⁹. L'implication de ces cellules, ainsi que des différents médiateurs qu'elles expriment, dans l'initiation et l'évolution de l'inflammation au cours de la PR sera discutée dans la suite.

I.1 Les cellules de la réponse immunitaire innée

I.1.1 Les granulocytes

Les granulocytes ou polynucléaires sont classés en 3 catégories : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. En raison de leur nombre élevé au site de l'inflammation par rapport aux polynucléaires éosinophiles et basophiles, les **neutrophiles** ont été plus largement décrits. Ils constituent des éléments essentiels de la défense contre les pathogènes. Ce sont les premières cellules à migrer au site de l'inflammation, suivies des monocytes¹⁰. Les neutrophiles libèrent dans l'espace extracellulaire des médiateurs cytotoxiques comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des protéases endommageant ainsi à la fois le pathogène et le tissu hôte. Il s'ensuit une accumulation dans l'intima de synoviocytes macrophage-like (synoviocytes de type A) et fibroblaste-like (synoviocytes de type B) engendrant une hyperplasie de la membrane synoviale et une sécrétion excessive de métalloprotéases (**Figure 2**).

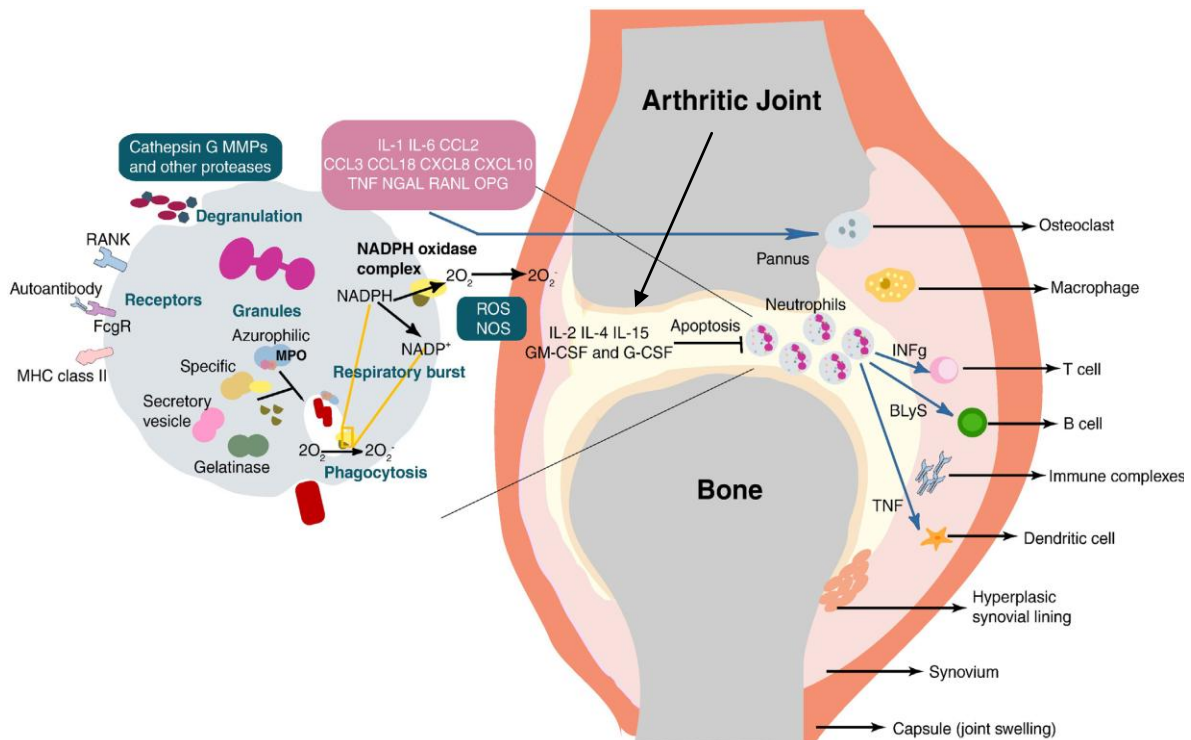


Figure 2 : Rôle des neutrophiles dans l'inflammation articulaire (Adaptée de Cascão et al. *Autoimmun Rev*, 2010)¹¹

Une fois le pathogène éliminé, les neutrophiles entrent en apoptose et sont phagocytés par les macrophages¹². Dans le cadre de la PR, les mécanismes d'activation, de recrutement et d'apoptose des neutrophiles sont altérés. Dans le cas d'un dysfonctionnement du mécanisme apoptotique, les neutrophiles entament une nécrose. L'ingestion des débris cellulaires par les macrophages induit la production de cytokines pro-inflammatoires amplifiant ainsi le scénario inflammatoire de la PR¹³.

En effet, chez les patients atteints de PR avec une synovite active, les neutrophiles sanguins produisent beaucoup moins de ROS que ceux des individus sains ou les patients en rémission¹⁴. De plus, chez les patients ayant une arthrite débutante, les neutrophiles sanguins montrent un niveau significativement moins élevé d'apoptose que les neutrophiles des patients présentant d'autres formes d'arthrite¹⁵. Plus tard, cette même observation a été faite pour les neutrophiles du liquide synovial de patients¹⁶ montrant ainsi que le défaut d'apoptose des neutrophiles est une caractéristique de la PR. Ceci peut être corrélé avec les niveaux élevés de cytokines anti-apoptotiques, comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-15 ou le GM-CSF, retrouvés dans les articulations des patients ayant une PR débutante¹⁷.

Une étude récente, réalisée sur un modèle d'arthrite induite au collagène, a suggéré que les **éosinophiles** pourraient être les cellules à l'origine de l'échec des biothérapies anti-TNF- α et anti-CD20 chez certains patients¹⁸. En effet, bien que ces cellules ne soient pas présentes en nombre élevé dans les articulations de patients atteints de PR, des protéines cationiques ayant pour origine les éosinophiles, sont retrouvées dans le liquide synovial de patients en échec de thérapies anti-TNF- α et anti-CD20¹⁹. De plus, chez un certain nombre de patients, la sévérité de la PR a été associée à une hyperéosinophilie²⁰.

Quant aux **basophiles**, ils ont été plus décrits dans le cadre de la sécrétion d'auto-anticorps IgE et d'histamine dans les réactions allergiques auto-immunes associées à la PR²¹. Cette sécrétion est médiée par l'IL-3 et induit l'expression par les basophiles de la cytokine pro-arthritogénique IL-6²². En effet, une étude récente, réalisée sur un modèle d'arthrite induite au collagène, a suggéré que l'IL-3 aggrave les premières phases de l'arthrite en permettant l'augmentation du nombre de basophiles activés dans le sang circulant et en induisant l'expression d'anticorps anti-collagène dans le plasma. Cette même étude a montré que l'action de l'IL-3 n'intervient pas dans les phases tardives de la maladie²³.

I.1.2 Les mastocytes

Les **mastocytes** sont des cellules granuleuses essentiellement présentes dans le tissu conjonctif et qui pourraient également jouer un rôle précoce dans le processus de la PR. Dans le tissu synovial, les mastocytes sont retrouvés dans l'intima²⁴ mais peuvent être également retrouvés au niveau des sites

de destruction du cartilage²⁵. Leur proximité avec les terminaisons nerveuses et les vaisseaux sanguins leur permet d'être en première ligne, avec les neutrophiles et les macrophages, pour initier une réponse inflammatoire et activer les cellules endothéliales. Chez les patients atteints de PR, le nombre de mastocytes est très augmenté²⁶.

Ces cellules sont souvent retrouvées activées et dégranulées²⁷ :

- L'activation des mastocytes est probablement due à la formation de complexes immuns impliquant leur Fc γ RI ou CD64²⁸. En réponse à cette activation, les mastocytes sécrètent de l'histamine et des eicosanoïdes qui peuvent induire la production d'IL-1 (surtout d'IL-1- β) par les macrophages²⁹. Ils produisent également une quantité importante de cytokines, dont le TNF- α , qui en retour va accélérer le recrutement des neutrophiles³⁰ (Figure 3).

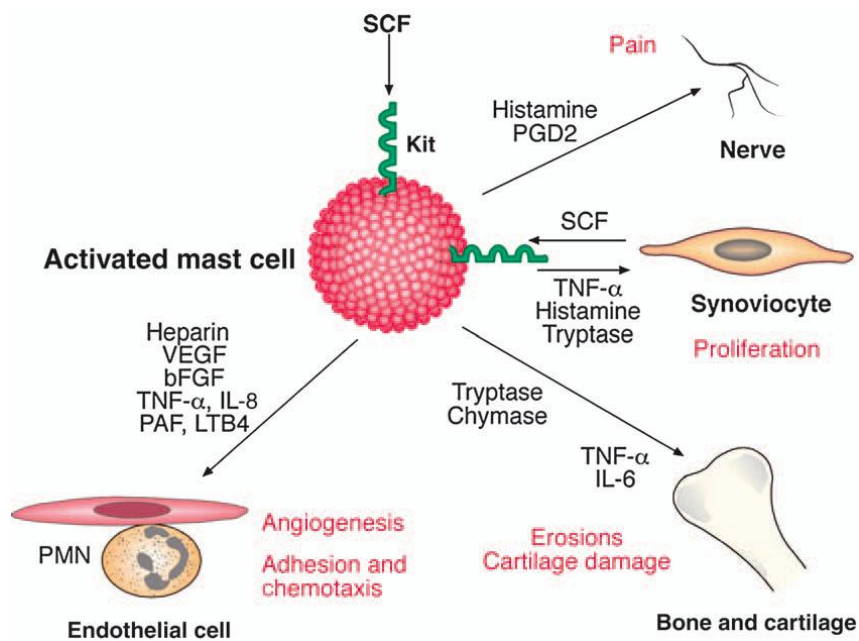


Figure 3 : Illustration simplifiée du rôle des mastocytes dans l'arthrite³¹

- La dégranulation des mastocytes apparaît dès la 1ère heure après injection de sérum arthritogène de souris K/BxN à des souris C57BL/6 naïves et se prolonge pendant 12 jours. L'injection de ce sérum à des souris déficientes en mastocytes n'induit pas d'inflammation articulaire faute de recrutement de cellules inflammatoires, mais ce phénomène est réversible après greffe de mastocytes, indiquant un rôle potentiel des mastocytes dans le développement de l'arthrite³².

Comme pour les polynucléaires basophiles, l'IL-3 a été décrite comme une cytokine induisant la prolifération des mastocytes dérivant des précurseurs de la moelle de souris³³. Il a été montré que

les glucocorticoïdes inhibent l'expression de cette cytokine³⁴. Dans le cas de la PR, ce type de traitement est efficace pour supprimer quelques aspects de l'inflammation mais ne suffit pas pour traiter la maladie.

I.1.3 Les plaquettes

Il est actuellement établi que les patients atteints de PR sont plus assujettis aux maladies cardio-vasculaires³⁵. La forte prévalence de ces maladies chez les patients atteints de PR ne peut pas s'expliquer uniquement par la présence de facteurs de risques tels que le tabagisme, l'hypertension ou le diabète³⁶. Un environnement fortement inflammatoire où des facteurs pathogéniques sont présents en grand nombre et possèdent une activité accrue peut être également à l'origine de la prévalence des maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de PR³⁷. Dans cet environnement, l'activation des **plaquettes** amplifie le risque de maladies cardio-vasculaires. Il a été montré que ces cellules activées sont présentes en grand nombre dans la membrane synoviale et dans le liquide synovial. Des microparticules de 0,2 à 1µm de diamètre, exprimant l'IL-1α et l'IL-1β, bourgeonnent de ces cellules et permettent d'amplifier l'inflammation en activant la sécrétion d'IL-6 par les synoviocytes fibroblaste-like (synoviocytes de type B)³⁸ (Figure 4).

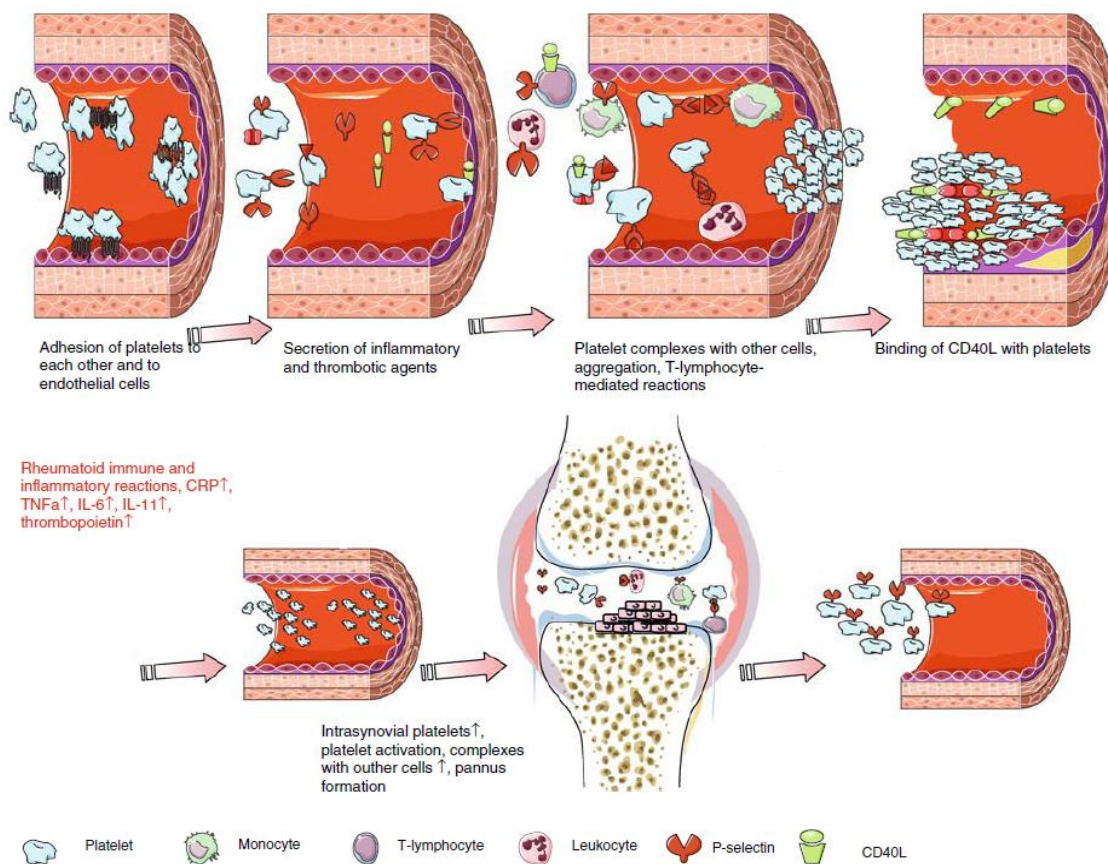


Figure 4 : Activation des plaquettes au cours de la PR³⁹

Dans le liquide synovial, les plaquettes sécrètent également des quantités importantes de facteurs de croissance⁴⁰. Dans un modèle d'arthrite du lapin, il a été montré que parmi ces facteurs de croissance, le PDGF (Platelet-derived Growth Factor), un puissant agent angiogénique, induit une hyperplasie de la synoviale et la formation du pannus⁴¹ ; l'angiogénèse, c'est-à-dire la croissance de nouveaux capillaires sanguins à partir des vaisseaux préexistants, étant une composante majeure de l'inflammation développée au cours de la PR. En effet, la prolifération vasculaire au sein du pannus permet son développement et sa croissance, favorisant secondairement la destruction cartilagineuse et osseuse ainsi que le remodelage articulaire⁴². Dans un modèle murin d'arthrite du genou, il s'avère que la P-sélectine, une molécule d'adhésion produite par les plaquettes et les cellules endothéliales adhérentes permet l'interaction entre ces cellules. L'agrégation des plaquettes qui en découle conduit à la formation du thrombus et à l'altération de la circulation au niveau de la synoviale^{43, 44}. Une autre molécule, CD40L, membre de la famille des TNF, est exprimée à la surface des plaquettes. CD40L se lie à son récepteur CD40 exprimé par les Lymphocytes T et B et par les monocytes. La formation du complexe CD40L/CD40 stimule la sécrétion de chimiokines telles que RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) ou MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)⁴⁵, renforçant ainsi les interactions entre les cellules immunitaires.

I.1.4 Les monocytes / macrophages

De par ses multiples fonctions biologiques, ce système contribue largement au déclenchement et au développement des maladies inflammatoires chroniques, comme la PR. Les cytokines IL-1, IL-3 et SCF (Stem Cell Factor) stimulent les cellules souches hématopoïétiques CD34+ pour qu'elles s'engagent dans la lignée myéloïde. Les précurseurs myéloïdes générés expriment CD33, CD34 et HLA-DR et se différencient sous l'effet de M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) en monocytes matures qui passent dans le sang périphérique. Ces **monocytes** circulants présentent un phénotype activé (libération de cytokines pro-inflammatoires et de prostanoïdes, expression de molécules d'adhésion)^{46, 47}. Dans le sang périphérique, ils perdent leur marqueur précoce CD34 et deviennent CD14+. Il a été montré que le nombre de cellules CD14+ est supérieur chez les patients atteints de PR que chez les sujets sains, suggérant une altération de l'homéostasie monocyttaire en amont de leur activation synoviale⁴⁸. Parmi ces cellules CD14+, un grand nombre traverse la barrière trans-endothéliale et migre vers les compartiments articulaires (liquide synovial, membrane synoviale, pannus de l'os et du cartilage)⁴⁹ où ils deviennent des **macrophages**.

Tout comme les synoviocytes macrophage-like (de type A) résidant dans la membrane synoviale, ces macrophages provenant du sang périphérique ont un phénotype activé au cours de la PR : ils

représentent la source majeure de NO et de cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1. Ils libèrent des facteurs de croissance tel que le GM-CSF, des chimiokines comme l'IL-8, le MIP-1 et MCP-1, des enzymes métalloprotéases impliquées dans la dégradation du cartilage, telles la MMP-3 et la MMP-9⁵⁰ et sur-expriment des molécules du CMH de classe II⁵¹.

Le système **monocyte / macrophage** représente une part importante de l'immunité innée développée au cours de la PR. L'activation de ce système, qui s'étend à la majorité des précurseurs de la moelle osseuse de la lignée myéloïde, démontre le caractère systémique de cette pathologie. L'importance de ce système sera plus détaillée dans la 2^{ème} partie (*Cf. II. La résorption osseuse au cours de la Polyarthrite Rhumatoïde*).

I.1.5 Les cellules dendritiques

Les **cellules dendritiques** (DCs) sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques qui jouent un rôle majeur dans la décision du type de réponse immunitaire à mettre en jeu. Elles font partie du système réticulo-histiocytaire et présentent dans certaines conditions, comme leur nom l'indique, des dendrites (des prolongements cytoplasmiques). Elles ne constituent pas une population homogène et regroupent 2 sous-populations dont les phénotypes et les fonctions sont assez bien caractérisés⁵² :

- Les DCs plasmacytoïdes (pDCs) : appelées aussi DCs lymphoïdes, elles expriment des marqueurs lymphoïdes comme l'IFN de type I (essentiellement l'IFN- α) ou le TNF- α . Elles sont particulièrement activées en réponse à une stimulation virale⁵³.
- Les DCs myéloïdes (mDCs) : Dérivées des monocytes, elles expriment des marqueurs myéloïdes comme CD11b et CD33⁵⁴. Ce sont des cellules phagocytaires résidant dans le sang périphérique et exprimant un large éventail de protéines qui permet de détecter la présence de pathogènes et font partie des cellules présentatrices d'antigène. Il a été montré que, parmi les sous-populations de DCs, les mDCs jouent le rôle le plus important dans la pathogénie de la PR. En effet, un nombre élevé de ces cellules a été mis en évidence dans le liquide, mais surtout dans le tissu synovial et ce nombre est corrélé à la sévérité de la PR⁵⁵. Dans la suite, on désignera ces cellules par le simple terme DCs.

Dans le tissu synovial, les DCs ont un phénotype activé par rapport à celles du sang et du liquide synovial. Leur maturation et leur migration dans le pannus synovial permettent d'initier la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la production d'anticorps par les Lymphocytes B⁵⁶. La différenciation des DCs est induite par de nombreux mécanismes impliquant les molécules dérivées de pathogènes (LPS, ADN, ARN), les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α), les facteurs

tissulaires (protéines HSP) et surtout l'interaction de CD40 et CD40 ligand exprimé par les cellules T^{57, 58}.

Par leur puissant pouvoir de présentation de l'antigène, les DCs jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la PR. Elles interviennent aussi dans la transformation phénotypique des Lymphocytes T naïfs en type Th1 ou Th2, selon les cytokines présentes dans le milieu. Les interactions entre DCs et cellules T se font par contact cellulaire soit à travers des interactions de type récepteur/ligand soit par l'intermédiaire de cytokines et de chimiokines. Les DCs produisent de l'IL-12 et de l'IL-23 qui font basculer la réponse immunitaire vers les types Th1 et Th17, respectivement. L'IL-23 augmente la production lymphocytaire T d'IL-17, qui à son tour va activer les fibroblastes synoviaux et augmenter leur réponse à d'autres signaux provenant des cellules T (Figure 5).

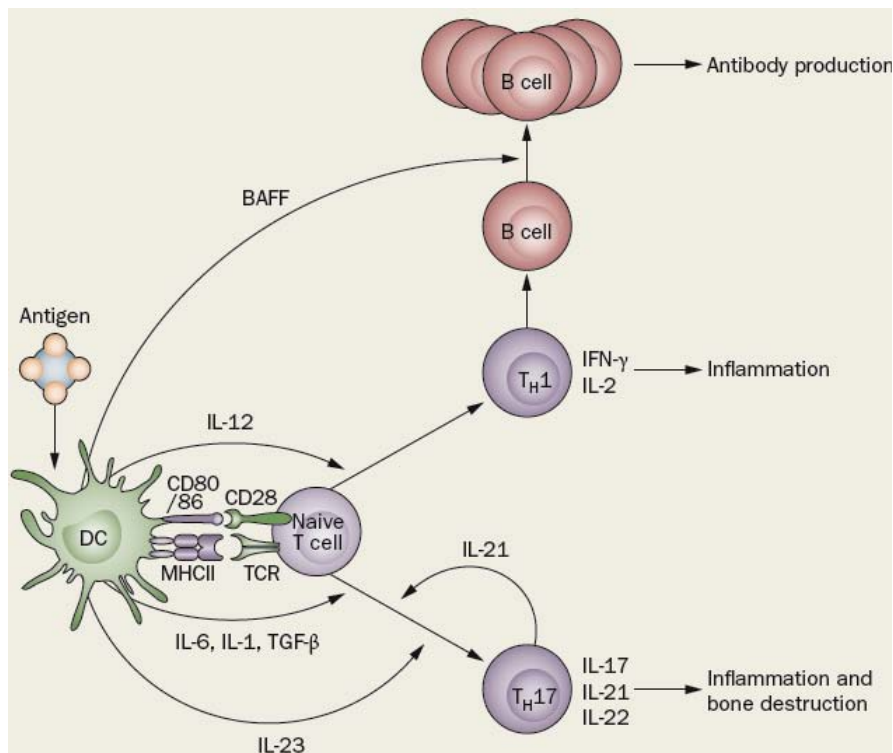


Figure 5 : Rôle des DCs dans la réponse inflammatoire au cours de la PR⁵⁹

L'interaction entre RANK (Récepteur Activateur de NF-κB) situé sur les DCs et RANK ligand (RANKL) exprimé par les cellules T conduit à l'augmentation de la survie des DCs⁵⁸. Ainsi, les DCs pourraient jouer un rôle primordial dans la présentation de l'antigène arthritogène aux Lymphocytes T et dans l'activation des cellules B. Tout ceci aboutirait à la formation de Lymphocytes T mémoires et pourrait influencer les réponses des macrophages et synoviocytes. Les cytokines présentes dans

l'environnement pourraient contribuer à la survie des DCs, conduisant au caractère chronique de la PR.

I.1.6 Les cellules Natural Killer

Les cellules **Natural Killer** (NK) sont une composante essentielle de l'immunité innée. Elles ont la capacité de lyser les cellules pathogéniques et de sécréter des cytokines immuno-régulatrices⁶⁰. Représentant environ 10% des cellules du sang circulant, ces cellules sont caractérisées par l'absence de CD3 et l'expression de CD56. Elles possèdent également un répertoire de récepteurs appelés NKR (Natural Killer Receptors) qui leur permet de reconnaître et de lyser toute cellule dépourvue de CMH de classe I⁶¹. Le rôle de ces cellules dans la pathogénie de la PR a été très peu étudié. Dans un modèle animal d'arthrite, la déplétion de ces cellules augmente la production d'auto-anticorps anti-DNA et accélère l'accumulation de Lymphocytes T CD4+ auto-réactifs. L'injection de cellules NK permet, par contre, la suppression de ces manifestations auto-immunes⁶². De plus, une étude a reporté que les patients atteints de PR ont un nombre anormalement bas de cellules NK dans le sang périphérique en comparaison avec des individus sains⁶³. Toutes ces observations suggèrent donc un rôle protecteur de ces cellules dans la PR. Cependant, ce rôle a été controversé, puisque les cellules NK représentent une large proportion des cellules présentes dans le liquide synovial de patients ayant une PR évoluée et que ces cellules produisent des taux élevés de cytokines essentielles pour la destruction osseuse ainsi que de chimiokines qui participent au recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation^{64, 65}. De plus, une étude plus récente a montré que les cellules NK induisent *in vitro* la différenciation des monocytes en ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse. Cette étude a également montré que ces cellules sont aussi présentes dans les articulations de souris arthritiques et que leur déplétion réduit la sévérité de l'arthrite chez souris et prévient l'érosion osseuse⁶⁶.

I.1.7 Les cellules NKT

Les NKT représentent une population hétérogène possédant à la fois les marqueurs des cellules NK et les marqueurs des Lymphocytes T $\alpha\beta$ (Lymphocytes T CD3+CD4+ et Lymphocytes T CD3+CD8+). Dans le modèle d'arthrite induite au collagène, il a été montré que l'activation des NKT par un ligand synthétique α -GalCer (α -galactosylcéramide) permet la sécrétion d'IL-10 et prévient ainsi le développement de l'arthrite chez ce modèle⁶⁷. Cependant, une autre étude a montré que des souris *cd1d*^{-/-} (déficientes en NKT) ayant reçu du sérum arthritogène de souris K/BxN sont résistantes au développement de l'arthrite grâce à une forte production de TGF- β (Transforming Growth Factor- β), un facteur de croissance considéré comme ayant un rôle anti-inflammatoire⁶⁸. Ces 2 études sur les

modèles murins reflètent l'intervention des cellules NKT dans les différentes phases de l'arthrite avec un rôle suppressif dans la phase d'induction de la maladie illustré par le modèle d'arthrite induite au collagène et un rôle inductif dans la phase effectrice de la maladie illustré par le modèle d'arthrite induite aux anticorps K/BxN.

I.2 Les cellules de la réponse immunitaire adaptative

I.2.1 Les Lymphocytes B

Les **Lymphocytes B** (LB) sont les premiers acteurs de la réponse immunitaire adaptative à avoir été mis en évidence dans la pathogénie de la PR. La découverte des facteurs rhumatoïdes (FR), des auto-anticorps souvent de type IgM (mais pouvant être aussi de type IgA ou IgG) produits par les plasmocytes et dirigés contre les IgG, a conduit à l'hypothèse selon laquelle la PR pourrait être une maladie auto-immune causée par des auto-anticorps. Depuis, d'autres auto-anticorps ont été détectés chez les patients atteints de PR : des auto-anticorps anti-CCP (Cyclic Citrullinated Peptide) et des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du cartilage comme le collagène de type II ou l'aggrécane (Figure 6).

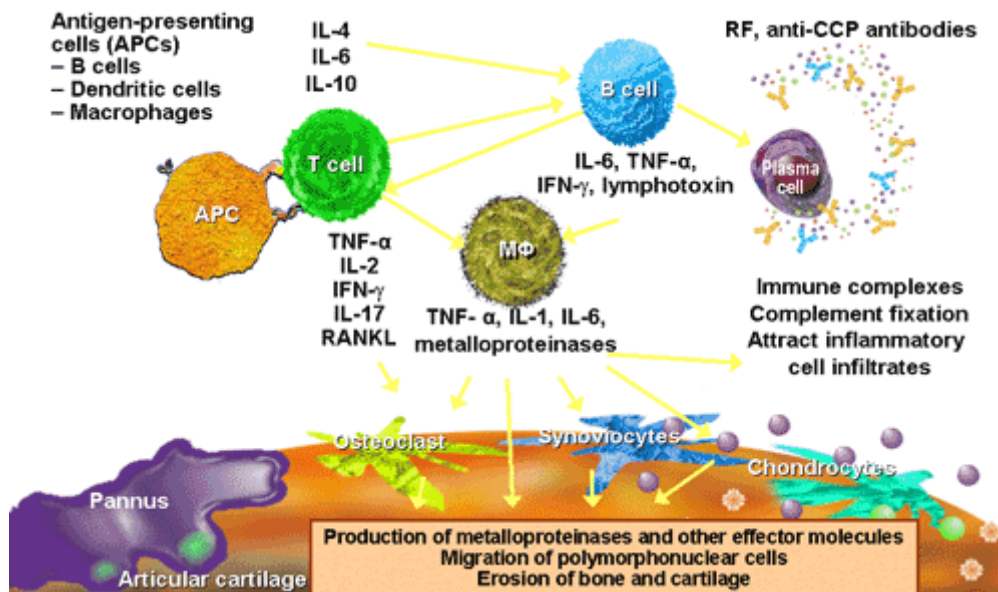


Figure 6 : Rôle des LB dans la pathogénie de la PR (Adaptée de Smolen et al. *Nat Rev Drug Discov*, 2003)⁶⁹

Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle important des LB dans la pathogénie de la PR : la « B cell activating factor belonging to the TNF family » ou BAFF est une cytokine synthétisée par les monocytes/macrophages et les DCs et qui influence l'activation des LB. Des concentrations sériques

et synoviales importantes de cette cytokine ont été mises en évidence chez des patients atteints de PR, ce qui suggérerait que cette cytokine puisse jouer un rôle dans la synthèse d'auto-anticorps au cours de la PR⁷⁰. A leur tour, les LB sont également capables d'activer les Lymphocytes T auto-réactifs⁷¹. Ainsi, l'infiltration tissulaire des Lymphocytes T et les manifestations auto-immunes sont dépendantes des LB^{72, 73}. En outre, les LB présents dans le thymus jouent un rôle dans l'acquisition du répertoire de Lymphocytes T en régulant la sélection positive de ces cellules⁷⁴.

Enfin, les LB sont indispensables à l'activation des Lymphocytes T dans la membrane synoviale rhumatoïde. Leur déplétion par des anticorps anti-CD20 (Rituximab) conduit à la disparition du nombre d'agrégats de Lymphocytes T et B synoviaux⁷⁵, à la diminution des Lymphocytes T infiltrant la membrane synoviale⁷⁶ et donc à la diminution des taux d'IL-1 et de TNF- α ⁷⁷. L'administration d'anticorps anti-CD20 à des patients atteints de PR permet l'amélioration des signes cliniques de la PR, alors que les concentrations sériques d'immunoglobulines ne sont pas modifiées⁷⁸, suggérant que les LB jouent aussi un rôle dans la pathogénie de la PR, indépendamment de la synthèse d'anticorps⁷⁹.

1.2.2 Les Lymphocytes T

De nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle essentiel des **Lymphocytes T (LT) CD4+** dans la physiopathologie de la PR. D'une part, ils sont souvent retrouvés en abondance dans le tissu synovial et le liquide articulaire de patients atteints de PR, notamment les LT exprimant le phénotype mémoire CD4+CD45RO+ et les lymphocytes porteurs de marqueurs d'activation comme le CD40L ou le CD28^{80, 81}. D'autre part, les modèles expérimentaux viennent à l'appui de cette théorie, notamment le modèle d'arthrite induite au collagène dans lequel l'arthrite ne peut être déclenchée en l'absence de LT actifs. Le rôle pivot des LT dans la pathogénie de la PR, est renforcé par l'hypothèse du peptide arthritogène. Le peptide arthritogène pourrait être d'origine exogène (agents infectieux ou super-antigènes) ou endogène (collagène de type II, protéoglycanes, glycoprotéine gp39 chondrocytaire). Il est reconnu par les LT CD4+, avec comme conséquences la prolifération et l'activation des LT, des lymphocytes B, la sécrétion de cytokines et de médiateurs inflammatoires. Cependant, plusieurs arguments plaident contre leur rôle exclusif : premièrement, la faible quantité de cytokines T-dépendantes (IL-2, IL-3, IL-4 et IFN- γ) dans l'articulation par rapport à des cytokines produites par d'autres types cellulaires ; deuxièmement, les lymphocytes synoviaux sont des cellules peu actives présentes en faible nombre pendant la phase de multiplication avec des marqueurs d'activation tardifs ; troisièmement, l'absence d'oligoclonalité des LT dans la synoviale rhumatoïde ; quatrièmement, la destruction paraît souvent peu dépendante de la présence des cellules T et enfin, la déplétion par des anticorps monoclonaux anti-CD4 n'est pas toujours efficace en pratique

clinique⁸². Les LT synoviaux sont pour la plupart des cellules CD4+ de type Th1 produisant de l'IFN- γ et de l'IL-2⁸³. Un autre sous-type de LT CD4+, les lymphocytes Th17, a également montré son importance dans la pathogénie de la PR au point que le concept d'une maladie de type Th1 soit remis en cause⁸⁴. La production d'IL-17 est la seule signature de ces lymphocytes Th17 dont l'influence sur la biologie des ostéoclastes a été démontrée. En effet, les lymphocytes Th17 produisent du RANKL⁸⁵ et du TNF- α ⁸⁶ qui agissent directement sur les précurseurs d'ostéoclastes pour les engager dans un processus de différenciation. De plus, l'IL-17 induit l'expression de RANKL par les fibroblastes synoviaux et les ostéoblastes ce qui permet à ces Th17 de contrôler indirectement la résorption osseuse⁶⁹. La découverte de l'IL-17 et des contrôles direct et indirect qu'elle exerce sur le processus rhumatoïde a entraîné une redéfinition de la PR, qui n'est plus alors considérée comme une maladie de type Th1 mais plutôt comme une maladie Th1/Th17 (Figure 7).

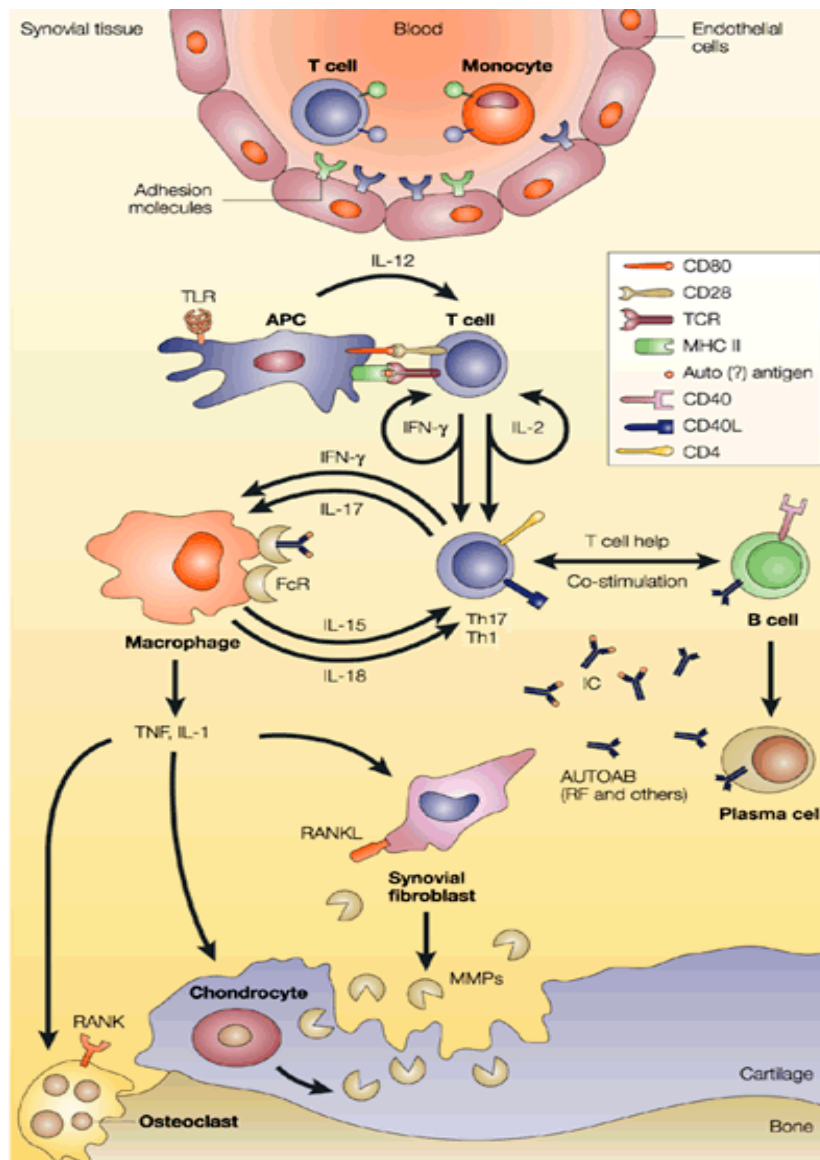


Figure 7 : Rôle des LT dans la pathogénie de la PR (Adaptée de Smolen JS and Steiner G *Nat Rev Drug Discov*, 2003)⁸⁷

Les **LT CD8+**, présents en proportion plus modeste que les **LT CD4+**, ont aussi un rôle pathogénique. Ils peuvent intervenir par la production de cytokines, leur fonction cytotoxique ou en participant à une inhibition spécifique de la réponse à certains antigènes. En effet, par l'expression de molécules d'adhérence, ils entrent en interaction avec la cellule endothéliale. Les cellules T retenues au sein du tissu synovial sont alors sélectionnées grâce à des chimiokines. Ils s'organisent alors en ganglion lymphatique, formant un véritable organe lymphoïde secondaire avec des zones à prédominance de LT voisinant étroitement des zones de lymphocytes B⁸⁸. La chronologie et le mécanisme de formation de cette néo-organogénèse lymphoïde sont encore mal connus.

Il existe aussi des **cellules T régulatrices** (Treg) CD4+ CD25+ caractérisées par l'expression du facteur de transcription Foxp3 et du récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes (GITR). Cette population est divisée en 2 types cellulaires :

- Les cellules iTreg (inducible regulatory T cells) induites par le TGF- β et caractérisées par l'expression du CD103 et par leur forte capacité à sécréter l'IL-10^{89,90}.
- Les cellules nTreg (natural regulatory T cells) caractérisées par une plus forte expression du CD25 que les iTreg et dont le mécanisme d'action requiert un contact cellulaire avec la cible. Dans le modèle d'arthrite induite au collagène, la suppression de ces cellules par un anticorps anti-CD25 avant l'immunisation accélère et augmente la sévérité de la maladie alors que le transfert de cellules CD25+ permet le traitement de la maladie⁹¹. Dans le liquide synovial de patients atteints de PR, cette population se trouve altérée ce qui se traduit par un défaut d'inhibition des LT CD4+ auto-réactifs. En effet, le TNF- α , largement exprimé chez les patients atteints de PR, en se liant à son récepteur à la surface des Treg inhibe l'expression de Foxp3 par ces cellules. Cette inhibition affecte le potentiel anti-prolifératif que possède les Treg vis-à-vis des LT CD4+ autoréactifs⁹².

I.3 Les médiateurs de l'inflammation

Le dysfonctionnement des différentes cellules de l'immunité observé au cours de la PR est certainement une conséquence d'un déséquilibre de la production de certains facteurs qui donne lieu à la surexpression ou à la suppression d'autres facteurs, notamment des anticorps, des cytokines, des chimiokines et des enzymes métalloprotéases. Tous ces facteurs constituent un réseau qui contribue aux caractères systémique et chronique de la PR.

I.3.1 Les auto-anticorps

Des études réalisées chez les rongeurs ont montré que des anticorps spécifiques dirigés contre des auto-antigènes sont directement impliqués dans la pathologie de la PR et contribuent au caractère auto-immun de cette pathologie ; ils sont appelés **auto-anticorps**. Le plus documenté de ces auto-anticorps reste le facteur rhumatoïde (FR) mais on retrouve également les auto-anticorps dirigés contre les protéines citrullinées (ACPA ou Anti-Citrullinated Protein Antibodies), les auto-anticorps anti-nucléaires (ANA ou Anti-Nuclear Antibodies) dirigés contre les acides nucléiques, les auto-anticorps anti-collagène de type II (anti-CII) et les anticorps anti-Glucose-6-Phosphate Isomérase (anti-GPI) :

- Le facteur rhumatoïde (FR) : il a été identifié en 1949 comme un auto-anticorps appartenant à la famille des Immunoglobulines M (IgM) dirigé contre la région constante des IgG autologues. Ce facteur est exprimé dans 60-85% des cas de PR⁹³. Il est établi qu'un taux sérologique élevé de FR est corrélé à l'aggravation des signes cliniques et témoigne donc de la sévérité de la maladie⁹⁴. Ce facteur a été identifié dans plusieurs modèles murins d'arthrite et comme pour la PR humaine, il est préférentiellement dirigé contre les IgG autologues ce qui confirme que cet anticorps est produit en réponse à un antigène endogène⁹⁵.
- Les ACPA : le déterminant antigénique de ces anticorps est l'acide aminé citrulliné obtenu par désimination de l'arginine par l'enzyme Peptidyl-Arginine Désiminase (PAD)⁹⁶. Le processus de citrullination des protéines synoviales a été identifié dans le modèle d'arthrite aiguë induite par *Streptococcus pyrogenes* et dans le modèle d'arthrite chronique induite au collagène⁹⁷. Les protéines citrullinées ont également été identifiées dans la membrane synoviale de patients atteints de PR⁹⁸. Une méta-analyse a démontré que les auto-anticorps anti-CCP sont plus spécifiques de la PR que le FR⁹⁹. D'ailleurs, ces auto-anticorps ont été retrouvés chez des donneurs de sang plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques de PR¹⁰⁰ et dans les modèles animaux, le transfert de ces auto-anticorps accentue la sévérité de l'arthrite ce qui souligne leur rôle effecteur^{101, 102}. Récemment, des tests ELISA ont été développés pour détecter la présence des ACPA dans le sérum de patients et ont montré une grande performance dans le diagnostic de la maladie¹⁰³.

- Les anticorps anti-nucléaires (ANA) : ces auto-anticorps représentent un groupe hétérogène d'anticorps dirigés contre des fragments d'acides nucléiques. L'anti-RA33 est un auto-anticorps qui présente un intérêt particulier dans la PR. Dirigé contre la protéine A2 (33kDa), il est retrouvé dans 30% des cas de PR¹⁰⁴. Cependant, cet auto-anticorps reste moins spécifique que le FR ou les anti-CCP et son expression n'est pas corrélée avec le caractère érosif de la pathologie. En effet, les patients qui sont séropositifs pour cet auto-anticorps uniquement ne développent pas une PR agressive^{105, 106}. L'anti-RA33 est également détecté dans plusieurs modèles d'arthrite expérimentale, spécifiquement chez le rat où il apparaît avant le déclenchement des signes cliniques¹⁰⁷.
- Les anticorps anti-CII : le collagène de type II est un constituant majeur du cartilage. Les auto-anticorps anti-CII ont été identifiés chez les patients atteints de PR sous leurs formes native et dénaturée¹⁰⁸. Cependant, la prévalence de ces auto-anticorps reste incertaine. En effet, la multiplicité des techniques de détection rend les résultats très disparates ce qui ne permet pas à ces auto-anticorps de constituer un marqueur de diagnostic ou d'activité de la PR. En revanche, pour les modèles animaux, la situation est beaucoup plus claire. Le modèle d'arthrite induite au collagène résulte d'une réponse auto-immune au collagène de type II¹⁰⁹.
- Les anticorps anti-GPI : la Glucose-6-Phosphate isomérase est une enzyme de la voie de la glycolyse retrouvée dans toutes les cellules. Les auto-anticorps dirigés contre cette enzyme ont été identifiés chez les souris K/BxN^{109, 110}. Ces auto-anticorps sont eux-mêmes arthritogéniques puisque le transfert passif du sérum de souris K/BxN à des souris normales induit une réponse auto-immune anti-GPI et une arthrite sévère^{111, 112}. Cependant, très peu d'études ont réussi à déterminer une forte prévalence de ces auto-anticorps chez les patients atteints de PR¹¹³.

I.3.2 Les cytokines et chimiokines

I.3.2.1 Les cytokines pro-inflammatoires

- Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) : ce médiateur classique de l'inflammation a été identifié comme une cytokine clé de la PR (Figure 8).

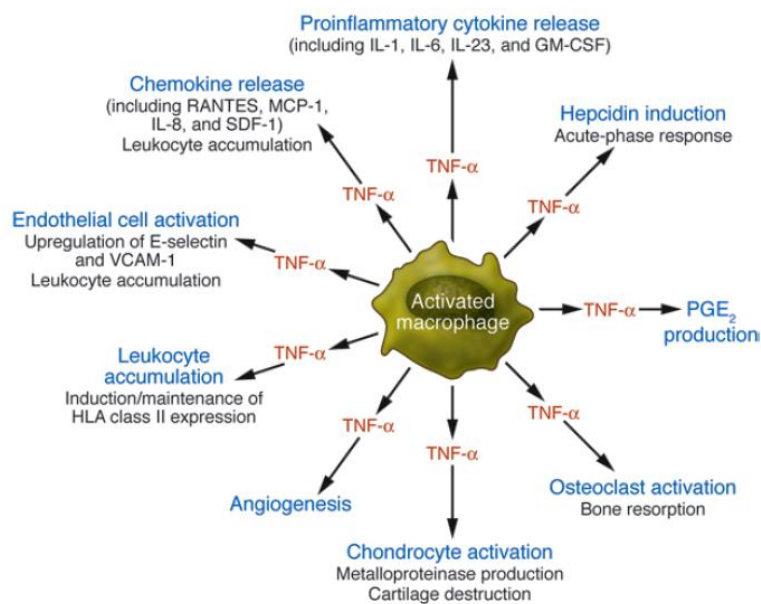


Figure 8 : Importance du TNF- α dans la pathogénie de la PR¹¹⁴

Exprimé par les macrophages activés, les LT et les synoviocytes de la membrane synoviale, il régule directement le recrutement des ostéoclastes précurseurs et augmente l'expression de RANK par ces cellules¹¹⁵. Le TNF- α module également la différenciation et la fonction des ostéoblastes en régulant l'expression de Runx2, facteur de transcription spécifique aux ostéoblastes¹¹⁶. En effet, *in vitro*, il réduit l'expression de l'ARNm de la phosphatase alcaline, du collagène de type I et de l'ostéocalcine¹¹⁷. De plus, les taux élevés de TNF- α retrouvés chez les patients atteints de PR sont souvent corrélés à une phase active de la maladie¹¹⁸. L'importance de cette cytokine dans la pathogénie de la PR a entraîné le développement d'anticorps monoclonaux (Infliximab, Adalimumab) et de protéines de fusion (Etanercept, protéines formées par la fusion du domaine de liaison du TNFRII avec le domaine Fc de l'IgG), utilisés aujourd'hui comme traitements de la PR¹¹⁹.

- **IL-1** : cette cytokine est produite par les macrophages activés et les fibroblastes de la membrane synoviale^{120, 121}. Induite par le TNF- α , elle permet l'expression des enzymes métalloprotéases et de RANKL dans le tissu synovial favorisant ainsi la résorption osseuse¹²². Il a été montré que les souris déficientes en IL-1 sont totalement protégées de l'arthrite alors que les souris déficientes en TNF- α ne le sont que partiellement ce qui prouve l'importance de cette cytokine dans la pathogénie de la PR¹²³. Cette cytokine, existant sous 2 formes, α et β , exerce donc un rôle très important dans l'inflammation. Une étude a par ailleurs montré que l'IL-1 β est la seule forme qui permet l'induction de l'inflammation. En effet, les souris IL-1 β ^{-/-} ou IL-1 α/β ^{-/-} ne répondent pas à l'induction de

fièvre par la térébenthine alors que les souris IL-1- $\alpha^{-/-}$ répondent à cette induction¹²⁴. Bien que l'importance de l'IL-1 ait été largement démontrée, chez les patients atteints de PR, l'utilisation de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) sous forme recombinante (Anakinra) a montré des propriétés anti-inflammatoires limitées¹²⁵.

- IL-6 : Les macrophages et fibroblastes synoviaux représentent la source prédominante d'IL-6¹²⁶. Elle présente un rôle pivot dans la PR et plus spécifiquement dans la destruction osseuse due à l'induction de l'expression de RANKL et à l'activation des enzymes métalloprotéases. En effet, les souris surexprimant l'IL-6 présentent une sévère ostéopénie caractérisée par la perte de la masse osseuse et des altérations de l'architecture osseuse¹²⁷. Ce constat a permis le développement d'un anticorps monoclonal spécifique au récepteur à l'IL-6, le Tocilizumab. L'utilisation de cet anticorps sur une arthrite expérimentale débutante inhibe le recrutement des lymphocytes Th17 dans la membrane synoviale ce qui résulte en une diminution de l'expression de l'Interleukine-17¹²⁸.
- IL-17 : produite par les Th17¹²⁹ et les mastocytes, l'IL-17 joue un rôle majeur dans l'initiation de l'inflammation. Chez les patients atteints de PR, elle est exprimée dans la membrane synoviale et régule l'expression de diverses cytokines, dont l'IL-6, en se fixant à son récepteur sur les macrophages et les fibroblastes^{130, 131}. En effet, l'IL-17 contrôle indirectement la formation d'ostéoclastes via la modulation de l'expression de RANKL¹³². De même que l'IL-6 régule l'expression de l'IL-17, l'IL-17 peut réguler l'expression de l'IL-6 en retour. Ainsi, dans le modèle d'arthrite induite au collagène, il a été montré que l'IL-6 inhibe préférentiellement l'expression de l'IL-17¹³³. Actuellement, une étude clinique de phase I est en cours pour valider l'utilisation comme stratégie thérapeutique de la PR d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-17¹³⁴.
- Les Colony-Stimulating Factors (CSFs): M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor) et G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) ont été identifiés grâce à leur capacité à générer *in vitro* des colonies de cellule myéloïdes matures à partir des cellules précurseurs de la moelle osseuse¹³⁵. M-CSF est produit de manière constitutive par différents types cellulaires comme les monocytes / macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules stromales, les cellules musculaires et les ostéoblastes alors que la production de GM-CSF requiert généralement un stimulus de type inflammatoire¹³⁶. L'IL-1 et le TNF- α

stimulent l'expression de ces cytokines par les fibroblastes synoviaux, les chondrocytes et les cellules endothéliales¹³⁷. GM-CSF a été impliqué dans la progression de l'arthrite chez les souris exprimant le transgène codant l'IL-1 α humaine¹³⁸. De plus, l'administration de l'une de ces cytokines à des souris ayant une arthrite modérée rend la maladie plus sévère. Cette expérience a permis de montrer par la suite que la délétion des gènes codant ces cytokines ou leur blocage par un anticorps monoclonal prévient le développement de l'arthrite¹³⁹. D'ailleurs, des essais cliniques de phase I sont en cours pour développer les anticorps monoclonaux dirigés contre ces cytokines. Il a été également montré que l'inhibition par l'Imatinib mésylate de l'activité tyrosine kinase au niveau du récepteur c-Fms, récepteur spécifique du M-CSF, prévient la destruction articulaire dans le modèle d'arthrite induite au collagène¹⁴⁰.

- RANKL : l'identification du système RANKL-RANK-ostéoprotégérine (OPG) a permis des avancées majeures dans la compréhension de la physiologie osseuse. La rupture de ce système provoque un déséquilibre entre formation et résorption osseuse et perturbe ainsi l'homéostasie osseuse. RANKL est un membre de la superfamille des TNF exprimé par les ostéoblastes et les LT CD4+ activés sous forme membranaire et soluble¹⁴¹. Il est nécessaire aux différentes étapes de différenciation des ostéoclastes. Par conséquent, les souris *rankl*^{-/-} présentent une ostéopétrose sévère caractérisée par une augmentation de la densité et de l'épaisseur des os due à un défaut de formation des ostéoclastes¹⁴². De plus, certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-17 et surtout le TNF- α induisent et augmentent l'expression de RANKL par les fibroblastes synoviaux et les LT CD4+ activés. Ainsi, RANKL se retrouve surexprimé dans plusieurs modèles animaux d'arthrite et dans le tissu synovial de patients atteints de PR¹³⁴. L'interaction de RANKL avec son récepteur RANK déclenche une cascade de signalisation qui conduit à la différenciation des ostéoclastes. Cette interaction peut être modulée par l'OPG, un facteur soluble dont l'action a été démontrée *in vitro* et *in vivo*^{143, 144}. En raison du rôle central de RANKL dans la pathogénie de la PR, un anticorps monoclonal dirigé contre cette cytokine a été développé (Dénosumab). Bien que cette stratégie thérapeutique ait montré des effets spectaculaires sur la résorption osseuse, elle ne permet pas pour autant de moduler la réponse inflammatoire¹⁴⁵.
- IFN- γ : Plusieurs études ont classé la PR comme une maladie à prédominance Th1 associée à une surexpression d'IFN- γ par les LT auto-réactifs. Cette classification découle surtout de l'étude du modèle d'arthrite induite au collagène où l'administration de l'IFN- γ

augmente l'incidence et la sévérité de la maladie¹⁴⁶. Par contre, dans le modèle d'arthrite induite au protéoglycane, c'est l'effet inverse qui se produit¹⁴⁷. Ainsi, le paradoxe lié à la signalisation induite par l'IFN- γ rend les applications thérapeutiques basées sur le rôle de cette cytokine assez complexes.

- Autres cytokines : D'autres cytokines dépendantes ou non de l'expression de celles précédemment citées sont impliquées dans la pathogénie de la PR mais aucune preuve n'a jusqu'à lors été apportée quant à leur rôle central. Parmi ces cytokines, on retrouve l'IL-2, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. Elles sont également retrouvées dans la membrane synoviale de patients atteints de PR^{113, 148}. Par ailleurs, l'IL-18 identifiée d'abord comme un inducteur de l'IFN- γ ¹⁴⁹ présente également une activité pro-inflammatoire au sein de la membrane synoviale et contribue à l'accélération de l'athérosclérose chez les patients atteints de PR¹⁵⁰.

1.3.2.2 Les cytokines anti-inflammatoires

En réponse à l'activation des cellules de l'immunité et aux cytokines pro-inflammatoires produites, des mécanismes anti-inflammatoires tentent de contrôler ce processus d'auto-réactivité installé dans les articulations. Ces mécanismes anti-inflammatoires sont gérés par des cytokines, dites de type Th2, parmi lesquelles on retrouve :

- IL-4 : Il a été montré que cette cytokine est présente à des quantités très faibles dans le liquide synovial de patients atteints de PR¹⁵¹. Ce manque en IL-4 contribue au déséquilibre des médiateurs de l'inflammation chez les patients atteints de PR. *In vitro*, l'IL-4 inhibe la formation d'ostéoclastes en bloquant de manière irréversible et STAT6-dépendante la voie RANK-RANKL¹⁵². La thérapie génique par l'IL-4 de l'arthrite induite au collagène chez la souris a permis de montrer que le rôle protecteur de cette cytokine *in vivo* contre la destruction cartilagineuse. En effet, l'IL-4 inhibe l'expression d'IL-6 et d'IL-17 et prévient ainsi la libération de collagène par les enzymes métalloprotéases activées¹⁵³.
- IL-10 : Plusieurs modèles animaux ont permis de démontrer l'efficacité d'un traitement par l'IL-10 dans la réduction de l'inflammation et de l'infiltration cellulaire ainsi que dans la destruction articulaire au cours de l'arthrite^{154, 155}. En effet, elle inhibe l'expression de l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α et augmente le ratio IL-1Ra / IL-1¹⁵⁶. Une étude réalisée en *ex vivo*

sur des LT CD4+ de patients atteints de PR a permis également de montrer que l'IL-10 supprime les lymphocytes Th17 et stimule les lymphocytes Treg CD4+ CD25+¹⁵⁷. Cependant, le traitement de patients atteints de PR pendant 28 jours par l'IL-10 a plutôt montré des résultats décourageants en terme d'efficacité¹⁵⁸.

- **IL-13** : il s'agit d'une cytokine dite IL-4-like en raison de leurs homologies structurale et fonctionnelle. En effet, tout comme l'IL-4, l'IL-13 présente une activité inhibitrice sur les fonctions monocytaires¹⁵⁹. Dans le modèle d'arthrite induite au collagène, le traitement par cette cytokine inhibe l'expression de l'IL-17¹⁶⁰. Une étude réalisée sur un modèle d'arthrite chez le rat a montré que l'IL-13 inhibe l'expression des métalloprotéases 2 et 9 ce qui lui confère des propriétés anti-angiogéniques¹⁶¹.

1.3.2.3 Les chimiokines

Les **chimiokines** sont des cytokines spécifiques du chimiotactisme qui aident les leucocytes à migrer à travers la barrière endothéliale et à atteindre le tissu synovial ce qui permet d'initier et d'entretenir l'arthrite¹⁶². Cette famille de cytokines est constituée de 4 groupes classés selon la position de leurs résidus cystéines : les C-X-C, les C-C, les C et les C-X-C3. Le rôle des 2 derniers groupes ne paraît pas très important dans la pathogénie de la PR, hormis peut être la lymphotactine, une chimiokine qui active les LT, les macrophages et les fibroblastes¹⁶³. Appartenant aux C-chimiokines et majoritairement produite par les LT CD8+ et T CD4+, elle inhibe l'expression de certaines enzymes métalloprotéases par les fibroblastes synoviaux¹⁶⁴. Parmi les C-X-C-chimiokines impliquées dans la pathogénie de la PR, on retrouve l'IL-8, ENA-78, Gro- α , Gro- β et CTAP-3. Abondamment présentes dans le liquide synovial et le sérum de patients atteints de PR en comparaison avec d'autres rhumatismes inflammatoires, elles sont chimio-attractives pour la plupart des cellules immunitaires mais préférentiellement pour les neutrophiles et possèdent des propriétés pro-angiogéniques. Parmi les C-C-chimiokines, on retrouve MCP-1, MIP-1 α et RANTES. Plus spécifiques du recrutement des macrophages que les C-X-C-chimiokines, elles sont détectées aux sites présentant des infiltrats extensifs et dans le sang périphérique des patients atteints de PR¹⁶³. Les interactions entre ces familles de chimiokines et les cytokines des voies Th1, Th17 et Th2 permettent de perpétuer l'inflammation au niveau des articulations ce qui contribue au caractère chronique de la PR.

I.3.3 Les enzymes métalloprotéases

Les **métalloprotéases** ou MMPs représentent la famille des endopeptidases. Elles sont capables de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène, le protéoglycane, la fibronectine et la laminine¹⁶⁵. Au cours de la PR, la destruction du cartilage articulaire est causée par certaines de ces métalloprotéases dérivées à la fois de la synovite et des chondrocytes stimulés, cellules formant le cartilage. Ces cellules surexpriment les MMP-1, -3, et -9¹⁶⁶. D'autres cellules participent également à ce processus : les fibroblastes produisent MMP-2, les polynucléaires neutrophiles sécrètent quant à eux MMP-8 et MMP-9 alors que les macrophages produisent MMP-1 et MMP-9¹⁶⁷. Toutes ces MMPs sont sécrétées dans la cavité articulaire où elles attaquent la surface du cartilage immergée dans le liquide synovial¹⁶⁸. Parmi elles, la MMP-3 est une collagénase particulièrement augmentée dans le liquide synovial de patients atteints de PR et sa détection dans le sérum semble prédire le niveau de destruction articulaire^{169, 170}. Cependant, dans le modèle d'arthrite induite au collagène, aucune différence significative n'a été notée entre les souris *mmp3*^{-/-} et les souris sauvages¹⁷¹. Une autre MMP semble jouer un rôle primordial dans la destruction articulaire : il s'agit de la MMP-9, une gélatinase fortement exprimée par les ostéoclastes et particulièrement localisée dans le cartilage calcifié¹⁶⁷. Des quantités élevées de proMMP-9, forme inactive de MMP-9, ont été retrouvées dans le sérum et le liquide synovial de patients atteints de PR en comparaison avec des donneurs sains. Un marquage abondant de cette protéase a été également retrouvé dans les vaisseaux sanguins à proximité de la membrane synoviale, indiquant vraisemblablement une activité pro-angiogénique¹⁷². Des inhibiteurs de ces MMPs, appelés TIMPs, sont également sécrétés par les mêmes cellules de l'infiltrat inflammatoire qui sécrètent les MMPs, mais il a été montré que dans le liquide synovial rhumatoïde, le ratio MMPs / TIMPs est augmenté¹⁶⁹.

I.4 Conclusion

Bien que ces différents acteurs de l'inflammation présentent une activité accrue au cours du processus rhumatoïde, aucun d'entre eux n'est exclusif de la PR. Néanmoins, certains examens sanguins et synoviaux permettent de contribuer au diagnostic de la maladie et d'en suivre l'évolution. Par contre, il est clair que l'ensemble de ces acteurs contribue aux caractères auto-immun, systémique et chronique de la PR. L'auto-réactivité des cellules de l'immunité et la surexpression des différents médiateurs de l'inflammation au niveau de la cavité articulaire conduit à une hyper-production de MMPs et à une activité accrue des ostéoclastes, qui vont respectivement détruire le cartilage articulaire et résorber l'os sous-chondral. Cette destruction cartilagineuse et osseuse constitue donc la deuxième composante de la PR.

II. La résorption osseuse au cours de la Polyarthrite Rhumatoïde

L'homéostasie osseuse dépend de l'activité coordonnée des cellules résorbant l'os, les ostéoclastes, et des cellules formant l'os, les ostéoblastes. Cette activité dépend de l'expression de la cytokine RANKL qui contrôle la balance entre ces 2 types cellulaires. Des études histologiques ont montré que dans la PR, comme dans toute autre maladie ostéolytique d'ailleurs, un déséquilibre de cette balance est créé en faveur d'une augmentation de l'activité des ostéoclastes^{173, 174}.

II.1 Mécanisme cellulaire de différenciation des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes allant de 20 à 100µm et multinucléées renfermant entre 3 et 100 noyaux, des lysosomes, des granules denses et un appareil de Golgi particulièrement extensif. Tous ces éléments sont nécessaires à la synthèse des facteurs requis pour la dégradation de la matrice osseuse et à la phagocytose des produits de cette dégradation¹⁷⁵.

Les ostéoclastes dérivent des cellules souches hématopoïétiques qui se différencient en progéniteurs myéloïdes CFU-M (Macrophage-Colony Forming Unit) sous l'effet des cytokines de la famille des CSF (M-CSF, G-CSF et GM-CSF) (Figure 9).

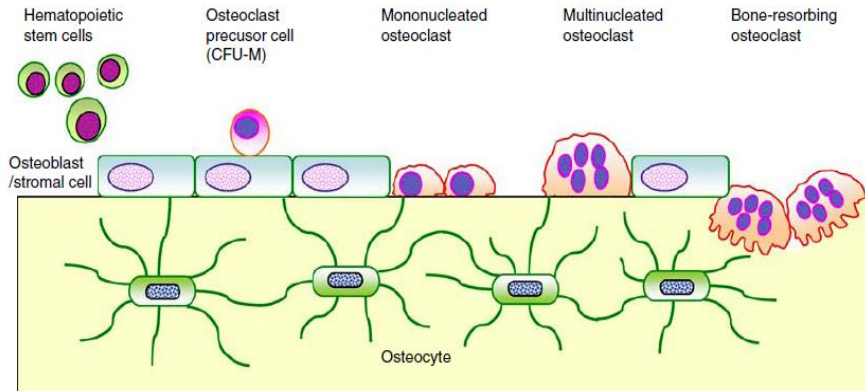


Figure 9 : Différenciation des ostéoclastes à partir des cellules souches hématopoïétiques¹⁷⁶

Ces progéniteurs myéloïdes peuvent être des monocytes qui se différencient en ostéoclastes en réponse aux cytokines M-CSF et RANKL¹⁷⁷. De façon similaire, ils peuvent être des DCs immatures soit dérivées de monocytes sanguins circulants après stimulation par le GM-CSF et l'IL-4, soit dérivées directement de cellules souches CD34+, en réponse au GM-CSF et au TNF- α ^{178, 179}. Plusieurs expériences ont démontré la pluripotentialité de progéniteurs myéloïdes. En effet, des précurseurs de la moelle osseuse peuvent être induits à se différencier en DCs immatures ou en ostéoclastes, selon qu'ils soient cultivés en présence de RANKL combiné au GM-CSF ou au M-CSF, respectivement¹⁸⁰. De plus, des monocytes sanguins stimulés par le GM-CSF et l'IL-4 se

différencieront en DCs immatures, tandis qu'en présence de M-CSF et d'IL-6, ils formeront des macrophages¹⁸¹. Enfin, des précurseurs macrophagiques Flt3+, obtenus après culture primaire de cellules de moelle osseuse en présence de Flt3 ligand, montrent une évolution séquentielle de leur potentiel de différenciation qui peut s'orienter en fonction du temps de culture vers différentes lignées. En effet, ils s'orientent vers la lignée ostéoclastique sous l'effet des cytokines M-CSF et RANKL ou du TNF- α . Ils peuvent également s'orienter vers la lignée dendritique sous l'effet de GM-CSF et de RANKL ou du TNF- α . Sur un temps de culture plus long, ils peuvent s'orienter vers la lignée microgliale. Le phénotype CD11b+ étant maintenu au cours de ces différenciations, ces cellules conservent donc leur potentiel de différenciation macrophagique¹⁸². Ce dernier résultat souligne la plasticité de différenciation des phagocytes mononucléés et renforce l'idée qu'il existe un progéniteur commun à ces différentes lignées (Figure 10).

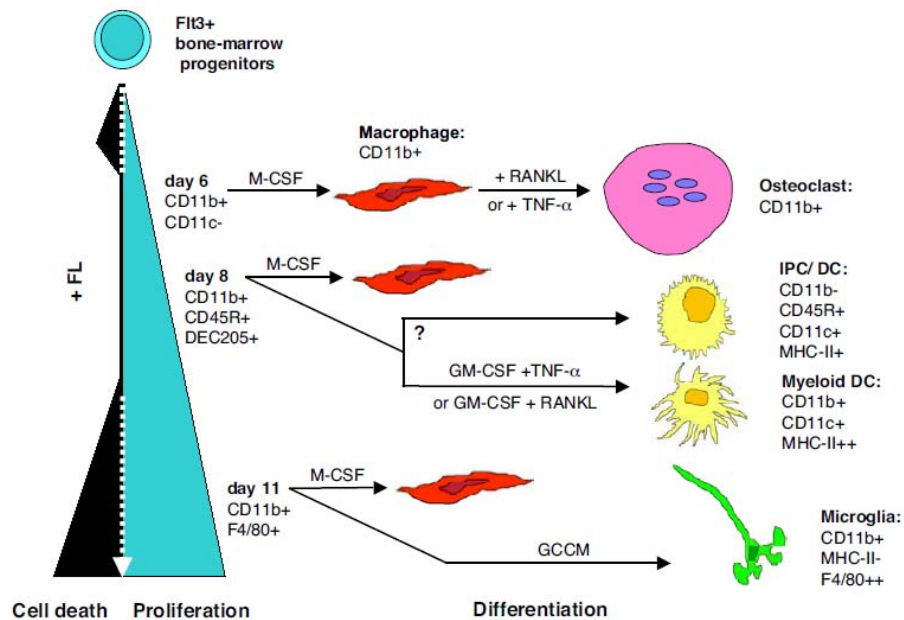


Figure 10 : Différenciation séquentielle des précurseurs Flt3+ en macrophages, ostéoclastes, DCs, et cellules microgliales (GCCM: glial cell-conditioned medium; IPC: interferon producing cells)¹⁸²

Dans le tissu synovial, les différents précurseurs d'ostéoclastes prolifèrent et sous l'effet de la cytokine RANKL, produite par les ostéoblastes, les fibroblastes synoviaux et les LT, une cascade de signalisation est mise en place pour permettre la fusion de ces cellules mononucléées et la formation d'ostéoclastes. Ce mécanisme de fusion leur permet d'augmenter la taille de la cellule et de résorber ainsi une surface osseuse plus large¹⁸³. L'expression de certains gènes spécifiques comme le gène codant la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) ou le gène codant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est caractéristique des cellules multinucléées générées¹⁷⁶.

II.2 Mécanisme moléculaire de différenciation des ostéoclastes

Bien que très peu d'information existe quant à l'ostéoclastogénèse *in vivo*, il est établi que la différenciation des monocytes / macrophages *in vitro* en ostéoclastes est soutenue par les cellules mésenchymateuses (cellules stromales et ostéoblastes) à travers un processus de contact cellule-cellule¹²¹. Le mécanisme moléculaire de cette différenciation est régulé par les deux cytokines M-CSF et RANKL.

II.2.1 La prolifération des précurseurs d'ostéoclastes

La prolifération des précurseurs d'ostéoclastes est la première étape conduisant à la formation d'ostéoclastes. Elle est régulée par la cytokine M-CSF, identifiée comme un facteur essentiel de l'ostéoclastogénèse. Cette cytokine transmet son signal via son récepteur spécifique c-Fms, membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase¹⁸⁴. Chez l'Homme, ce récepteur est retrouvé dans les tissus hématopoïétiques tels que la rate et les ganglions lymphatiques et est principalement exprimé par les cellules de la lignée monocytaire/macrophagique, les ostéoclastes, les lymphocytes B et aussi par les cellules microgliales (macrophages résidant dans le cerveau)¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. L'auto-phosphorylation du récepteur c-Fms en réponse au M-CSF conduit à sa liaison avec plus de 150 complexes protéiques, impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation et la ré-organisation du cytosquelette¹⁸⁹ (Figure 11).

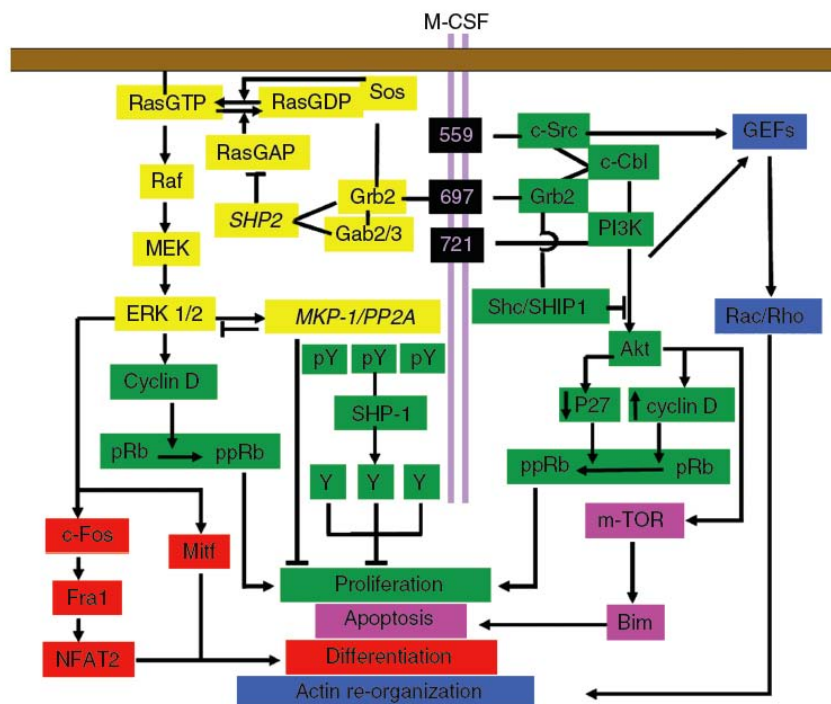


Figure 11 : Résumé des mécanismes moléculaires liés à l'activation du récepteur c-Fms¹⁸⁴

La formation de ce complexe macromoléculaire autour du récepteur c-Fms dénote la complexité du signal induit en aval de ce récepteur. L'activation des voies ERK et Akt constitue un des paramètres clés de la signalisation induite par M-CSF puisque ces voies sont nécessaires à la prolifération des cellules précurseurs qui constitue la première étape de la formation des ostéoclastes¹⁸⁴.

La régulation de l'expression du récepteur c-Fms est fortement contrôlée par le facteur de transcription Runx1. En effet, Runx1 est physiquement associé à un nombre limité de facteurs de transcription comprenant PU.1¹⁹⁰, C/EBP α ¹⁹¹ et Cbfb¹⁹² qui sont impliqués dans le contrôle de la différenciation des cellules myéloïdes. Un autre facteur de transcription, MITF, est également important dans la régulation de l'expression du récepteur c-Fms. Activé par la liaison de M-CSF à son récepteur, MITF induit Bcl-2 qui joue un rôle crucial dans la survie cellulaire. En effet, il a été montré que l'expression transgénique de Bcl-2 supprime l'ostéopétrose congénitale développée par les souris *op/op*, déficientes en M-CSF¹⁹³. La mutation *op* consiste en l'insertion d'une thymidine en position 262 du gène codant M-CSF. Ceci conduit à la formation d'un codon stop prématuré et aboutit à la production d'une forme tronquée de M-CSF, biologiquement inactive^{194, 195}. L'analyse des souris *op/op* a permis par ailleurs de montrer que l'activité de M-CSF est exclusivement assurée par le c-Fms. En effet, les souris dont le gène *c-fms* est invalidé présentent le même phénotype que les souris *op/op*¹⁹⁶. Le déficit en M-CSF entraîne d'importantes conséquences sur l'hématopoïèse : le nombre de progéniteurs myéloïdes CFU-M présents dans la moelle osseuse est réduit d'environ 90%, la population macrophagique médullaire est déficiente, tandis que la rate, le thymus et le foie présentent 30 à 45% du nombre normal de macrophages¹⁹⁷. Ceci indique que M-CSF joue le rôle d'un facteur de survie des cellules précurseurs d'ostéoclastes.

M-CSF stimule également l'expression de RANK sur les précurseurs d'ostéoclastes, les rendant ainsi capables de répondre efficacement à RANKL⁸⁶. Une série de modèles murins a montré que l'axe RANK / RANKL est indispensable à la différenciation des ostéoclastes^{141, 142}.

II.2.2 La fusion des précurseurs d'ostéoclastes

RANKL, anciennement nommé ODF (Osteoclast Differentiation Factor) ou encore TRANCE (TNF-Related Activation-induced Cytokine), est une protéine membranaire appartenant à la famille des TNF qui exerce son activité via sa liaison avec son récepteur RANK exprimé par les précurseurs d'ostéoclastes. Produit en 3 sous-unités qui s'assemblent pour former un complexe trimérique, il s'ancre dans la membrane mais peut être également sécrété sous forme soluble¹⁹⁸. Les 2 formes fonctionnent comme des agonistes potentiels de la formation d'ostéoclastes *in vitro* mais certains auteurs suggèrent que la forme membranaire serait plus efficace que la forme soluble¹⁹⁹.

Identifié comme un activateur des DCs, il a été suggéré que RANKL constitue un pont entre le système immunitaire et le système osseux. En effet, en plus de l'ostéopétrose sévère, la délétion du gène *rankl* conduit à une formation anormale des organes lymphoïdes et par conséquent à un défaut de la différenciation lymphocytaire. L'hypothèse découlant de cette observation est que la résorption osseuse observée au cours de la PR est due à un défaut de contrôle du métabolisme osseux par le système immunitaire¹⁷⁶. Ainsi, il a été montré que le mécanisme moléculaire de formation des ostéoclastes est régulé par les LT via la signalisation induite par RANKL (Figure 12) (Cf. 1.2.2 Les lymphocytes T). Les ostéoclastes se retrouvent donc à l'interface entre le système immunitaire et la physiologie osseuse ce qui a conduit à l'émergence de l'ostéoimmunologie, un concept offrant de nouvelles perspectives dans la compréhension et le traitement des pathologies inflammatoires ostéo-articulaires, telles que la PR.

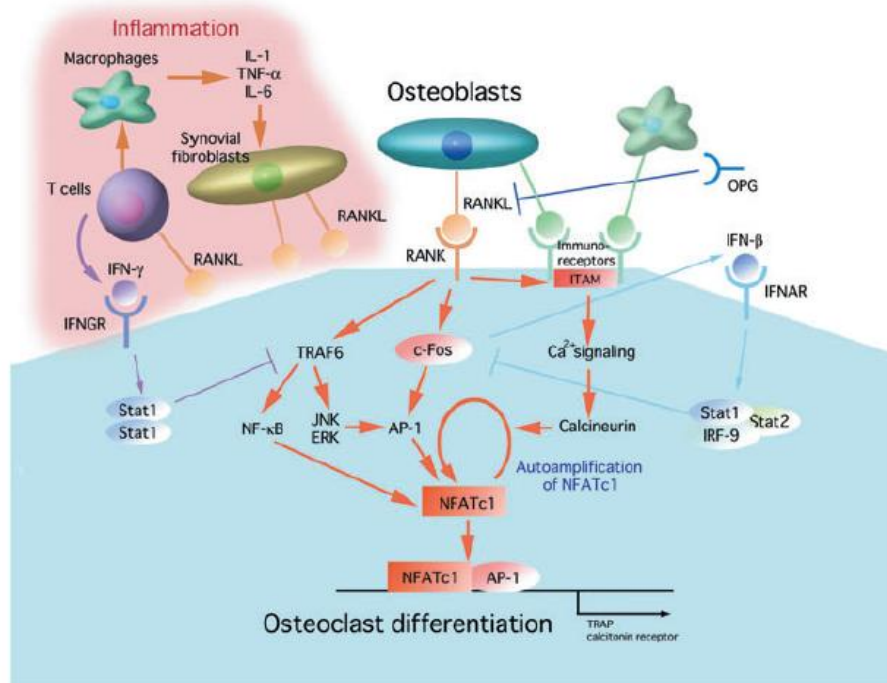


Figure 12 : Interactions entre les systèmes immunitaires et osseux à travers RANKL¹⁴¹

La formation d'ostéoclastes peut être activée par la vitamine D3 (dérivée du cholestérol) et par les cytokines pro-inflammatoires IL-1, TNF- α , IL-6 et IL-17 qui régulent positivement l'expression de RANKL¹⁴¹. Cette formation d'ostéoclastes peut être également inhibée *in vitro* par l'OPG, une protéine sécrétée présentant une homologie de séquence avec RANKL¹⁴¹. En effet, elle joue le rôle de récepteur soluble pour RANKL et permet ainsi d'inhiber de manière compétitive sa fixation au récepteur RANK²⁰⁰ (Cf. 1.3.2.1 Les cytokines pro-inflammatoires / RANKL) (Table 1).

	RANKL	OPG
Hormones		
Vitamin-D3	Increased	Increased
PTH	Increased	Decreased
PTHrP	Increased	Decreased
Estradiol	No change	Increased
Cytokines		
TNF- α	Increased	Increased
IL-1	Increased	Increased
IL-6	Increased	n.t.
IL-11	Increased	n.t.
IL-17	Increased	n.t.
Growth factors		
TGF- β	Decreased	Increased
BMP-2	n.t.	Increased
Others		
Prostaglandin E2	Increased	Decreased
Glucocorticoid	Increased	Decreased
CD40L	Increased	n.t.

Table 1 : Molécules régulant l’expression de RANKL et de l’OPG¹⁴¹

Le TGF- β , facteur de croissance sécrété par les LT, est une cytokine qui régule négativement l’expression de RANKL par les ostéoblastes, *in vitro*, affectant ainsi sa capacité à initier l’ostéoclastogénèse²⁰¹. De plus, l’administration de TGF- β réduit considérablement l’infiltration cellulaire et la destruction du cartilage chez les souris dont l’arthrite est induite au streptocoques (SCW, Streptococcal Cell Wall)²⁰². Cependant, le rôle protecteur du TGF- β a été récemment controversé puisque dans des cultures de LT supplémentées de TNF- α , il accroît l’expression de RANKL²⁰³. Cette controverse est également soutenue par l’inhibition *in vivo* de l’arthrite induite au collagène chez le rat après administration d’un inhibiteur du récepteur au TGF- β ²⁰⁴.

Le récepteur RANK est un hétérodimère membranaire exprimé par les précurseurs d’ostéoclastes, les ostéoclastes matures et les chondrocytes¹⁷³. Les souris *rank*^{-/-} présentent un défaut de formation d’ostéoclastes exactement comme les souris *rankl*^{-/-}.

Ce défaut peut être restauré par la réintroduction de RANK dans les progéniteurs de la moelle osseuse^{205, 206}. Par ailleurs, le récepteur RANK ne possède pas d’activité enzymatique intrinsèque dans son domaine intracellulaire et transduit son signal via le recrutement de protéines dites « adaptatrices » dont la plus importante est la protéine TRAF-6^{207, 208}. D’autres protéines adaptatrices sont également impliquées dans la signalisation induite par RANKL. Parmi ces protéines, on retrouve DAP12 et les récepteurs de type Fc γ . Associées à un récepteur de type Ig-like, ces protéines induisent un signal de co-stimulation pour le récepteur RANK et permettent surtout l’activation du signal calcique²⁰⁹.

II.2.2.1 Activation de NF- κ B

Le trimère RANKL/RANK/TRAF-6 formé permet surtout l'activation de NF- κ B. Il s'agit d'un facteur de transcription dimérique initialement présent dans le cytoplasme. Le signal induit par RANKL permet sa translocation dans le noyau où il reconnaît une séquence spécifique d'ADN nommée I κ B. Chez les mammifères, il existe plusieurs protéines NF- κ B dont les plus documentées sont NF- κ B1 (ou p50) et NF- κ B2 (ou p52)²¹⁰. Il a été montré que ces deux protéines ont des activités qui se compensent mutuellement alors que l'absence des deux à la fois entraîne un défaut de résorption osseuse. En effet, les souris *p50*^{-/-} et les souris *p52*^{-/-} ne montrent aucun désordre du métabolisme osseux alors que les souris *p50/p52*^{-/-} développent une ostéopétrose sévère due au défaut de formation d'ostéoclastes²¹¹. Il est établi que les voies de signalisation des cytokines pro-inflammatoires convergent vers le facteur de transcription NF- κ B ce qui dénote donc de son rôle essentiel à la fois dans le mécanisme inflammatoire et dans la résorption osseuse entourant la pathogénie de la PR.

II.2.2.2 Activation des MAPKs

Le signal induit par RANKL permet également l'activation des Mitogen-Activated Kinases (MAPKs). Parmi ces MAPKs, p38 semble jouer un rôle important dans la différenciation d'ostéoclastes. En effet, l'inhibition des 2 sous-unités α et β de p38-MAPKs supprime la formation d'ostéoclastes dans les lignées macrophagiques murines RAW264.7²¹². Bien que très peu d'informations existent quant au rôle des MAPKs *in vivo* et leur implication dans la formation d'ostéoclastes, il a été montré que p38-MAPKs est impliquée dans l'activation des facteurs de transcription de la famille AP-1 dont le rôle est essentiel pour la fusion des progéniteurs myéloïdes CFU-M²¹³.

II.2.2.3 Activation de la voie c-Fos/AP-1

Le complexe de transcription AP-1 est formé des protéines Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2), Jun (c-Jun, JunB et JunD) et ATF (ATF-a, ATF-2, ATF-3, ATF-4 et B-ATF). La protéine la plus importante de ce complexe est la protéine c-Fos²¹⁴. En effet, les souris *cfos*^{-/-} développent une ostéopétrose sévère due à un blocage total de la formation d'ostéoclastes²¹⁵. *In vitro*, les autres membres de la famille Fos peuvent partiellement se substituer à la protéine c-Fos et restaurer faiblement la différenciation des précurseurs d'ostéoclastes²¹⁶. Quant à la famille Jun, il a été montré que la déficience de c-Jun et JunB est létale pour les embryons murins, *c-jun* et *jun-B* étant deux gènes nécessaires pour la formation du placenta^{217, 218}. Pour déterminer le rôle des protéines Jun dans le développement

osseux, un allèle floxé de JunB a été introduit par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires. Les souris homozygotes *JunB^{f/f}* générées de cette mutation sont croisées par la suite à des souris MORE-Cre, exprimant la Cre-recombinase au niveau de l'épiblaste (feuillet cellulaire externe de l'embryon). A l'âge de 4 semaines, les souris issues de ce croisement développent une ostéopénie sévère due à l'absence de formation d'ostéoclastes et qui progresse avec l'âge²¹⁸. Contrairement à la famille Fos, ce blocage de la différenciation des ostéoclastes n'est pas total ce qui suggère que, les protéines Jun peuvent se substituer complètement les unes aux autres. Concernant les protéines ATF, leur implication dans la formation d'ostéoclastes n'a pas été définie²¹⁹.

L'importance de la voie c-Fos/AP1 réside surtout dans sa capacité à induire spécifiquement NFATc1, le facteur de transcription majeur de l'ostéoclastogénèse.

II.2.2.4 Activation de NFATc1

La famille des facteurs de transcription NFAT a initialement été identifiée dans les LT et comprend 5 membres : NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 et NFAT5. Ils sont impliqués dans la régulation de plusieurs systèmes biologiques dont le système cardiovasculaire, le système musculaire et le système immunitaire²²⁰. Le rôle essentiel et suffisant de NFATc1 dans la formation d'ostéoclastes a été démontré à la fois *in vivo* et *in vitro*. En effet, la délétion du gène *nfatc1* est létale en raison de l'importance de ce facteur de transcription dans la morphogénèse des valves cardiaques²²¹. Il a été montré que les cellules souches embryonnaires *nfatc1^{-/-}* ne se différencient pas *in vitro* en ostéoclastes et que l'expression de NFATc1 par les cellules précurseurs dérivées de la moelle osseuse conduit à la formation d'ostéoclastes même en absence de RANKL²²². Dans le noyau, NFATc1 se fixe à son propre promoteur et en association avec d'autres facteurs de transcription comme AP-1, PU.1 et MITF, il induit sa propre amplification ainsi que l'expression des gènes spécifiques de l'ostéoclastogénèse⁸⁶. Parmi ces gènes régulés par NFATc1, on retrouve le gène codant la protéine Dendritic-Cell-Specific Transmembrane protein (DC-STAMP). Le rôle de cette protéine transmembranaire a initialement été identifié dans les DCs et dans les macrophages stimulés par l'IL-4. En effet, la capacité des cellules mononucléées *dc-stamp^{-/-}* à fusionner est totalement bloquée mais ces cellules restent toujours actives suggérant que cette protéine est exclusivement impliquée dans le processus de fusion²²³. Le gène codant le FcγR OSCAR (Osteoclast-Associated Receptor), identifié comme spécifique des ostéoclastes, est également régulé par NFATc1. En effet, OSCAR est un récepteur de type Ig-like qui constitue un signal de co-stimulation pour RANK et permet également le recrutement des Spleen tyrosine kinases (Syk)^{209, 224}. Ces kinases activent la

phospholipase C γ ce qui conduit à la libération du calcium par les vésicules intracellulaires. Le signal calcique engendré active à son tour une phosphatase spécifique, appelée calcineurine, qui entretient en retour l'expression de NFATc1 (Figure 13)⁸⁶.

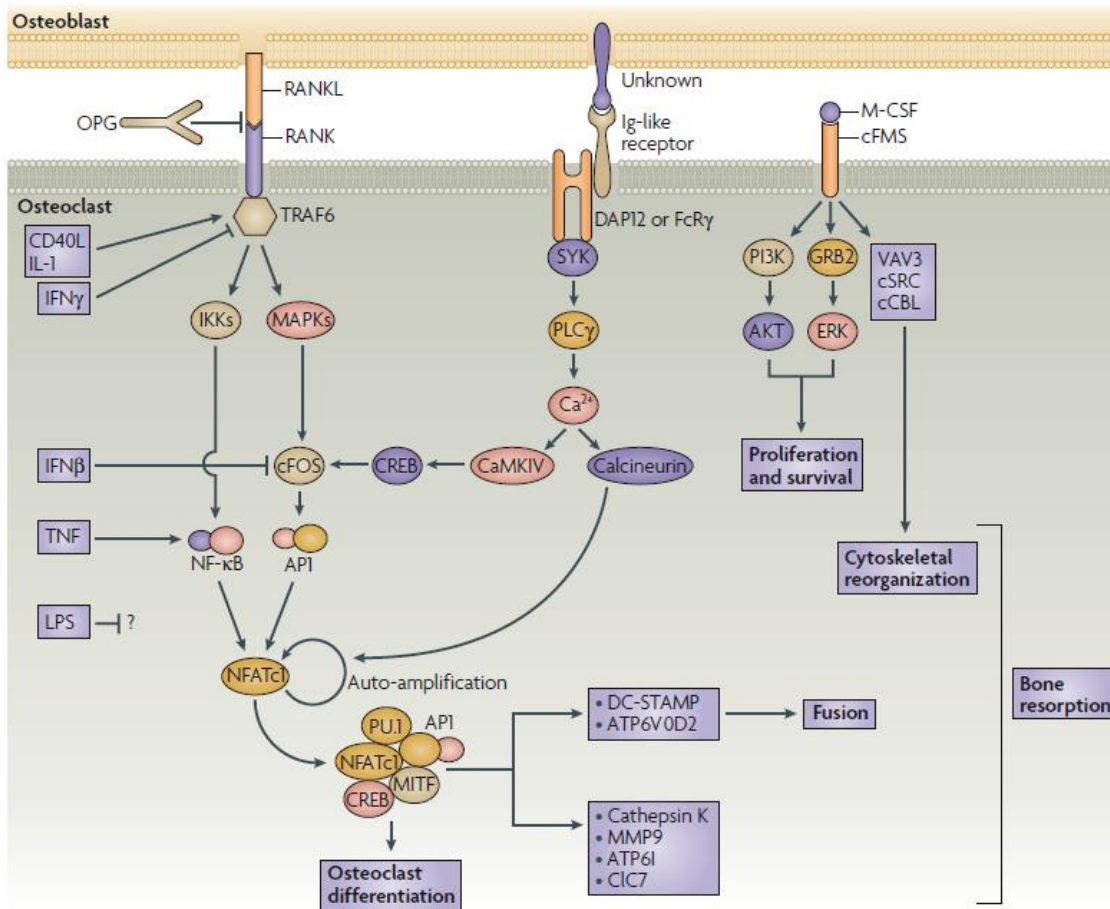


Figure 13 : Mécanisme moléculaire de différenciation des ostéoclastes⁸⁶

II.3 Mécanisme de destruction cartilagineuse et osseuse

II.3.1 La destruction cartilagineuse

Contrairement au remodelage osseux dans lequel des cellules non-résidentes d'origine hématopoïétique et mésenchymateuse sont recrutées à la surface de l'os, le remodelage du cartilage est exclusivement réalisé par les chondrocytes. Ces cellules sont responsables de la formation de la matrice extracellulaire mais aussi de la synthèse des protéases qui dégradent cette matrice. Contrairement à l'os qui est remodelé tout au long de la vie, le remodelage du cartilage est très limité dans le temps en raison de l'incapacité des chondrocytes à réparer continuellement la matrice. La majorité des médiateurs inflammatoires responsables de l'activité accrue des ostéoclastes sont également responsables de la destruction du cartilage. Ces médiateurs agissent soit directement en activant les protéases présentes dans la membrane synoviale, soit indirectement en activant les

chondrocytes qui vont produire de manière excessive les MMPs et dégrader ainsi plus rapidement le cartilage qu'ils ne le forment¹⁷³.

II.3.2 La destruction osseuse

Dans les conditions physiologiques normales, la signalisation initiant le processus de remodelage osseux est activée par les ostéoblastes à la surface de l'os et les cellules stromales de la moelle osseuse. Activées par des cytokines et des hormones, ces cellules libèrent à leur tour des cytokines et des chimiokines responsables du recrutement et de l'induction des ostéoclastes. Une fois la phase de résorption achevée, les ostéoblastes résidents et les ostéoclastes entrent en apoptose et la surface osseuse est de nouveau repeuplée par des pré-ostéoblastes qui se différencient en ostéoblastes. Ces cellules matures sont déposées alors sur la matrice osseuse qu'elles minéralisent pour former la nouvelle surface osseuse. Au cours de ce processus de remodelage osseux, la quantité d'os résorbé par les ostéoclastes est proportionnelle à la quantité d'os formé par les ostéoblastes. Ainsi, ce processus permet au squelette de s'adapter à son environnement biomécanique.

Comme on l'a vu précédemment, dans un contexte de PR, les cellules immunitaires libèrent les médiateurs de l'inflammation (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-17, M-CSF, RANKL, etc) de manière excessive et incontrôlée ce qui aboutit à une différenciation et à une activité accrues des ostéoclastes. Par conséquent, les érosions osseuses observées témoignent d'un déséquilibre de la balance entre formation et résorption osseuse. En effet, à l'interface os-pannus, on retrouve des lacunes de résorption envahies par des ostéoclastes à forte activité de résorption. Un certain nombre de marqueurs phénotypiques (OSCAR, DC-STAMP) sont utilisés pour identifier ces cellules et surtout pour les différencier de leurs précurseurs ainsi que des autres types cellulaires présents dans l'os¹⁷³. Par ailleurs, les ostéoclastes particulièrement compétents dans la résorption osseuse sont caractérisés par leur multi-nucléation ainsi que l'expression de protéases acides telles que la Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) et la Cathepsine K, responsables de la dégradation de la matrice osseuse. Ces cellules ont également la particularité d'exprimer à leur surface des récepteurs impliqués dans l'attachement cellulaire tels que la Vitronectine et le récepteur à la Calcitonine. Ce dernier s'avère particulièrement intéressant puisqu'il n'est exprimé ni par les macrophages, ni par les autres cellules hématopoïétiques et apparaît exclusivement au moment où la cellule devient pleinement apte à résorber l'os²²⁵.

Bien que plusieurs études impliquent directement d'autres types cellulaires comme les fibroblastes ou les macrophages synoviaux, les études sur les modèles animaux ont largement démontré que les ostéoclastes sont les cellules majeures responsables de l'érosion osseuse observée au cours de la PR^{226, 227}.

II.4 Conclusion

Les médiateurs de l'inflammation jouent un rôle primordial dans l'initiation et l'entretien de l'inflammation synoviale. Ils agissent également de façon directe sur les cellules de l'os et du cartilage, affectant ainsi leur fonction et leur capacité à maintenir l'homéostasie osseuse. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la destruction osseuse et cartilagineuse observée au cours de la PR ont permis le développement de différentes stratégies thérapeutiques basées essentiellement sur l'inhibition de ces médiateurs (Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Anakinra, Tocilizumab, Denosumab, Abatacept, Rituximab, etc) et qui permettent aujourd'hui de mieux contrôler les processus inflammatoires et destructeurs qui caractérisent la PR.

III. Les thérapies de la Polyarthrite Rhumatoïde

La PR est une maladie qui évolue en 3 phases : dans un premier temps, l'inflammation intervient par le biais de l'enchaînement d'un certain nombre de phénomènes biochimiques et cellulaires, étroitement liés entre eux, culminant avec la libération de cytokines pro-inflammatoires dans la synovite, ce qui occasionne des douleurs, une sensibilité à la pression et un gonflement autour des articulations. Dans un second temps, cet enchaînement entraîne une prolifération des cellules immunitaires qui épaississent la membrane synoviale et entraînent la formation du pannus. Enfin, les enzymes (métalloprotéinases, sérine protéases) présentes dans l'articulation et à l'interface pannus - cartilage, provoquent la destruction du cartilage et de l'os sous-chondral. Un traitement précoce et adéquat des patients détermine l'évolution de la maladie et notamment permet de prévenir les destructions articulaires et les complications qui résultent d'un état inflammatoire chronique (lymphomes, troubles cardiovasculaires, etc) (Figure 14).

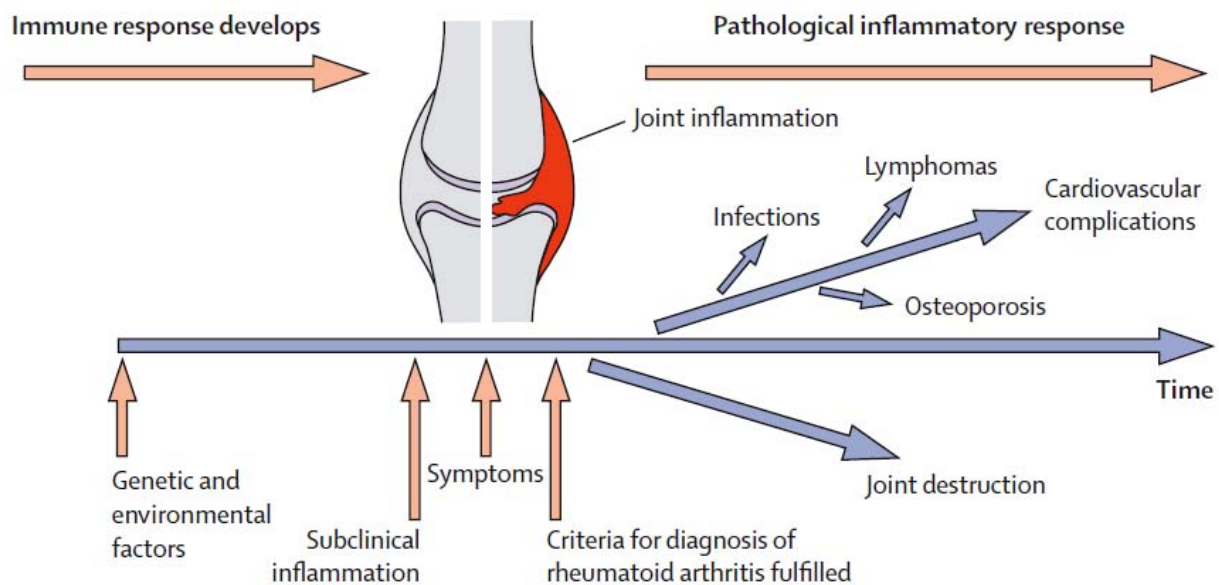


Figure 14 : Evolution de la PR au cours du temps²²⁸

Durant les années 1980, le traitement de la PR a été basé sur le contrôle des symptômes de la PR (douleur, rigidité) par l'utilisation d'Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens (AINS) ou de corticostéroïdes. L'efficacité limitée de ces traitements et leur incapacité à modifier le cours de maladie à long terme a conduit à l'utilisation de traitements, dits de fond qu'on regroupe sous l'appellation DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs). Ces DMARDs constituent un groupe hétérogène d'agents pharmacologiques ayant des effets anti-rhumatismaux spécifiques : ils

réduisent le gonflement articulaire et la douleur, inhibent les marqueurs de la phase aiguë de la maladie et limite la destruction osseuse. A la fin des années 1990, l'introduction d'agents biologiques dans le traitement de la PR, regroupés sous le nom « Biothérapies », a révolutionné la prise en charge de cette maladie²²⁹.

III.1 Les traitements de fond

Visant à contrôler les manifestations inflammatoires cliniques de la maladie et à freiner son évolution destructrice, l'efficacité de ces traitements, dits de fond, est en général retardée (un à trois mois), rémanente (reprise d'activité après l'arrêt du traitement), et malheureusement inconstante. Ils doivent donc être constamment adaptés à l'activité inflammatoire et à la sévérité de la maladie. Parmi ces traitements, on retrouve :

III.1.1 Le Méthotrexate

Le méthotrexate inhibe la dihydrofolate réductase, une enzyme catalysant la conversion du dihydrofolate en tétrahydrofolate, la forme active du folate. L'acide tétrafolique étant nécessaire à la synthèse de novo des purines et de la thymidine, le méthotrexate inhibe la synthèse de l'ADN. Ainsi, il agit comme un cytostatique sélectif de la phase S de la réplication cellulaire ce qui explique qu'il est plus actif sur les cellules à prolifération rapide. Il constitue le DMARD le plus utilisé que ce soit seul ou en combinaison avec un autre DMARD ou avec une biothérapie. Bien qu'il ne soit pas spécifique à la PR (leucémie lymphoblastique aiguë, psoriasis, maladie de Crohn), plusieurs études ont établi qu'il est particulièrement efficace sur les arthrites débutantes²³⁰⁻²³³. D'ailleurs, une étude récente a montré qu'il est particulièrement préférable d'administrer le méthotrexate à des patients arthritiques avant même de diagnostiquer spécifiquement une PR²³⁴. L'efficacité et le faible coût du traitement par méthotrexate (150€ par an) ont certainement contribué à son succès. Cependant, il s'avère aujourd'hui que cette efficacité n'est que partielle puisqu'une minorité de patients atteints de PR et traités uniquement par méthotrexate entrent en rémission²³⁵. De plus, il présente des effets secondaires non négligeables (fortement tératogène, risque accru de pneumopathie)²³⁶.

III.1.2 Le Léflunomide

Le léflunomide (*Arava*) inhibe la dihydroorotate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale qui permet la transformation du dihydroorotate en orotate, étape nécessaire à la synthèse de novo des pyrimidines et plus particulièrement de l'uridine monophosphate (UMP). Le déficit en UMP active l'expression de la protéine p53 ce qui conduit à l'arrêt de la division cellulaire. Plus spécifique de la

PR que le méthotrexate mais d'une efficacité comparable, le léflunomide est surtout administré dans les cas d'arthrite active modérée à sévère ou d'antécédents de troubles pulmonaires qui empêchent la prescription de méthotrexate. Particulièrement actif sur les LT CD4+ auto-réactifs, il possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-destructrices qui permettent un ralentissement des signes radiologiques de la PR^{237, 238}. Comme le méthotrexate, le léflunomide est fortement tératogène et accroît le risque d'atteintes hépatiques et rénales^{239, 240}.

III.1.3 La Sulfasalazine

La Sulfasalazine (*Salazopirine*) est un dérivé de l'acide amino-salicylique qui permet d'inhiber l'activité de NF- κ B et d'induire l'apoptose des cellules T²⁴¹. D'efficacité comparable à celle du méthotrexate auquel elle pourrait être associée en cas de poussées, la sulfasalazine est mieux tolérée chez les patients âgés. Généralement, elle constitue une alternative à l'administration du méthotrexate et est administrée dans les cas très sévères de PR²⁴².

D'autres immunosuppresseurs sont plus rarement administrés car ils sont soit moins efficaces que le méthotrexate : c'est le cas de l'Azathioprine (*Imurel*)²⁴³ soit plus toxiques : c'est le cas de la Ciclosporine (*Neoral*)²⁴⁴. De plus, les effets secondaires de ces deux traitements sont non négligeables : augmentation du risque infectieux par tuberculose²⁴⁵, troubles hépatiques (taux élevés des transaminases hépatiques)²⁴³ suite au traitement par l'Azathioprine, troubles cardiovasculaires (hypertension artérielle)²⁴⁶ et rénaux (taux élevés de créatinine)²⁴⁴ suite au traitement par Cyclosporine.

III.2 Les Biothérapies

Bien que les traitements de fond soient efficaces et assez bien tolérés, un nombre conséquent de patients ne répondent pas à ces traitements. De plus, les effets secondaires qui découlent de leur utilisation, notamment à forte dose, sont assez conséquents. Ceci a conduit au développement de stratégies thérapeutiques, appelées « biothérapies », basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de protéines de fusion ciblant une cytokine particulière ou une molécule de surface spécifique (Figure 15).

La première percée des biothérapies ciblant la réponse immunitaire innée découle de la caractérisation biologique du TNF- α dans la membrane synoviale de patients atteints de PR au début des années 1990^{247, 248}. En effet, le blocage du TNF- α chez des patients ayant une PR active par un anticorps monoclonal chimérique, le cA2, a montré le rôle important que joue cette cytokine dans la

pathogénie de la PR²⁴⁹. Depuis, plusieurs anti-TNF- α (Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Certolizumab Pegol) ont été développés et sont couramment utilisés en clinique. Le succès qu'ont réalisé ces anticorps a conduit, par la suite, au développement d'une série d'autres agents biologiques ciblant des cellules (Abatacept, Rituximab) et des voies inflammatoires qui ont leur importance dans la pathogénie de la PR (Anakinra, Tocilizumab).

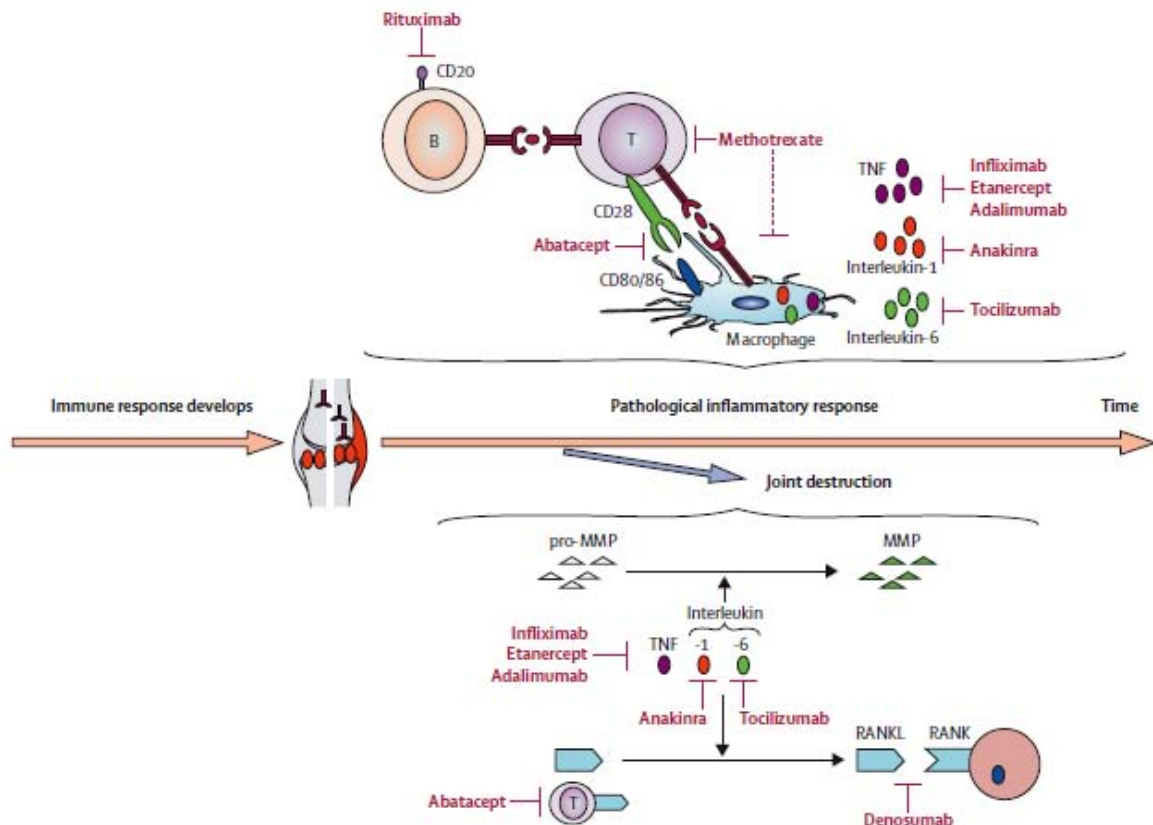


Figure 15 : Mode d'action des différents traitements de la PR²²⁸

Le progrès de ces biothérapies ne cesse de croître si bien que d'autres anticorps sont aujourd'hui en cours d'évaluation clinique (Golimumab, Anti-IL-17, Anti-CSF, Anti-CSFR).

III.2.1 Les biothérapies ciblant des cytokines

III.2.1.1 Les anti-TNF- α

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle central dans la pathogénie de la PR (Figure 16) ce qui justifie l'inhibition de son activité à différents sites.

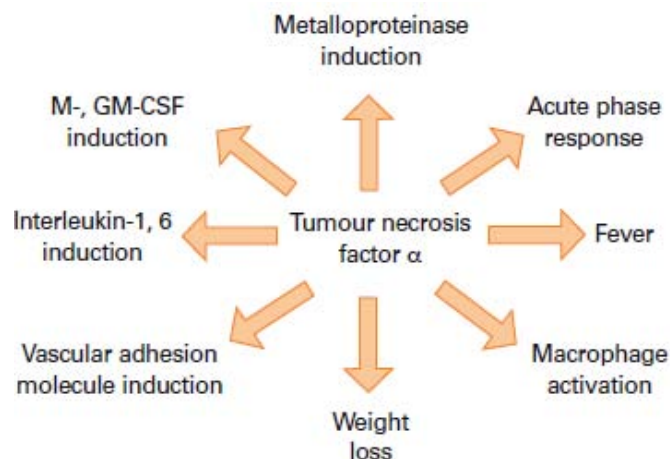


Figure 16 : Actions du TNF- α ²⁵⁰

Les stratégies thérapeutiques utilisées sont essentiellement basées sur la neutralisation de son expression à la surface de la cellule ou de sa forme soluble et se résument en 4 anticorps monoclonaux et une protéine de fusion :

- L'infliximab (*Remicade*) est le premier anti-TNF- α développé. Il s'agit d'un anticorps monoclonal recombinant chimérique composé d'un fragment Fc humain et d'un fragment (Fab')₂ murin.
- L'adalimumab (*Humira*) est également un anticorps monoclonal recombinant mais totalement humanisé.
- Le Certolizumab (*Cimzia*) qui est un anticorps monoclonal humanisé dépourvu de fragment Fc et PEGylé au niveau de son fragment Fab'²⁵¹. Cet anticorps présente deux avantages majeurs : l'absence de fragment Fc empêche l'anticorps de traverser la barrière placentaire et la PEGylation protège l'anticorps de la dégradation protéolytique ce qui lui procure une meilleure stabilité et un temps de circulation plus long.
- L'etanercept (*Enbrel*) est une protéine de fusion recombinante formée du domaine de liaison extracellulaire du récepteur soluble de type II du TNF- α et du domaine Fc de l'IgG.

Plusieurs études réalisées au cours de ces dix dernières années ont montré l'efficacité de ces traitements par anti-TNF- α puisqu'ils permettent de retarder ou même d'abroger la destruction articulaire²⁵²⁻²⁵⁵. Chez un nombre important de patients, la seule administration des traitements de fond comme le méthotrexate n'induit pas une réponse suffisante. Une stratégie thérapeutique consiste alors à coupler ces traitements au blocage du TNF- α ²⁵⁶⁻²⁵⁹. La complémentarité du méthotrexate et des anti-TNF- α peut s'expliquer par le fait que le méthotrexate, en affectant l'activation des LT, atténue la réaction immunitaire contre les anti-TNF- α ²⁶⁰.

En dépit de leur efficacité, les anti-TNF- α ont également montré quelques effets secondaires non négligeables mais assez bien contrôlés, notamment l'augmentation du risque infectieux, en particulier par tuberculose²⁶¹. Ils ne peuvent également être prescrits à des patients ayant eu un cancer datant de moins de 5 ans ou à des patients souffrant d'insuffisance cardiaque sévère. Quant aux cas de cancers, des études ont montré que le risque de développer des lymphomes chez les patients atteints de PR et traités par des anti-TNF- α est plus attribuable à la chronicité de la maladie plutôt qu'au traitement^{262, 263}.

Le Golimumab (*Simponi*) est un anti-TNF- α en cours d'évaluation. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé possédant le même fragment constant que l'infliximab mais avec un fragment Fab humain. Les essais cliniques, actuellement en phase III, ont montré une efficacité et une toxicité du traitement seul ou lorsqu'il est combiné au méthotrexate similaires à celles obtenues avec les autres anti-TNF- α ²⁶⁴.

Le succès des anti-TNF- α a rapidement conduit au développement d'une série de biothérapies ciblant différentes voies de signalisation impliquées dans la pathogénie de la PR.

III.2.1.2 L'IL-1Ra : Anakinra

L'anakinra (Kineret) est le premier des biothérapies développées après les anti-TNF- α . Il s'agit d'une version recombinante de l'IL-1Ra humain qui inhibe de manière compétitive la liaison de l'IL-1 à son récepteur. Des études de toxicité ont montré que, contrairement aux anti-TNF- α , l'anakinra n'augmente pas le risque d'infections opportunistes et de tuberculose²⁶⁵. En dépit de ces résultats, l'anakinra ne présente pas d'avantages en terme d'efficacité dans le traitement de la PR comparé aux anti-TNF- α ²⁶⁶. Il est surtout utilisé aujourd'hui dans des syndromes rares caractérisés par une production accrue d'IL-1 comme le syndrome DIRA (Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist)^{267, 268}.

III.2.1.3 L'anti-IL-6R : Tocilizumab

Le tocilizumab (*RoActemra*) est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur à l'IL-6. *In vitro*, il prévient la formation d'ostéoclastes induite par l'IL-6²⁶⁹ et réduit *in vivo* l'arthrite induite au collagène chez la souris et le singe^{270, 271}. Chez les patients atteints de PR en échec de thérapies anti-TNF- α , il a été montré que le tocilizumab réduit à la fois l'inflammation et l'érosion osseuse²⁷².

III.2.1.4 L'anti-IL-17

L'anti-IL-17 (LY2439821) est un anticorps monoclonal humanisé qui permet la neutralisation de l'IL-17. Un essai clinique de phase I a montré que ce traitement potentiel de la PR, combiné aux DMARDs conventionnels est efficace dans la résolution de l'arthrite sans effets secondaires notables¹³⁴.

III.2.1.5 Les anti-CSF

En dépit du faible intérêt porté à l'implication des CSFs dans la pathogénie de la PR, les essais cliniques impliquant M-CSF, GM-CSF ou leurs récepteurs respectifs viennent d'être entamés (Table 2).

Therapeutic approach	Company	Status
GM-CSF-specific antibody	KaloBios Pharmaceuticals Inc. MorphoSys AG Micromet Inc. and Nycomed	Phase I/II clinical trial Phase I clinical trial Preclinical studies
GM-CSF-receptor-specific antibody	MedImmune and CSL	Phase I clinical trial
M-CSF-specific antibody	Pfizer Inc.	Phase I clinical trial
M-CSF-receptor inhibitors	Kirin Brewery Co. Ltd, GlaxoSmithKline, Johnson & Johnson, Abbott Laboratories, Cytopia Ltd	Preclinical studies
M-CSF mutant protein	Chiron Corp.	Preclinical studies

Table 2 : Stratégies thérapeutiques ciblant M-CSF et GM-CSF¹³⁵

III.2.2 Les biothérapies ciblant des cellules

III.2.2.1 Le CTLA4-IgG : Abatacept

L'abatacept (*Orancia*) est une protéine de fusion recombinante composée du domaine extracellulaire CTLA4 et du fragment Fc de l'IgG1. A la surface des LT, l'abatacept présente plus d'affinité pour le CD80 et le CD86, signaux de co-stimulation provenant des cellules présentatrices de l'antigène, que le CD28. Il inhibe ainsi l'activation des LT ce qui s'est révélé efficace dans la résolution de l'arthrite dans les modèles murins. Ce traitement est particulièrement employé après échec des anti-TNF- α ²⁷³.

III.2.2.2 L'anti-CD20 : Rituximab

Le rituximab (*Mabthera*) est un anticorps monoclonal chimérique humain-souris qui se lie au CD20 à la surface des pré-LB ou des LB matures, provoquant la déplétion de ces cellules de la circulation sanguine. Longuement approuvé dans le traitement des lymphomes, le rituximab a été également approuvé dans le traitement de la PR chez des patients en échec de thérapies anti-TNF- α ²⁷⁴. Bien que le rituximab réduise considérablement la concentration en FR, son mécanisme d'action n'est pas clair²⁷⁵. Dans tous les essais cliniques entrepris, il a été par ailleurs montré que la déplétion des LB est valable pour environ 6 mois. En effet, le CD20 étant absent de la surface des cellules souches, les LB repeuplent le sang périphérique et la maladie se réactive²⁷⁶. D'efficacité comparable aux anti-TNF- α , le rituximab peut être prescrit pour les patients ayant eu un cancer récent²⁷⁷.

III.3 Les nouveaux DMARDs

Définir les mécanismes par lesquelles les différentes cytokines impliquées dans la pathogénie de la PR opèrent et en particulier, mettre en évidence le facteur au niveau duquel ces cytokines convergent semble déterminant pour optimiser les stratégies thérapeutiques de la PR. Les facteurs régulant les voies de signalisation à l'origine de la production de ces cytokines, en particulier les kinases, pourraient constituer ce point de convergence.

III.3.1 Les inhibiteurs des Spleen Tyrosine Kinases (Syk)

Les Spleen Tyrosine Kinases (Syk) se lient à la région cytoplasmique des Fc γ R présents au niveau des LB, des mastocytes, des macrophages, des neutrophiles et des synoviocytes. Il s'ensuit une activation de ces kinases qui vont induire la signalisation par les MAPKs, la PI3K et la PLC γ . Cette signalisation résulte en une augmentation de la production d'IL-6 et de MMPs. Un agent oral, appelé Fostamatinib disodium, faisant l'objet de 3 essais cliniques de phase II, a montré des résultats prometteurs en terme d'efficacité et de toxicité, notamment chez les patients non répondeurs au méthotrexate²⁷⁸⁻²⁸⁰.

III.3.2 Les inhibiteurs des Janus Kinases (JAKs)

Les Janus Kinases (JAK) se lient à la région cytoplasmique des récepteurs trans-membranaires des cytokines. Une fois la cytokine liée à son récepteur, les JAKs sont activées et il s'ensuit une phosphorylation des tyrosines au niveau de ces récepteurs et une induction de la voie des STATs qui

agissent comme des facteurs de transcription²⁸¹. Les JAKs constituent une famille de kinases dans laquelle JAK3 est une kinase cruciale pour l'activation, la fonction et la prolifération des lymphocytes. En effet, elle est exprimée dans les cellules hématopoïétiques et se lie aux récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-21. D'ailleurs, des souris *jak3*^{-/-} sont uniquement déficientes en LT, LB et cellules NK. Ainsi, un agent qui inhibe sélectivement JAK3 aurait le potentiel de moduler la réponse immunitaire sans affecter les organes. CP-690,550, un antagoniste oral de JAK1/3, est actuellement en développement²⁸².

III.3.3 Les inhibiteurs de p38 MAPK

p38 MAPK est un régulateur clé de la production de cytokines. Plusieurs études ont montré que l'inhibition de p38 MAPK supprime la production *in vitro* de cytokines pro-inflammatoires. De plus, les études réalisées *in vivo* ont montré que l'inhibition de cette MAPK résulte en une réduction de l'inflammation et de la destruction articulaire²⁸³. Cependant, les essais cliniques récents ont été caractérisés par une efficacité limitée des inhibiteurs utilisés et surtout par une toxicité inacceptable notamment au niveau du système nerveux central, du foie et de la peau^{284, 285}.

III.4 Conclusion

Au cours des dix dernières années, des avancées considérables ont été réalisées dans le traitement de la PR et les différents mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathogénie ont été exploités pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui se sont révélées très efficaces. Néanmoins, ces stratégies permettent de contrôler de manière empirique l'inflammation et la destruction articulaire et d'améliorer la qualité de vie des patients mais en aucun cas, elles ne traitent la maladie. De plus, les cliniciens restent confrontés à un problème majeur : la réponse au traitement. En effet, 30-35% des patients atteints de PR ne répondent pas ou répondent peu aux biothérapies. Le coût de ces biothérapies constitue également un problème majeur. En effet, ce sont pour la plupart des anticorps monoclonaux humanisés ou non, obtenus par génie génétique, ce qui implique un coût élevé du traitement, de l'ordre de 10000 à 15000€ par an. Ainsi, un important travail de recherche reste à accomplir afin de palier ces inconvénients.

IV. Les modèles murins d'arthrite

Les modèles animaux d'arthrite, essentiellement les modèles murins, sont utilisés soit pour déterminer les mécanismes physiologiques impliqués dans la pathogénie de la PR, soit pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et valider des traitements potentiels. Ils présentent de nombreuses caractéristiques analogues à la PR humaine mais possèdent également des différences. Ainsi, il existe 3 critères de sélection d'un modèle animal²⁸⁶ :

- La capacité à prédire l'efficacité des agents thérapeutiques chez l'Homme.
- La facilité d'utilisation du modèle (reproductibilité des résultats, durée d'expérimentation).
- La similitude avec la pathogénie humaine

La majorité des modèles murins utilisés pour étudier la PR répondent à ces critères et présentent de telles similitudes avec la PR humaine qu'ils aident à prédire l'efficacité et potentiellement la toxicité des agents thérapeutiques. Cependant, d'importantes différences existent avec la PR humaine. En effet, l'arthrite chez les souris progresse très rapidement par rapport à la maladie humaine et par conséquent, elle est caractérisée par une réponse primaire de type inflammation aiguë. De plus, en réponse à l'inflammation articulaire, les souris ont tendance à développer une résorption osseuse beaucoup plus marquée que chez l'homme. Parmi les modèles murins les plus utilisés, on retrouve des modèles d'arthrite induite et des modèles transgéniques développant une arthrite spontanée.

Dans ce chapitre, nous ne nous intéresserons pas aux modèles knock-out qui ont permis de mettre en évidence le rôle d'une cytokine, d'un récepteur ou d'un facteur de transcription dans la pathogénie de la PR (*csf1r*^{-/-} ; *rankl*^{-/-} ; *rank*^{-/-} ; *p50/p52*^{-/-} ; *cfos*^{-/-} ; *junB*^{-/-}, etc). En effet, il s'agit ici de dresser une liste non exhaustive des modèles d'arthrite qui ont permis de réaliser des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes qui régissent la pathogénie de la PR. Nous nous proposons également dans ce chapitre de déterminer les similitudes ainsi que les différences entre ces modèles murins et la pathologie humaine ce qui nous permettra de justifier par la suite le choix du modèle qui a été utilisé pour la réalisation du présent travail.

IV.1 Les modèles d'arthrite induite

Plusieurs approches ont été développées chez la souris pour induire l'arthrite soit par immunisation ou par injection. Le modèle d'arthrite induite au collagène (CIA) est le plus connu et certainement le plus apprécié car il implique l'immunisation avec une composante du cartilage : le collagène. L'arthrite peut également être induite par transfert passif soit d'anticorps comme les anticorps anti-Collagène de type II (anti-CII), soit de sérum arthritogène comme pour le modèle

d'arthrite induite au sérum de souris K/BxN. Le modèle d'arthrite induite aux antigènes (AIA) est un autre modèle d'arthrite où les antigènes peuvent varier (BSA, pristane, protéoglycane, SCW, adjuvant de Freund) et qui permet de mettre en évidence la notion de peptide arthritogène.

IV.1.1 Modèle d'arthrite induite au collagène (CIA)

IV.1.1.1 Importance du collagène de type II

La forte incidence des anticorps anti-CII, particulièrement au cours des premières phases de développement de la PR, indique que le CII est l'un des auto-antigènes majeurs impliqués dans l'initiation de l'inflammation articulaire²⁸⁷. Etant donné qu'il est exclusivement exprimé au niveau du cartilage articulaire, l'immunité développée à son encontre conduit à la dégradation de ce cartilage. Ce concept a été largement approuvé dans plusieurs études réalisées sur différentes espèces (rat, souris, singe)²⁸⁸⁻²⁹⁰. Ainsi, il est actuellement établi que l'arthrite induite au collagène est un modèle valide et relevant pour l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénie de la PR (Figure 17). En effet, ce modèle a permis de démontrer que l'auto-immunité au CII permet de développer une arthrite auto-immune caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale, une destruction du cartilage articulaire et une érosion osseuse, analogues à la PR humaine¹⁰⁸.

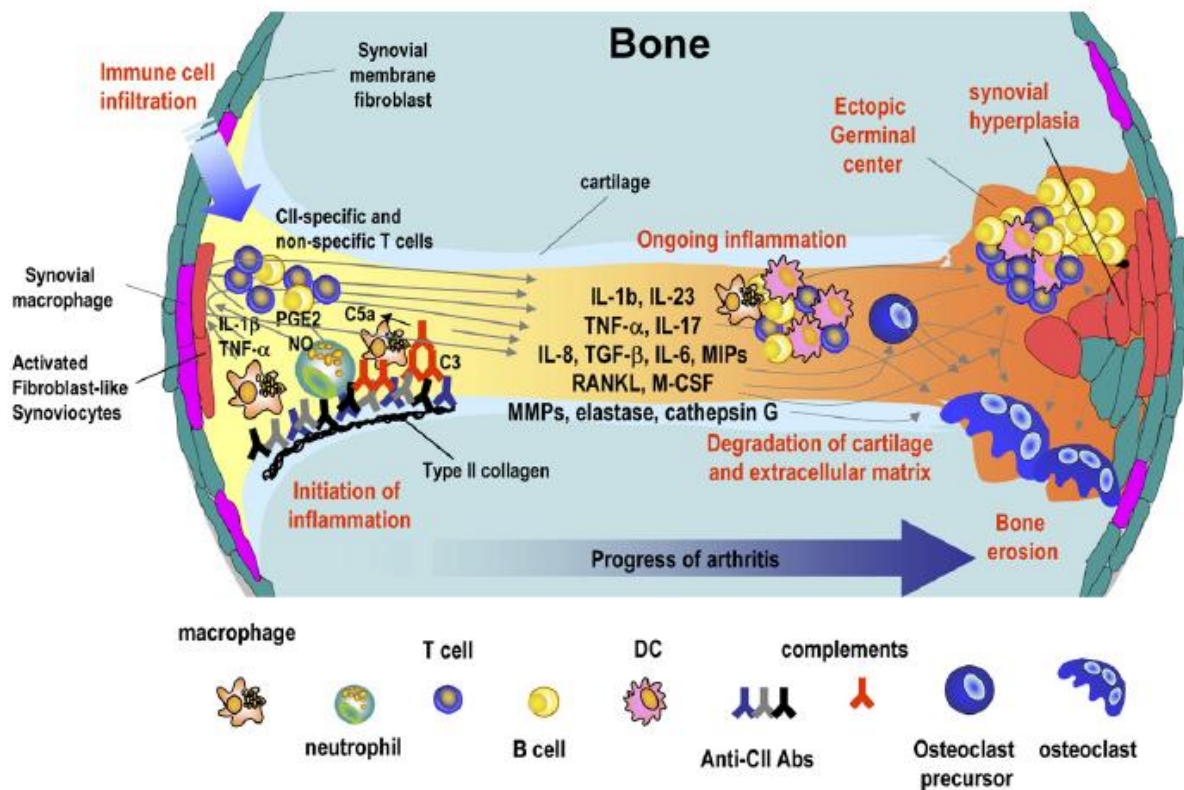


Figure 17 : Schéma de l'inflammation et de la résorption osseuse développée dans le modèle CIA¹⁰⁸

IV.1.1.2 Induction de l'immunité anti-CII

Typiquement, des souches murines génétiquement susceptibles (ayant l'haplotype H-2^q du CMH de classe II), telles que les souris DBA/1, B10.Q et B10.RIII, sont immunisées une première fois par injection sous-cutanée de CII bovin émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund. Trois semaines plus tard, une seconde immunisation au CII bovin émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund permet l'initiation rapide d'une arthrite sévère caractérisée par forte prolifération des LT CD4⁺ au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques. Les lésions articulaires développées par ce modèle, où l'arthrite est maintenue pendant 9 semaines, présentent des caractéristiques cliniques (érythèmes, œdèmes), histologiques (hyperplasie synoviale, infiltration cellulaire, formation de pannus, destruction de l'os et du cartilage) et immunologiques (fort taux d'anti-CII, production de FR) similaires à la PR humaine. De plus, comme pour la PR humaine, plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont fortement exprimées dans les articulations des souris arthritiques (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17 et IL-23). Contrairement à la PR humaine, les souris dont l'arthrite est induite au collagène développent une périostite tibiale (inflammation du périoste, membrane fibreuse recouvrant l'os)²⁹¹.

Ce modèle a permis de définir l'implication d'un ensemble de facteurs, incluant le CMH de classe II, les LT et les gènes de susceptibilité, dans la pathogénie de la PR. Il a en effet été montré que la susceptibilité au développement de l'arthrite dans ce modèle dépend de l'haplotype du CMH de classe II. Ainsi, la souche murine C57BL/6, ayant l'haplotype H-2^b du CMH de classe II peut développer une arthrite sévère avec une forte incidence, de l'ordre de 60-70%. D'un point de vue clinique et histologique, l'arthrite développée ressemble à celle obtenue chez la souche DBA/1 qui, elle, possède l'haplotype H-2^{q139}. Par contre, la souche Sv/129, possédant également l'haplotype H-2^b, est résistante au développement de l'arthrite induite au collagène. Le répertoire TCR est également important dans ce modèle. Les souches Biozzi H.I et Biozzi H.II, possédant toutes deux l'haplotype H-2^q mais un répertoire TCR différent, sont respectivement, susceptible et résistante au développement de la CIA²⁹².

Bien que le mécanisme impliquant les LT dans le développement de la CIA reste encore non élucidé, il est certain aujourd'hui que ces cellules sont requises dans le développement de l'arthrite dans ce modèle. Curieusement, le transfert passif de LT de souris CIA à des souris naïves n'induit que des changements mineurs au niveau de l'articulation alors que le transfert de sérum de souris CIA résulte en une inflammation sévère mais transitoire. Le transfert de LT et de sérum à la fois, induit par contre une arthrite chronique²⁹³. Ainsi, même si les LT jouent un rôle prééminent dans la régulation et le développement de la CIA, les auto-anticorps dirigés contre le CII murin semblent être

à l'origine du mécanisme d'initiation de la pathogénie dans ce modèle. En effet, durant les premiers stades du développement de l'arthrite, les anticorps anti-CII se lient au cartilage articulaire et déclenchent la cascade du complément qui va jouer le rôle de pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 18). Le rôle pathogénique de ces auto-anticorps a été révélé par les expériences de transfert passif d'anticorps anti-CII qui permettent le développement d'arthrites sévères même dans les souches résistantes à la CIA²⁹⁴.

Par ailleurs, la difficulté d'utilisation de ce modèle vient du fait que le développement de la pathologie dépend aussi d'autres facteurs tels que les conditions d'immunisation et d'hébergement des souris.

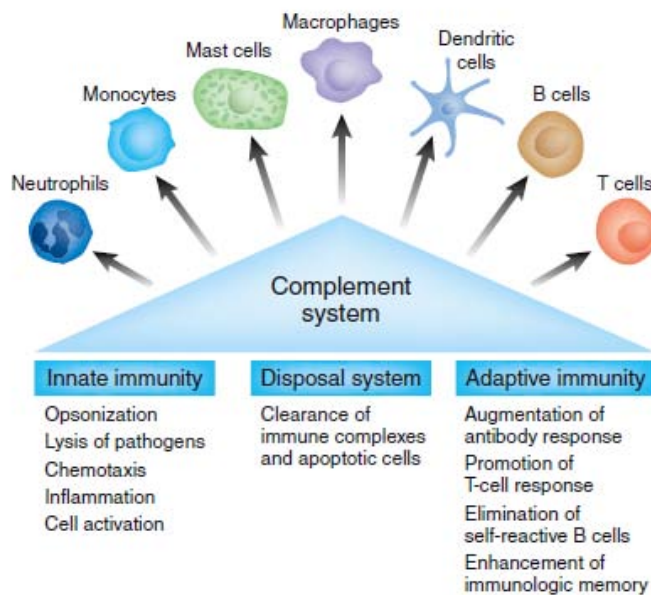


Figure 18 : Le système du complément est un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative²⁹⁵

IV.1.2 Les modèles de transfert passif

IV.1.2.1 Arthrite induite à l'anti-CII

Un autre modèle d'arthrite impliquant le collagène de type II peut être rapidement établi par injection d'un cocktail d'anticorps monoclonaux anti-CII à des souris présentant n'importe quel haplotype du CMH de classe II. Contrairement à la CIA, ce modèle induit à l'anti-CII développe une arthrite sévère en quelques heures avec une incidence approchant les 100%. En effet, en 24 à 48h, l'arthrite peut être observée. L'inflammation atteint son seuil vers 5-7 jours et persiste pendant 2 semaines. Par conséquent, ce modèle permet d'observer à la fois la phase aiguë et la phase chronique de l'arthrite avant le déclin de la réponse inflammatoire après 3 semaines²⁹⁶.

IV.1.2.2 Arthrite induite au sérum de souris K/BxN

Le développement de cette arthrite correspond à l'induction d'une réponse immunitaire par transfert de sérum de souris K/BxN, appelé sérum KRN (Figure 19), correspondant à des auto-anticorps anti-Glucose-6-Phosphate isomérase (Cf. IV.2.4 Le modèle K/BxN). Contrairement aux souris K/BxN qui développent une arthrite chronique, l'arthrite induite par le transfert de sérum de ces souris est transitoire, montrant une phase de déclin 15 jours après le transfert²⁹⁷. Cependant, l'inflammation peut être maintenue par répétition du transfert de sérum. De même que pour le transfert d'anticorps anti-CII, le transfert de sérum de souris K/BxN ne requiert pas l'utilisation d'une souche particulière. De plus, il a été montré qu'aussi bien le transfert de sérum que d'IgG purifiées à des souris naïves ou mêmes à des souris déficientes en cellules T ou en cellules B, permet le développement d'une arthrite sévère 24h après le transfert²⁹⁸.

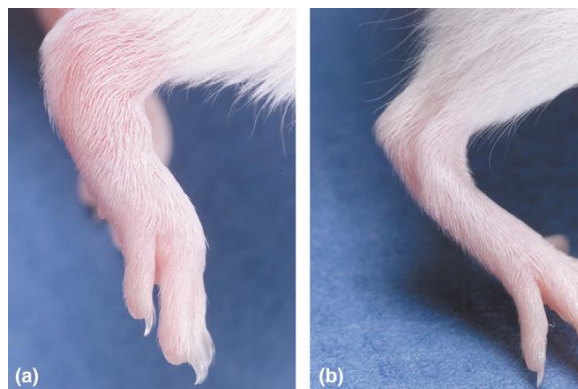


Figure 19 : Modèle de transfert de sérum de souris K/BxN (a) Souris naïves ayant reçu le sérum de souris K/BxN (b) Souris naïves ayant reçu le sérum de souris saines²⁹⁷

Ce modèle a été très utile pour l'étude des mécanismes qui lient la production pathologique d'Ig et le développement de l'arthrite. En effet, comme l'activité arthritogénique du sérum KRN est spécifique à la fraction IgG, il a été suggéré que les Fc γ R jouent un rôle essentiel dans le développement de la maladie. Le transfert de sérum de souris K/BxN à des souris déficientes en Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII a montré que les deux premiers récepteurs ne sont pas impliqués dans le développement de la maladie alors que le Fc γ RIII pourrait probablement jouer un rôle. En effet, chez les souris déficientes en Fc γ RIII, la maladie se déclenche plus tardivement que chez les souris sauvages et évolue de manière moins robuste. Cependant, les souris succombent rapidement à l'arthrite ce qui ne permet pas à cette étude d'apporter une conclusion définitive quant au rôle de ce récepteur²⁹⁹.

Ce modèle a également permis de déterminer la cinétique d'expression des différentes cytokines pro-inflammatoires au cours de l'arthrite induite. En effet, l'injection de sérum de souris K/BxN à des

souris C57BL/6 montre que toutes les cytokines sont exprimées quelques heures seulement après le transfert mais à des taux modestes. Le TNF- α est la première cytokine qui atteint un pic d'expression à 24h et qui est suivie par une expression beaucoup plus intense de l'IL-1 β à 48h. Cette étude a également montré que l'IL-6 est exprimée plus tardivement, à 72h, et que son expression est transitoire¹²². Ceci suggère que l'expression de l'IL-6 est seulement une conséquence de la surexpression des cytokines TNF- α et IL-1. Le transfert de sérum KRN à des souris C57BL/6 déficientes en IL-6 a permis plus tard de confirmer que l'IL-6 n'a aucun rôle dans le déclenchement de l'arthrite induite puisque les souris *il-6*^{-/-} développent exactement la même arthrite que les souris sauvages¹²². Ceci est en accord avec les observations faites sur le modèle CIA et le modèle d'arthrite induite aux antigènes³⁰⁰ mais contredit certaines études réalisées sur le modèle CIA où l'on observe un effet de l'anti-IL-6R sur le développement de la maladie^{270, 301}.

Il a été également montré que la cytokine IL-17 est déterminante pour la sévérité de l'arthrite dans ce modèle ce qui soutient le postulat selon lequel la PR est une maladie de type Th1/Th17 plutôt qu'une maladie exclusivement de type Th1³⁰² (**Cf. Paragraphe 1.2.2**).

Toutes ces caractéristiques font que le modèle d'arthrite induite au sérum de souris K/BxN est un excellent modèle pour l'étude des mécanismes inflammatoires impliqués dans le processus rhumatoïde.

IV.1.3 Les modèles d'arthrite induite à l'antigène

IV.1.3.1 Arthrite induite à la BSA

Ce modèle d'arthrite, existant aussi chez le rat et le lapin, est obtenu essentiellement par injection intra-articulaire d'un antigène soluble, la BSA (Bovine Serum Albumin) méthylée, à une souris précédemment sensibilisée au même antigène émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund. Ceci implique que l'arthrite développée est une réponse immunitaire à cet antigène caractérisée par une activité accrue des cellules présentatrices de l'antigène. Bien que ce modèle montre des similitudes histologiques avec la PR humaine, incluant une hyperplasie synoviale avec une infiltration prédominante de LT CD4+, de LB et de macrophages, il reste limité au niveau du développement de la maladie. En effet, l'arthrite se développe uniquement au niveau de l'articulation qui a reçu l'injection et par conséquent, ne présente pas de caractère systémique, contrairement à la PR humaine³⁰³. Très peu utilisé actuellement, ce modèle d'arthrite a permis, entre autres, de démontrer le rôle de la fibrine dans l'entretien de l'inflammation chronique³⁰⁴.

IV.1.3.2 Arthrite induite aux adjuvants (pristane ou adjuvant complet de Freund)

Le modèle d'arthrite induite au pristane, initialement développé chez le rat, a permis de définir l'importance des auto-anticorps dans le développement de la PR mais surtout dans le lupus érythémateux disséminé (LED ou SLE pour Systemic Lupus erythematosus)³⁰⁵. Quant au modèle d'arthrite induite à l'adjuvant de Freund, obtenu par simple injection de l'adjuvant contenant une suspension de *Mycobacterium tuberculosis*, il a été le premier modèle développé chez le rat mais très peu chez la souris.

IV.1.3.3 Arthrite induite au protéoglycane

Ce modèle est obtenu par injection intra-péritonéale à des souris BALB/c de protéoglycane émulsifié dans un adjuvant de diméthyl-dioctadecylammonium bromide (DDA). Le protéoglycane est isolé du cartilage humain obtenu après arthroplasties. Bien que ce modèle ne soit pas des plus communément utilisés, il a permis de définir le profil d'expression de différents gènes au cours des arthrites aiguës et des arthrites chroniques débutantes³⁰⁶.

IV.1.3.4 Arthrite induite aux Streptocoques ou modèle SCW (Streptococcal Cell Wall)

Beaucoup plus utilisé chez le rat, ce modèle est obtenu par injection intra-péritonéale d'une suspension de streptocoques, préalablement soumis à une sonication. Cette étape permet de libérer un complexe peptidoglycane-polysaccharide (PGPS) où la fraction PG semble déterminante pour l'induction de l'inflammation³⁰⁷. Le muramyl di-peptide (MDP), représentant la fraction minimale de ce complexe PGPS a été également utilisé pour induire l'arthrite. Dans les 2 cas, l'arthrite développée paraît aiguë. En effet, ne dépassant pas 7 jours, elle ne présente ni formation de pannus, ni érosions osseuses. Par contre, les similitudes avec la PR humaine correspondent à l'infiltration de cellules polynucléaires, de LT CD4+ et de macrophages³⁰³. Il a été par ailleurs démontré que la souche BALB/c est celle qui répond le plus efficacement à cette induction alors que la souche C57BL/6 s'avère résistante²⁹³.

IV.2 Les modèles d'arthrite spontanée

Les modèles de souris génétiquement modifiées ont un double rôle dans l'étude de la pathogénie de la PR. La délétion ou l'introduction de gènes codant des récepteurs particuliers ou des cytokines permet d'abord de tester le rôle de ces effecteurs dans le processus pathologique. L'inflammation spontanée qui résulte de cette modification génétique permet également d'apporter un nouveau

modèle d'étude de l'arthrite qui tente de faire mieux comprendre le dysfonctionnement immunitaire à l'origine de la PR.

IV.2.1 Le modèle TNF-Tg

Le TNF- α étant une cytokine centrale de la PR, cette pathologie a souvent été décrite comme une conséquence d'une dérégulation de l'expression ou de la production du TNF- α . Dans ce contexte, le premier modèle transgénique décrit a été généré par l'utilisation d'un vecteur contenant un fragment codant entièrement le TNF- α humain dans le lequel la région 3'UTR a été modifiée. Cette mutation augmente la stabilité de l'ARNm *tnf- α* et induit ainsi une surexpression chronique de TNF- α . Par conséquent, les souris TNF-Tg recevant le vecteur développent une arthrite sévère et érosive présentant de nombreuses caractéristiques de la PR humaine³⁰⁸. Des études de localisation du TNF- α ont montré que la cytokine est fortement exprimée au niveau de la rate, des articulations et des poumons. De plus, l'administration d'un anti-TNF- α à ces souris transgéniques prévient totalement le développement de la maladie³⁰⁹.

Plusieurs lignées de souris TNF-Tg ont été générées et 100% de ces lignées développent une arthrite chronique et érosive touchant toutes les articulations, sans exception. Ainsi, ce modèle constitue, par exemple, le seul modèle d'arthrite touchant l'articulation temporo-mandibulaire³¹⁰. Dans ce modèle, les premiers signes cliniques caractérisés par un gonflement des articulations apparaissent à l'âge de 2 mois et la maladie progresse rapidement jusqu'à l'âge de 1 an à condition que les souris puissent vivre jusqu'à cet âge. En effet, les souris TNF-Tg présentent une luxation et une dislocation des articulations métacarpiennes et de la cheville. Dans les lignées possédant un nombre important de copies du transgène, la maladie apparaît plus tôt, vers l'âge de 4 à 5 semaines, et son évolution est accélérée puisque les souris perdent totalement leur mobilité vers l'âge de 9 à 10 semaines et il s'ensuit la mort vers l'âge de 12 à 14 semaines³¹¹. Les caractéristiques histologiques de ce modèle correspondent à une hyperplasie de la membrane synoviale avec une infiltration de l'espace synovial par des lymphocytes et des polynucléaires qui évoluent en fonction du stade de l'arthrite. La formation de pannus et la destruction du cartilage ainsi que du tissu fibreux constituent les caractéristiques du développement de l'arthrite. De plus, la surface des os au niveau des articulations de ces souris se retrouve recouverte d'ostéoclastes qui vont massivement résorber l'os³⁰⁸. Ces différents signes cliniques et histologiques miment étroitement la PR humaine.

Une des contributions les plus importantes du modèle TNF-Tg a été de déterminer la relation entre le TNF- α et l'IL-1 dans la réponse inflammatoire au cours de la PR. Le traitement de souris TNF-Tg avec un anticorps dirigé contre l'IL-1R de type I, qui bloque à la fois l'activité de l'IL-1 α et l'IL-1 β ,

prévient le développement de l'arthrite. Ainsi, il a été montré que l'IL-1 est un médiateur potentiel dont l'activité dépend du TNF- α . Par ailleurs, le taux de TNF- α dans le sang des souris TNF-Tg est diminué par ce traitement, ce qui implique que l'IL-1 exerce un rétro-contrôle négatif sur l'activité du TNF- α ³¹².

En comparaison avec les modèles d'arthrite induite, plus particulièrement la CIA, il a été montré que dans le modèle TNF-Tg, l'arthrite se développe indépendamment de l'haplotype du CMH de classe II. En effet, le modèle TNF-Tg peut être généré sur des souches ayant l'haplotype H-2^k ou H-2^b. Néanmoins, le facteur génétique a son influence sur la sévérité de l'arthrite, puisque les TNF-Tg générée sur une souche DBA/1 (ayant l'haplotype H-2^q), développent une arthrite plus rapide et bien plus sévère³¹³. De plus, il a été montré que ce modèle est indépendant des cellules immunitaires puisque le croisement de souris TNF-Tg avec des souris *rag1*^{-/-}, déficientes en LT et B, permet le développement d'une arthrite érosive³¹⁴. Bien que présentant de nombreuses caractéristiques de la PR humaine, ces souris n'expriment le FR à aucun stade du développement de la maladie³⁰⁸. Ceci suggère que les souris TNF-Tg représentent un excellent modèle pour l'étude des aspects non auto-immuns de la PR.

IV.2.2 Le modèle SKG

Le modèle SKG est obtenu par mutation du gène codant la protéine ZAP-70 (Zeta-chain-Associated Protein kinase of 70kDa) chez la souche BALB/c. La protéine ZAP-70, exprimée par les LT et les cellules NKT, joue un rôle critique dans l'initiation de la signalisation par les LT. En effet, la cellule présentatrice de l'antigène présente le peptide arthritogène aux LT qui s'engagent par leur TCR et qui sont ainsi activés. Cette activation permet aux tyrosines kinases de phosphoryler le domaine intracellulaire ITAM du complexe CD3. Le CD3 zeta est le membre le plus important de ce complexe. La liaison de ZAP-70 au CD3 zeta active la cascade de signalisation qui conduit à la prolifération des LT et la transcription des gènes codant différents médiateurs de l'inflammation³¹⁵. Le modèle SKG développe ainsi spontanément une arthrite auto-immune chronique présentant des caractéristiques communes à la PR humaine. En effet, les souris présentent une hyperplasie de la membrane synoviale avec une forte infiltration de l'espace articulaire par les LT CD4+. Ce modèle est également caractérisé par la formation d'un pannus, l'érosion de l'os, la dégradation du cartilage et la manifestation de nombreuses complications extra-articulaires. Contrairement au modèle TNF-Tg, le modèle SKG développent des auto-anticorps, dont le FR. Ce modèle a permis de montrer que la production thymique de LT pathogéniques pourrait être un facteur de prédisposition ou encore une première cause du développement de la PR humaine³¹⁶.

IV.2.3 Le modèle HLA-Tg

IV.2.3.1 Implication du CMH de classe II dans la PR humaine

Le **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)** est l'une des régions les plus étudiées du génome humain en raison de l'association de plusieurs variants de ce locus à certaines maladies auto-immunes dont la PR. Dans cette pathologie, le CMH compte pour un tiers des facteurs de risque génétiques et ce risque est formellement associé aux antigènes HLA-DR4 et HLA-DR1 qui ont été les premiers facteurs de susceptibilité décrits dans la PR³¹⁷. La fonction initiale des molécules du CMH de classe II est de présenter l'antigène. L'ensemble antigène-molécule de classe II à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène ou CPA (DCs, monocyte, LB) est ensuite reconnu de façon spécifique par le récepteur à l'antigène de la cellule T CD4+ et forme un trimère (CMH-antigène-récepteur à l'antigène) (Figure 20).

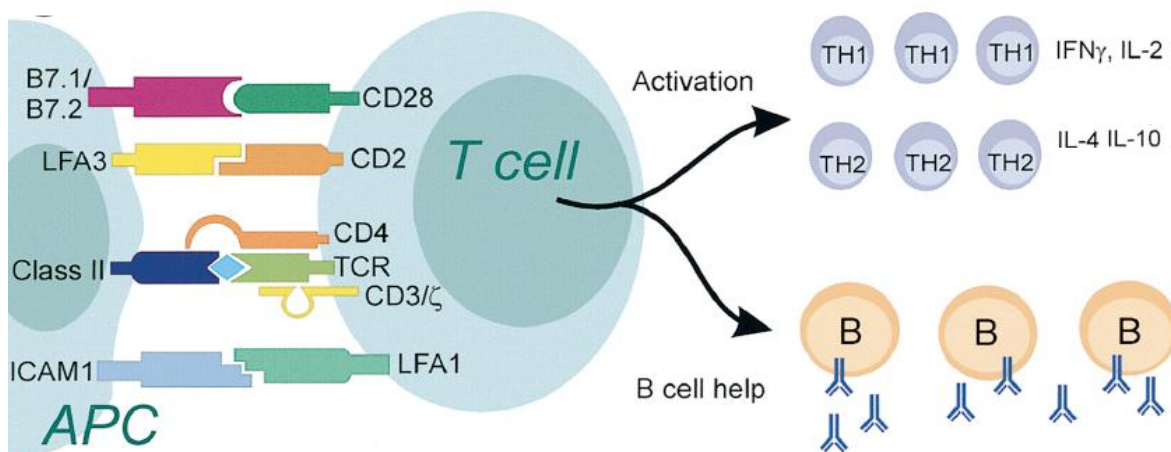


Figure 20 : Activation des LT CD4+ par la présentation d'antigène dans un contexte HLA de classe II³¹⁸

Les allèles HLA à risque ont en commun une série d'acides aminés (QKRAA ou QRRAA) entre les positions 70 et 74 de la troisième région hypervariable de la chaîne DR β 3. Cette séquence est appelée « épitope de susceptibilité » ou « épitope partagé » (ou encore « shared epitope ») et elle constitue une partie de poche moléculaire dans laquelle se loge l'antigène présenté^{319, 320}. Cette séquence pourrait jouer un rôle de reconnaissance d'antigènes déclenchant les phénomènes auto-immuns et être responsable d'une altération de la réponse immunitaire contre un agent arthritogène. Un certain nombre de polymorphismes génétiques ont été également mis en évidence dans des gènes codant des cytokines, des enzymes et des récepteurs qui jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire synoviale, tels que l'IL-1, la MMP-3 et le récepteur Fc γ RIII. Si certains

de ces polymorphismes constituent des facteurs de sévérité de la PR, tous ne sont pas associés à la PR : par exemple, il n'existe aucune corrélation entre le polymorphisme du gène codant l'IFN- γ et la sévérité de la PR³²⁰. En ce qui concerne le TNF- α , une étude a montré une association entre certains allèles et la sévérité de la PR. De plus, un polymorphisme dans le gène codant le récepteur du TNF- α (TNFR11) a été identifié comme facteur de risque de la PR.

L'implication des molécules du CMH de classe II dans le développement de la PR n'est pas uniquement due à leur capacité à lier et à présenter les antigènes aux cellules T puisqu'il a été montré que même le niveau d'expression des molécules du CMH de classe II représente à lui seul un facteur de risque dans la PR. En effet, une étude réalisée sur des souris transgéniques a montré qu'une expression aberrante des gènes codant les molécules du CMH de classe II au niveau de l'articulation augmente la susceptibilité au développement de la CIA chez ces souris et facilite le déclenchement et l'évolution de l'arthrite³²¹.

IV.2.3.2 Physiopathologie de l'arthrite chez les souris HLA-Tg

Le modèle HLA-Tg, exprimant le gène HLA-DR humain, a été généré essentiellement pour déterminer le rôle des molécules HLA de classe II dans la pathogénie de la PR³²². Les molécules du CMH de classe II codées par le transgène participent à la sélection du répertoire TCR murin et à la médiation des réponses immunitaires impliquant les LT CD4+. De plus, ces molécules confèrent aux souris la susceptibilité au développement de l'arthrite, qu'elle soit spontanée ou induite par des peptides arthritogènes³²³. Ainsi, ce modèle a été particulièrement utile pour déterminer s'il existe une association entre le développement d'auto-anticorps anti-CII et le gène HLA-DR chez les patients atteints de PR. Il a été montré que, après immunisation de souris transgéniques HLA-DR4 avec du CII humain, les LT CD4+ reconnaissent certaines formes glycosylées de cet antigène. Chez certains patients atteints de PR, les LT CD4+ reconnaissent également différentes formes glycosylées du CII³²⁴. Le caractère arthritogénique du fibrinogène citrulliné, dans un contexte d'arthrite associée aux molécules du CMH de classe II, a également été mis en évidence dans ce modèle³²⁵. En effet, il avait déjà été démontré que, bien que le substrat des auto-anticorps anti-citrulline ait initialement été identifié comme étant la filaggrine citrullinée, le fibrinogène citrulliné dérivé de la synoviale constitue une cible pour ces auto-anticorps⁹⁷. Il peut, en effet, être généré dans la lésion rhumatoïde, où les dépôts de fibrine sont co-localisés avec la peptidylarginine désiminase (qui, comme on l'a vu précédemment, est une enzyme responsable de la conversion de l'arginine en citrulline)^{326, 327}. La réponse immunitaire HLA-dépendante développée suite à l'immunisation par le fibrinogène citrulliné provoque une arthrite qui présente différents aspects de la PR humaine, dont l'hyperplasie de la

membrane synoviale, mais qui présente également des différences, notamment par rapport à l'infiltration cellulaire qui est quasi inexistante³²⁵.

IV.2.4 Le modèle K/BxN

Le modèle K/BxN a été généré en croisant des souris C57BL/6 possédant un TCR transgénique qui reconnaît la ribonucléase bovine présentée par l'haplotype I-A^k du CMH de classe II avec des souris immuno-déficientes NOD (Non-Obese-Diabetic) ayant l'haplotype I-A^{g7} du CMH de classe II³²⁸. Curieusement, ce TCR, placé dans un contexte I-A^{g7}, reconnaît un second peptide. La réactivité des LT à ce peptide résulte en l'activation des LB et leur maturation en plasmocytes qui produisent de larges quantités d'auto-anticorps de type Ig dirigés contre ce peptide, provoquant ainsi le déclenchement rapide d'une arthrite sévère (Figure 21). Ce peptide a été identifié par la suite comme étant dérivé de la Glucose-6-Phosphate Isomérase (GPI), une enzyme cytosolique exprimée de façon ubiquitaire dans différentes cellules¹⁰⁹.

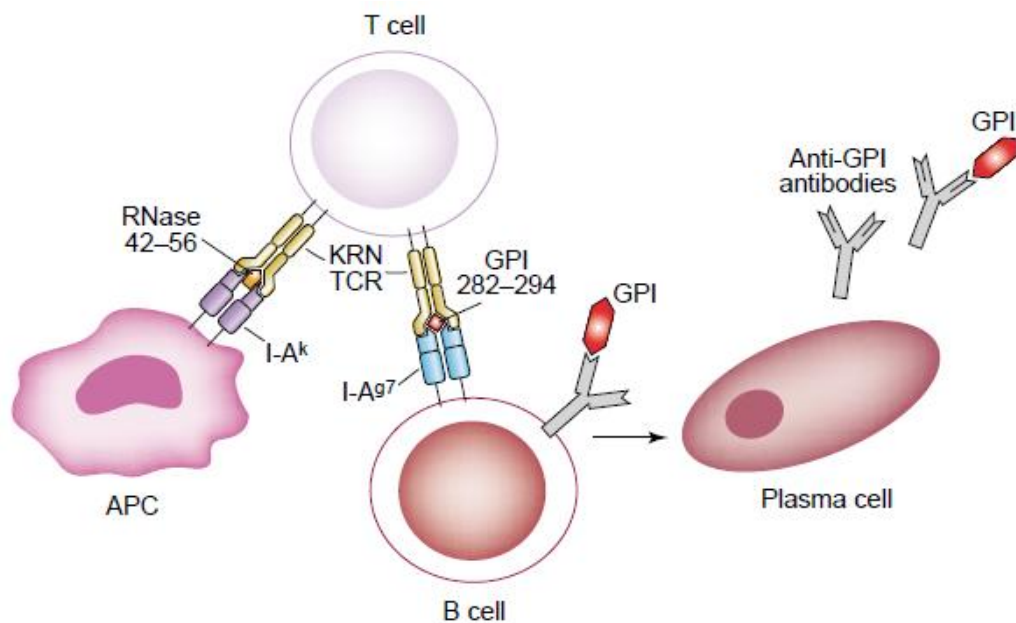


Figure 21 : Mécanisme d'induction de l'arthrite dans le modèle K/BxN²⁹⁷

L'examen histologique des articulations de souris sauvages montre que la GPI est présente dans la cavité articulaire longeant le cartilage. Chez les souris arthritiques, ces dépôts de GPI sont amplifiés et son co-localisés avec des IgG anti-GPI et des fragments du complément. Cette accumulation pourrait expliquer le fait qu'un auto-antigène exprimé de façon ubiquitaire induise une maladie auto-immune dans un tissu spécifique. En effet, l'accumulation de la GPI et des anticorps anti-GPI dans les articulations conduit à la formation de complexes immuns à la surface du cartilage^{329, 330}. A travers la

liaison aux récepteurs pour le Fc γ (particulièrement Fc γ RIII) et l'activation de la voie du complément, ces complexes immuns vont attirer et activer les neutrophiles et les mastocytes, qui sécrètent une variété de cytokines dont l'IL-1 et le TNF- α . L'influence de la voie du complément a été mise en évidence par les expériences de transfert de sérum KRN à une série de souris knock-out. Ces expériences ont montré que les souris déficientes en facteurs B, C3, C5a ou C5aR (C5a Receptor), facteurs appartenant à la voie alternative du complément, ne développent pas d'arthrite alors que les souris déficientes en facteurs C1q et C4, facteurs appartenant à la voie classique du complément, développent une arthrite analogue à celles des souris sauvages. Ceci montre donc que la voie classique d'activation du système du complément n'est pas impliquée dans la pathogénie de la PR. De plus, l'administration d'un anticorps anti-C5a à des souris recevant le sérum KRN prévient le développement de l'arthrite ce qui met en avant le rôle de ce facteur dans la pathogénie de la PR. D'autres expériences ont permis de montrer plus tard que l'effet arthritogénique des auto-anticorps anti-GPI ne dépend pas uniquement de l'activation du facteur C5a mais également de la force d'interaction entre C5a et son récepteur C5aR, retrouvé essentiellement à la surface des neutrophiles et des mastocytes (Figure 22).

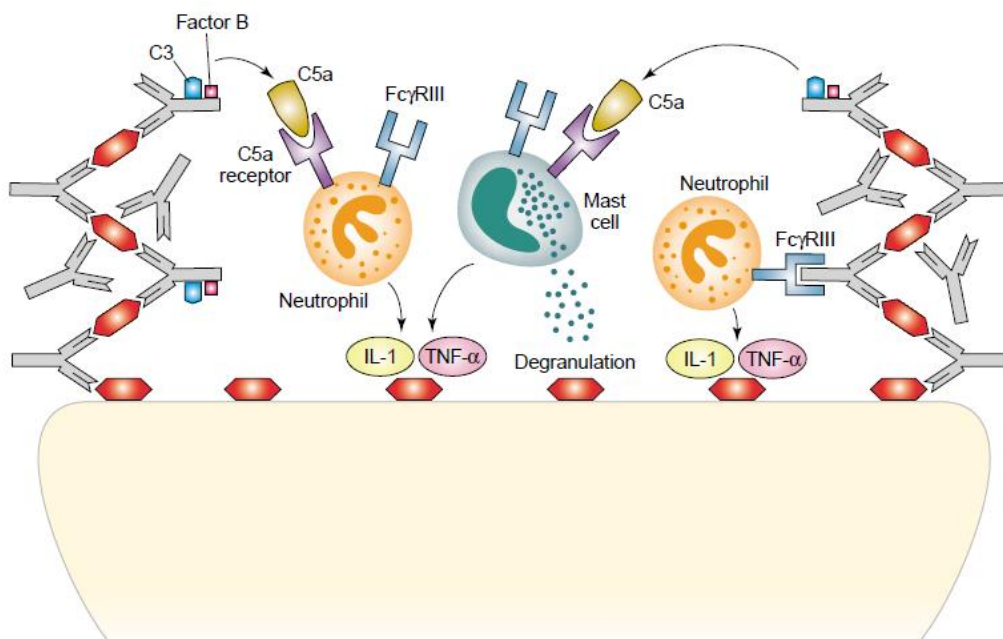


Figure 22 : Voies de signalisation activées par les auto-anticorps arthritogéniques anti-GPI²⁹⁷

Vu les similitudes entre le modèle K/BxN et la PR humaine, il est probable que les événements immunologiques qui conduisent au développement de l'arthrite dans le modèle K/BxN pourraient également avoir lieu chez les patients atteints de PR (Table 3).

	K/BxN	Rheumatoid arthritis
Arthritis	Symmetrical Chronic progressive	Symmetrical Chronic progressive
Joints involved	Hip joints spared	DIP joints spared
Spine involvement	Yes	No
Rheumatoid factor	No	Yes
Joint destruction	Yes	Yes

Table 3 : Similitudes et différences entre le modèle K/BxN et la PR humaine³³¹

En effet, le traitement par le Rituximab des souris K/BxN exprimant le transgène CD20 humain réduit le taux d'auto-anticorps anti-GPI dans le sérum. Il a été montré que les plasmocytes exprimant ces auto-anticorps anti-GPI ont une courte durée de vie, expriment le CD20 et sont rapidement déplétés par le Rituximab³³². Cette étude a permis de mettre en avant le rôle des plasmocytes dans le développement des maladies auto-immunes.

IV.2.5 Le modèle *IL-1ra*^{-/-}

IV.2.5.1 Importance de l'*IL-1Ra*

L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle très important dans le processus rhumatoïde. Elle a été identifiée initialement comme un activateur des lymphocytes et des ostéoclastes. Elle consiste en deux molécules : l'IL-1 α et l'IL-1 β ³³³. Bien que ces deux molécules dérivent de deux gènes différents et ne présentent que 25% d'homologie de séquence, elles exercent des activités biologiques similaires à travers un seul récepteur : L'IL-1RI. Un autre récepteur, l'IL-1RII est également présent mais joue un rôle dans la régulation plutôt que dans la transduction du signal³³⁴. Un antagoniste au récepteur à l'IL-1, l'IL-1Ra, appartenant à la famille de l'IL-1, se lie à ces récepteurs sans induire de réponse cellulaire et inhibe de manière compétitive la liaison de l'IL-1 α et de l'IL-1 β à leur récepteur³³⁵. La protéine adaptatrice TRAF-6 ne peut alors être recrutée ce qui bloque l'activation du facteur de transcription NF- κ B et l'effet inflammatoire qui en découle. Par conséquent, l'IL-1Ra est un inhibiteur naturel de l'IL-1 (Figure 23).

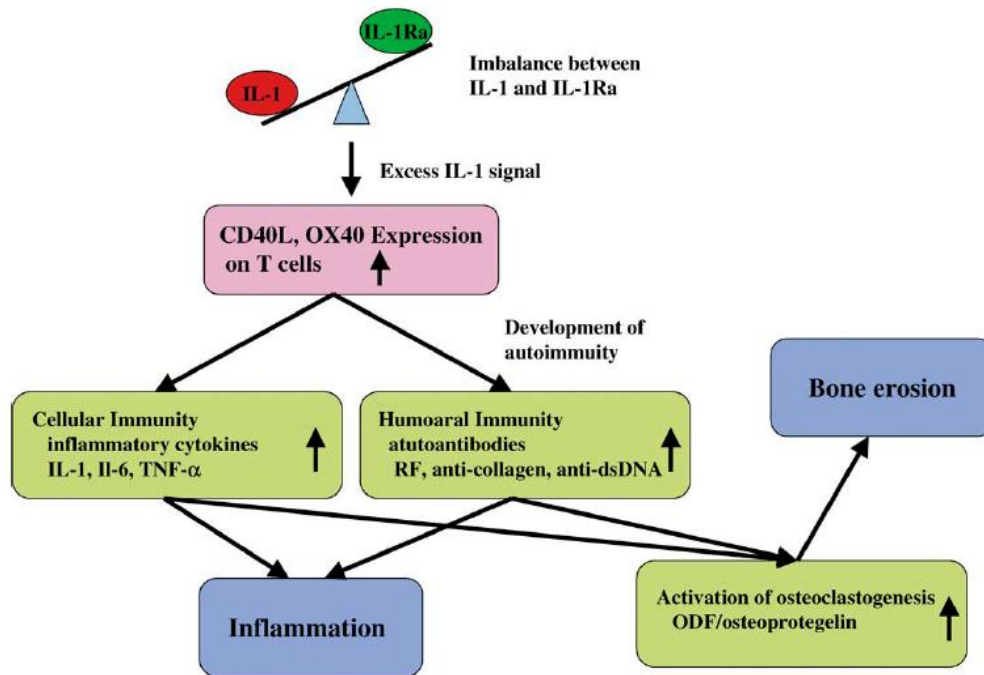


Figure 24 : Dérégulation de la balance IL-1 / IL-1Ra au cours de la PR³³⁶

Dans la pathologie humaine, des taux élevés d'IL-1Ra sont retrouvés dans le sérum et dans le liquide synovial. Cette augmentation du taux d'IL-1Ra circulant dénote un mécanisme préventif qui tente de contrer une réponse inflammatoire excessive. Cependant, au niveau de la membrane synoviale, on retrouve une faible production d'IL-1Ra endogène qui s'avère insuffisante pour bloquer de façon effective les effets de l'IL-1 produite localement³³³. En effet, des examens histologiques de la membrane synoviale de patients atteints de PR montrent que l'IL-1 est produite dans 90% des cellules situées au niveau de la jonction cartilage-pannus, alors que l'IL-1Ra est produit dans moins de 10% des cellules. Ces cellules sont principalement des macrophages et des fibroblastes³⁴².

L'importance de cet antagoniste dans la régulation de l'inflammation conduite par l'IL-1 a été clairement démontrée par les souris déficientes en IL-1Ra¹²⁴. De plus, les manifestations inflammatoires auto-immunes observées chez des enfants déficients en IL-1Ra ont largement soutenu le rôle régulateur de cet antagoniste²⁶⁷ et ainsi validé l'utilisation de ce modèle dans l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénie de la PR.

IV.2.5.2 Caractéristiques des souris IL-1ra^{-/-}

Ce modèle développe spontanément une polyarthropathie chronique dont les caractéristiques histologiques sont fortement similaires à la PR humaine. En effet, les examens histologiques des articulations montrent une inflammation synoviale et péri-articulaire marquée par une infiltration de cellules inflammatoires, essentiellement des macrophages et des neutrophiles ainsi qu'une

hyperplasie de la membrane synoviale. Les articulations de ces souris sont également caractérisées par la formation d'un pannus où logent des ostéoclastes ayant une forte activité érosive.

D'un point de vue clinique, les premiers signes de l'arthrite apparaissent à l'âge de 5 semaines et la maladie évolue graduellement jusqu'à une incidence de 100% à l'âge de 13 semaines, que ce soit pour les mâles ou les femelles. Il a été montré que l'incidence de l'arthrite dépend du fond génétique des souris. En effet, 100% des souris *IL-1ra*^{-/-} ayant un fond génétique BALB/c sont arthritiques à l'âge de 16 semaines alors que les souris *IL-1ra*^{-/-} ayant un fond génétique C57BL/6 ne développent pas la maladie au même âge et l'incidence atteint 29% vers l'âge de 48 semaines (Table 4)³⁴³.

Les souris *IL-1ra*^{-/-} sont également caractérisées par un faible poids dû à la réduction de leur masse grasseuse en comparaison avec des souris sauvages. Curieusement, ces souris ont relativement un fort appétit par rapport à leur poids lorsqu'elles suivent un régime alimentaire standard. Ceci pourrait être dû à une forte dépense énergétique et à la réduction de la concentration en leptine dans le sang qui se trouve être 6 fois plus faible que chez les souris sauvages³⁴⁴. Ces souris souffrent aussi de vascularites et d'inflammation cutanée^{345, 346}.

Age	BALB/cA	C57BL/6J	129 × C57BL/6J
wk			
8	24/30 (80)	0/56 (0)	0/114 (0)
16	56/56 (100)	0/56 (0)	0/114 (0)
24	ND	1/13 (8)	0/17 (0)
32	ND	2/13 (15)	0/2 (0)
48	2/2 (100)	2/7 (29)	ND

Arthritic mice/total mice examined. Numbers in parentheses show the incidence (%) of arthritic mice.

Table 4 : Incidence de l'arthrite chez les souris *IL-1ra*^{-/-} en fonction du fond génétique³⁴³

D'un point de vue immunologique, des taux élevés d'IgG ainsi que d'auto-anticorps anti-IgG, anti-CII et anti-DNA sont détectés chez les souris *IL-1ra*^{-/-} ce qui indique clairement que l'excès d'IL-1 provoqué par la déficience en IL-1Ra est une cause de l'auto-immunité. Dans les conditions physiologiques, l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1Ra sont exprimés de façon constitutive dans les articulations. Chez les souris *IL-1ra*^{-/-}, la concentration sérique de l'IL-1 β est 2 à 3 fois plus élevée. L'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-17 est également augmentée en comparaison par rapport aux souris sauvages, indiquant le rôle régulateur de l'IL-1Ra^{347, 348}.

Ainsi, en l'absence d'IL-1Ra, les taux physiologiques d'IL-1 induisent une réponse pathogénique de cette même cytokine ce qui conduit au développement de l'inflammation et de l'auto-immunité.

IV.2.5.3 Le syndrome auto-inflammatoire DIRA

Le terme « syndrome auto-inflammatoire » décrit un ensemble de désordres génétiques caractérisés par une réponse immunitaire innée exagérée qui conduit à des épisodes inflammatoires récurrents affectant plusieurs organes³⁴⁶.

La mutation du gène *IL-1rn* codant l'IL-1Ra, conduit à la déficience d'IL-1Ra, un syndrome auto-inflammatoire nommé « DIRA ». Cette maladie inflammatoire est une maladie autosomale récessive qui a été très récemment découverte chez 8 enfants. Elle se manifeste précocement par une inflammation sévère incluant, une ostéopénie marquée, un gonflement articulaire, des lésions osseuses ainsi que des éruptions cutanées purulentes. L'administration d'Anakinra à ces enfants réduit considérablement ces manifestations^{267, 268}.

IV.3 Conclusion

Tous les modèles murins présentés dans cette partie ont plus ou moins apporté de nouveaux éléments qui permettent de mieux comprendre la physiopathologie de la PR ou de développer des traitements qui ont montré leur efficacité au cours des dernières décennies. Le choix d'un modèle animal dépend alors des paramètres que l'on veut observer et de la relevance du modèle pour mimer le plus étroitement possible la PR humaine.

Dans le cadre de cette étude où l'on veut mettre en évidence l'éventuelle utilisation d'une nouvelle génération de molécules dans la thérapie de la PR, la facilité d'utilisation (rapidité de l'arthrite et incidence à 100%) ainsi que les différentes caractéristiques immunologiques (taux élevés d'auto-anticorps et de cytokines pro-inflammatoires) et cliniques (gonflement des articulations et manifestations extra-articulaires) du modèle *IL-1ra*^{-/-} font qu'il représente un excellent modèle d'étude.

V. Les dendrimères

V.1 Structure et synthèse des dendrimères

V.1.1 Structure générale des dendrimères

Les dendrimères (du grec « *dendra* » = arbre) sont des molécules polymériques constituées de monomères branchés qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central pluri-fonctionnel. Ainsi, autour du cœur, on retrouve des fragments identiques appelés « dendrons » dont le nombre dépend de la multiplicité du cœur. Un dendrimère peut alors être divisé en 3 régions : le cœur, le squelette constitué des branches et la périphérie constituée des groupements de surface. Les points de divergence portés par les monomères, du cœur vers la périphérie, définit la génération d'un dendrimère (Figure 25). La construction arborescente des dendrimères s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions jusqu'à l'obtention à la fin de chaque cycle réactionnel d'une nouvelle génération et d'un nombre croissant de branches identiques. Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique, hautement ramifiée et pluri-fonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes en périphérie. Les dendrimères de grandes générations sont donc plus larges, plus branchés et possèdent plus de groupements de surface à leur périphérie que les dendrimères de petites générations³⁴⁹.

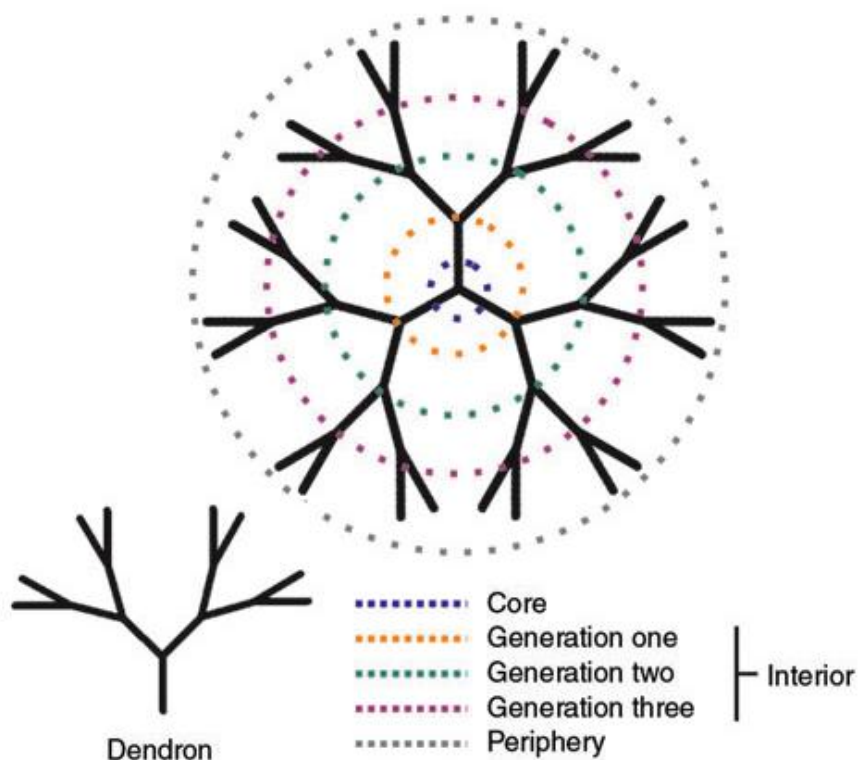


Figure 25 : Représentation schématique de la structure d'un dendrimère³⁴⁹

V.1.2 Synthèse des dendrimères

Deux méthodes de synthèse peuvent être employées pour obtenir des dendrimères : la synthèse divergente et la synthèse convergente (Figure 26) :

- La synthèse divergente résulte en une croissance exponentielle de la molécule en terme de taille, qui s’effectue du cœur vers la périphérie, en greffant un nombre de plus en plus grand de monomères³⁵⁰.
- La synthèse convergente consiste à construire séparément les dendrons et à les rattacher lors d’une étape finale à un cœur pluri-fonctionnel³⁵¹.

Il s’agit donc de molécules de taille et de structure définies synthétisées selon un processus parfaitement contrôlé. Cette synthèse multi-étapes fait que les dendrimères sont des molécules théoriquement monodisperses, contrairement aux polymères traditionnels qui eux sont polydisperses. Les molécules monodisperses sont particulièrement prisées dans le domaine médical puisqu’elles offrent une forte reproductibilité des expériences et permettent une réduction des variabilités expérimentales et thérapeutiques. La monodispersité des dendrimères est observée, en pratique, pour les dendrimères de petites générations (jusqu’à 3 générations)³⁴⁹.

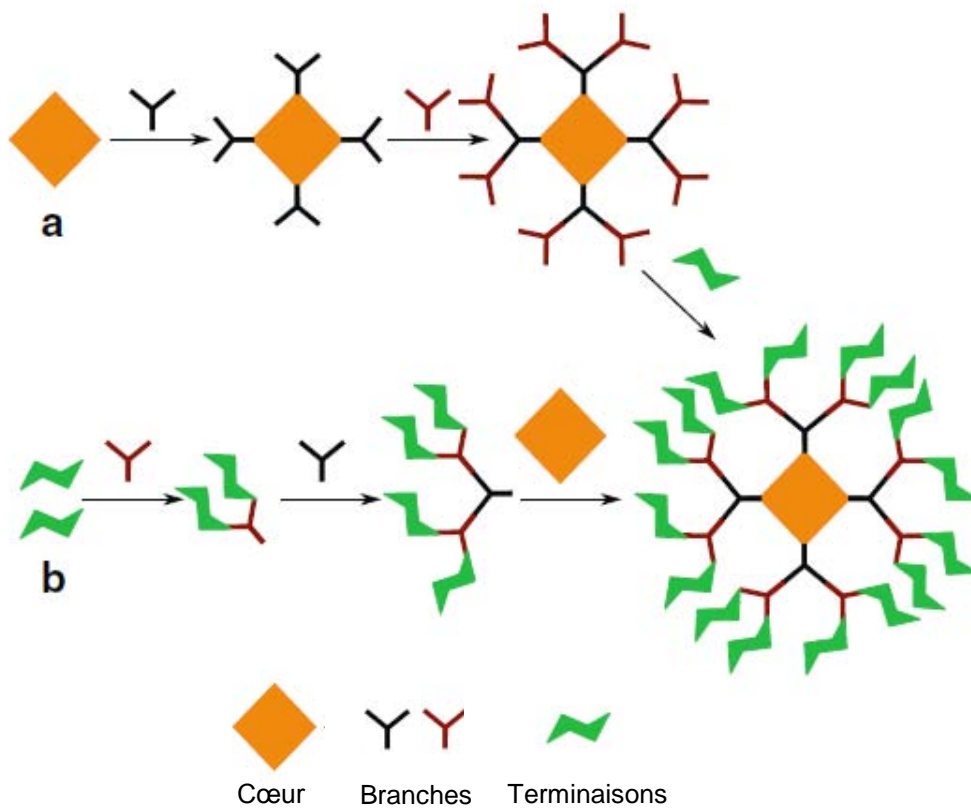


Figure 26 : Méthodes de synthèse d’un dendrimère : (a) Synthèse divergente (b) Synthèse Convergente³⁵²

V.2 Propriétés des dendrimères

Les dendrimères possèdent des propriétés particulières de solubilité, de viscosité et de stabilité thermique. Elles offrent donc une large palette d'applications allant de la chimie moléculaire et supramoléculaire à la biochimie en passant par la biologie, les nanosciences, les matériaux, etc. Ces applications découlent des propriétés intrinsèques des polymères mais aussi et surtout des caractéristiques même des dendrimères : fonctions aisément accessibles en surface, porosité de ces nanomolécules, flexibilité des branches internes, accessibilité au cœur, etc. Certaines de ces propriétés peuvent s'avérer très intéressantes pour d'éventuelles applications biomédicales.

V.2.1 La plurivalence

La propriété des dendrimères la plus exploitée en biomédecine est leur plurivalence. Cette propriété est particulièrement utile lorsque le dendrimère est couplé à un ligand. En effet, elle permet au dendrimère d'accrocher plusieurs copies du ligand créant ainsi une interaction beaucoup plus forte avec les récepteurs présents à la surface d'une cellule^{353, 354}. Cette propriété a largement trouvé son application dans la prévention de l'adhésion des cellules tumorales et des métastases *in vitro*³⁵⁵ et dans l'inhibition de l'infection par le virus HIV chez les macaques³⁵⁶.

Le nombre de branches qui forment le dendrimère peut moduler de façon intéressante sa conformation. Par exemple, un dendrimère de petite génération a une structure relâchée en forme de disque alors qu'un dendrimère de grande génération a une structure plus globulaire ou même sphérique. Cette propriété structurelle des dendrimères a été exploitée en biomédecine pour l'encapsulation de molécules chimiquement sensibles comme le méthotrexate lorsqu'il est utilisé en thérapie anti-cancéreuse³⁵⁷.

V.2.2 La bio-compatibilité

Les molécules de faible poids moléculaire ne posent généralement pas de problèmes de bio-compatibilité puisque, lorsqu'elles sont métabolisées, elles sont rapidement excrétées dans l'urine ou dans les matières fécales³⁴⁹. En revanche, les molécules de haut poids moléculaire, comme les polymères, ne sont pas facilement éliminées³⁵⁸. En ce qui concerne les dendrimères, considérés comme des molécules de faible poids moléculaire, du moins pour les petites générations, ils ne devraient pas entraîner des réponses indésirables de la part de leur hôte et devraient être facilement éliminés ou bio-dégradés par le système rénal, même si aucune étude ne l'a encore prouvé. La notion de bio-compatibilité des dendrimères ou leur compatibilité avec le système biologique hôte se résume en deux points essentiels :

V.2.2.1 La Toxicité

Les groupements de surface déterminent généralement si le dendrimère présente ou non une certaine toxicité. En effet, les dendrimères présentant des groupements cationiques à leur surface entraînent, *in vitro*, une apoptose et des effets hémolytiques beaucoup plus importants que les dendrimères à surface anionique ou neutre, à la même concentration^{359, 360}. Dans le cas des dendrimères Poly(amido)amines (PAMAM) (Figure 27) à surface cationique, cette cytotoxicité augmente avec le nombre de génération ce qui n'est pas le cas des dendrimères Polypropylèneimines (PPI)^{359, 361} (Figure 28). Ces résultats sont vérifiés *in vivo* puisque les souris ne tolèrent que faiblement les dendrimères à surface cationique injectés par voie intra-péritonéale. En effet, une dose de 10mg/kg entraîne une forte augmentation du taux d'alanine transaminase et provoque une nécrose hépatique. L'injection d'une dose de 160mg/kg est, quant à elle, létale à 100%³⁶². Lorsque les groupements cationiques de ces dendrimères sont remplacés par des groupements neutres, la dose tolérée par les souris peut dépasser 1g/kg³⁶³.

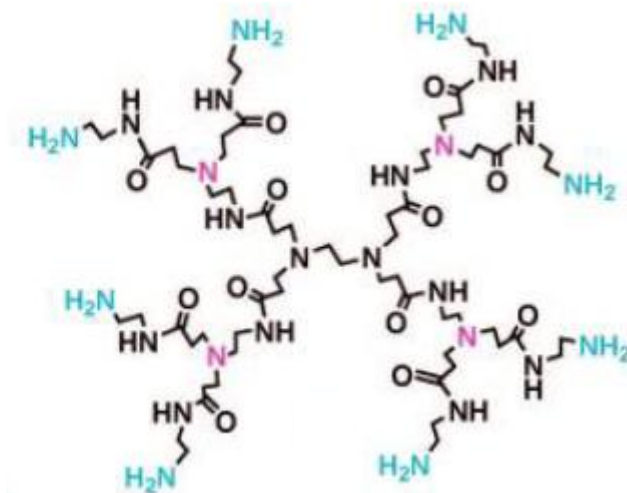


Figure 27 : Structure d'un dendrimère PAMAM³⁶⁴

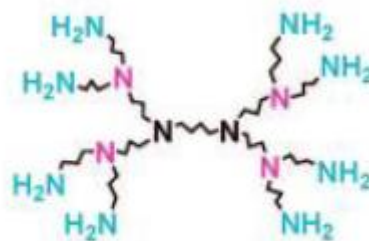


Figure 28 : Structure d'un dendrimère PPI³⁶⁴

V.2.2.2 La Dégradation

Les dendrimères Polyester ont été conçus de sorte que les produits de l'hydrolyse des groupements esters soient non toxiques³⁶⁵. De même, les dendrimères composés de liaisons pouvant être des substrats pour certaines enzymes sont facilement bio-dégradables³⁶⁶. Par contre, les dendrimères contenant des polypeptides ou des oligonucléotides sont généralement résistants à la dégradation enzymatique^{367, 368}. Pour certains dendrimères formés par l'assemblage de composés aromatiques, une seule réaction chimique au niveau du cœur ou de la périphérie permet de cliver rapidement le dendrimère en unités structurellement similaires et biologiquement actives³⁶⁹. La charge à la surface du dendrimère ainsi que son poids moléculaire déterminent sa vitesse de dégradation. En effet, il a été montré que les dendrimères à surface anionique de poids moléculaire supérieur à 40kDa circulent plus longtemps dans le sang. De même, plus le nombre de branches d'un dendrimère est élevé, moins il sera facile de l'éliminer³⁷⁰.

V.3 Applications biomédicales des dendrimères

La biomédecine est l'un des secteurs les plus concernés par l'émergence des dendrimères. Parmi les dendrimères qu'on retrouve dans ce secteur, les plus utilisés sont les dendrimères à structure PAMAM, commercialisés avec différentes fonctions de surface et une large variété de générations. La découverte de ces dendrimères au début des années 1980 et leur comparaison avec les systèmes biologiques comme l'ADN, l'insuline, l'hémoglobine ou la bicouche lipidique des membranes a révélé plusieurs analogies notamment en terme de taille et de structure globulaire. Ainsi, l'ingénierie médicale utilisant les dendrimères s'est développée aux débuts des années 1990 et une des premières applications de ces molécules a été la synthèse de dendrimères capables de mimer des anticorps qui vont reconnaître de manière très sélective des régions de l'ADN. Par la suite, les dendrimères ont servi de capteurs qui permettent la détection et la quantification du virus HIV. A partir de là, les applications biomédicales des dendrimères sont devenues de plus en plus prometteuses.

V.3.1 La délivrance d'agents thérapeutiques

L'utilisation des dendrimères dans la délivrance d'agents thérapeutiques a révolutionné la médecine en augmentant de façon spectaculaire l'efficacité des traitements et en diminuant considérablement leurs effets secondaires. Ceci a permis l'apparition d'une nouvelle science appelée « nanomédecine » basée sur l'utilisation de nanostructures en médecine³⁷¹.

Plusieurs études ont montré l'efficacité *in vitro* des dendrimères comme transporteurs d'agents thérapeutiques mais très peu d'études réalisées *in vivo* existent. Un des exemples les plus démonstratifs est celui du cisplatine. Conjugué à un dendrimère PAMAM, le cisplatine est 10 fois plus soluble que lorsqu'il est seul. L'injection intraveineuse de ce complexe à la lignée murine B16 ralentit significativement la progression tumorale. De plus, les souris tolèrent une dose de cisplatine de 15mg/kg lorsqu'il est conjugué au dendrimère alors que la dose maximale tolérée pour le cisplatine seule est de 5mg/kg³⁷².

Grâce à leur stabilité, leur structure parfaitement définie ainsi qu'à la nature de leurs groupements de surface, les dendrimères peuvent être aussi d'excellents agents de transfection. En effet, les interactions électrostatiques entre le groupement phosphate de l'ADN et l'amine protonée sous conditions physiologiques du dendrimère résulte en la formation d'un complexe ADN-Dendrimère, appelé « dendriplexe »³⁷³. Ce dendriplexe se lie à la membrane cellulaire, également par liaisons électrostatiques, et est internalisé par endocytose dans le cytoplasme où il rejoint le noyau selon un mécanisme non encore identifié^{374, 375}.

V.3.2 L'imagerie médicale

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est une méthode diagnostique non invasive fréquemment utilisée en médecine pour visualiser les organes et les vaisseaux sanguins. Les premières applications des dendrimères *in vivo* consistaient à les utiliser comme des vecteurs des agents de contraste utilisés dans cette technique³⁷⁶.

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est également une méthode d'imagerie non invasive dans laquelle les dendrimères ont trouvé leur application. En effet, lorsque des molécules de métalporphyrine, protéine impliquée dans le transport de l'oxygène, sont encapsulées dans des dendrimères fluorescents, l'intensité de fluorescence dégagée dans un tissu donné est inversement proportionnelle à la concentration en oxygène dans ce tissu³⁷⁷. Dans certaines tumeurs, la mesure de la concentration en oxygène indique si le traitement utilisé est efficace ou pas³⁷⁸.

La tomodensitométrie ou CT-scan (Computed Tomography) est une méthode d'imagerie médicale qui permet de visualiser la vascularisation d'un organe. Elle peut utiliser des agents de contraste contenant de l'iode radioactif, ce qui rend cette méthode fortement irradiante. La conjugaison des agents de contraste à des dendrimères contenant un cœur PEG (PolyEthylène Glycol) permet d'augmenter de 7 fois le temps de rétention de l'agent de contraste et de diminuer considérablement l'irradiation provoquée par l'utilisation de l'iode³⁷⁹.

V.3.3 Les dendrimères bio-capteurs

Au début des années 2000, les dendrimères constitués d'acides nucléiques ont été utilisés dans les micropuces à ADN³⁸⁰. Le principe de ces micropuces consiste à immobiliser par liaisons covalentes des nucléotides couplés à groupement fluorescent sur un support contenant déjà les dendrons afin d'analyser les acides nucléiques. La fluorescence, qui renseigne sur le taux d'hybridation de ces acides nucléiques, est considérablement augmentée et est beaucoup plus stable lorsque le support contient les dendrons^{381, 382}. Dans ce contexte, des dendrimères PAMAM de 3^{ème} génération conjugués à la biotine et greffés sur un support contenant de la streptavidine permettent d'augmenter la sensibilité pour l'ADN cible³⁸³.

Les bio-capteurs de glucose basés sur l'utilisation des dendrimères représentent également une application des dendrimères en bio-médecine, notamment pour déterminer la glycémie chez les patients diabétiques. Généralement, les bio-capteurs de glucose utilisent des électrodes contenant la glucose oxydase, une enzyme catalysant l'oxydation de β -D-glucose en lactone et H_2O_2 ³⁸⁴. Dans des essais réalisés *in vitro*, le couplage de la glucose oxydase à des dendrimères greffés sur les électrodes entraîne une réponse plus rapide au rajout de glucose³⁸⁵.

V.3.4 Les thérapies basées sur les dendrimères

Très peu de dendrimères ont été conçus pour servir de thérapeutiques. Il a été montré que les dendrimères PAMAM stimulent l'élimination des cellules infectées par des protéines de prions³⁸⁶. L'architecture branchée des dendrimères paraît importante pour cette application puisque les polyamines linéaires sont inefficaces. De plus, un dendrimère Poly(L-Lysine) de 4^{ème} génération présentant des groupements sulfate à sa périphérie a été évalué pour ses propriétés anti-virales contre le virus de l'herpès³⁸⁷ et le virus HIV^{388, 389}. En se liant à l'enveloppe protéique virale, il bloque l'adsorption et par conséquent l'entrée du virus dans la cellule. Des essais réalisés *in vivo* sur des femelles macaques ont montré que lorsque le dendrimère est appliqué en gel sur le vagin de ces femelles, il empêche l'infection par le virus HIV³⁸⁸.

Les dendrimères pourraient également être utilisés comme matrice pour la réparation tissulaire. En effet, des expériences réalisées en *ex vivo* sur des yeux lacérés, humains ou non humains, ont montré que des dendrons contenant des groupements acrylate peuvent former un hydrogel insoluble qui permet de maintenir l'intégrité du tissu oculaire et de stabiliser la pression intraoculaire^{390, 391}.

Il a été également montré que les dendrimères PAMAM conjugués aux glucosamines possèdent des propriétés immuno-modulatrices qui permettent de prévenir les lésions tissulaires post-

opératoires. Cependant, contrairement aux anticorps anti-TNF- α et aux stéroïdes qui agissent sur la sécrétion de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) et de chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β et IL-8), les dendrimères agissent bien en amont en inhibant le recrutement des cellules inflammatoires et l'angiogénèse³⁹² (Figure 29).

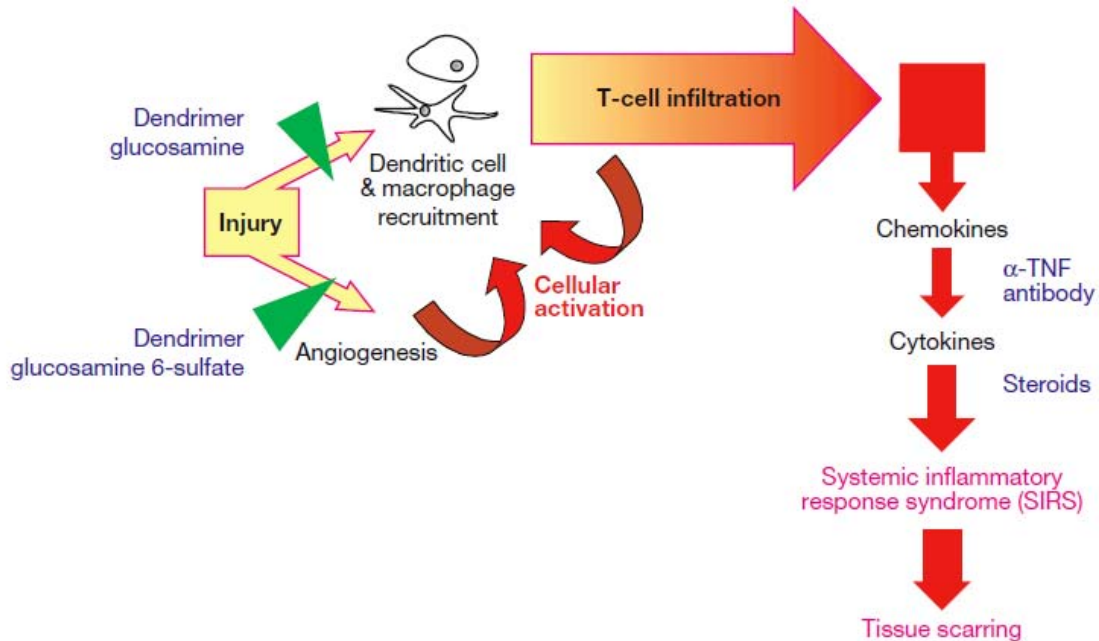


Figure 29 : Illustration de l'effet des dendrimères conjugués aux glucosamines³⁹²

Plus récemment, des dendrimères PAMAM possédant des groupements de surface amines et hydroxyles ont montré une activité anti-inflammatoire surprenante *in vivo*. Ceci a été vérifié sur 3 modèles différents à savoir un modèle d'œdème aigu de la patte, un modèle d'arthrite chronique induite à l'adjuvant de Freund et un modèle de granulome. Ces expériences réalisées chez le rat ont également montré que l'activité de ces dendrimères dépend de leurs groupements de surface et de leur génération³⁹³.

V.4 Les dendrimères phosphorés

V.4.1 Particularités des dendrimères phosphorés

Très peu de dendrimères phosphorés ont été synthétisés et caractérisés. Le premier dendrimère phosphoré qui a été construit contient du phosphonium à chaque point de divergence mais ce dendrimère n'a jamais été utilisé à des fins biologiques³⁹⁴. Depuis, plusieurs méthodes ont été décrites pour synthétiser des dendrimères phosphorés en solution mais ces méthodes présentent de nombreuses limites (nature du cœur utilisé, nombre de générations, etc). Par la suite, une méthode de synthèse permettant d'obtenir pour la première fois une large palette de dendrimères

phosphorés appelés dendrimères PMMH (PhénoxyMéthyl(MéthylHydrazone)) a été décrite par le groupe Majoral – Caminade³⁹⁵.

Ces dendrimères sont synthétisés suivant la méthode divergente à partir d'un cœur cyclotriphosphazène (N_3P_3). Ce cœur est caractérisé par une grande stabilité et une forte réactivité. De plus, grâce à ses six points d'ancrage, il offre aussi la possibilité de greffer un grand nombre de branches³⁹⁶. Ainsi, il est possible d'obtenir un dendrimère de 12^{ème} génération avec ce type de cœur, ce qui constitue le nombre de générations maximum jamais obtenu avec un autre type de dendrimère³⁹⁷.

Ces dendrimères ont les mêmes propriétés³⁹⁸ et les mêmes applications³⁹⁹⁻⁴⁰⁵ que la majorité des dendrimères décrits mais grâce à la présence de l'atome de phosphate, au niveau du cœur, des branches et de la périphérie, ils présentent deux particularités intéressantes :

- La présence d'atomes phosphorés, surtout à la surface leur permet de complexer plusieurs dérivés organométalliques. Cette propriété trouve son application dans les réactions de catalyse⁴⁰⁶.
- Ces dendrimères en solution chauffée produisent des hydrogels solides. En effet, une molécule de dendrimère permet la gélification de 50000 molécules d'eau. Cette propriété est intéressante puisque durant le processus de gélification, plusieurs types de substances hydrosolubles peuvent être incorporés dans le gel⁴⁰⁷.

V.4.2 Le dendrimère phosphoré à surface acide azabisphosphonique ABP

Parmi les dendrimères de type PMMH synthétisés, certains ont été testés pour leurs interactions avec les cellules hématopoïétiques du système immunitaires. Pour mettre en évidence ces interactions, les dendrimères PMMH ont été couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Ainsi, il a été montré que parmi les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC ou Peripheral Blood Mononuclear Cells), les monocytes constituent la population cible de ces dendrimères *in vitro*. L'utilisation d'une série de diverses structures dendritiques à surface acide phosphonique ou à surface acide carboxylique a montré que non seulement la surface acide phosphonique, mais aussi la structure dendritique entière, sont requises pour la bio-activité des dendrimères phosphorés^{408, 409}.

Parmi les dendrimères testés, le dendrimère de première génération à cœur cyclotriphosphazène et à surface acide aza-bis-phosphonique, appelé ABP (Figure 30) a montré des propriétés inédites d'activation du système immunitaire. En effet, lorsque ce dendrimère est mis en culture pendant 3 à 6 jours avec des PBMC, il a la propriété de se fixer en quelques secondes aux monocytes. Il s'ensuit une internalisation progressive du dendrimère et une activation morphologique (augmentation de la

taille et de la granulométrie) et phénotypique (diminution de l'expression des marqueurs de surface CD14 et HLA-DR) des monocytes. Il a été également montré que l'activation des monocytes par ce dendrimère fait intervenir un récepteur spécifique de l'immunité innée, le TLR-2 (Toll-Like Receptor), mais qui n'est pas pour autant le récepteur du dendrimère⁴⁰⁸. Une étude du transcriptome des monocytes activés par ce dendrimère ABP indique clairement une activation de type anti-inflammatoire⁴¹⁰, dite « activation alternative », par opposition à l'activation classique, inflammatoire⁴¹¹.

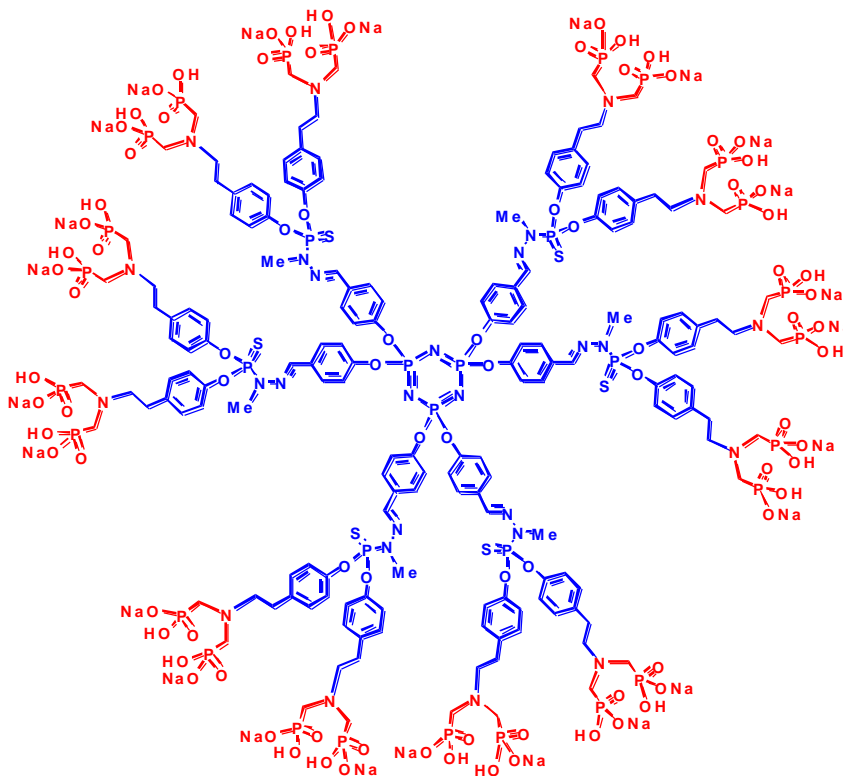


Figure 30 : Structure du dendrimère bio-actif ABP (*MW = 5820Da*)

L'action du dendrimère sur les cellules immunitaires ne se limite pas à l'activation des monocytes dans une voie anti-inflammatoire. Cette action est très complexe puisqu'elle intervient sur d'autres populations lymphocytaires comme sur les LT CD4+ et sur les cellules NK.

En effet, il a été montré que dans des cultures de PBMC (de 1 à 2 semaines) stimulées à l'IL-2, le dendrimère ABP inhibe de façon spécifique l'activation et par conséquent, la prolifération des LT CD4+ sans pour autant affecter la viabilité de ces cellules. Cette propriété régulatrice du dendrimère sur les LT CD4+ est directe et ne requiert pas la présence des monocytes⁴¹².

Dans de longues cultures (3 à 4 semaines) de PBMC en présence du dendrimère ABP, cette inhibition spécifique des LT CD4+ entraîne une expansion progressive et rapide en cellules NK dont le nombre peut être multiplié par 500 (Figure 31)⁴¹².

Les thérapies anti-cancéreuses basées sur l'utilisation de cellules NK constituent un concept théoriquement plausible mais en pratique, aucune méthode n'a vraiment permis jusqu'à aujourd'hui d'augmenter de façon artificielle le nombre de cellules immunitaires.

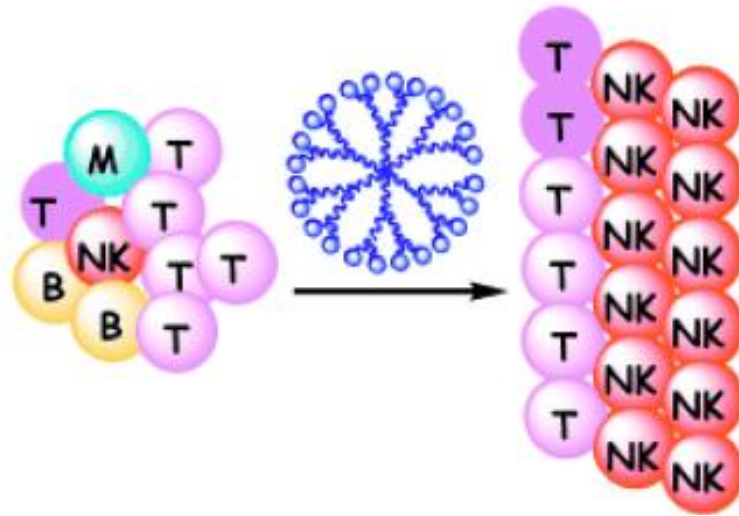


Figure 31 : Illustration de l'amplification des cellules NK du sang périphérique⁴¹³

Cette amplification jamais égalée par le dendrimer ABP ne modifie pas l'activité des cellules et ne compromet pas leur cytotoxicité envers les cellules cancéreuses⁴¹⁴. De plus, ce dendrimer a l'avantage d'être fortement stable et contrairement aux amino-bisphosphonates, déjà utilisés pour amplifier activer et / ou multiplier les cellules $T\gamma\delta+$, il est insensible à l'action des phospholipases et des phosphatases^{415, 416}.

V.5 Conclusion

Les dendrimères constituent une nouvelle classe de polymères ayant une structure moléculaire parfaitement définie. Leurs champs d'applications ne cessent de se diversifier notamment en nanomédecine où ils présentent un intérêt particulier grâce à leur forte interaction avec leur cible. D'ailleurs, nous avons récemment décrit ces applications ainsi que l'intérêt que présentent ces molécules en tant qu'agents anti-inflammatoires dans une revue que nous avons récemment publiée⁴¹⁷. Parmi ces molécules, le dendrimer de première génération à cœur cyclotriphosphazène et à surface acide aza-bis-phosphonique ABP, synthétisé par le groupe Majoral-Caminade, possède des propriétés inédites d'activation des monocytes dans une voie anti-inflammatoire. Ceci suggère que ces propriétés pourraient être applicables à des pathologies inflammatoires où les monocytes jouent un rôle prédominant.

Anti-Inflammatory Properties of Dendrimers *per se*

Myriam Hayder¹, Séverine Fruchon¹, Jean-Jacques Fournié², Mary Poupot², and Rémy Poupot^{1,*}

¹*Inserm, U1043, CNRS, U5282 and Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France;* ²*Inserm, U1037, CNRS, U5294 and Université de Toulouse, UPS, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Toulouse, F-31300, France*

E-mail: remy.poupot@inserm.fr

Received February 11, 2011; Revised May 27, 2011; Accepted June 22, 2011; Published July 7, 2011

Dendrimers are polybranched and polyfunctionalized tree-like polymers. Unlike linear polymers, they have perfectly defined structure and molecular weight, due to their iterative step-by-step synthesis. Their multivalent structure and supramolecular properties have made them attractive nanotools for applications, particularly in biology and medicine. Among the different biological and medical properties of dendrimers that have been developed over the past decades, the anti-inflammatory properties of several groups of dendrimers are the most recently discovered. Thereof, dendrimers emerge as promising, although heretical, drug candidates for the treatment of still-uncured chronic inflammatory disorders. This mini-review is based on the five main scientific articles giving an overview of what can be the spectrum of anti-inflammatory characteristics displayed by dendrimers.

KEYWORDS: dendrimers, inflammation, inflammatory disorders

INTRODUCTION

Short Historical and Semantic Preliminaries about Dendrimers

It is a generally acknowledged fact that the first report describing the synthesis of a series of “cascade molecules”, compounds exhibiting potentially perpetual branching, was published by Buhleier et al. in 1978[1]. Earlier, the same group had described many-armed (although not branched) “octopus molecules”[2]. This term referred to both the structure of the molecules and their capability of extracting picric acid from a water solution. In the 1970s, “octopus” and “cascade” molecules were synthesized mainly as complex-forming ligands capable of solubilizing hydrophilic salts in aprotic organic solvents[3].

In the 1980s, after the proposal of “octopus” and “cascade” molecules, chemists vied with each other to find a name for this new family of molecules. “Tentacle molecules”[4] or “cauliflower polymers”[5] appeared. In 1985, Tomalia et al. referred to these radially symmetrical molecules as possessing “starburst” topology[6]. The word “dendrimer” appears for the first time in this report and, carefully reading the reference[7], it can be ascribed to A.J. Vogel as cited: “we acknowledge A.J. Vogel for coining this very

appropriate term” in deference to their branched (Greek = dendritic; tree-like) as well as their oligomeric nature. “Dendrimer” was definitively popularized and widely established during the 1990s[8].

What are Dendrimers?

Dendrimers belong to the polymer family. Unlike polydisperse linear polymers (molecules of different sizes), dendrimers are monodisperse polymers, i.e., their synthesis affords isomolecular species whose molecular size, shape, and disposition of organic moieties are perfectly controlled and adjusted. Dendrimers possess three distinguishable structural characteristics: (1) a central core unit, (2) one or several series of radial branches, and (3) functional groups that are affixed on the outermost series of branches. Dendrimers are built following either a divergent route (starting from the core unit) or a convergent route (starting from the functional groups)[9].

In divergent synthesis, the core unit is like a hub from which the radial growth of the dendrimer is initiated. After a first series of branches has been added onto the core, a point of divergence is created at the end of each branch. This point of divergence will enable the dendritic growth at the next step of the synthesis (Fig. 1). The branch and the divergence chemical pattern constitute the repeating unit of the dendrimer. The number of repeating units determines the generation of the dendrimer. Thus, starting with a core unit in the center, the branches can branch again and again, theoretically *ad libitum*. The divergent synthesis of dendrimers ends with the engraftment of functional groups at the points of divergence in the last generation of branches (Fig. 1). This iterative process of synthesis leads to a steric congestion of the numerous terminal groups at the periphery of the dendrimer. The core and repeating units make up the inner shell of the dendrimer, the functional groups constitute the outer shell at its periphery. Probably more than 50 different types of inner shells have been described so far. The molecular and electronic structure, and therefore the physicochemical properties (especially the hydrophilic/hydrophobic balance), of the inner shell account for specific interactions within the dendrimer, and thus affect both the global tridimensional scaffold of the dendrimer in its environment and its self-assembly properties[10].

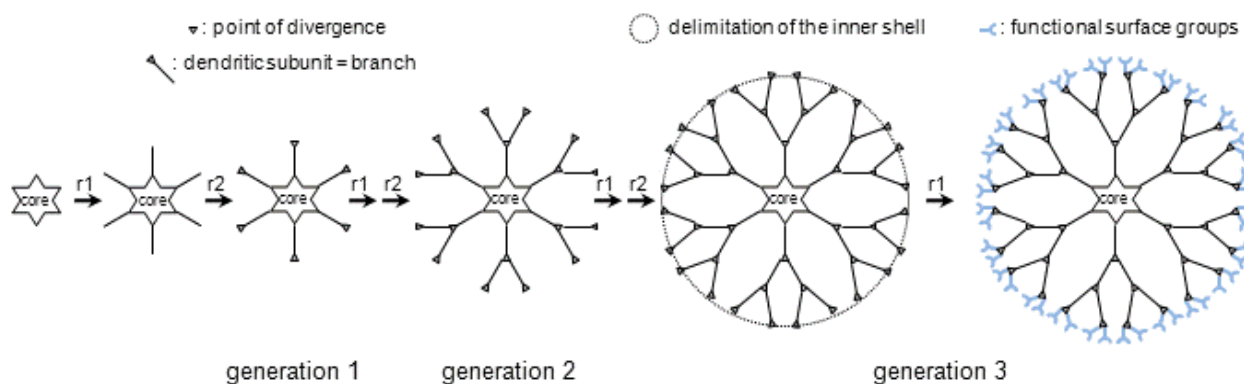


FIGURE 1. Scheme of the divergent synthesis route of a generation 3 dendrimer. r1 and r2 are the iterative reactions.

Biomedical Applications of Dendrimers

Due to their supramolecular properties, dendrimers are attractive devices in a great variety of fields, such as described in Astruc et al.[11]: materials for optoelectronics and sensing (including biosensing), catalysis, imaging, or biological and medical applications. Of course, most of these fields largely overlap each other.

Very soon after the pioneering synthesis of dendrimers, this new family of molecules generated a great deal of attention for their use in biological and medical applications. Four main features of dendrimers underlie their successful emergence in the biomedical field:

1. Due to their sequential process of synthesis, dendrimers have perfectly defined structure and molecular weight. These are key points for the fate of dendrimers in biomedical applications, for the advent of new dendrimer-based therapeutics and diagnostic tools, in regard to regulation requirements.
2. Their supramolecular properties are strongly involved in their uses; i.e., supramolecular interactions with guest molecules inside the dendrimer and supramolecular interactions at the periphery of the dendrimer with substrates, molecular and/or cellular targets, or other dendrimers to generate nanodevices.
3. Their nanometric size and globular shape are comparable to those of biomolecules (such as nucleic acids and proteins) and supramolecular biostructures (such as biological membranes). One can assume that the size of a first-generation dendrimer begins at 1 or 2 nm and that, more or less, 1 nm in size is gained with each supplemental generation. Therefore, dendrimers undoubtedly pertain to the nanoworld. Together with their supramolecular properties, these structural characteristics make dendrimers perfect carriers of biomolecules and biomimics.
4. Their multivalency enables polyvalent interactions with biotargets. The majority of biological molecular interactions occur through polyvalent bindings[12]. The valency of a ligand corresponds to the number of separate cognate interactions of the same kind that can be established with its receptor(s). The strength of a single cognate interaction between a ligand and a receptor is called “affinity”. Natural ligands with multiple receptor binding sites (multivalent ligands) or multivalent engineered nanodevices interact through polyvalent interactions with their partner receptors. The strength of these polyvalent cognate interactions is called “avidity” (also “functional affinity”) and is much higher than the simple sum of the strengths of the single interactions. Thus, from monovalent to oligovalent and then polyvalent ligands, there is a strong enhancement in the intensity and duration of the stimulating signal that is delivered to a cell through a ligand-receptor interaction. From this point of view, dendrimers are perfect nanoplatforms to enable polyvalent interactions involving ligands that are originally monovalent and, thus, to alter a biological process[13]. Although the understanding of interactions between cells and nanostructures needs to be refined[14], appropriately designed dendrimers are potential therapeutics to activate a protective physiological response or to efficiently inhibit a deleterious pathological disorder.

Based on these underlying concepts, dendrimers burst onto the biomedical field[15] and are now part, in their own right, of the nanomedicine landscape[16]. Dendrimers can be designed for magnetic resonance imaging (MRI) as contrast agents, as well as for fluorescence imaging[17]. Recently, the design of a radiolabeled dendrimer for use in positron-emitted tomography (PET) as a nanoprobe specifically targeting $\alpha_v\beta_3$ integrin overexpressed in angiogenesis constitutes a paradigm of how the advantages of dendrimers can be combined to afford an innovative nanobiotool[18].

Biosensing techniques are another area that is innovatively using dendrimers. In particular, DNA microarrays and biosensors are a fast-developing business for dendrimers. Thanks to the need for genomic information in medicine (gene expression, mutation analyses), in forensic science (genotyping of individuals), and in analytical biochemistry (such as testing the safety and quality of food and environment), there is an increasing demand for more specific, more sensitive, and more user-friendly biosensors. Dendrimers are also involved in biosensors for antibodies or antigens, glucose, glutamate, and dopamine as diagnostic tools[11]. Due to the interactions that DNA and dendrimers display[19], the latter are also major transfection agents for gene or RNA delivery. Cationic dendrimers, via supramolecular electrostatic interactions with anionic nucleic acids, on the one hand, and negatively charged membrane

surface on the other hand, bring the advantage of safety and versatility in comparison to viral vectors, especially regarding the intention of *in vivo* application (gene- and RNA-based therapies)[17,20].

As mentioned in the pioneering synthesis of dendrimers by Buhleier et al.[1], the rationale for the synthesis of large host molecules through a repetitive stepwise sequence of reactions was the inclusion of guest compounds in cavities or pseudocavities. Later on, nuclear magnetic resonance (NMR) studies of guest molecules in solution with starburst dendrimers of different generations suggested that these macromolecules (generation 4 and above) are able to encapsulate, and also aggregate at their surface, smaller guest molecules[21]. According to this study, encapsulation should be permitted when considering the predicted existence of void cavities in starburst dendrimers of the fourth generation and above. The first experimental evidence of a locked-in encapsulation of guest molecules in a dendritic structure designed and synthesized as such was afforded in 1994, with a diffusion of the guest out of the dendritic box, which was immeasurably slow[22]. The potential of dendrimers as drug nanocarriers has been recognized and explored since then. Different kinds of drugs have been encapsulated in or covalently conjugated with dendrimers. The objectives are to enhance the solubility of hydrophobic drugs in aqueous biological fluids[23]; to enhance the transdermal permeability of drugs, such as indomethacin (a nonsteroidal anti-inflammatory drug [NSAID])[24] or 5-fluorouracil[25]; to facilitate the intestinal absorption of poorly absorbable hydrophilic drugs and macromolecular compounds[26]; or to improve the pulmonary absorption of peptide and protein drugs[27]. The mechanisms by which a dendritic nanostructure can cross biological barriers are poorly depicted[28], but will benefit from studies regarding cellular responses mediated by nanoparticles[13].

The versatility of dendrimers enables the linkage of targeting functions at the surface of the nanocarrier, optimizing the biodistribution of the dendrimer-encapsulated or -conjugated drug. The specific targeting of the nanocarrier enables the site-specific delivery of the drug. Folic acid is the paradigm of the targeting group, which can be conjugated to dendrimers to target anticancer drugs to cancer cells[29]. In conclusion, the targeting of covalent and noncovalent drug-dendrimer nanoassemblies enables (1) the protection of the drug during its blood and tissue transit, (2) a lower dosage of the drug, (3) the avoidance of off-target effects of the drug, and, finally, (4) the controlled release of the drug to its target.

More recently, dendrimers *per se* also emerged as therapeutic agents. A wide variety of applications have been explored to promote these innovative drugs for prion diseases, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, viral and bacterial infections (including AIDS), tissue repair, cancer, and inflammatory diseases[30]. The most advanced dendrimer drug in clinical development ("VivaGel" from Starpharma) is intended for topical intravaginal use as an antiviral agent and is now in phase II clinical trials (<http://clinicaltrials.gov/>)[31]. In degenerative prion and Alzheimer's diseases, the beneficial effects of dendrimers are due to their direct interactions with detrimental accumulative peptide structures associated with these pathologies. Dendrimers can disrupt peptide aggregates and thereby block their deleterious accumulation. The direct anticancer properties of dendrimers that have been described are mediated by immunomodulation through interaction with cells of the immune system[32]. In this study, a glyco-conjugated dendrimer brings advantages on overall survival and tumor growth in a melanoma rat model by enhancing both the cytotoxicity of natural killer (NK) cells against the tumor and the activation of acquired immunity (CD4+ T lymphocytes).

The intrinsic anti-inflammatory properties of dendrimers are displayed mainly through immunomodulatory alterations of pathophysiological responses of the immune system. These properties have been proven *ex vivo* with human immune cells or *in vivo* in rodent models as reviewed below in a chronological order whenever logical.

The anti-inflammatory property of dendrimer glucosamine (DG) was evaluated by measuring the release of proinflammatory chemokines (macrophage inhibitory protein [MIP]-1 α and -1 β , interleukin [IL]-8) and cytokines (tumor necrosis factor [TNF]- α , IL-1 β , and IL-6) by different immune cells stimulated during 21 h by *Salmonella minnesota* lipopolysaccharide (LPS). Immune cells were exposed to DG 30 min prior to LPS activation, or DG was added 2 or 4 h after the beginning of activation by LPS. In all these experimental settings, DG inhibited the LPS-mediated release of chemokines and cytokines by total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 6.8 ± 1.1 μ M. These experiments have been repeated on purified populations of cells, demonstrating that the primary effect of DG is on monocyte-derived macrophages (MDMs) and immature monocyte-derived dendritic cells (DCs). The inhibition of chemokine and cytokine release has been confirmed at the mRNA level by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Moreover, LPS stimulation induced at various time intervals after DG exposure shows that the anti-inflammatory effect of DG is reversible.

An immunosuppressive effect of DG is also demonstrated in this study, insofar as this dendrimer inhibits the proliferation of lymphocytes in mixed leukocyte reactions (MLR) between DCs and peripheral blood lymphocytes (PBLs) with an IC₅₀ of 5.1 ± 0.8 μ M.

The second dendrimer used in this study is dendrimer glucosamine-6-sulfate (DGS). DGS harbors antiangiogenic activity proven by the *in vitro* inhibition of the proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Also, the toxicity of DG and DGS for a T-cell line and a macrophage cell line has been evaluated. With DG, the 50% lethal doses (LD₅₀) for the T-cell line and the macrophage cell line are, respectively, 134 ± 17 and 209 ± 8 μ M. With DGS, LD₅₀ are 22 ± 2 and 19 ± 1 μ M, respectively. When added at 15 μ M (DG) and 7 μ M (DGS) in culture of PBMCs, MDMs, DCs, T lymphocytes, or HUVECs, no adverse effect on cell viability or growth is observed.

The combination of the immunomodulatory dendrimer DG and the antiangiogenic dendrimer DGS has been tested *in vivo* onto the subconjunctival scarring in a rabbit model after glaucoma filtration surgery. Postsurgical scarring is due to a persistent inflammatory and angiogenic response. The combination of dendrimers was administered in 15 injections (beginning at day -2 before glaucoma surgery and ending at day 28 after it). The total amounts of DG and DGS were, respectively, 60.30 and 30.15 mg, 99% of which were injected by the intraperitoneal route, the remaining 1% was injected by the subconjunctival route. The efficacy of the treatment was inferred by the persistence of bleb after surgery, indicating an excessive scar tissue formation. This experiment shows a dramatic effect of the combination of DG and DGS, increasing the long-term success of surgery from 30 to 80%.

Anti-Inflammatory Properties of Phosphorus-Containing Dendrimers

In 2006, we reported that phosphorus-based dendrimers capped by amino-bisphosphonate groups, and especially dendrimer azabisphosphonate (ABP) presented in Fig. 3, have activating properties towards human monocytes[34]. These properties were depicted mainly as changes in the morphology and the phenotype of monocytes, increase of their phagocytosis activity, and their survival in culture at concentrations in the micromolar range (2 and 20 μ M).

Here, we give away for the first time the rationale for the design of dendrimers ended by phosphorus-containing functions. It relies on the structural features of particular nonpeptide antigens that specifically activate a subpopulation of peripheral blood T cells, the so-called V γ 9V δ 2 T lymphocytes[35]. These cells are stimulated by small pyrophosphorylated molecules and have an antitumor cytotoxic activity that makes them potential effectors in cellular anticancer therapies[36]. We have shown that the pyrophosphate group is crucial for the bioactivity of these molecules[37] and proposed to call them phosphoantigens. In line with the concept that polyvalent ligands should enable higher functional affinity and finally stronger activation of target cells[12], as already evoked in this review, we proposed to the neighboring Majoral-Caminade research team to prepare a dendritic device bearing pyrophosphate groups at its surface as a potent activator of V γ 9V δ 2 T lymphocytes. Due to the instability of pyrophosphate

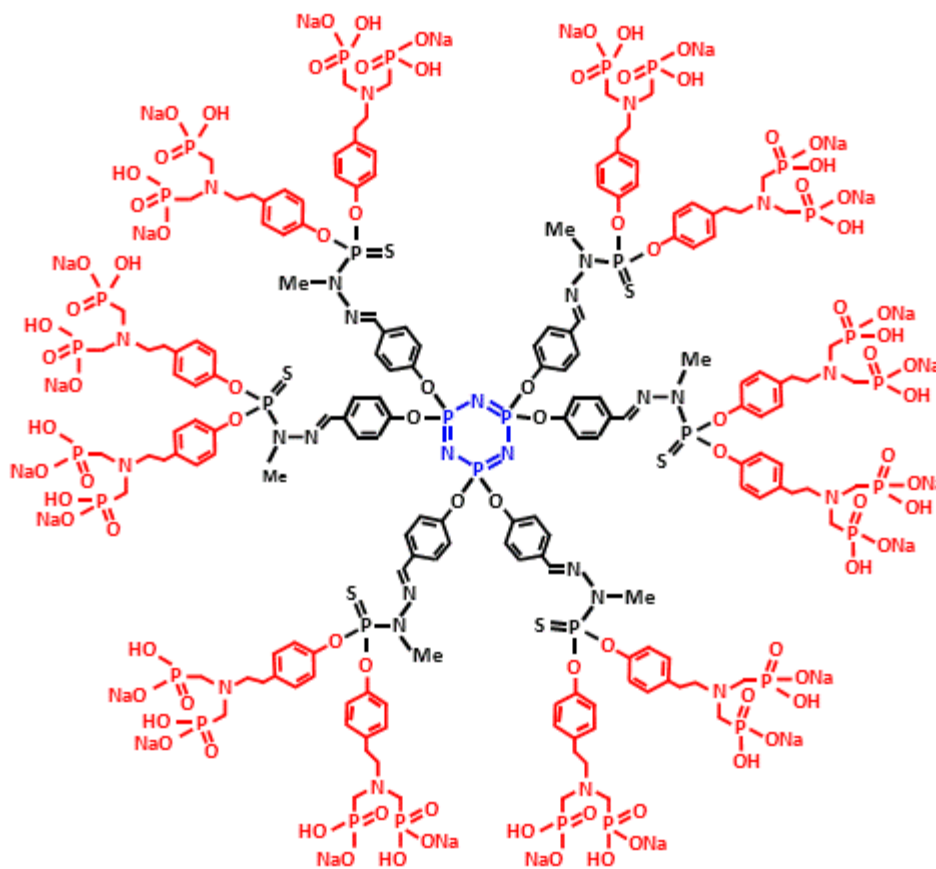


FIGURE 3. Structure of the phosphorus-containing dendrimer ABP used in Fruchon et al.[46]. In blue, the cyclo-triphosphazene (N_3P_3) core; in black, the phenoxy-methyl-hydrazone branches; in red, the tyramine-based ABP surface groups.

in acidic environment, which makes the prospected synthesis hazardous, the first dendrimers we tested bore azamono- or azabisphosphonate groups instead of the phosphate-intended groups[38,39,40]. Phosphonate-capped dendrimers have a poor effect on the activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes, but twists and turns of research led us to the discovery of the unprecedented immunomodulatory effects of dendrimer ABP on the human immune system[41,42]. Aside from its effect on human monocytes, we found that dendrimer ABP promotes the amplification of human NK cells in cultures of PBMCs[43]. One of the cellular events leading to the proliferation of NK cells is the specific inhibition of the proliferation of $CD4^+$ T lymphocytes by dendrimer ABP[44]. NK cells are cytotoxic effectors against virus-, bacteria-, or parasite-infected cells and against tumor cells. Therefore, NK cells are of particular interest for immunocellular therapies, especially for cancer treatments, provided their production in batches compliant with their use in human therapy from a quantitative (and qualitative) point of view. Dendrimer ABP is the first chemical compound proposed for the *ex vivo* production of NK cells starting with PBMCs from healthy donors or from cancer patients[45].

At the beginning of 2009, we published new results refining the activating properties of dendrimer ABP towards human monocytes[46]. We chose an overall, comprehensive approach comparing the transcriptional profiles of nonactivated and dendrimer-activated (*da*) human monocytes purified from three healthy donors. Monocytes had been activated for 6 h before preparing mRNA. We performed a high-standard statistical analysis of the results as genes were considered differentially regulated in *da* monocytes in comparison with nonactivated monocytes, if they had a fold change of ≥ 2.0 or ≤ 2.0 for at

least two donors of the three. With these settings, 78 genes were found overexpressed and 62 genes were found underexpressed by *da* monocytes. Twenty-five of the up-regulated genes and 17 of the down-regulated genes were relevant of an anti-inflammatory activation of monocytes (also called alternative activation), displaying features of IL-4, IL-10, or IL-13 activation. This alternative-like activation of human monocytes by dendrimer ABP was confirmed by quantitative real-time PCR of four gene products characterizing the classical inflammatory activation of monocytes (one proinflammatory chemokine [CCL5] and three proinflammatory cytokines [IL-1 β , IL-6, and IL-12]) and five gene products characterizing the alternative, anti-inflammatory activation of monocytes (the mannose receptor MRC1, IL-1RN, IL-10, CCL18, and CD23). The comparison of the level of gene transcripts in *da* monocytes and in nonactivated monocytes gave clear-cut results. The anti-inflammatory mRNA were significantly overexpressed in *da* monocytes, whereas the inflammatory RNA were either underexpressed or remained unmodified. Flow cytometry analyses at the protein level (i.e., the phenotype) of *da* monocytes, inflammatory monocytes, and anti-inflammatory monocytes showed that the expression of CD206 (mannose receptor MRC1) was strong in anti-inflammatory and *da* monocytes (contrary to inflammatory monocytes), whereas the expression of CD64 (Fc γ -RI) and CD13 (membranous aminopeptidase N) was decreased in anti-inflammatory and *da* monocytes in comparison with inflammatory monocytes.

The stimulatory properties of the three types of activated monocytes have been evaluated in MLRs. MLRs were assessed as the proliferation of CD4+ T lymphocytes triggered by the differently activated monocyte populations. These functional experiments also confirmed the close likeness of anti-inflammatory and *da* monocytes: both cells gave the weaker MLRs in comparison with inflammatory monocytes. What is more, the CD4+ T lymphocytes generated in the weak MLRs with anti-inflammatory and *da* monocytes are potent immunomodulatory cells as they produce IL-10.

Thus, dendrimer ABP has anti-inflammatory and immunomodulatory properties, either exerted directly towards monocytes or as the consequence of the activation of the latter on other immune cells. By some aspects, its *in vitro* properties match those of glucocorticoids, the most widely used immunosuppressive drugs[47]. Although the effect of dendrimer ABP remains to be challenged in *in vivo* models of inflammation, phosphorus-containing dendrimers may represent a new family of immunologically active drugs for the resolution of inflammatory disorders.

Anti-Inflammatory Properties of PAMAM Nanocarriers Alone

Later in 2009, the unprecedented anti-inflammatory activity of simple surface-functionalized PAMAM dendrimers was revealed[48]. The prior objective of this work was the pharmacokinetic study on the well-known PAMAM dendrimers conjugated with indomethacin, an NSAID. In this study, naked dendritic nanocarriers were probably intended to be negative controls of the properties of PAMAM–indomethacin complexes. Three different rat models of inflammation were screened: (1) the acute model of carrageenan-induced paw edema, (2) the subacute cotton pellet model, and (3) the chronic model of adjuvant-induced arthritis. The dendrimers tested are based mainly on a 1,2-diaminoethane-cored generation 4.0/4.5 PAMAM skeleton ended by –NH₂ (G4-NH₂), –OH (G4-OH), and –COOH (G4.5-CO₂H) groups (Fig. 4). The latter corresponds to the dendrimer that had been derived in glucosamine-conjugated dendrimers, as seen in Shaunak et al.[33].

In the acute carrageenan-induced paw edema model, a single dose of test formulations was injected into the intraperitoneal cavity, just before the injection of the carrageenan solution in a paw. Edema was monitored for 8 h by measuring the volume of the injected paw. A first experiment compared the effect of dendrimer G4-NH₂ alone (8 mg/kg), indomethacin alone (1.6 mg/kg), and a complex of dendrimer G4-NH₂ and indomethacin (8 and 1.6 mg/kg, respectively). At all time intervals, the mean percentage of inhibition of the paw swelling was higher with the G4-NH₂–indomethacin complex in comparison with indomethacin alone, and G4-NH₂ alone exhibited the lowest effect. Nevertheless, 1 h after the inflammation had been induced, G4-NH₂ inhibited the paw swelling by 30%. This rate can be increased at around 45% with a dose of 16 mg/kg of G4-NH₂. Then, on the same test, the effects of G4-NH₂, G4-OH,

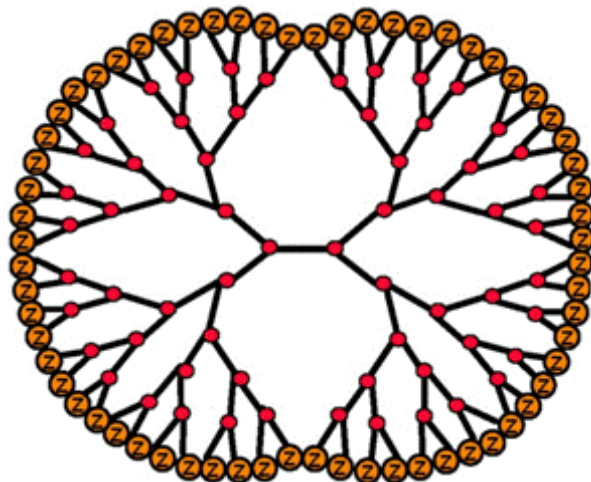


FIGURE 4. Schematic representation of 1,2-diaminoethane-cored generation 4.0 PAMAM dendrimers (if Z = $-\text{NH}_2$: G4- NH_2 , if Z = $-\text{OH}$: G4-OH). (Reprinted with permission from Chauhan et al. *Biomacromolecules* **10**, 1195–1202. Copyright 2009 American Chemical Society.)

and G4.5- CO_2H were compared. The effects of G4- NH_2 and G4-OH seemed to be more or less the same, and G4.5- CO_2H exhibited substantially less activity, but the figure is missing in the article.

In the subacute cotton pellet test, G4- NH_2 , indomethacin alone, and the G4- NH_2 -indomethacin complex were compared. Test formulations were injected intraperitoneally daily from day 1 to 7. At day 8, rats were euthanized, and pellets with granuloma tissue were dried and weighed. Contrary to the carrageenan-induced paw edema model, the G4- NH_2 -indomethacin complex and G4- NH_2 exhibited significantly higher mean percentage of inhibition of granuloma formation than indomethacin alone (47 and 50% vs. 22%).

With the third model, a preventive assay was performed insofar as daily intraperitoneal dosing of test formulations had been initiated at day -1 (prior to Freund's adjuvant injection) and until day +14. The progression of arthritis was assessed by measuring paw swelling at different days. In the early days, the inhibitory effect of G4- NH_2 -indomethacin was higher than the effect of G4- NH_2 and indomethacin alone, in respective rank. Later on, the effects of G4- NH_2 -indomethacin and G4- NH_2 were more or less the same and were significantly higher than that of indomethacin alone.

To gain deeper cellular and molecular insights into the effect and mechanism of the *in vivo* anti-inflammatory properties of these PAMAM dendrimers, authors investigated their effects on proinflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and cyclo-oxygenases (COX) *in vitro*. The effect of PAMAM dendrimers was evaluated via the production of NO by rat peritoneal macrophages triggered by LPS. In a concentration range between 0.005 and 1 nM, G4- NH_2 and G4-OH exhibited slightly greater inhibitory activity compared to G4.5- CO_2H , but without any dose effect.

COX enzymes, and especially the inducible COX-2, are activated in an inflammatory context. Therefore, COX-2 inhibition is an accurate target for the development of anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The authors ended their study with the screening of the effects of different dendrimers (generation, terminations) towards COX-2 *in vitro*. In a first series of experiments, dendrimers at the common generation level (i.e., G = 4.0) were tested at 0.174 w/v (more or less 10^{-4} M, depending on molecular weights). Amine- and hydroxyl-containing surface functions (G4- NH_2 , the supplementary aminoethylethanolamine-capped dendrimer [G4-AEEA], and G4-OH) displayed the highest inhibitory activity of COX-2, between 53.7 ± 8.4 and $34.9 \pm 4.9\%$, respectively. Other supplementary dendrimers ended by tris(hydroxymethyl)aminomethane (G4-Tris), N-(3-carbomethoxy) pyrrolidone (G4-Pyr), or

polyethylene glycol (G4-PEG) groups showed decreasing inhibitory effects. Carboxylate-capped dendrimers (G4-CO₂H and the supplementary succinamic acid-capped dendrimer [G4-SUC]) had no detectable effect on COX-2 inhibition. In a second series of tests, the effect of dendrimer generation was explored with AEEA-terminated dendrimers of generation 4.0, 5.0, and 6.0 at a concentration of 24.36 μM. Whereas G4-AEEA had no effect at this concentration on COX-2 inhibition, G5-AEEA and G6-AEEA dendrimers showed activity up to 42.5 ± 5.4% for the latter. This is the generation-dependent dendritic effect. However, no core effect had been noted in this study when comparing 1,2-diaminoethane- and 1,12-diaminododecane-cored dendrimers of the G5-AEEA and G6-AEEA series.

All in all, this article reports the various effects of different series of PAMAM dendrimers in *in vivo* and *in vitro* tests. Although it is difficult at this stage to delineate clear-cut structure-activity relationships — for instance, some dendrimers are active *in vivo*, but not *in vitro* — the inhibitory effect of some of these dendrimers on COX-2 is relevant in the current competition for the discovery of safe COX-2 inhibitors. This is of particular importance in fighting against cancers as prostaglandin E₂ (PGE₂), a final metabolite of the COX pathway, has strong immunosuppressive properties towards Vγ9Vδ2 T lymphocytes and NK cells, two major subsets of the immune system with antitumor cell cytotoxicity[49,50].

Anti-Inflammatory Properties of Polyethylene Oxide (PEO) Dendrimers

So far, we have reviewed the anti-inflammatory properties displayed by dendrimers, focused towards immune cells of the myeloid lineage such as MDMs and immature DCs[33], peripheral blood monocytes[46], and peritoneal macrophages[48]. Nevertheless, one crucial step of the inflammatory response is the recruitment of the inflammatory effectors, or their circulating precursors, from the blood to the site of inflammation. Therefore, another potent form of anti-inflammatory therapy is to target this leukocyte trafficking[51]. Extravasation of leukocytes through the endothelial barrier to the sites of inflammation is initiated by selectin-induced leukocyte tethering and rolling on the endothelial surface. Selectins are glycoproteins of the lectin family, expressed both by leukocytes (L-selectin or CD62L) and endothelial cells (E- and P-selectins or CD62E and CD62P). In return, leukocytes express CD162 (or P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1), a high-affinity ligand of E- and P-selectins, whereas endothelial cells express the ligands of L-selectin: CD34 (or sialomucin) and glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (Gly-CAM-1). These ligands are O-glycosylated proteins that present carbohydrate epitopes consisting of sulfated derivatives of the tetrasaccharide sialyl Lewis X motif. Generating sulfated glycoconjugate analogs of sialyl Lewis X as antagonist ligands for selectins is a promising track in order to develop anti-inflammatory drugs.

In this aim, Rele et al.[52] synthesized three- and four-arm PEO (or polyethylene glycol, PEG) “stars” and a second-generation PEO dendrimer built on a N₃P₃ core (Fig. 5). These molecules were ended by lactose groups on which hydroxyls can be naked, acetylated, or sulfated. Their anti-inflammatory properties were compared to that of heparin (a sulfated polysaccharide), which exhibits anti-inflammatory properties by blocking L- and P-selectins via sulfate-dependent interactions. An acute inflammatory response was induced in mice by thioglycollate injection into the peritoneal cavity. Five minutes later, mice received intravenous injection of heparin or “star” and dendrimer analogs at 0.5 mg/mouse (i.e., 20 mg/kg). The recruitment of neutrophils and macrophages was quantified 3 h later in the peritoneal cavity. Whereas the three- and four-arm sulfated PEO “stars” showed little activity, the sulfated PEO dendrimer dramatically reduced the recruitment of neutrophils (86%, the same rate as heparin) and macrophages (60%, less than the heparin control). Once more, the dendritic scaffold takes advantage of a multivalent ligand presentation to have a similar degree of bioactivity than the natural polymer. As the effect of the sulfated PEO dendrimer was presumed to be mediated by a selectin-dependent blockade, the authors confirmed this assessment by an inhibition test of the adhesion of U937 lymphoma cells to immobilized E-, L-, or P-selectins *in vitro*. Heparin and the sulfated PEO dendrimer were unable to inhibit cell adhesion to E-selectin. These data were expected as E-selectin is the only one that has no positively charged motifs

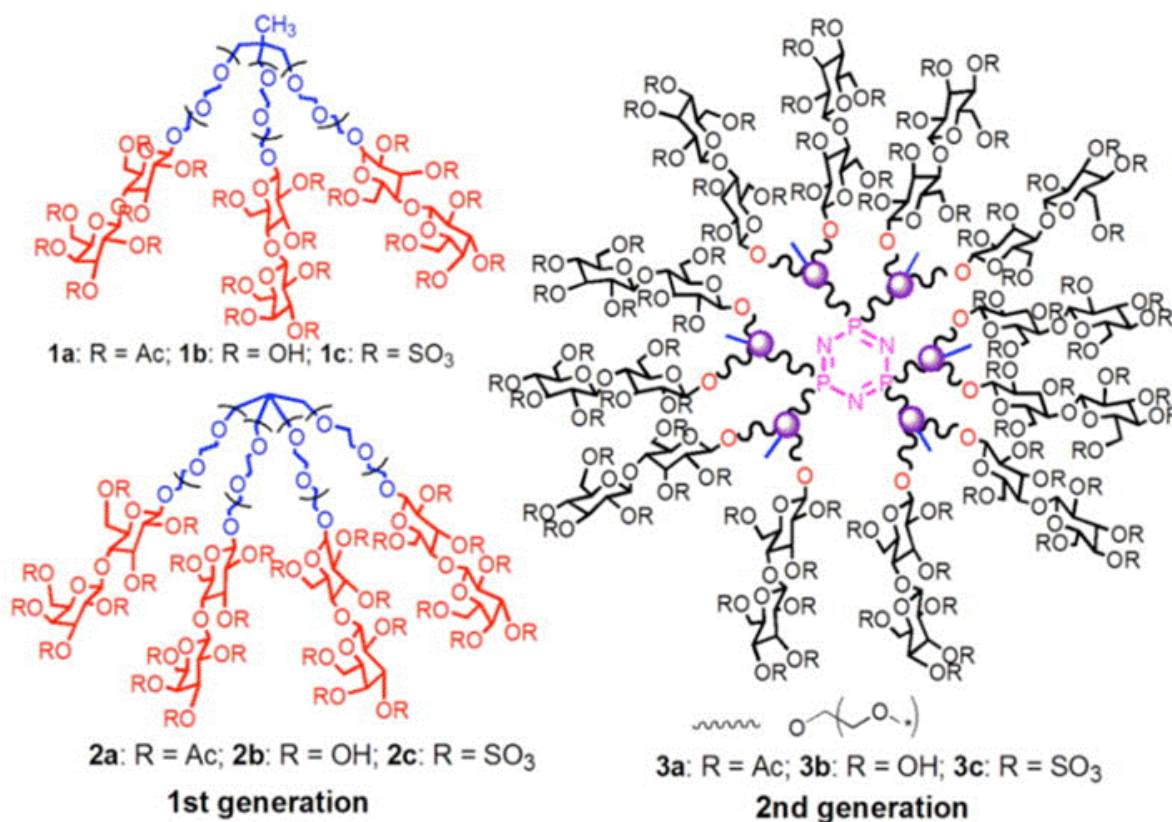


FIGURE 5. Structure of PEO glycosylated three-arm (1a, b, and c) and four-arm (2a, b, and c) “stars” and N₃P₃ core-based PEO glycodendrimers (3a, b, and c). (Reprinted with permission from Rele et al. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10132–10133. Copyright 2005 American Chemical Society.)

in its binding pocket. The dendrimer did not inhibit the adhesion to P-selectin either (contrary to heparin), but selectively blocked the adhesion to L-selectin in a dose-dependent manner with an IC₅₀ = 2.4 nM. No explanation is given regarding the different behavior of heparin and sulfated PEO dendrimer towards P-selectin. It is also surprising that a compound acting solely through L-selectin blockade is able to block *in vivo* leukocyte extravasation. Nevertheless, applicability of these data is encouraging insofar as the sulfated PEO dendrimer has no antithrombin activity, whereas the clinical use of heparin is limited due to its anticoagulant effects.

Following the same line, Dervede et al.[53] designed dendritic polyglycerol sulfates (dPGS) as heparin analogs (Fig. 6). To delineate structure-activity relationships, two structural features of dendrimers had been varied: the core size (MW between 2,500 and 6,000 Da) and the degree of sulfation (0 [for dPG] to 61 [for dPGS₆₁] sulfate groups per dendrimer), leading to the screening of six dendritic polyglycerol. In addition, a triglycerol sulfate was also included (MW = 650 Da).

In a first part of their work, the authors evaluated the binding properties of dPGS towards selectins using a surface plasmon resonance (SPR)-based binding assay. Selectin ligands were bound on a chip and E-, L-, or P-selectins functionalized gold particles. If dPGS bound to selectins, gold particles did not interact with the chip. As awaited, polyanionic dPGS did not inhibit the binding of E-selectin-coated particles. To block the interaction of L-selectin with its ligand, the most active dendrimer was dPGS₆₁ (MW = 12,300 Da) with an IC₅₀ = 8 nM. The small triglycerol sulfate had an IC₅₀ = 2 mM. More surprisingly, the unfractionated heparin linear polymer (carrying approximately 63 sulfate groups, MW around 15,000 Da) had an IC₅₀ = 12 μM in the same conditions. In this assay, the comparison of the values of IC₅₀ of the dendrimers indicates that both the number of sulfate groups and the core size are pivotal determinants of

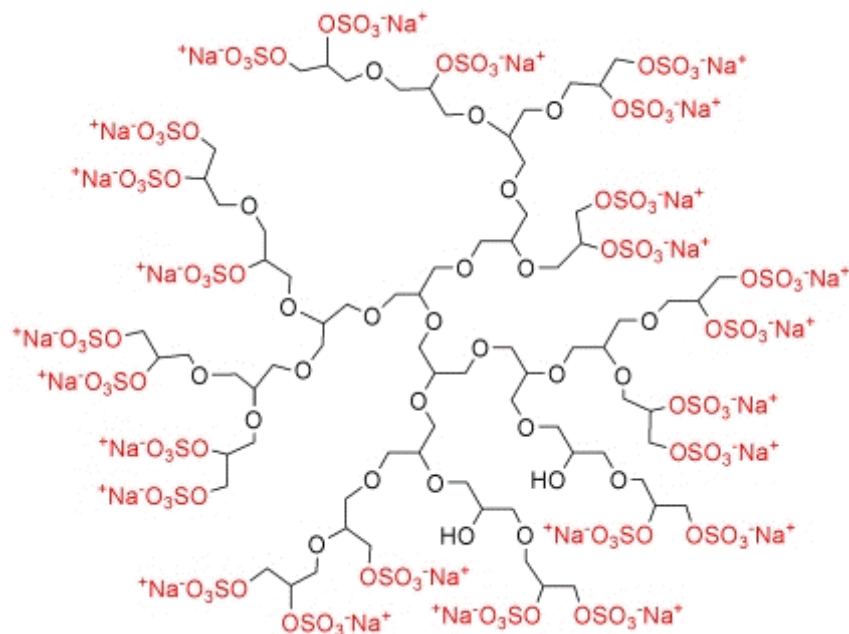


FIGURE 6. Representative structure of the PEO-sulfated dendrimers used in Dervede et al.[53]. (© PNAS, reproduced with permission.)

the bioactivity. The inhibitory property of dPGS₆₁ was confirmed in a realistic cell-to-cell binding assay between a leukocyte cell line expressing L-selectin and HUVECs activated to express L-selectin ligand. It is noteworthy that, contrary to the data afforded in Dervede et al.[53] with the second generation N₃P₃-based PEO dendrimer, dPGS have also an inhibitory activity towards P-selectin binding.

As dPGS target both L-selectin on leukocytes and P-selectin on endothelial cells, the active dPGS₆₁ should inhibit leukocyte extravasation to inflammatory sites. This has been proven *in vivo* in a mouse model of acute allergic contact dermatitis with typical symptoms: redness, ear swelling, edema, and cellular infiltration. To induce contact dermatitis, mice were sensitized at day 0 by a first application of trimellitic anhydride (TMA) and challenged at day 5 by a second application of TMA on ears. One hour prior to the challenge application, test compounds (dPGS₆₁ [at 3, 10, and 30 mg/kg], heparin, and prednisolone as a positive control [at 30 mg/kg]) were injected subcutaneously. Twenty-four hours later, ear swelling was evaluated and showed that both prednisolone and dPGS₆₁ clearly reduced the ear swelling in a dose-dependent manner for dPGS₆₁. The benefit of the tested compounds on the ear swelling can be assigned to the reduction of leukocyte extravasation to inflamed ear tissue as the enzymatic activity of neutrophil elastase was dramatically reduced in ear homogenates from mice treated with prednisolone or dPGS₆₁ (with a maximal effect already at the lowest dose of 3 mg/kg).

Finally, the anti-inflammatory effect of dPGS₆₁ also lies in the fact that it inhibits the generation of anaphylatoxin C5a (which causes enhanced vascular permeability) as shown in a mouse model of complement activation *in vivo*. SPR experiments showed that this inhibition is due to the binding of dPGS₆₁ on the C5 glycoprotein of the complement system, which is the precursor of C5a. This binding should occur through multivalent electrostatic interactions between the polyanionic dPGS₆₁ and positively charged protein motifs of C5, as hypothesized for the inhibition of L- and P-selectins.

CONCLUDING REMARKS

Among the potential applications of dendrimers in the nanomedicine landscape, the anti-inflammatory properties of dendrimers *per se* are the most recently discovered. This mini-review is based on the results presented in five main articles in which three families of dendrimers were evaluated: PAMAM-based dendrimers[33,48], phosphorus-based dendrimers of the Majoral-Caminade team[46], and PEO/PEG dendrimers[52,53]. In three out of five cases[46,52,53], the anti-inflammatory dendrimers are polyanionic nanodevices, and Dervede et al.[53] especially afford data indicating that both the size and the polyanionic features of PEO dendrimers are crucial for their bioactivity, which appears to be based on multivalent electrostatic interactions with immune molecular partners. In the phosphorus-based dendrimer family, we have also shown that the anionic density at the surface of the dendrimer is pivotal for bioactivity[40]. Nevertheless, we also published results showing that the anionic character of the phosphorus-containing surface group is not the only critical parameter and that its precise chemical structure can be tuned to get an improved bioactivity[34,38,43].

In the work by Shaunak et al.[33], the anti-inflammatory PAMAM dendrimer bears nine glucosamine monosaccharides (dendrimer DG), whereas the same dendrimer with nine 6-O-sulfated glucosamine residues (dendrimer DGS) has no anti-inflammatory effect, but rather antiangiogenic properties. Conversely, the highly sulfated PEO glycodendrimer synthesized by Rele et al. exhibits anti-inflammatory properties[52]. Therefore, one can hypothesize that the sulfate group density of DGS is not sufficient to display anti-inflammatory activity.

Intriguingly, the most active PAMAM dendrimers revealed in Chauhan et al.[48] are amino- (G4-NH₂, which should be positively charged in physiological conditions) or hydroxyl-terminated (G4-OH, G4-AEEA) nanostructures. The carboxy-terminated dendrimers G4-CO₂H and G4-SUC have much weaker anti-inflammatory effects.

Once anti-inflammatory properties of different dendrimers have been exemplified in various animal models of acute and chronic inflammatory disorders, and supported by complementary *in vitro* experiments, what is the future of these drug candidates? According to the “rule of 5” proposed originally in 1997[54], the potential for a chemical compound to rank among drug candidates requires no more than five H-bond donors, 10 H-bond acceptors, a molecular weight under 500 Da, and a calculated logP under 5 (it is a measure of the differential solubility of a compound between water and an immiscible solvent such as octanol). None of the anti-inflammatory dendrimers reviewed in this article fulfilled the first three “requirements”. For instance, the phosphorus-based dendrimer ABP comprises 90 oxygen and 27 nitrogen atoms (in addition with 33 phosphorus and six sulfur atoms); its molecular weight is 5820 Da. Nevertheless, a forerunner drug-candidate dendrimer has recently reached phase II clinical trials[31]. A breach has been made in the dogma that other dendrimers may use. The use of nanomaterials (including dendrimers) as drug carriers or medical imaging reagents should also benefit the development of dendrimers themselves as drugs. Indeed, the development of novel drug-delivery nanosystems such as dendrimers requires us to determine accurate regulatory issues regarding physicochemical characterization (PCC) and absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) studies[55]. Pharmacokinetic and toxicology aspects also play an important role in the design and clinical development of dendrimers as nanocarriers and imaging reagents; in this respect, much more data are available[56].

Another consideration that promises the advent of new therapeutics is the crucial need of innovative therapy for the treatment of chronic inflammatory diseases (CIDs). CIDs are medical conditions characterized by persistent inflammation due to an inappropriate, uncontrolled response of the immune system to either endogen (autoimmune) or exogen stimuli (environmental factors). People with CIDs tend to undergo a great deal of suffering and disabling disadvantages. CIDs include, among others, rheumatoid arthritis, psoriasis, inflammatory bowel diseases (such as ulcerative colitis and Crohn’s disease), atherosclerosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and neurodegenerative CIDs such as multiple sclerosis and Alzheimer’s disease. Given the pivotal role of proinflammatory (upstream in the inflammatory cascade) and inflammatory (downstream in the inflammatory cascade) cytokines in the

onset, the development, and the persistence of CIDs, tremendous efforts have been made to chart the cytokine network in each CID. This has led to the development of biological therapeutics: monoclonal antibodies (directed against these cytokines or their receptors) or soluble receptors neutralizing these cytokines to treat CID. Although these biotherapies have been highly effective, they also have strong drawbacks essentially regarding secondary risks (increase of infections and malignancies) and cost (between US\$10,000 and 15,000/patient/year for long-term treatments that only suspend the disease without curing it). When taking into account all these elements, they exacerbate the urgent problem raised in developed societies with regard to aging and health care costs, in particular in relation to Alzheimer's disease, whose prevalence is scheduled to strongly increase in the coming decades. This is one of the reasons why the *New York Times* is writing so much about Alzheimer's disease therapies[57].

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Amy Cross for English editing of the manuscript.

REFERENCES

1. Buhleier, E., Wehner, W., and Vögtle, F. (1978) Cascade-chain-like and nonskid-chain-like syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis* **2**, 155–158.
2. Vögtle, F. and Weber, E. (1974) Octopus molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **13**, 814–816.
3. Hyatt, J.A. (1978) Octopus molecules in the cyclotrimeratrylene series. *J. Org. Chem.* **43**, 1808–1811.
4. Suckling, C.J. (1982) Host guests binding by a simple detergent derivative-tentacle molecule. *J. Chem. Soc.* **12**, 661–662.
5. de Gennes, P.G. and Herve, H. (1983) Statistics of starburst polymers. *J. Phys. Lett.* **44**, 351–360.
6. Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., and Smith, P. (1985) A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polym. J.* **17**, 117–132.
7. Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., and Smith, P. (1986) Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* **19**, 2466–2468.
8. Tomalia, D.A., Naylor, A.M., and Goddard, W.A., III (1990) Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 138–175.
9. Vögtle, F., Richardt, G., and Werner, N. (2009) *Dendrimer Chemistry*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
10. Rodriguez-Roper, F., Zanuy, D., and Aleman, C. (2010) Electronic characterization of all-thiophene conducting dendrimers: molecules and assemblies. *Polymer* **51**, 308–315.
11. Astruc, D., Boisselier, E., and Ornelas, C. (2010) Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem. Rev.* **110**, 1857–1959.
12. Mammen, M., Choi, S.K., and Whitesides, G.M. (1998) Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 2754–2794.
13. Jiang, W., Kim, B.Y.S., Rutka, J.T., and Chan, W.C.W. (2008) Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 145–150.
14. Rolland, O., Turrin, C.O., Caminade, A.M., and Majoral, J.P. (2009) Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action. *New J. Chem.* **33**, 1809–1824.
15. Lee, C.C., MacKay, J.A., Fréchet, J.M.J., and Szoka, F.C. (2005) Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1517–1526.
16. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.K., and Zweck, A. (2006) The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1211–1217.
17. Menjoge, A.R., Rangaramanujam, M.K., and Tomalia, D.A. (2010) Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discov. Today* **15**, 171–185.
18. Almutairi, A., Rossin, R., Shokeen, M., Hagooley, A., Ananth, A., Capoccia, B., Guillaudeu, S., Abendschein, D., Anderson, C.J., Welch, M.J., and Fréchet, J.M.J. (2009) Biodegradable dendritic positron-emitting nanoprobes for noninvasive imaging of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 685–690.
19. Caminade, A.M., Turrin, C.O., and Majoral, J.P. (2008) Dendrimers and DNA: combinations of two special topologies for nanomaterials and biology. *Chemistry* **14**, 7422–7432.
20. Dufès, C., Uchegbu, I.F., and Schätzlein, A.G. (2005) Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2177–2202.

21. Naylor, A.M., Goddard, W.A., III, Kiefer, G.E., and Tomalia, D.A. (1989) Starburst dendrimers. 5. Molecular shape control. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 2339–2341.
22. Jansen, J.F.G.A., de Brabander-van den Berg, E.M.M., and Meijer, E.W. (1994) Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science* **266**, 1226–1229.
23. Gupta, U., Agashe, H.B., Asthana, A., and Jain, N.K. (2006) Dendrimers: novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. *Biomacromolecules* **7**, 649–658.
24. Chauhan, A.S., Sridevi, S., Chalasani, K.B., Jain, A.K., Jain, S.K., Jain, N.K., and Diwan, P.V. (2003) Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Release* **90**, 335–343.
25. Venuganti, V.V. and Perumal, O.P. (2009) Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: influence of charge, generation, and concentration. *J. Pharm. Sci.* **98**, 2345–2356.
26. Lin, Y., Fujimori, T., Kawaguchi, N., Tsujimoto, Y., Nishimi, M., Dong, Z., Katsumi, H., Sakane, T., and Yamamoto, A. (2011) Polyamidoamine dendrimers as novel potential absorption enhancers for improving the small intestinal absorption of poorly absorbable drugs in rats. *J. Control. Release* **149**, 21–28.
27. Dong, Z., Hamid, K.A., Gao, Y., Lin, Y., Sakane, T., and Yamamoto, A. (2011). Polyamidoamine dendrimers can improve the pulmonary absorption of insulin and calcitonin in rats. *J. Pharm. Sci.* **100**, 1866–1878.
28. Goldberg, D.S., Ghandehari, H., and Swaan, P.W. (2010) Cellular entry of G3.5 poly(amido amine) dendrimers by clathrin- and dynamin-dependent endocytosis promotes tight junctional opening in intestinal epithelia. *Pharm. Res.* **27**, 1547–1557.
29. Gupta, U., Dwivedi, S.K.D., Bid, H.K., Konwar, R., and Jain, N.K. (2010) Ligand anchored dendrimers based nanoconstructs for effective targeting to cancer cells. *Int. J. Pharm.* **393**, 185–196.
30. Gajbhiye, V., Palanirajan, V.K., Tekade, R.K., and Jain, N.K. (2009) Dendrimers as therapeutic agents: a systematic review. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 989–1003.
31. O’Loughlin, J., Millwood, I.Y., McDonald, H.M., Price, C.F., Kaldor, J.M., and Paull, J.R. (2010) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SPL7013 gel (VivaGel): a dose ranging, phase I study. *Sex. Transm. Dis.* **37**, 100–104.
32. Vannucci, L., Fiserova, A., Sadalapure, K., Lindhorst, T.K., Kuldova, M., Rossmann, P., Horvath, O., Kren, V., Krist, P., Bezouska, K., Luptovcova, M., Mosca, F., and Pospisil, M. (2003) Effects of N-acetyl-glucosamine-coated glycodendrimers as biological modulators in the B16F10 melanoma model in vivo. *Int. J. Oncol.* **23**, 285–296.
33. Shaunak, S., Thomas, S., Gianasi, E., Godwin, A., Jones, E., Teo, I., Mireskandari, K., Luthert, P., Duncan, R., Patterson, S., Khaw, P., and Brocchini, S. (2004) Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. *Nat. Biotechnol.* **22**, 977–984.
34. Poupot, M., Griffe, L., Marchand, P., Maraval, A., Rolland, O., Martinet, L., L’Faqihi-Olive, F.E., Turrin, C.O., Caminade, A.M., Fournié, J.J., Majoral, J.P., and Poupot, R. (2006) Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. *FASEB J.* **20**, 2339–2351.
35. Espinosa, E., Belmant, C., Sicard, H., Poupot, R., Bonneville, M., and Fournié, J.J. (2001) Y2K+1 state-of-the-art or non-peptide phosphoantigens, a novel category of immunostimulatory molecules. *Microbes Infect.* **3**, 645–654.
36. Martinet, L., Poupot, R., and Fournié, J.J. (2009) Pitfalls on the roadmap to $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapies. *Immunol. Lett.* **124**, 1–8.
37. Belmant, C., Espinosa, E., Halary, F., Tang, Y., Peyrat, M.A., Sicard, H., Kozikowski, A., Buelow, R., Poupot, R., Bonneville, M., and Fournié, J.J. (2000) A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human $\gamma\delta$ T cells. *FASEB J.* **14**, 1669–1670.
38. Marchand, P., Griffe, L., Poupot, M., Turrin, C.O., Bacquet, G., Fournié, J.J., Majoral, J.P., Poupot, R., and Caminade, A.M. (2009) Dendrimers ended by non-symmetrical azadiphosphonate groups: synthesis and immunological properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3963–3966.
39. Rolland, O., Turrin, C.O., Bacquet, G., Poupot, R., Poupot, M., Caminade, A.M., and Majoral, J.P. (2009) Efficient synthesis of phosphorus-containing dendrimers capped with isosteric functions of amino-bis(methylene) phosphonic acids. *Tetrahedron Lett.* **50**, 2078–2082.
40. Rolland, O., Griffe, L., Poupot, M., Maraval, A., Ouali, A., Coppel, Y., Fournié, J.J., Bacquet, G., Turrin, C.O., Caminade, A.M., Majoral, J.P., and Poupot, R. (2008) Tailored control and optimization of the number of phosphonic acid termini on phosphorus-containing dendrimers for the ex-vivo activation of human monocytes. *Chemistry* **14**, 4836–4850.
41. Caminade, A.M., Turrin, C.O., and Majoral, J.P. (2010) Biological applications of phosphorus dendrimers. *New J. Chem.* **34**, 1512–1524.
42. Turrin, C.O., Caminade, A.M., Majoral, J.P., Poupot, M., Fournié, J.J., and Poupot, R. (2010) Immuno-modulations induced by phosphored dendrimers. *Bull. Cancer* **97**, S60–S61.
43. Griffe, L., Poupot, M., Marchand, P., Maraval, A., Turrin, C.O., Rolland, O., Métivier, P., Bacquet, G., Fournié, J.J., Caminade, A.M., Poupot, R., and Majoral, J.P. (2007) Multiplication of human natural killer cells by nanosized phosphonate-capped dendrimers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 2523–2526.
44. Portevin, D., Poupot, M., Rolland, O., Turrin, C.O., Fournié, J.J., Majoral, J.P., Caminade, A.M., and Poupot, R. (2009) Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4⁺ T cell proliferation enhances ex-vivo expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy. *J. Transl. Med.* **7**, 82.

45. Poupot, M., Fruchon, S., Bourin, P., Cappellesso, S., Attal, M., Griffe, L., Turrin, C.O., Caminade, A.M., Majoral, J.P., Fournié, J.J., and Poupot, R. (2008) Immunotherapy in multiple myeloma: use of NK amplified cells with a phosphorus dendrimer. *Bull. Cancer* **95**, S54–S55.
46. Fruchon, S., Poupot, M., Martinet, L., Turrin, C.O., Majoral, J.P., Fournié, J.J., Caminade, A.M., and Poupot, R. (2009) Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bio-active dendrimer. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 553–562.
47. Ehrchen, J., Steinmüller, L., Barczyk, K., Tenbrock, K., Nacken, W., Eisenacher, M., Nordhues, U., Sorg, C., Sunderkötter, C., and Roth, J. (2007) Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood* **109**, 1265–1274.
48. Chauhan, A.S., Diwan, P.V., Jain, N.K., and Tomalia, D.A. (2009) Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules* **10**, 1195–1202.
49. Martinet, L., Fleury-Cappellesso, S., Gadelorge, M., Dietrich, G., Bourin, P., Fournié, J.J., and Poupot, R. (2009) A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 752–762.
50. Martinet, L., Jean, C., Dietrich, G., Fournié, J.J., and Poupot, R. (2010) PGE₂ inhibits natural killer and $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA Type I-dependent signaling. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 838–845.
51. Ulbrich, H., Eriksson, E., and Lindbom, L. (2003) Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 640–647.
52. Rele, S.M., Cui, W., Wang, L., Hou, S., Barr-Zarse, G., Tatton, D., Gnanou, Y., Esko, J.D., and Chaikof, E.L. (2005) Dendrimer-like PEO glycopolymers exhibit anti-inflammatory properties. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10132–10133.
53. Dervedde, J., Rausch, A., Weinhart, M., Enders, S., Tauber, R., Licha, K., Schirmer, M., Zügel, U., von Bonin, A., and Haag, R. (2010) Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19679–19684.
54. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3–25.
55. Zolnik, B.S. and Sadrieh, N. (2009) Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 422–427.
56. Wijagkanalan, W., Kawakami, S., and Hashida, M. (2010) Designing dendrimers for drug delivery and imaging: pharmacokinetic considerations. *Pharm. Res.* **28**, 1500–1519.
57. Bartfai, T. (2010) Why is the *New York Times* writing so much about Alzheimer's disease therapies? *TheScientificWorldJOURNAL* **10**, 1886–1889.

This article should be cited as follows:

Hayder, M., Fruchon, S., Fournié, J.-J., Poupot, M., and Poupot, R. (2011) Anti-inflammatory properties of dendrimers *per se*. *TheScientificWorldJOURNAL* **11**, 1367–1382. DOI 10.1100/tsw.2011.129.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les dendrimères sont des molécules de synthèse de taille et de structure parfaitement définies qui trouvent leurs applications dans plusieurs domaines, notamment biomédical : agents de transfection, délivrance d'agents thérapeutiques, imagerie médicale, réparation tissulaire, etc. Ces différentes applications des dendrimères ont contribué au développement d'une nouvelle science : la nanomédecine. Parmi les différentes nanostructures, les dendrimères phosphorés ont montré des propriétés inédites d'activation du système immunitaire. En particulier, le dendrimère de première génération à cœur cyclotriphosphazène et à surface acide aza-bis-phosphonique, appelé ABP, permet de cibler les monocytes de façon sélective, parmi les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Il s'ensuit une internalisation du dendrimère et une activation des monocytes, en quelques jours, vers une voie anti-inflammatoire.

Dans ce travail, nous avons voulu exploiter le potentiel thérapeutique de ce dendrimère dans le traitement d'une maladie inflammatoire impliquant fortement la lignée myéloïde, comme la **Polyarthrite Rhumatoïde** (PR). La PR est une maladie inflammatoire auto-immune caractérisée par une destruction du cartilage articulaire et une résorption de l'os sous-chondral dues à une forte activité des ostéoclastes. Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique qui décalcifient et dégradent la matrice osseuse. Ce sont des cellules géantes multinucléées résultant de la fusion des précurseurs monocytes-macrophages. *In vitro*, les monocytes-macrophages se différencient en ostéoclastes sous l'effet de deux cytokines : **M-CSF** (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et **RANKL** (Receptor of Activator NF- κ B Ligand).

M-CSF a été identifié comme un facteur essentiel de l'ostéoclastogénèse. Il transmet son signal via un récepteur spécifique : le c-Fms, membre de la famille des récepteurs aux tyrosines kinases. M-CSF est un facteur clé de la prolifération et de la survie des cellules précurseurs des ostéoclastes notamment par l'activation des voies Erk et Akt. La liaison de M-CSF à son récepteur induit l'expression du récepteur RANK dans ces cellules pour les rendre aptes à répondre efficacement à RANKL. RANKL est le facteur indispensable de la différenciation des précurseurs monocytes-macrophages en ostéoclastes. Il s'agit d'une protéine membranaire de type II appartenant à la famille du TNF et contenant un domaine C-terminal par lequel elle se lie à son récepteur RANK. La sécrétion de RANKL, notamment par les ostéoblastes, est régulée par l'**Interleukine-1** (IL-1), en particulier l'IL-1 β . L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages, les monocytes et les DCs. Elle augmente l'expression de facteurs d'adhésion sur les cellules endothéliales, afin de faciliter la transmigration des leucocytes aux sites de l'infection et joue ainsi un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire. Chez les patients atteints de PR, le taux d'IL-1 est augmenté. Cette cytokine est impliquée à la fois dans l'entretien de l'inflammation et dans la destruction articulaire. En effet, elle stimule l'expression des MMPs matricielles et des aggrecanases, responsables des destructions cartilagineuses et altère le processus de réparation articulaire en

inhibant la synthèse du collagène et des protéoglycanes qui composent le cartilage. De plus, elle augmente la résorption osseuse en activant la différenciation et la survie des ostéoclastes. En plus de l'IL-1, d'autres cytokines comme le **TNF- α** , l'**IL-6** et l'**IL-17** sont essentielles pour le développement de la PR et sont désormais considérés comme cibles thérapeutiques pour la prévention et le traitement de cette pathologie. Durant les dernières décennies, plusieurs approches thérapeutiques, appelées biothérapies, ont été développées. Ces biothérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de récepteurs solubles, permettent de neutraliser les cytokines impliquées dans l'initiation de la maladie, d'inactiver des cellules immunitaires comme les LT et les LB ou de prévenir la résorption osseuse. Bien que ces biothérapies aient montré une efficacité clinique spectaculaire, elles restent toutefois très onéreuses et présentent de nombreuses contre-indications (antécédents de cancer, grossesse, maladies cardio-vasculaires, etc). De plus, une proportion importante de patients ne répond pas à ces biothérapies. Ainsi, des molécules innovantes, comme les dendrimères, obtenues par synthèse chimique donc à moindre coût et ayant à la fois un effet anti-ostéoclastique et un effet anti-inflammatoire représentent une alternative de choix pour le traitement de la PR. Elles nous permettraient d'élaborer une nouvelle approche thérapeutique, ciblant de manière efficace un des aspects les plus invalidants de la maladie, à savoir la destruction du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral. Le premier volet de ce travail est une étude *in vivo* dans laquelle nous avons mis en évidence les effets anti-inflammatoire et anti-arthritique du dendrimère ABP. Pour cela, nous avons choisi le modèle murin d'arthrite spontanée *IL-1ra*^{-/-}. L'antagoniste au récepteur de l'IL-1, l'IL-1Ra, inhibiteur endogène de l'IL-1, se lie au même récepteur membranaire que l'IL-1, et empêche celle-ci d'envoyer son signal à la cellule. *In vivo*, la délétion du gène codant l'IL-1Ra conduit au développement spontané et rapide d'une arthropathie inflammatoire ressemblant étroitement dans ses caractéristiques histologiques et immunologiques à la PR. De plus, les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-17 sont déterminantes dans la physiopathologie de ce modèle, tout comme dans la PR. Pour valider les observations faites sur **le modèle *IL-1ra*^{-/-}**, nous avons choisi d'utiliser **le modèle d'arthrite induite au sérum K/BxN** chez des souris naïves BALB/c. Ce sérum contient des auto-anticorps anti-Glucose-6-Phosphate isomérase qui permettent l'induction rapide d'une réponse inflammatoire aiguë. Le deuxième volet de ce travail est une étude *in vitro* dans laquelle nous avons caractérisé les réponses cellulaires et moléculaires au dendrimère ABP à la fois sur les monocytes des souris *IL-1ra*^{-/-} mais aussi sur les monocytes humains du sang périphérique.

Les conséquences de cette étude pour la pathologie humaine sont très importantes. La similitude entre la pathologie développée chez les souris *IL-1ra*^{-/-}, bien que non totale avec la pathologie humaine laisse penser que les résultats obtenus pourraient être applicables à la PR humaine.

RESULTATS



Science
**Translational
Medicine**

Online issue 4 May 2011

AUTOIMMUNE DISEASE

A Phosphorus-Based Dendrimer Targets Inflammation and Osteoclastogenesis in Experimental Arthritis

Myriam Hayder,^{1,2,3} Mary Poupot,^{3,4} Michel Baron,^{1,2,3} Delphine Nigon,⁵ Cédric-Olivier Turrin,⁶ Anne-Marie Caminade,⁶ Jean-Pierre Majoral,⁶ Robert A. Eisenberg,⁷ Jean-Jacques Fournié,^{3,4} Alain Cantagrel,^{1,2,3,5} Rémy Poupot,^{1,2,3*} Jean-Luc Davignon^{1,2,3,5*}

Dendrimers are highly branched “tree-like” polymers that have demonstrated therapeutic potential in drug delivery, medical imaging, and tissue engineering in recent years. In addition, we have shown that an azabisphosphonate (ABP)-capped dendrimer selectively targets monocytes and directs them toward anti-inflammatory activation. We explored this property to assess the therapeutic potential of dendrimer ABP in the treatment of an inflammatory disease, rheumatoid arthritis. Intravenous injections of dendrimer ABP inhibited the development of inflammatory arthritis in two animal models: IL-1ra^{-/-} mice and mice undergoing K/BxN serum transfer. Suppression of disease was characterized by normal synovial membranes, reduced levels of inflammatory cytokines, and the absence of cartilage destruction and bone erosion. Dendrimer ABP also exhibited anti-osteoclastic activity on mouse and human cells, mediated by c-FMS (cellular-feline McDonough strain sarcoma virus oncogene homolog) inhibition. These preclinical demonstrations suggest the potential use of dendrimer ABP as a nanotherapeutic for rheumatoid arthritis.

INTRODUCTION

Dendrimers are a class of highly branched “tree-like” polymers, characterized by their precisely defined structures and molecular weights. Dendrimer multivalency enables polyvalent interactions with cellular and molecular targets; thus, they have been explored for their potential use in drug delivery (1), biological imaging (2), tissue engineering (3), and nanomedicine (4, 5). We reported recently that a phosphorus-containing dendrimer bearing an N₃P₃ (cyclotriphosphazene) core and PMMH (phenoxyethyl-methylhydrazone) branches, capped with azabisphosphonate (ABP) end groups, selectively targets monocytes when cultured with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro (6). This led to the internalization of the dendrimer, followed by a commitment of human monocytes toward anti-inflammatory activation (7). This dendrimer also activates the amplification of human natural killer (NK) cells (8) by inhibiting the interleukin-2 (IL-2)-dependent proliferation of CD4⁺ T lymphocytes (9). Other dendrimers have exhibited in vivo anti-inflammatory activities. Dendrimers with a polyamidoamine (PAMAM) skeleton have anti-inflammatory properties, as evidenced by inhibition of inflammatory cytokine secretion by human macrophages and dendritic cells (DCs) (3) and inhibition of acute and chronic inflammatory disorders induced in rat models (10). Poly(ethylene oxide) (PEO) dendrimers [also called poly(ethylene glycol) (PEG) dendrimers] have demonstrated anti-inflammatory properties by inhibiting the extravasation of inflammatory leukocytes through the endothelial barrier to inflammatory sites (11, 12).

On the basis of our previous findings, we have assessed the therapeutic potential of dendrimer ABP for the treatment of chronic inflamma-

tory diseases, such as rheumatoid arthritis (RA). RA is an autoimmune inflammatory disorder that affects ~1% of the population in developed countries. It is characterized by inflammation of the synovial membrane, cartilage degradation, and subsequent bone erosion by osteoclasts, which leads to joint deformation and handicap (13). In RA, a hierarchical network of cytokines controls the immunological processes that promote autoimmunity, chronic inflammation, and tissue destruction in the rheumatoid joint (14). Among these cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1, and IL-6 have been shown to be prominent therapeutic targets owing to their involvement in inflammation and bone erosion (15). Two other cytokines, namely, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor activator for nuclear factor κ B (RANK) ligand (RANKL), are also of therapeutic interest and have been considered as drug target candidates because they promote the differentiation of monocytes into osteoclasts. In particular, M-CSF and its receptor c-FMS (cellular-feline McDonough strain sarcoma virus oncogene homolog) are promising therapeutic target candidates owing to their involvement in both inflammation and osteoclastogenesis (16, 17). On the basis of these paradigms, biologic therapeutic approaches have been developed by using primarily monoclonal antibodies and soluble receptors that neutralize the effects of these cytokines (18, 19). Other major players in the immune system that are dysfunctional in RA, including B and T cells, can be targeted with anti-CD20 (20) and anti-CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) (21), respectively. Although these biological drugs have proven to be efficient in RA, they are costly, act on a single target, present several contraindications (for example, previous cancer and heart failure), and induce higher risks of infection (18, 22, 23). Moreover, these drugs only inhibit or delay the deleterious aspects of RA, and some patients are unresponsive to these biotherapies (24, 25). There is an unmet clinical need for innovative molecules that target simultaneously proinflammatory cytokines and osteoclast differentiation. Such molecules might prove to be curative therapeutics for RA (17, 26, 27).

Using the IL-1ra^{-/-} and K/BxN serum transfer mouse models of autoimmune arthritis, which are some of the most relevant to human

¹INSERM, U1043, Toulouse F-31300, France. ²CNRS, U5282, Toulouse F-31300, France.

³Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse F-31300, France.

⁴Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, UMR1037, Toulouse F-31024, France.

⁵Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Hôpital Purpan, Centre de Rhumatologie, Toulouse F-31300, France.

⁶CNRS, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 route de Narbonne, Toulouse F-31077, France.

⁷Division of Rheumatology, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: jean-luc.davignon@inserm.fr (J.-L.D.); remy.poupot@inserm.fr (R.P.)

RA (28, 29), we show that dendrimer ABP targets monocytes, leading to a decrease in the production of proinflammatory cytokines, an increase in the production of anti-inflammatory cytokines, and inhibition of osteoclast differentiation. Comparable biological activity was also demonstrated *ex vivo* in human synovial tissue. Dendrimer ABP might therefore represent a new drug candidate for combating the inflammatory and bone-eroding characteristics of RA.

RESULTS

Antiarthritic properties of dendrimer ABP *in vivo*

Dendrimer ABP (Fig. 1A) was initially compared to two other dendrimer-based systems, dendrimer azamonophosphonate (AMP) and dendrimer polypropyleneimine (PPI), for antiarthritic activity in mice. Dendrimer AMP (Fig. 1B) is a phosphorus-based dendrimer that is similar in structure and composition to dendrimer ABP, whereas dendrimer PPI (Fig.

1C) is a second-generation diaminobutane-core dendrimer that has the same ABP surface moieties as dendrimer ABP (Supplementary Material).

IL-1 α ^{-/-} mice develop spontaneous arthritis beginning at 4 weeks of age. By 10 weeks, 100% of mice show full-blown disease, with marked paw swelling. We assessed the effect of dendrimers ABP, AMP, and PPI in this model of arthritis via weekly intravenous injections (10 mg/kg) starting at 8 weeks of age. The evolution of inflammation and arthritis was followed by measuring the hind paw swelling and by clinical arthritic score. The arthritic score per animal was the sum of the scores attributed to the four paws (28). Only dendrimer ABP showed a significant decrease in paw swelling and in arthritic score at the age of 15 weeks (Fig. 1D).

We next established the effect of dendrimer ABP at doses ranging from 0.001 to 10 mg/kg. Dendrimer ABP completely inhibited inflammation and arthritis at doses of 1 and 10 mg/kg (Fig. 2A). The 0.1-mg/kg dose of dendrimer ABP delayed the evolution of the disease

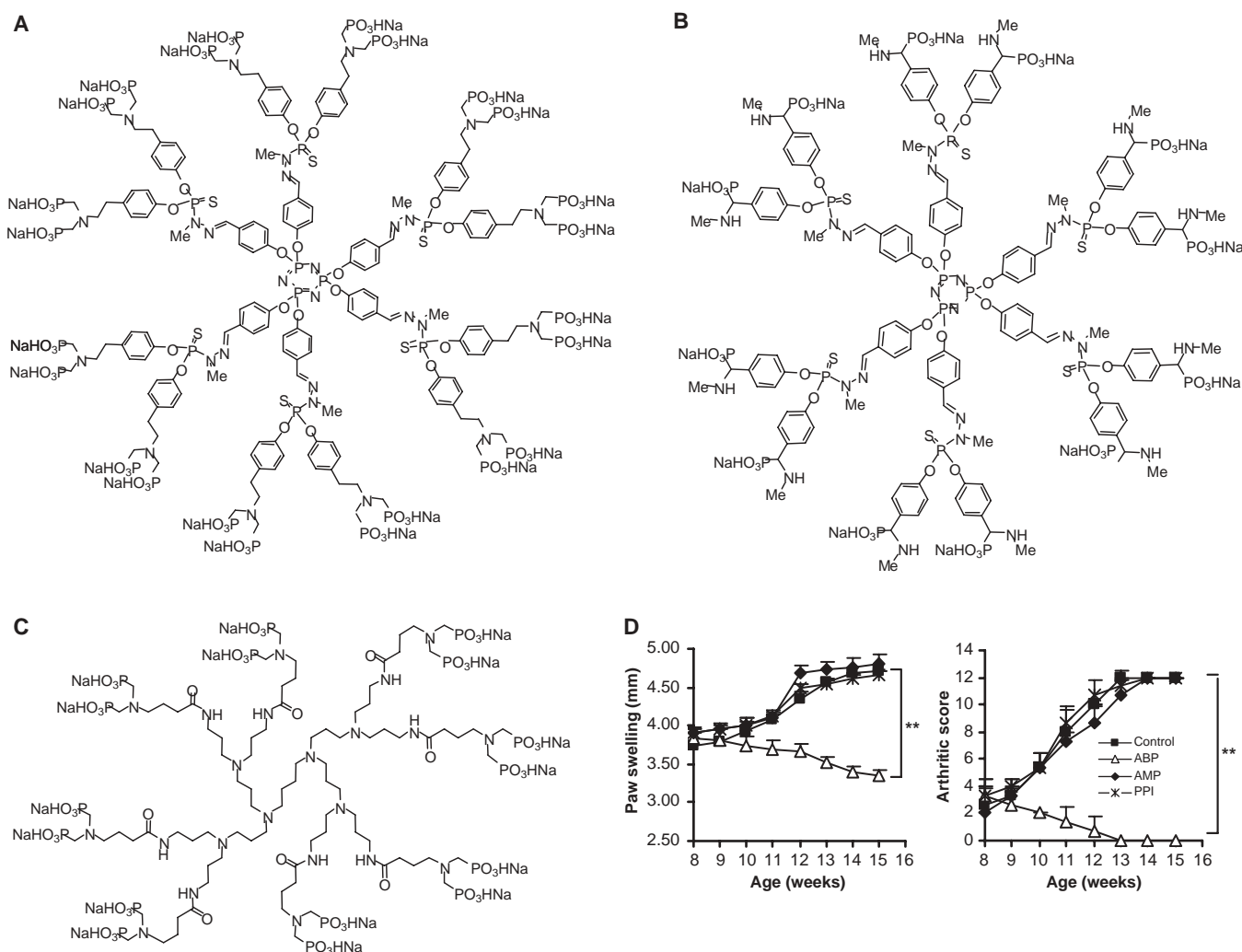


Fig. 1. Structure of dendrimers used in this study. (A) Dendrimer azabisphosphonate (ABP). (B) Dendrimer azamonophosphonate (AMP). (C) Dendrimer polypropyleneimine (PPI). (D) Comparison of the effect of dendrimer ABP, AMP, or PPI (10 mg/kg) on the devel-

opment of arthritis in IL-1 α ^{-/-} mice ($n = 3$ per dendrimer treatment group). Control: untreated IL-1 α ^{-/-} mice ($n = 3$). Curves represent means \pm SD. ** $P < 0.01$ versus control (as calculated with Student's t test).

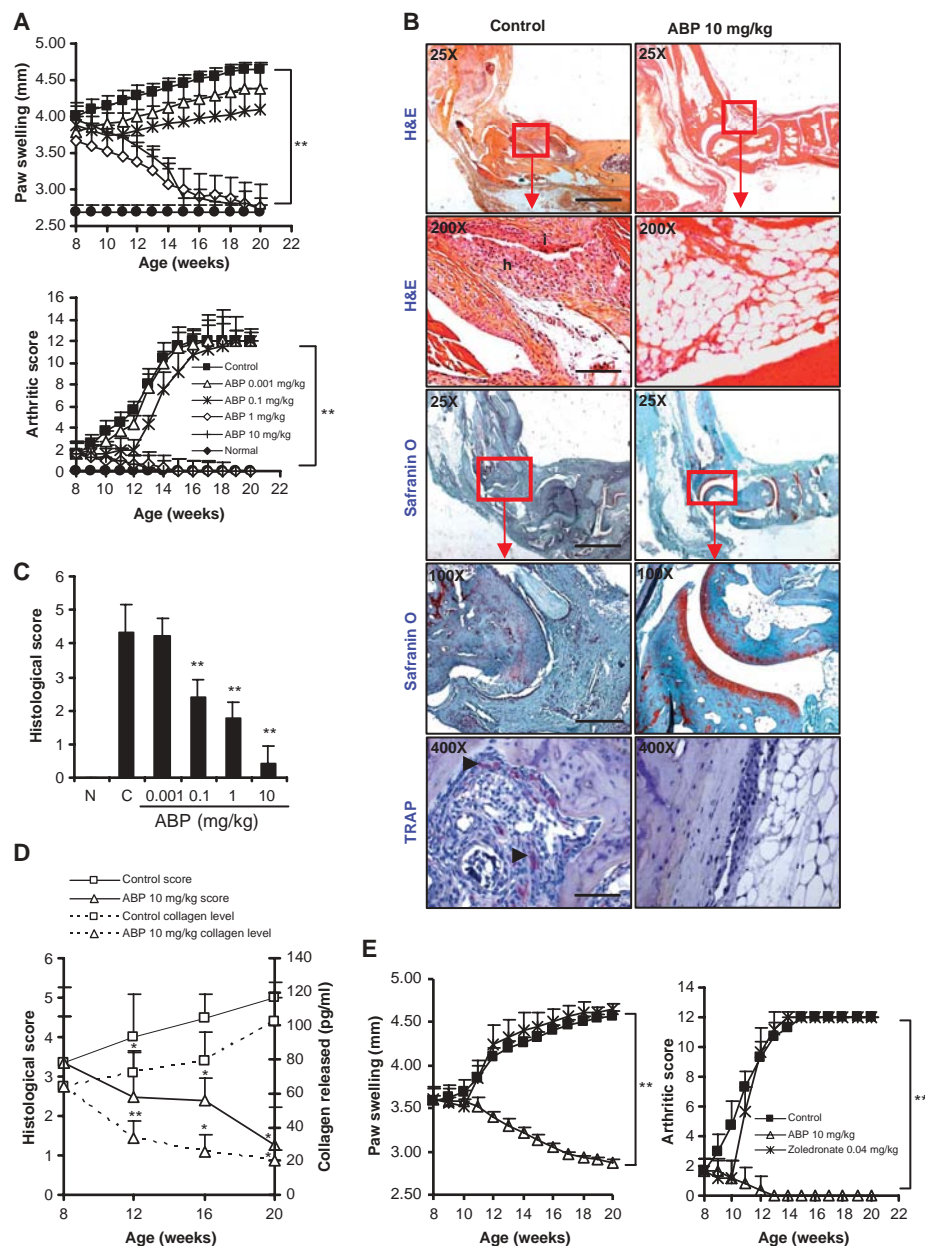


Fig. 2. Dendrimer ABP inhibits the development of arthritis in IL-1ra^{-/-} mice. **(A)** Dose effect of dendrimer ABP on the arthritis (paw swelling and arthritis score) of IL-1ra^{-/-} mice (*n* = 6 per group). Control: untreated IL-1ra^{-/-} mice. Normal: untreated nonarthritic BALB/cA mice. **(B)** Histopathology of hind paws of IL-1ra^{-/-} mice after 12 weeks of treatment: H&E (scale bar for 25x: 120 μm; scale bar for 200x: 14 μm), Safranin O (scale bar for 25x: 120 μm; scale bar for 100x: 30 μm), and TRAP staining (scale bar for 400x: 7 μm). Tissue sections were from joints of untreated (left) or dendrimer ABP-treated (10 mg/kg) (right) IL-1ra^{-/-} mice and were considered representative of six mice. **h**, synovial hyperplasia; **i**, cell infiltration. **(C)** Histological scores of synovial hyperplasia and cell infiltration, where 5 indicates a severe synovitis with pannus formation and erosions of articular cartilage and subchondral bone, and 0 indicates a normal knee joint (*n* = 6 per group). Control (C): untreated IL-1ra^{-/-} mice. Normal (N): untreated nonarthritic BALB/cA mice. **(D)** Collagen telopeptides in the serum of untreated or dendrimer ABP-treated IL-1ra^{-/-} mice (right axis; dotted lines) as compared with the evolution of histological scores (left axis; solid lines) (*n* = 6 per group). **(E)** Comparison of the effect of dendrimer ABP (10 mg/kg) and zoledronate (0.04 mg/kg) on inflammation (paw swelling) and arthritis (arthritic score) in IL-1ra^{-/-} mice (*n* = 6 per treatment group). Control: untreated IL-1ra^{-/-} mice. Data represent mean ± SD. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 versus control [as calculated with Student's *t* test for (A) and (E) and Mann-Whitney test for (C) and (D)].

by 4 weeks on the basis of the arthritic score, but lower doses showed no effect on the evolution of arthritis. After 12 weeks of weekly intravenous injection with dendrimer ABP, mice were killed for histopathology of the ankle joints. Hematoxylin-eosin (H&E) staining showed hyperplasia (enlargement of the synovial membrane) and inflammation of the synovial membrane, with neutrophil, lymphocyte, and macrophage infiltration in untreated IL-1ra^{-/-} mice; conversely, mice treated with dendrimer ABP (10 mg/kg) displayed near-normal synovial membranes (Fig. 2B). In untreated control IL-1ra^{-/-} mice, the cartilage was completely eroded, as revealed by Safranin O staining (Fig. 2B), indicating that the joint was seriously damaged. In mice treated with dendrimer ABP (10 mg/kg), the cartilage was preserved and the joint appeared normal.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining showed the presence of osteoclasts (purple areas) in the eroded bone matrix of untreated IL-1ra^{-/-} mice. No osteoclasts were present in the bone matrix of mice treated with dendrimer ABP (Fig. 2B). Finally, sections of joints from IL-1ra^{-/-} mice treated with dendrimer ABP did not show cells expressing IL-17 (fig. S1), which is a prominent cytokine of arthritis pathogenesis (30, 31). Histological scoring of H&E sections (on a scale of 0 to 5) showed a significant effect of dendrimer ABP (50% reduction at 0.1 mg/kg and 80% reduction at 10 mg/kg) (Fig. 2C). Bone degradation, as evidenced by the presence of collagen telopeptides in sera of both untreated and dendrimer ABP-treated IL-1ra^{-/-} mice, correlated with the evolution of histological score over time (Fig. 2D). Finally, we examined the histology of the aorta, liver, spleen, kidneys, and lungs from IL-1ra^{-/-} mice treated with dendrimer ABP at the highest dose (10 mg/kg) for 12 weeks. These sections were compared with those of normal mice (untreated nonarthritic BALB/cA mice), and it was determined that the dendrimer did not result in any off-target effects (fig. S2).

Dendrimer ABP is a nanomolecular construct displaying aminobisphosphonates at its surface. We therefore challenged the dendrimer's effect in IL-1ra^{-/-} mice with a therapeutic nitrogenous bisphosphonate (zoledronate). Zoledronate at 0.04 mg/kg had no positive effect on inflammation and arthritis of diseased mice (Fig. 2E). The dose of 0.4 mg/kg, used to treat osteoporosis

in humans (32), was lethal for IL-1ra^{-/-} mice. Furthermore, zoledronate had no effect on the in vitro osteoclastic differentiation of human peripheral blood monocytes and was cytotoxic at 10 μM, whereas dendrimer ABP remained nontoxic at 100 μM (fig. S3).

Dendrimer ABP increases amounts of anti-inflammatory cytokines

We quantified the amounts of proinflammatory cytokines in the sera of both control (untreated) and dendrimer ABP-treated IL-1ra^{-/-} mice, starting at the age of 8 weeks. Injections of dendrimer ABP decreased serum concentrations of IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-17 in a dose-dependent manner (Fig. 3A). IL-1ra^{-/-} mice treated with dendrimer ABP at 1 and 10 mg/kg regained the same concentrations of proinflammatory cytokines as nonarthritic BALB/cA (normal) mice after ~10 weeks of treatment (Fig. 3A). Treatment with dendrimer ABP at 10 mg/kg over the course of 12 weeks led to decreased amounts of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) and MMP-9 [enzymes responsible for cartilage degradation (33) in the sera of IL-1ra^{-/-} mice, by 84 and 77%, respectively] (Fig. 3B).

After 12 weeks of treatment with dendrimer ABP, we cultured spleen immune cells (splenocytes) from IL-1ra^{-/-} mice ex vivo in the presence of an anti-CD3ε monoclonal antibody, which targets T lymphocytes and triggers a cascade of activation of various cells, including monocytes and B cells. Compared with untreated, age-matched IL-1ra^{-/-} mice, the secretion of proinflammatory T helper 1 (T_H1) cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-17, IL-2, and interferon-γ (IFN-γ) by splenocytes from diseased IL-1ra^{-/-} mice was significantly decreased (*P* < 0.01) by dendrimer ABP in a dose-dependent manner, reaching the amounts seen in nonarthritic BALB/cA mice (Fig. 4); conversely, splenocyte secretion of anti-inflammatory T_H2 cytokines IL-4 and IL-10 was

increased, suggesting that dendrimer ABP skews lymphocytes to an anti-inflammatory T_H2 response in a dose-dependent manner (Fig. 4).

Together, these data suggest that dendrimer ABP has antiarthritic and anti-inflammatory effects on spontaneous arthritis developed in IL-1ra^{-/-} mice. Moreover, dendrimer ABP did not induce any apparent toxicity (fig. S2) and mice appeared in good health throughout the duration of the treatment, as witnessed by the body weight follow-up (fig. S4).

K/BxN serum transfer mouse model

We further tested the effect of dendrimer ABP in another widely used mouse model: the K/BxN serum transfer model. To develop this animal model, we transferred serum from autoimmune K/BxN mice into wild-type BALB/cA mice. This model relies on the presence of antibodies specific for autoantigen glucose-6-phosphate isomerase (GPI), which develop in autoimmune K/BxN mice (34); thus, inflammation and arthritis are more rapidly induced and transient when compared to spontaneous chronic arthritis in IL-1ra^{-/-} mice. We tested the effect of dendrimer ABP at high concentration (10 mg/kg) using two separate protocols: (i) a prophylactic regimen, in which dendrimer ABP was injected intravenously at day 1—between the first and the second injection of the K/BxN serum—and then again at days 4 and 11 (Fig. 5A), and (ii) a therapeutic regimen, in which dendrimer ABP was injected intravenously at days 3 and 10—after the two injections of K/BxN serum at days 0 and 2 (Fig. 5B). As for the IL-1ra^{-/-} mouse model, the evolution of inflammation and arthritis was followed by measuring the hind paw swelling and by clinical arthritic score (the arthritic score per animal was the sum of the scores attributed to the four paws). Both inflammation (paw swelling) and arthritis (arthritic score) were strongly suppressed with each protocol, suggesting that flares of arthritis could be prevented in this model by treatment with dendrimer ABP.

Anti-osteoclastic properties of dendrimer ABP in vitro

Osteoclasts are giant multinucleated cells derived either from bone marrow precursors of monocytes or directly from monocytes, which are the main cellular target of dendrimer ABP (6). Bone marrow precursors of monocytes were obtained from 5-week-old IL-1ra^{-/-} mice. M-CSF and RANKL cytokines were used to induce differentiation of these precursor cells into osteoclasts. This differentiation was strongly inhibited in vitro by dendrimer ABP in a dose-dependent manner, as determined by TRAP staining (Fig. 6A). The quantification of TRAP⁺ multinucleated cells showed that this inhibition was statistically significant even at the lowest concentration of dendrimer ABP (0.02 μM) (Fig. 6B). Because osteoclast-mediated bone erosion is a major component of arthritis and has been observed in IL-1ra^{-/-} arthritic mice (Fig. 2B), the effect of dendrimer ABP on osteoclastic bone-resorbing activity was

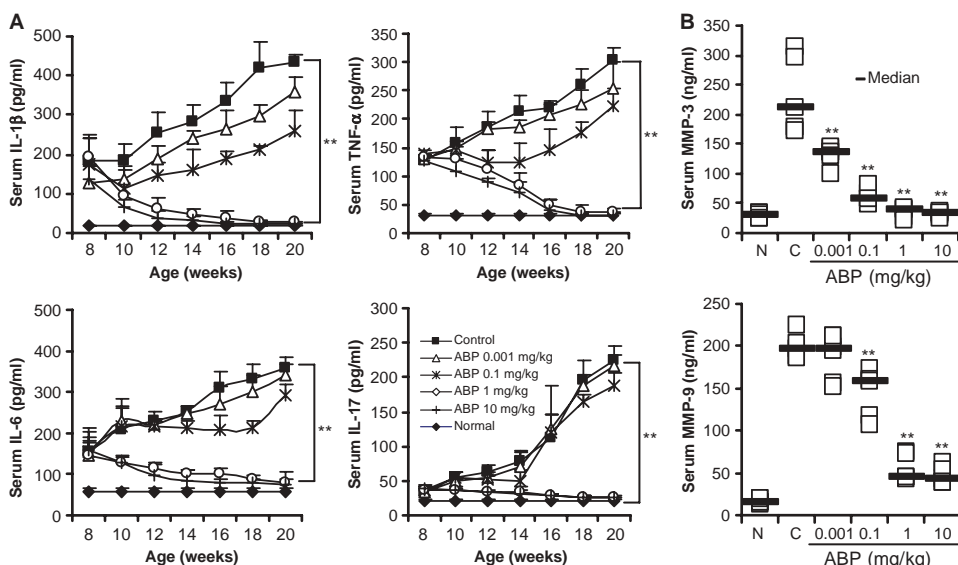


Fig. 3. Dendrimer ABP reduces the amounts of proinflammatory cytokines and metalloproteinases in the serum of IL-1ra^{-/-} mice. **(A)** Concentrations of IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-17 in the serum of IL-1ra^{-/-} mice during the 12-week treatment with doses of dendrimer ABP ranging from 0.001 to 10 mg/kg (*n* = 6 per dendrimer dose). Control: untreated IL-1ra^{-/-} mice. Normal: untreated nonarthritic BALB/cA mice. **(B)** Concentrations of MMP-3 and MMP-9 in the serum of IL-1ra^{-/-} mice at the end of the treatment (20 weeks) with varying doses of dendrimer ABP (*n* = 6 per dendrimer dose). Control (C): untreated IL-1ra^{-/-} mice. Normal (N): untreated, nonarthritic BALB/cA mice. Data in (A) represent mean ± SD. ***P* < 0.01 versus control (as calculated with Mann-Whitney test).

performed on human bone matrix in vitro. Measurement of type II collagen telopeptides released from the bone matrix showed that dendrimer ABP inhibited bone degradation in a dose-dependent

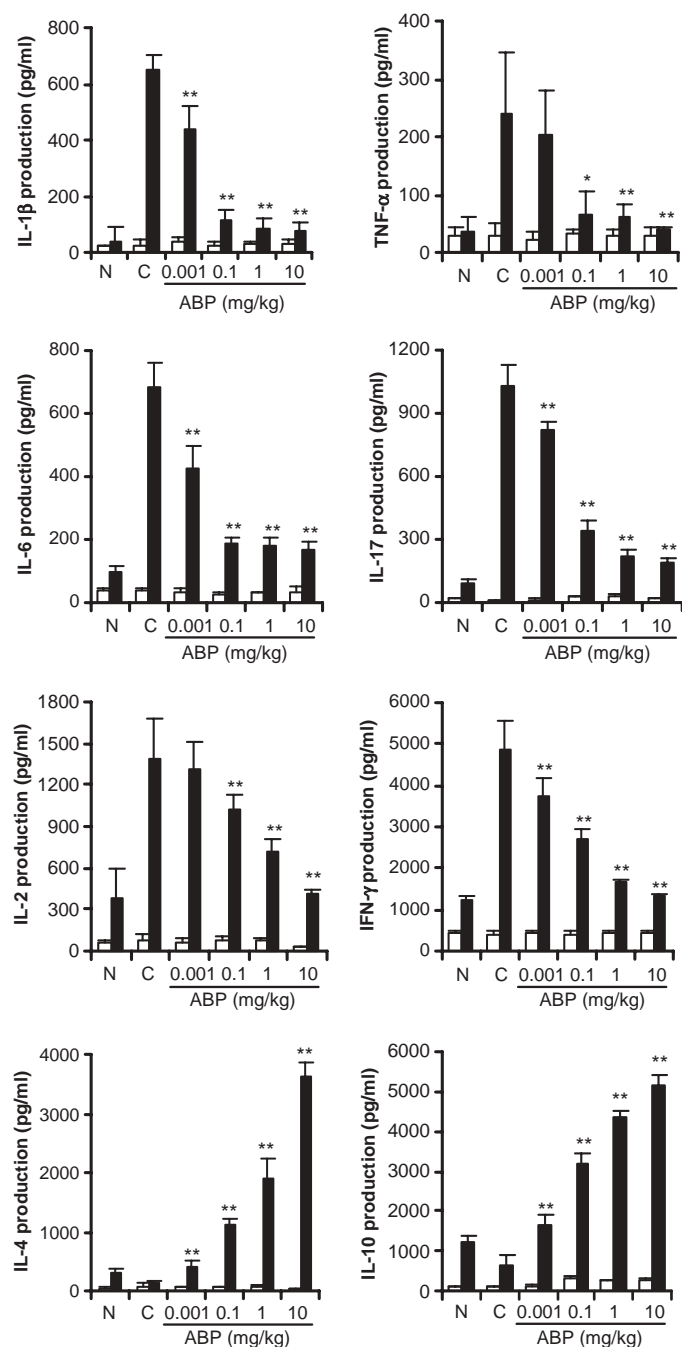


Fig. 4. Dendrimer ABP skews splenocytes toward an anti-inflammatory T_H2 phenotype in a dose-dependent manner. Concentrations of IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-17, IL-2, IFN-γ, IL-4, and IL-10 in the supernatants of splenocytes isolated from IL-1ra^{-/-} mice, which were stimulated (black bars) or not stimulated (white bars) with a CD3ε monoclonal antibody (n = 6 per dendrimer dose). Control (C): untreated IL-1ra^{-/-} mice. Normal (N): untreated, non-arthritic BALB/cA mice. Bars represent mean ± SD. *P < 0.05; **P < 0.01 versus control (as calculated with Mann-Whitney test).

manner but only showed a significant inhibition at 20 μM (Fig. 6C). Furthermore, the cell counts in dendrimer ABP-treated IL-1ra^{-/-} mice were indistinguishable after 12 weeks of treatment from those of non-arthritic BALB/cA (normal) mice, especially monocyte counts, which are increased in diseased IL-1ra^{-/-} mice (fig. S5). Increase in monocyte counts is also observed in blood samples of RA patients (35).

Differentiation of monocytes into osteoclasts is initiated via M-CSF interaction with its monocyte receptor, c-FMS. This interaction leads to the proliferation of monocytes and to the induction of RANK at the surface of monocytes. RANK interacts with RANKL, which is expressed by osteoblasts (bone-forming cells) and activated CD4⁺ T cells. This interaction promotes monocyte differentiation into osteoclasts (17). Dendrimer ABP inhibited the proliferation of bone marrow precursors of monocytes cultured in the presence of M-CSF and RANKL, as determined by nonradioactive cell proliferation assay (Fig. 6D). Therefore, we investigated whether the mechanism of action of the dendrimer involves c-FMS. Our results indicate that dendrimer ABP decreased the expression of c-FMS and RANK in a dose-dependent manner (Fig. 6E). The downstream NFATc1 (nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1), a major transcription factor for osteoclastogenesis, was also inhibited as a consequence of c-FMS inhibition, although

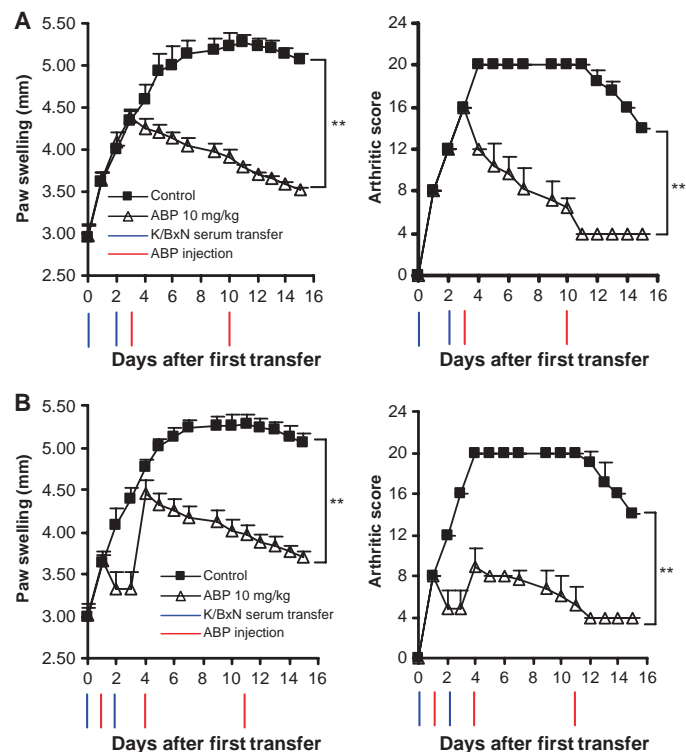


Fig. 5. The effect of dendrimer ABP in the K/BxN serum transfer mouse model. (A) Prophylactic effect of dendrimer ABP (10 mg/kg) on the onset of inflammation (paw swelling) and arthritis (arthritic score) in the K/BxN serum-transferred mice (n = 6 per group). (B) Therapeutic effect of dendrimer ABP (10 mg/kg) on the development of inflammation (paw swelling) and arthritis (arthritic score) in the K/BxN serum-transferred mice (n = 6 per group). Control: untreated K/BxN serum-transferred mice. Blue arrows indicate K/BxN serum transfer. Red arrows indicate ABP injection. Data represent mean ± SD. **P < 0.01 versus control (as calculated with Student's t test).

to a lesser extent (Fig. 6E). Dendrimer-mediated inhibition of *c-FMS* expression was also found to be at the mRNA level in *IL-1ra*^{-/-} mice. Mice treated for 12 weeks with dendrimer ABP (1 or 10 mg/kg) showed a 3.5-fold decrease in *c-fms* mRNA when compared with untreated

IL-1ra^{-/-} mice (0 μM ABP, M-CSF⁺, RANKL⁺) (Fig. 6F). Moreover, monocytes obtained from *IL-1ra*^{-/-} mice, which had been treated for 12 weeks with dendrimer ABP (10 mg/kg), produced fewer osteoclasts in cultures performed in the presence of M-CSF and RANKL (Fig. S6).

Dendrimer ABP also inhibited human monocyte differentiation into osteoclasts induced by M-CSF and RANKL in vitro. We showed that both in vitro differentiation of human peripheral blood monocytes into osteoclasts and bone degradation were inhibited in the presence of dendrimer ABP (Fig. 7A). Dendrimer-mediated inhibition of osteoclast differentiation, as measured by TRAP staining (Fig. 7B), and bone degradation, as determined by release of collagen telopeptides (Fig. 7C), was statistically significant for monocyte culture with all concentrations of dendrimer ABP (0.02 to 20 μM). Because myeloid DCs can also differentiate into osteoclasts (36), we tested the effect of dendrimer ABP on the transdifferentiation of myeloid DCs obtained from human monocytes. Dendrimer ABP caused a dose-dependent inhibition of this transdifferentiation, as assessed by TRAP staining (Fig. S7).

We then examined the inhibitory effect of dendrimer ABP on osteoclast differentiation ex vivo in cultures of synovial tissue obtained from arthroplastic surgery of RA patients. This inflamed tissue is composed of different cell types, including macrophages, lymphocytes, fibroblasts, neutrophils, DCs, and osteoclasts, in contact with bone. Membranes were cultured alone ("none"), in the presence of M-CSF and RANKL (control), or in the presence of M-CSF, RANKL, and dendrimer ABP at 20 μM. TRAP staining shows, as expected (37), the presence of osteoclasts in synovial membrane cultured alone (61 ± 12 osteoclasts per square nanometer of synovial tissue) (Fig. 7D). M-CSF and RANKL induced osteoclast differentiation in the ex vivo cultures (202 ± 24 osteoclasts per square nanometer of synovial tissue), but monocyte differentiation into osteoclasts was inhibited significantly ($P < 0.05$) by dendrimer ABP at 20 μM (92 ± 17 osteoclasts per square nanometer of synovial tissue) (Fig. 7D). H&E staining indicates that dendrimer ABP (20 μM) reduced macrophage infiltration, thus reflecting reduction of inflammation (Fig. 7D).

Finally, dendrimer ABP also inhibited the proliferation of human peripheral blood monocytes in vitro, which is typically

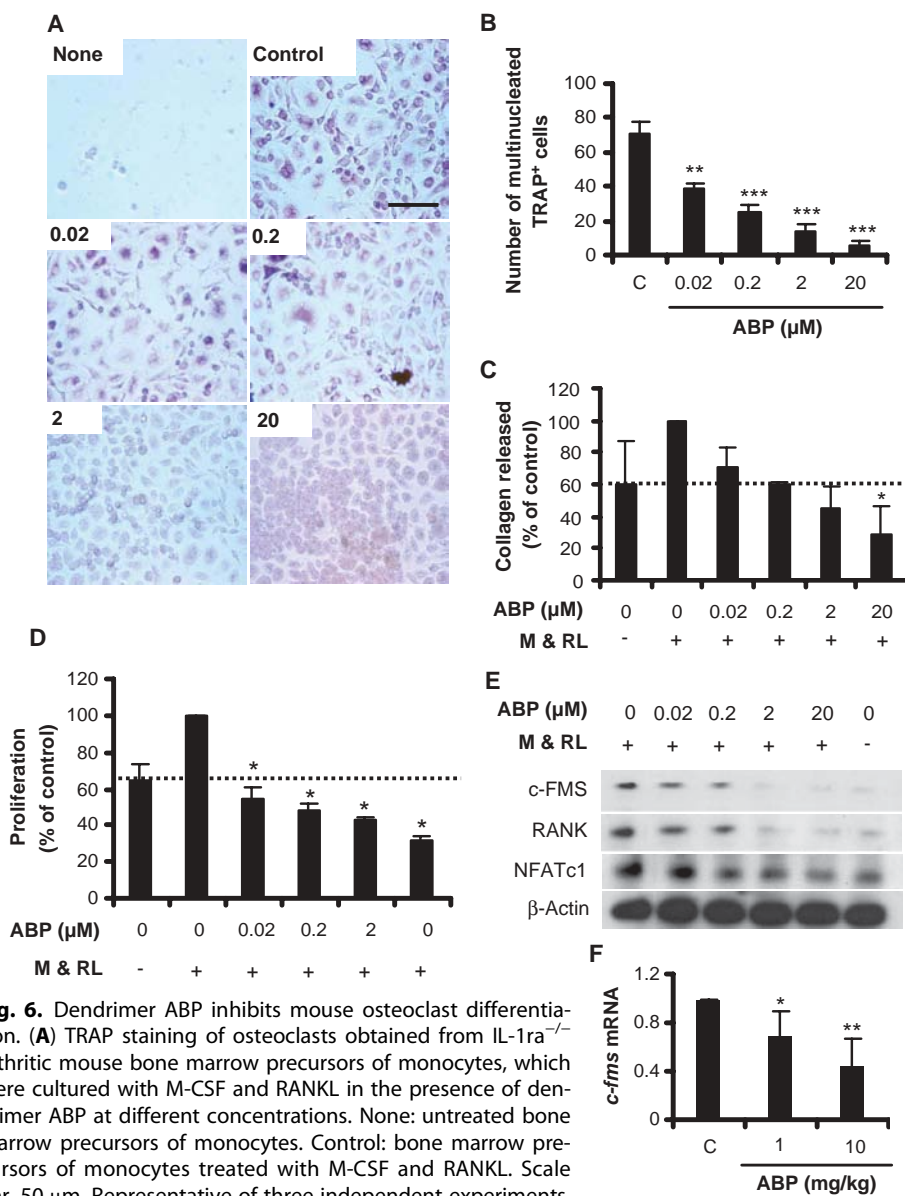


Fig. 6. Dendrimer ABP inhibits mouse osteoclast differentiation. **(A)** TRAP staining of osteoclasts obtained from *IL-1ra*^{-/-} arthritic mouse bone marrow precursors of monocytes, which were cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP at different concentrations. None: untreated bone marrow precursors of monocytes. Control: bone marrow precursors of monocytes treated with M-CSF and RANKL. Scale bar, 50 μm. Representative of three independent experiments.

(B) Quantification of the TRAP⁺ multinucleated cells (osteoclasts) at varying concentrations of ABP (0.02 to 20 μM) shown in (A). **(C)** Release of collagen telopeptides from bone matrix in vitro by treated and untreated monocytes from *IL-1ra*^{-/-} mice in the presence of dendrimer ABP ($n = 4$ per dendrimer dose). M & RL: M-CSF and RANKL. **(D)** Proliferation of *IL-1ra*^{-/-} arthritic mouse monocytes cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP using MTS-based colorimetric assay ($n = 4$ per dendrimer dose). **(E)** Western blot for *c-FMS*, *RANK*, and *NFATc1* prepared from *IL-1ra*^{-/-} arthritic mouse monocytes cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP. Rabbit anti-mouse β-actin was used as a control. Representative of three independent experiments. **(F)** Quantification of *c-fms* mRNA in monocytes of *IL-1ra*^{-/-} mice treated for 12 weeks with dendrimer ABP (1 or 10 mg/kg) using the $\Delta\Delta C_T$ method ($n = 6$). Control (C): *c-fms* mRNA from untreated *IL-1ra*^{-/-} mouse monocytes. Data represent mean ± SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.002$ versus control in (B) and (F) (as calculated with Student's *t* test) and versus mice cells treated with M-CSF and RANKL in (C) and (D) (as calculated with Mann-Whitney test).

triggered by M-CSF and RANKL (Fig. 7E). This is related to the decrease of c-FMS expression. A subsequent decrease in the expression of RANK and NFATc1 (Fig. 7F) contributed to inhibition of osteoclast differentiation. The inhibition of c-FMS in peripheral blood monocytes, which occurred at the mRNA level, could be explained by the decreased expression of *spi1* (spleen focus-forming virus proviral integration oncogene) mRNA that encodes PU.1 (Fig. 7G), one of the major transcription factors of *c-fms*.

DISCUSSION

Healthcare applications of dendrimers that include drug delivery, in vivo imaging, and in vitro diagnosis are being developed owing to dendrimer biocompatibility (1–4). Nevertheless, few studies have reported that these synthetic molecules can be used as drugs themselves. It has been shown in brain homogenates of scrapie-affected mice that branched polyamines, such as PAMAM dendrimers, stimulate the removal of prion proteins (38). Glucosamine-conjugated PAMAM dendrimers also have immunomodulatory properties and have prevented scar tissue formation (3). The most advanced dendrimer drug in clinical development (PAMAM) is intended for topical intravaginal use as an antiviral agent and is now in Phase II clinical trials (39). Because dendrimers with cationic end groups have shown higher toxicity after repeated intravenous use (40), we have synthesized several dendrimers with anionic ABP endings. Dendrimer ABP has been able to selectively target monocytes among human PBMCs and directs them toward an anti-inflammatory activation (7). Here, we showed that dendrimer ABP inhibits the expression of proinflammatory cytokines in monocytes in vitro and that dendrimer ABP-activated monocytes increase IL-10 secretion by CD4⁺ T cells, which suggests T_H2 skewing (7). On the basis of these previous findings, we tested in this study whether dendrimer ABP could be used as a potential therapeutic agent for inflammatory diseases involving monocytes, specifically RA.

Monocytes are known to play a pivotal role in inflammation and osteoclastogenesis in RA (41, 42). Pro-osteoclastic cytokines IL-1 β and TNF- α are mainly produced by monocytes and synergize with RANKL to produce mature osteoclasts, which carry out the bone-resorbing activity that is characteristic of RA (17). RANK/RANKL signaling is activated by M-CSF in monocytes (43, 44). Previous studies have shown that M-CSF plays a pivotal role in the differentiation and the survival of osteoclasts (43). In addition, *op/op* mice, which bear a nonsense mutation in the M-CSF gene, are deficient in osteoclasts and thus develop osteoporosis. A monoclonal antibody-neutralizing M-CSF has been shown to inhibit experimental arthritis (45), as well as specific inhibitors of c-FMS tyrosine kinase activity, which is the receptor of M-CSF on monocytes (46–49).

In our current study, we found that dendrimer ABP resolves arthritis developed in IL-1ra^{-/-} mice, with a great improvement in inflammation and inhibition of joint damage. This effect is due to the general three-dimensional structure

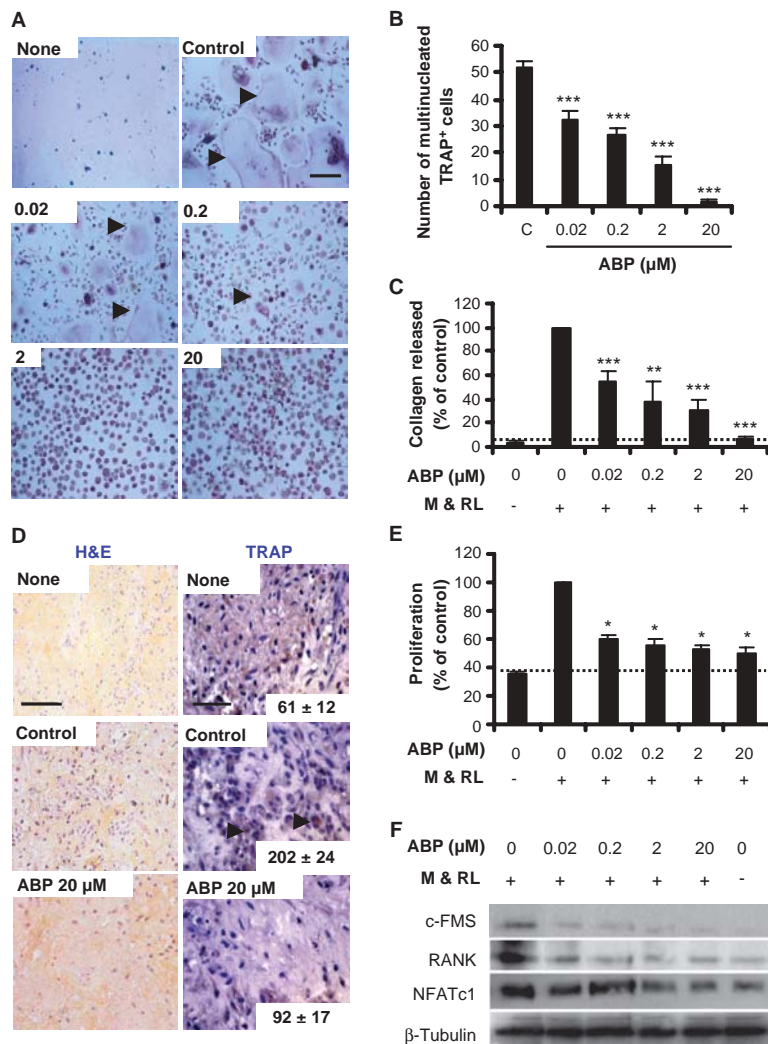


Fig. 7. Dendrimer ABP inhibits osteoclast differentiation of human monocytes ex vivo. (A) TRAP staining of human monocytes cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP at different concentrations. None: untreated human monocytes. Control: human monocytes treated with M-CSF and RANKL. Scale bar, 150 μm. Representative of three independent experiments. (B) Quantification of the TRAP⁺ multinucleated cells (osteoclasts) at varying concentrations of ABP. Control (C): human monocytes treated with M-CSF and RANKL only. (C) Release of collagen telopeptides from bone matrix by treated and untreated human monocytes in the presence of dendrimer ABP (n = 3 per dendrimer dose). M & RL: M-CSF and RANKL. (D) H&E (scale bar, 14 μm) and TRAP (scale bar, 7 μm) staining of human synovial tissue cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP at 20 μM (n = 3). Osteoclast number was quantified per square nanometer of synovial tissue. None: untreated synovial tissue. Control: synovial tissue treated with M-CSF and RANKL. (E) Proliferation of human monocytes cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP (n = 3 per dendrimer dose). (F) Western blot for c-FMS, RANK, and NFATc1 prepared from human monocytes cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP. Mouse anti-human β-tubulin was used as control. (G) Quantification of *c-fms* and *spi1* (PU.1) mRNA in human monocytes cultured with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP at 20 μM using the ΔΔC_T method (n = 3). Data represent mean ± SD. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.002 versus respective control [as calculated with Student's *t* test for (B) and (G) and Mann-Whitney test for (C) and (E)].

of dendrimer ABP, considering that other dendrimers, such as AMP (same core and branches as dendrimer ABP, but different surface groups) and PPI (different core and branches, but ABP surface groups), in addition to nitrogenous bisphosphonate (zoledronate) alone are ineffective at resolving arthritis in IL-1ra^{-/-} mice. The amounts of certain proinflammatory cytokines and MMPs were reduced to those of normal (nonarthritic BALB/cA) mice, whereas anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4 were increased. Our results therefore suggest that dendrimer ABP inhibition of c-FMS expression induces anti-inflammatory activity as well as anti-osteoclastogenesis both in vivo in mice and in vitro in human cells (7).

M-CSF and RANKL signaling acts synergistically with proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-17 (50, 51). Development of monoclonal antibody therapeutics directed against these cytokines has revolutionized the treatment of RA (18). A monoclonal antibody to CD20 (rituximab), initially used to treat B cell lymphoma (20), and a monoclonal antibody to CTLA-4 (21) (abatacept) have been shown to be effective in RA patients who were nonresponders to anti-TNF- α therapy. An anti-RANKL antibody, denosumab, has shown that targeting RANKL is efficient in delaying osteoclast-mediated joint destruction, but has failed to resolve inflammation (19). A newly developed monoclonal antibody specific for the receptor of proinflammatory IL-6 cytokine (tocilizumab) has shown effectiveness in treating arthritis, comparable to that of anti-TNF- α and anti-B and T cell biologic agents (52). Thus, inhibiting any of these cytokines might effectively control the disease, but it does not constitute a cure. One reason for this disappointing issue is that these therapeutic biological agents target only one of the cytokines involved in the inflammatory or in the bone erosion processes, whereas it seems increasingly unlikely that one single cytokine drives the pathogenesis of RA.

Dendrimer ABP, by acting directly on both inflammation and bone erosion, might be more efficacious against RA than previous antibody-based drugs. We provide evidence that dendrimer ABP resolves both IL-1ra^{-/-} and K/BxN serum-induced arthritis in mice and mitigates the differentiation of human monocytes into osteoclasts by inhibiting the c-FMS signaling in myeloid precursors without inducing overt toxicity. Thus, this dendrimer prevents differentiation and activity of osteoclasts, as well as the enhanced production of proinflammatory cytokines, while increasing the production of T_H2-type cytokines by acting upstream of the signaling cascade mediated by M-CSF and RANKL. The cytokine profile observed is pointing to a possible link between c-FMS signaling and T cell polarization, although this is yet to be evaluated in different settings and in a noninflammatory context.

Currently, the gold standard for RA therapy is methotrexate, which is administered weekly, either orally or intramuscularly, and was originally developed as an anticancer drug. It can also be prescribed in first line in combination with an anti-TNF- α . As indicated in mouse studies, treating arthritis with dendrimer requires the same timeframe of administration as with methotrexate. However, the combination of effects on proinflammatory cytokines and osteoclast differentiation predicts dendrimer as a more active drug on arthritis. Possible roadblocks to clinical use of dendrimer ABP lie in the repetition of drug injections. However, we have also observed that intravenous injections could be more interspaced (3 weeks, similar to anti-cytokine biotherapies). More flexible routes of administration, in particular orally, must be evaluated with dendrimer ABP. Moreover, pharmacokinetic studies, which are beyond the scope of the present paper, will require extensive experiments and observations in various species, but will be important steps in moving

this dendrimer-based RA treatment from animal models to human patients.

MATERIALS AND METHODS

Animal studies

IL-1ra^{-/-} mice were housed in a specific pathogen-free environment and cared for in accordance with European institutional guidelines (<http://eur-lex.europa.eu>). Swelling of the two hind paws was measured with a digital caliper and averaged. Severity of arthritis was assessed macroscopically in a blind fashion for each paw per mouse with a three-grade score as described previously (28). BALB/cA mice (Charles River) were used as nonarthritic controls. Mice were weighed and tail blood samples were collected weekly. Dendrimer, zoledronate, or phosphate-buffered saline (PBS) was injected intravenously. IL-1ra^{-/-} mice were killed at the age of 20 weeks.

Male 9-week-old BALB/cA mice were transferred at days 0 and 2 intraperitoneally with 200 μ l of 60-week-old K/BxN mice serum. In the prophylactic protocol, dendrimer ABP was injected intravenously at days 1, 4, and 11. In the therapeutic protocol, dendrimer ABP was injected intravenously at days 3 and 10. Mice were killed 15 days after the first transfer. Severity of arthritis in K/BxN-transferred mice was assessed macroscopically in a blind fashion for each paw per mouse with a five-grade score (0, normal; 1, light swelling of the joint; 2, obvious swelling of the joint; 3, obvious swelling of the joint with redness of the footpad; 4, severe swelling; 5, severe swelling and immobile mice).

Immunohistochemistry

Joints of hind paws were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, decalcified in 10% EDTA, and embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were stained with H&E for the general structure of organs and with TRAP for multinucleated giant cells that were counted with the LAS V3.7 software (Leica). Synovial hyperplasia was assessed with a five-grade score (0, normal knee joint; 1, normal synovium with occasional mononuclear cells; 2, definite arthritis, a few layers of flat to rounded synovial lining cells, and scattered mononuclear infiltrates; 3, clear hyperplasia of the synovium with three or more layers of loosely arranged lining cells and dense infiltration with mononuclear cells; 4, severe synovitis with pannus formation; 5, severe synovitis with pannus formation and erosions of articular cartilage and subchondral bone).

Human synovial tissue was fixed in 10% phosphate-buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (3 μ m) were stained with H&E and TRAP. Sections were also stained for IL-17⁺ cells with a goat anti-mouse IL-17 (2.5 μ g/ml) dissolved in PBS supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA) (AbD Serotec). The presence of this antibody was detected with biotinylated anti-goat antibody, followed by peroxidase streptavidin and diaminobenzidine successive stains.

Cytokine concentration

Single-cell suspensions were obtained by mechanically disrupting spleens. Cells were cultured for 24 hours at 37°C, 5% CO₂ in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) at a density of 5 \times 10⁵ cells/ml with or without anti-mouse CD3 ϵ antibody (BD Pharmingen). Cytokine concentration was analyzed in culture supernatants and in serum samples with

Mouse Ready-SET-Go! ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sets for IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17, and T_H1/T_H2 (eBioscience) and Quantikine Mouse Immunoassays for MMP-3 and MMP-9 (R&D Systems).

Osteoclast cultures

Bone marrow cells from femora were isolated from IL-1ra^{-/-} mice before and after 12-week treatment with dendrimer ABP or PBS (control: untreated IL-1ra^{-/-} mice). After lysis of red blood cells (Miltenyi Biotec), cells were incubated with M-CSF (50 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) (both from PeproTech) and cultured for 12 days at 37°C, 5% CO₂ in α -MEM (minimum essential medium) (Invitrogen) supplemented with 10% FBS at a density of 2.5×10^5 cells/ml. Medium was replaced every 4 days with M-CSF (50 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml). Human blood samples were collected from healthy donors, and PBMCs were prepared on a Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Biosciences). CD14⁺ monocytes were negatively selected from PBMCs by magnetic separation (CD14 Dynabeads, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with M-CSF (25 ng/ml) and RANKL (33 ng/ml) and cultured for 21 days at 37°C, 5% CO₂ in α -MEM supplemented with 10% FBS (Invitrogen) at a density of 2.5×10^4 cells/ml. Filtered solutions of dendrimer ABP or zoledronate were added to cultures at the same time as cytokines. Medium was replaced every 3 days with M-CSF (50 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml). Osteoclast formation was evaluated by Leukocyte Acid Phosphatase TRAP Kit (Sigma) staining and manual counting of the number of multinucleated TRAP⁺ cells.

Assessment of bone resorption

Bone marrow cells from femora of 5-week-old untreated IL-1ra^{-/-} mice and human CD14⁺ monocytes were cultured at 37°C, 5% CO₂ in α -MEM supplemented with 10% FBS at a density of 2.5×10^4 cells/ml in a 96-well human bone plate (Cambrex). After 8 days (for murine cells) or 12 days (for human cells), culture supernatants were analyzed for CTX (C-telopeptide of type II collagen) concentration with Urine Pre-Clinical CartiLaps ELISA kit (IDS) for murine cells and CrossLaps for Culture ELISA kit for human cells (Novartis). Serum collected from IL-1ra^{-/-} mice was analyzed for CTX level with Serum Pre-Clinical CartiLaps ELISA kit (IDS).

Synovial tissue culture

Synovial tissue obtained from arthroplastic surgery of RA patients was incubated on gel-foam sponges (53) with M-CSF (50 ng/ml) and RANKL (33 ng/ml) and cultured for 15 days at 37°C, 5% CO₂ in α -MEM supplemented with 10% FBS in the presence of 20 μ M dendrimer ABP. Medium was replaced every 3 days with M-CSF (50 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml).

Western blot

Cell suspensions were obtained by mechanically disrupting the spleens from IL-1ra^{-/-} mice (5 to 10 weeks old). CD11b⁺ monocytes were positively selected from spleen suspension by magnetic cell sorting on MS Separation Column (CD11b Microbeads, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Murine CD11b⁺ monocytes or human CD14⁺ monocytes were incubated with M-CSF (50 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) and cultured for 24 hours at 37°C, 5% CO₂ in α -MEM supplemented with 10% FBS at a density of 3×10^6 cells/ml. Protein extracts were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences), and probed with antibodies directed against c-FMS, RANK, NFATc1 (Abcam),

β -actin, and β -tubulin (Sigma), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. The hybridized bands were then visualized with electrochemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Proliferation assays

Murine CD11b⁺ monocytes positively selected from IL-1ra^{-/-} spleen suspension and human peripheral blood CD14⁺ monocytes were incubated with M-CSF (50 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) and cultured in 96-well plates for 72 hours at 37°C, 5% CO₂ in α -MEM supplemented with 10% FBS at a density of 5×10^4 cells/ml. CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega) was added (20 μ l per well) and plates were incubated for 2 hours at 37°C, 5% CO₂. Absorbance readings at 490 nm with a microplate reader (Thermo) measured the conversion of the tetrazolium compound MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] into a formazan product by the mitochondria of living cells.

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA (1 μ g) was extracted from murine CD11b⁺ monocytes and human CD14⁺ monocytes, which were cultured in 15-ml Falcon tubes (BD Pharmingen) for 24 hours in α -MEM containing 10% FBS at a density of 10^6 cells/ml. Total RNA was used as the template for complementary DNA (cDNA) synthesis. Primers were synthesized on the basis of the reported mouse and human cDNA sequences. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed with the following primers: mouse *c-fms*, 5'-GACCATGGTGAATGGTAGGG-3' and 3'-GTCCA-CAGCGTTGAGACTGA-5'; human *c-fms*, 5'-GTGGCTGTGAA-GATGCTGAA-3' and 3'-CAACTTTCTGCCAAGGAAGG-5'; human *spi1*, 5'-ACCTGGTTCCCTATGACACG-3' and 3'-GTCCAG-TAATGGTCGCTGT-5'. Amplification was conducted for 35 to 40 cycles in a thermal cycler (Roche Diagnostics), each at 95°C for 15 s, 60°C for 60 s, and 72°C for 60 s. The signal was quantified with Sequence Detection Software (Applied Biosystems).

Statistics

After the Shapiro-Wilk (or Shapiro-Francia, if $3 < n < 6$) normality test was performed, data were analyzed with Student's *t* test or Mann-Whitney test. Statistical analyses were performed with Stata Statistical Software (StataCorp). Data are represented as means \pm SD, and $P < 0.05$ (two-tailed) was considered to be statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/3/81/81ra35/DC1
Materials and Methods

Fig. S1. Dendrimer ABP inhibits IL-17-expressing cells in joints of IL-1ra^{-/-} mice.

Fig. S2. Dendrimer ABP does not show any off-target effects in mice.

Fig. S3. Zoledronate versus dendrimer ABP effect on osteoclast differentiation and toxicity.

Fig. S4. Dendrimer ABP does not affect the body weight of IL-1ra^{-/-} mice.

Fig. S5. Dendrimer ABP restores cellular counts in arthritic IL-1ra^{-/-} mice.

Fig. S6. Ex vivo differentiation of osteoclasts is inhibited after treatment of IL-1ra^{-/-} mice with dendrimer ABP.

Fig. S7. Dendrimer ABP inhibits transdifferentiation of myeloid DCs into osteoclasts.

REFERENCES AND NOTES

1. C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. Fréchet, F. C. Szoka, Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1517–1526 (2005).
2. A. R. Menjoge, R. M. Kannan, D. A. Tomalia, Dendrimer-based drug and imaging conjugates: Design considerations for nanomedical applications. *Drug Discov. Today* **15**, 171–185 (2010).

3. S. Shaunak, S. Thomas, E. Gianasi, A. Godwin, E. Jones, I. Teo, K. Mireskandari, P. Luthert, R. Duncan, S. Patterson, P. Khaw, S. Brocchini, Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. *Nat. Biotechnol.* **22**, 977–984 (2004).
4. V. Wagner, A. Dullaart, A. K. Bock, A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1211–1217 (2006).
5. O. Rolland, C. O. Turrin, A. M. Caminade, J. P. Majoral, Dendrimers and nanomedicine: Multivalency in action. *New J. Chem.* **33**, 1809–1824 (2009).
6. M. Poupot, L. Griffe, P. Marchand, A. Maraval, O. Rolland, L. Martinet, F. E. L'Faqihi-Olive, C. O. Turrin, A. M. Caminade, J. J. Fournié, J. P. Majoral, R. Poupot, Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. *FASEB J.* **20**, 2339–2351 (2006).
7. S. Fruchon, M. Poupot, L. Martinet, C. O. Turrin, J. P. Majoral, J. J. Fournié, A. M. Caminade, R. Poupot, Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 553–562 (2009).
8. L. Griffe, M. Poupot, P. Marchand, A. Maraval, C. O. Turrin, O. Rolland, P. Métivier, G. Bacquet, J. J. Fournié, A. M. Caminade, R. Poupot, J. P. Majoral, Multiplication of human natural killer cells by nanosized phosphonate-capped dendrimers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 2523–2526 (2007).
9. D. Portevin, M. Poupot, O. Rolland, C. O. Turrin, J. J. Fournié, J. P. Majoral, A. M. Caminade, R. Poupot, Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4⁺ T cell proliferation enhances ex-vivo expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy. *J. Transl. Med.* **7**, 82 (2009).
10. A. S. Chauhan, P. V. Diwan, N. K. Jain, D. A. Tomalia, Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules* **10**, 1195–1202 (2009).
11. S. M. Rele, W. Cui, L. Wang, S. Hui, G. Barr-Zarse, D. Tatton, Y. Gnanou, J. D. Esko, E. L. Chaikof, Dendrimer-like PEO glycopolymers exhibit anti-inflammatory properties. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10132–10133 (2005).
12. J. D. Nedde, A. Rausch, M. Weinhardt, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zügel, A. von Bonin, R. Haag, Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19679–19684 (2010).
13. L. Klareskog, A. I. Catrina, S. Paget, Rheumatoid arthritis. *Lancet* **373**, 659–672 (2009).
14. I. B. McInnes, G. Schett, Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 429–442 (2007).
15. S. Herman, G. Krönke, G. Schett, Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: Emerging targets for therapy. *Trends Mol. Med.* **14**, 245–253 (2008).
16. J. A. Hamilton, Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 533–544 (2008).
17. H. Takayanagi, Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 292–304 (2007).
18. J. L. Nam, K. L. Winthrop, R. F. van Vollenhoven, K. Pavelka, G. Valesini, E. M. Hensor, G. Worthy, R. Landewé, J. S. Smolen, P. Emery, M. H. Buch, Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: A systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 976–986 (2010).
19. S. B. Cohen, R. K. Dore, N. E. Lane, P. A. Ory, C. G. Peterfy, J. T. Sharp, D. van der Heijde, L. Zhou, W. Tsuji, R. Newmark; Denosumab Rheumatoid Arthritis Study Group, 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.* **58**, 1299–1309 (2008).
20. S. B. Cohen, P. Emery, M. W. Greenwald, M. Dougados, R. A. Furie, M. C. Genovese, E. C. Keystone, J. E. Loveless, G. R. Burmester, M. W. Cravets, E. W. Hesse, T. Shaw, M. C. Tootoritis; REFLEX Trial Group, Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* **54**, 2793–2806 (2006).
21. J. M. Kremer, R. Westhovens, M. Leon, E. Di Giorgio, R. Alten, S. Steinfeld, A. Russell, M. Dougados, P. Emery, I. F. Nuamah, G. R. Williams, J. C. Becker, D. T. Hagerty, L. W. Moreland, Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4lg. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1907–1915 (2003).
22. A. Wiens, R. Venson, C. J. Correr, M. F. Otuki, R. Pontarolo, Meta-analysis of the efficacy and safety of adalimumab, etanercept, and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacotherapy* **30**, 339–353 (2010).
23. J. E. Gottenberg, P. Ravaut, T. Bardin, P. Cacoub, A. Cantagrel, B. Combe, M. Dougados, R. M. Flipo, B. Godeau, L. Guillemin, X. Le Loët, E. Hachulla, T. Schaefferbeke, J. Sibilia, G. Baron, X. Mariette; Autoimmunity and Rituximab registry and French Society of Rheumatology, Risk factors for severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in the Autoimmunity and Rituximab registry. *Arthritis Rheum.* **62**, 2625–2632 (2010).
24. K. G. Saag, G. G. Teng, N. M. Patkar, J. Anuntiyi, C. Finney, J. R. Curtis, H. E. Paulus, A. Mudano, M. Pisu, M. Elkins-Melton, R. Outman, J. J. Allison, M. Suarez Almazor, S. L. Bridges Jr., W. W. Chatham, M. Hochberg, C. MacLean, T. Mikuls, L. W. Moreland, J. O'Dell, A. M. Turkiewicz, D. E. Furst; American College of Rheumatology, American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **59**, 762–784 (2008).
25. D. van der Woude, A. Young, K. Jayakumar, B. J. Mertens, R. E. Toes, D. van der Heijde, T. W. Huizinga, A. H. van der Helm-van Mil, Prevalence of and predictive factors for sustained disease-modifying antirheumatic drug-free remission in rheumatoid arthritis: Results from two large early arthritis cohorts. *Arthritis Rheum.* **60**, 2262–2271 (2009).
26. J. G. Stoll, U. Yasothan, Rheumatoid arthritis market. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 693–694 (2009).
27. P. E. Lipsky, Are new agents needed to treat RA? *Nat. Rev. Rheumatol.* **5**, 521–522 (2009).
28. R. Horai, S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, Y. Iwakura, Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**, 313–320 (2000).
29. H. J. Ditzel, The K/BxN mouse: A model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol. Med.* **10**, 40–45 (2004).
30. S. Nakae, S. Saijo, R. Horai, K. Sudo, S. Mori, Y. Iwakura, IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5986–5990 (2003).
31. M. Ziolkowska, A. Koc, G. Luszczkiewicz, K. Ksiezopolska-Pietrzak, E. Klimczak, H. Chwalinska-Sadowska, W. Maslinski, High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J. Immunol.* **164**, 2832–2838 (2000).
32. R. E. Marx, Y. Sawatari, M. Fortin, V. Broumand, Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **63**, 1567–1575 (2005).
33. S. R. Goldring, Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **42** (Suppl. 2), ii11–ii16 (2003).
34. D. Kyburz, M. Corr, The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* **25**, 79–90 (2003).
35. F. Lioté, B. Boval-Boizard, D. Weill, D. Kuntz, J. L. Wautier, Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: Increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 13–19 (1996).
36. A. Rivollier, M. Mazzorana, J. Tebib, M. Piperno, T. Aitsiselmi, C. Rabourdin-Combe, P. Jurdic, C. Servet-Delprat, Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: A novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* **104**, 4029–4037 (2004).
37. E. M. Gravalles, Y. Harada, J. T. Wang, A. H. Gorn, T. S. Thornhill, S. R. Goldring, Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* **152**, 943–951 (1998).
38. S. Supattapone, H. O. Nguyen, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, M. R. Scott, Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14529–14534 (1999).
39. J. O'Loughlin, I. Y. Millwood, H. M. McDonald, C. F. Price, J. M. Kaldor, J. R. Paull, Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SPL7013 gel (VivaGel): A dose ranging, phase I study. *Sex. Transm. Dis.* **37**, 100–104 (2010).
40. R. Jevprasesphant, J. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N. B. McKeown, A. D'Emanuele, The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* **252**, 263–266 (2003).
41. J. R. Aron, Y. Choi, Bone versus immune system. *Nature* **408**, 535–536 (2000).
42. K. Sato, H. Takayanagi, Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. *Curr. Opin. Rheumatol.* **18**, 419–426 (2006).
43. F. P. Ross, S. L. Teitelbaum, $\alpha_v\beta_3$ and macrophage colony-stimulating factor: Partners in osteoclast biology. *Immunol. Rev.* **208**, 88–105 (2005).
44. M. Asagiri, H. Takayanagi, The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**, 251–264 (2007).
45. I. K. Campbell, M. J. Rich, R. J. Bischof, J. A. Hamilton, The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: Exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 144–150 (2000).
46. J. G. Conway, H. Pink, M. L. Bergquist, B. Han, S. Depee, S. Tadepalli, P. Lin, R. C. Cummrine, J. Binz, R. L. Clark, J. L. Selph, S. A. Stimpson, J. T. Hutchins, S. D. Chamberlain, T. A. Brodie, Effects of the cFMS kinase inhibitor 5-(3-methoxy-4-(4-methoxybenzyl)oxy)benzylpyrimidine-2,4-diamine (GW2580) in normal and arthritic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 41–50 (2008).
47. J. G. Conway, B. McDonald, J. Parham, B. Keith, D. W. Rusnak, E. Shaw, M. Jansen, P. Lin, A. Payne, R. M. Crosby, J. H. Johnson, L. Frick, M. H. Lin, S. Depee, S. Tadepalli, B. Votta, I. James, K. Fuller, T. J. Chambers, F. C. Kull, S. D. Chamberlain, J. T. Hutchins, Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 16078–16083 (2005).
48. H. Ohno, Y. Uemura, H. Murooka, H. Takanashi, T. Tokieda, Y. Ohzeki, K. Kubo, I. Serizawa, The orally-active and selective c-Fms tyrosine kinase inhibitor Ki20227 inhibits disease progression in a collagen-induced arthritis mouse model. *Eur. J. Immunol.* **38**, 283–291 (2008).

49. R. T. Paniagua, W. H. Robinson, Imatinib for the treatment of rheumatic diseases. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **3**, 190–191 (2007).
50. W. J. Boyle, W. S. Simonet, D. L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337–342 (2003).
51. T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie, T. J. Martin, Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **20**, 345–357 (1999).
52. G. J. Bergman, M. C. Hochberg, M. Boers, N. Wintfeld, A. Kielhorn, J. P. Jansen, Indirect comparison of tocilizumab and other biologic agents in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs. *Semin. Arthritis Rheum.* **39**, 425–441 (2010).
53. J. C. Grivel, L. Margolis, Use of human tissue explants to study human infectious agents. *Nat. Protoc.* **4**, 256–269 (2009).
54. **Acknowledgments:** We thank Y. Iwakura (Institute of Medical Science, University of Tokyo) and T. Reno (Centre National de Recherche Scientifique UMR5201, Lyon, France) for supplying the animals used in this study. We thank T. Al Saati and F. Capilla (Plateau d'Histopathologie Expérimentale, Institut Fédératif de Recherche Bio-Médicale de Toulouse) for performing histologic assays. **Funding:** This research was supported by grants from the Fondation Arthritis and Université Paul Sabatier. M.H. was supported by a fellowship from Société Française de Rhumatologie. **Author contributions:** M.H. planned and performed all in vitro and in vivo

experiments, except reverse transcription–PCR (RT-PCR) assays on human monocytes, and analyzed the data. M.P. initiated osteoclast differentiation experiments and analyzed the data. M.B. participated in mice experiments and performed RT-PCR assays on human monocytes. D.N. performed all the statistical analyses. R.A.E., J.-J.F., and A.C. analyzed and discussed the results. C.-O.T., A.-M.C., and J.-P.M. supervised chemical syntheses and provided dendrimer batches. R.P. and J.-L.D. supervised the research. M.H., R.P., and J.-L.D. wrote the paper. **Competing interests:** Dendrimers ABP, AMP, and PPI are protected in pending patents WO 2006024769 and WO 2010013086. The authors declare that they have no other competing financial interests.

Submitted 1 February 2011

Accepted 15 April 2011

Published 4 May 2011

10.1126/scitranslmed.3002212

Citation: M. Hayder, M. Poupot, M. Baron, D. Nigon, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, R. A. Eisenberg, J.-J. Fournié, A. Cantagrel, R. Poupot, J.-L. Davignon, A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci. Transl. Med.* **3**, 81ra35 (2011).

Abstracts

One-sentence summary: A phosphorus-based dendrimer suppresses inflammation and reduces bone erosion in mouse models of rheumatoid arthritis.

Editor's Summary: Dendrimer Doubles Up

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease that is characterized by inflamed synovial tissue, cartilage degeneration, and bone erosion, leading to joint deformation and physical handicap. Biologic therapeutic approaches, such as monoclonal antibodies and soluble receptors, have been developed to relieve the symptoms of RA. Unfortunately, these drugs typically act on a single target: proinflammatory cytokines. There is an unmet clinical need for anti-RA drugs that target not only proinflammatory molecules and pathways, but also the osteoclastic differentiation of monocytes—the latter of which leads to bone resorption. In response, Hayder *et al.* synthesized a new dendrimer-based therapeutic that boasts a two-pronged attack on RA, with both anti-inflammatory and anti-osteoclastogenic activity.

Dendrimers are highly branched polymers whose multivalency allows for interaction with several cellular and molecular targets. The authors created an azabisphosphonate (ABP)-capped dendrimer that has been shown to target human monocytes and direct them toward an anti-inflammatory response. Two animal models of autoimmune arthritis were used: the IL-1ra^{-/-} mouse and the K/BxN serum transfer mouse. Dendrimer ABP was administered to IL-1ra^{-/-} mice via weekly intravenous injections at doses ranging from 0.001 to 10 mg/kg. At higher doses, the dendrimer was able to completely inhibit inflammation, as evidenced by a decrease in paw swelling, and arthritis histopathology, with ankle joints showing near-normal synovial membranes and intact cartilage after 12 weeks. Dendrimer ABP also decreased the amount of proinflammatory cytokines and increased levels of anti-inflammatory cytokines interleukin-4 (IL-4) and IL-10, thereby suggesting a skewing toward a T helper 2 (T_H2) response. The K/BxN mouse demonstrated similar results upon treatment with dendrimer ABP.

Treatment with dendrimer ABP also prevented osteoclastogenesis, as shown in human synovial tissue *ex vivo* and human peripheral blood monocytes *in vitro*. The authors further outlined a potential dendrimer-mediated mechanism that involves inhibition of c-FMS—a signaling molecule that promotes monocyte differentiation into osteoclasts. This study by Hayder and colleagues has shown that dendrimer ABP, by doubling up against inflammation and bone erosion, might be more effective at treating RA than existing antibody- and small-molecule-based biologic drugs.

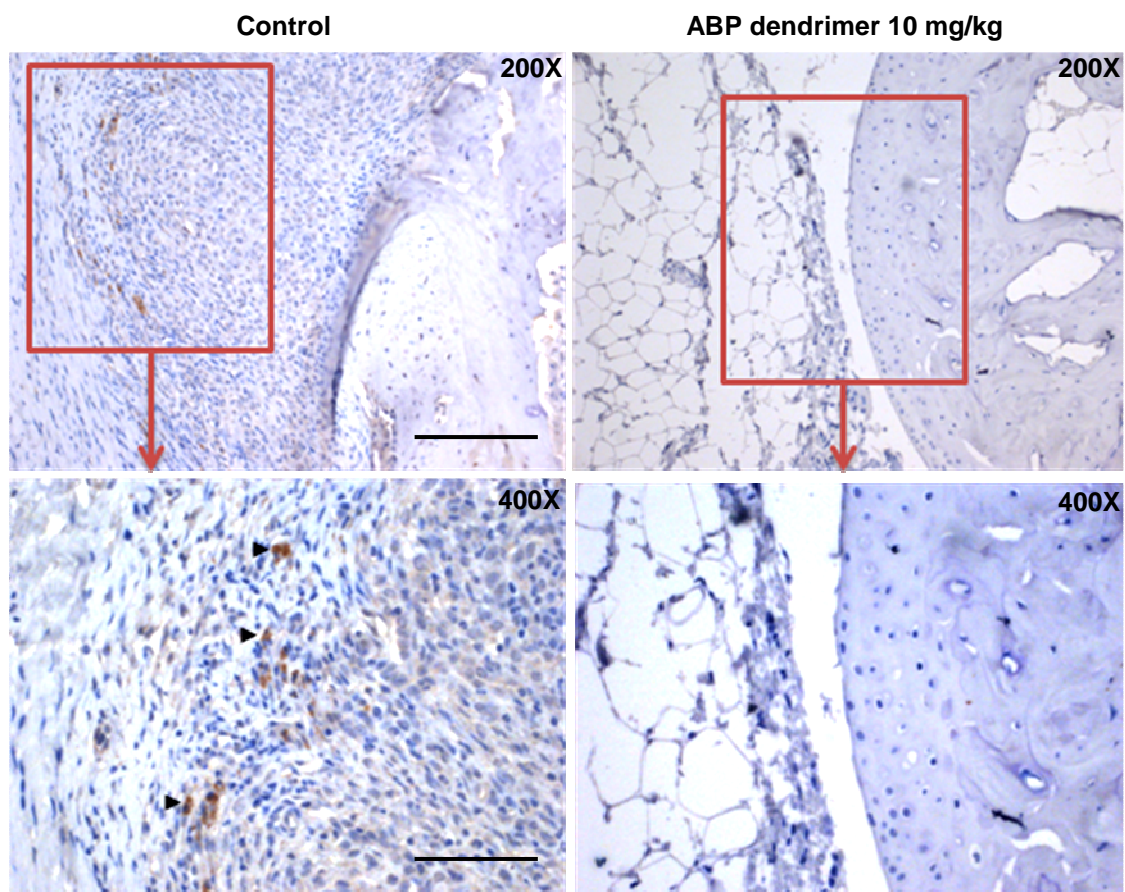


Fig. S1. Dendrimer ABP inhibits IL-17-expressing cells in joints of IL-1ra^{-/-} mice. IL-1ra^{-/-} mice were treated intravenously with 10 mg/kg of dendrimer ABP once per week starting at week 8 until week 20 of age (n = 6). Sections of joints of hind paws were stained for IL-17+ cells. Arrows indicate IL-17+ cells stained in brown. Control: untreated IL-1ra^{-/-} mice. Scale bar for magnification 200X: 14 μ m. Scale bar for magnification 400X: 7 μ m.

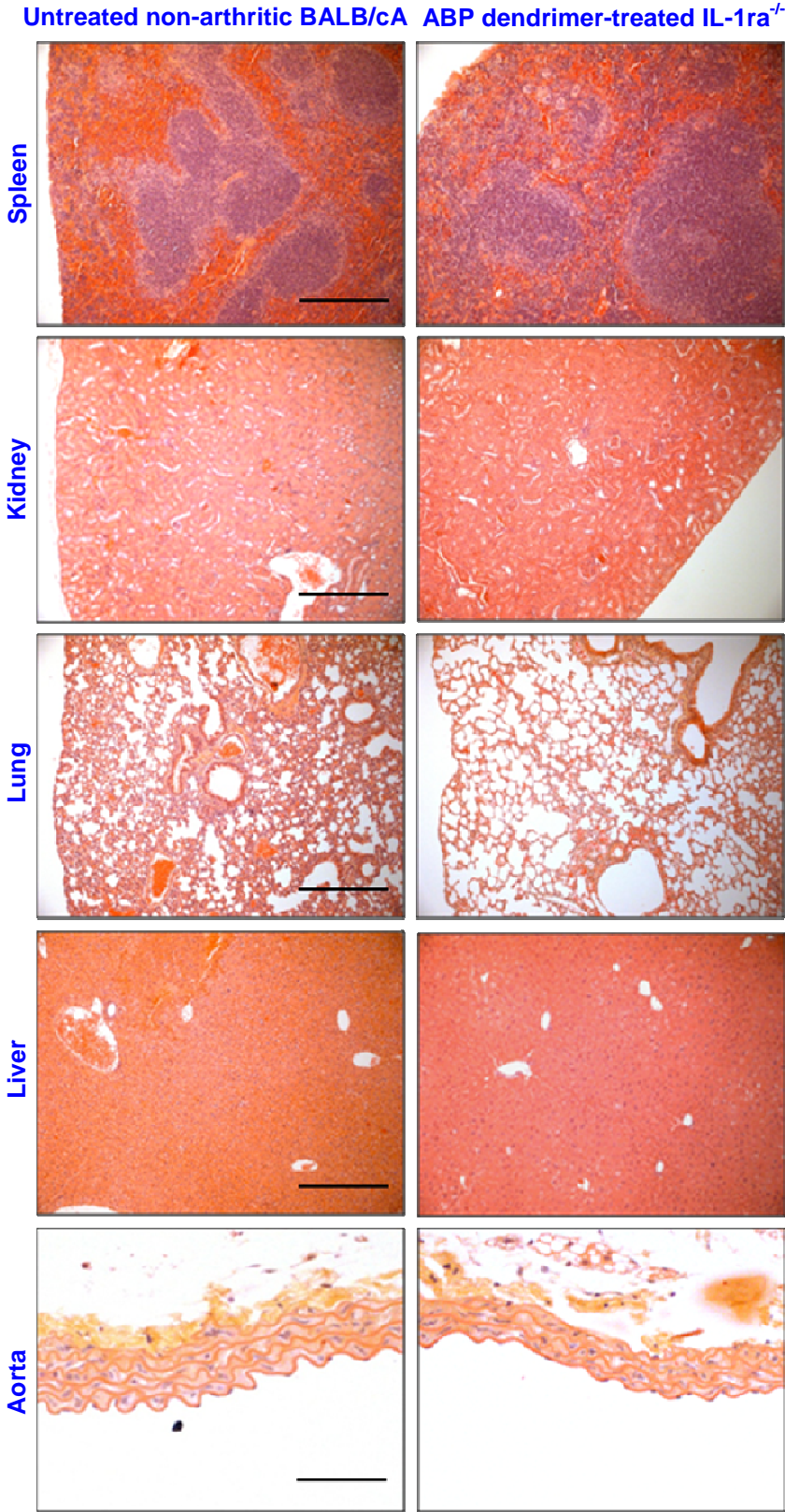


Fig. S2. Dendrimer ABP does not show any off-target effects in mice. IL-1ra^{-/-} mice were treated intravenously with 10 mg/kg of dendrimer ABP once per week starting at week 8 until week 20 of age (n = 6) and compared to untreated, non-arthritis BALB/cA mice (n = 6). H&E staining of spleen, kidney, lung, liver and aorta sections. Scale bar for spleen, kidney, lung, and liver sections (magnification 100X): 20 μ m. Scale bar for aorta sections (magnification 400X): 7 μ m.

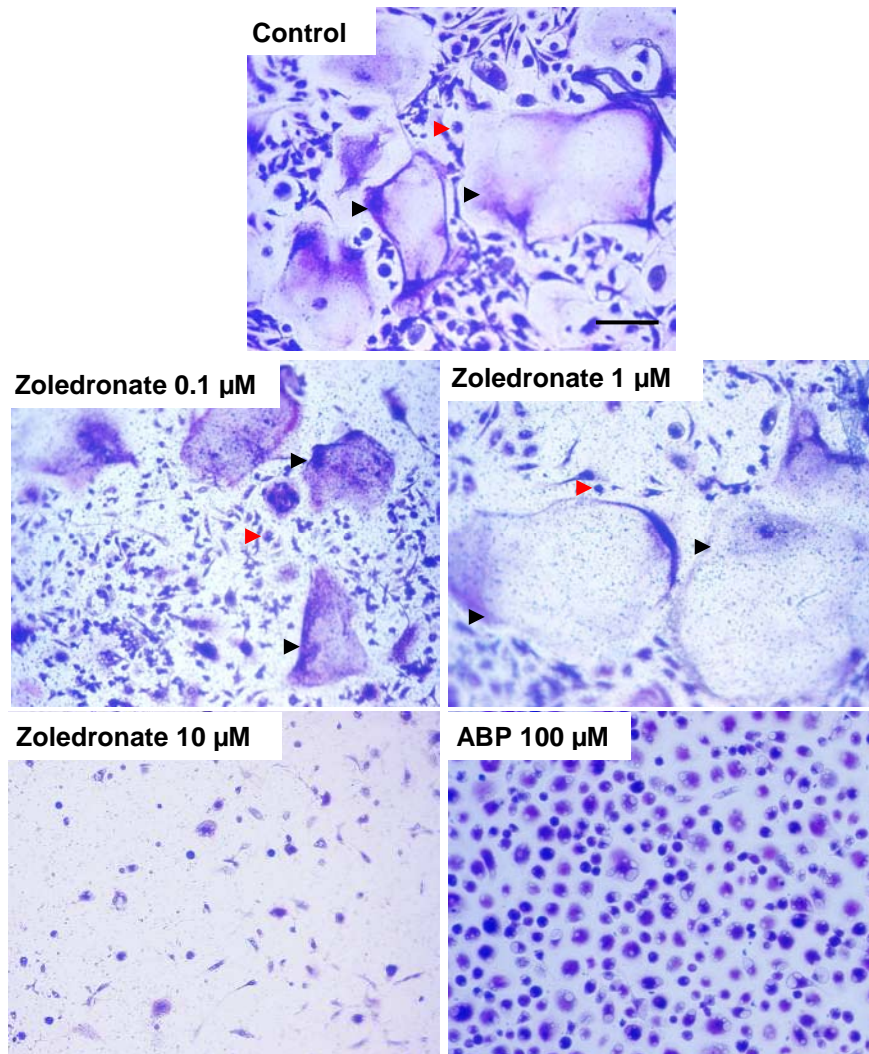


Fig. S3. Zoledronate versus dendrimer ABP effect on osteoclast differentiation and toxicity. TRAP staining of osteoclasts obtained from human monocytes cultured with M-CSF and RANKL showing absence of effect of Zoledronate at 0.1 and 1 μM and toxicity at 10 μM , whereas dendrimer ABP is still efficient at 100 μM . Control: human monocytes treated with M-CSF and RANKL. Black arrows indicate osteoclasts. Red arrows indicate non-differentiated monocytes. Scale bar: 120 μM . Representative of 3 independent experiments.

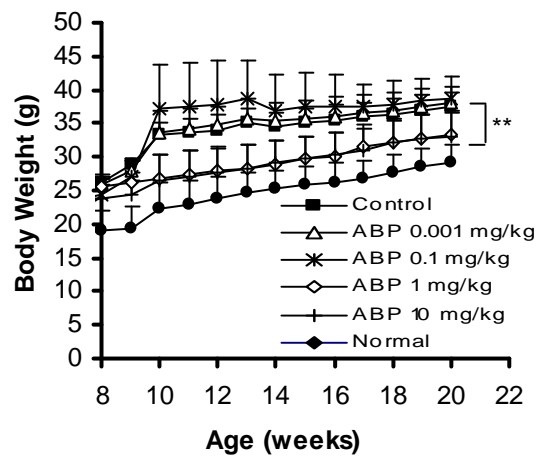


Fig. S4. Dendrimer ABP does not affect the body weight of IL-1ra^{-/-} mice. IL-1ra^{-/-} mice were treated intravenously with dendrimer ABP at doses ranging from 0.001 mg/kg to 10 mg/kg once per week starting at week 8 until week 20 of age (n = 6). Control: arthritic mice. Normal: non-arthritic BALB/cA mice. Values represent mean \pm SD. ** $p < 0.01$ vs control, as calculated using Student's t test.

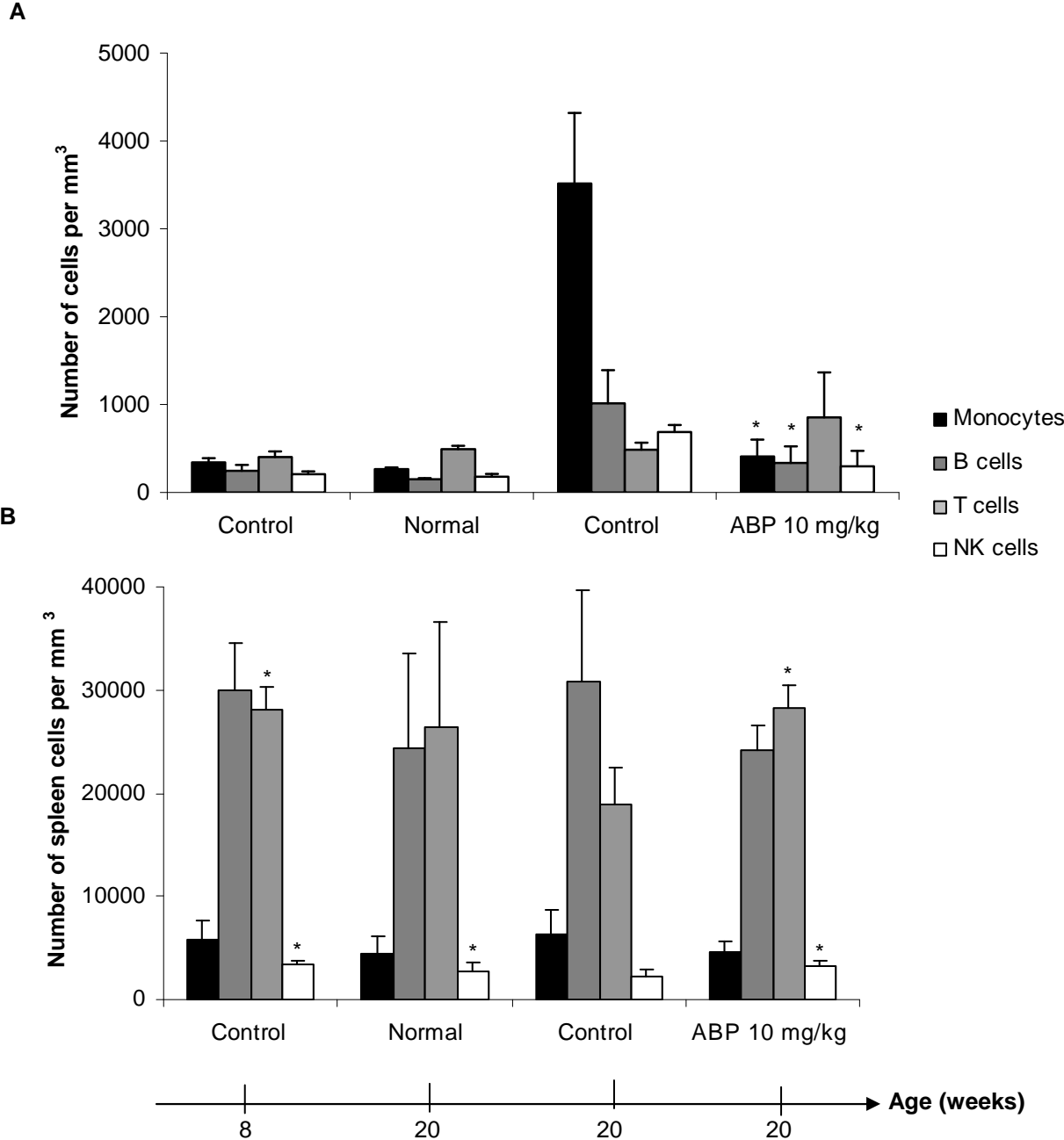


Fig. S5. Dendrimer ABP restores cellular counts in arthritic IL-1ra^{-/-} mice. IL-1ra^{-/-} mice were treated intravenously with 10 mg/kg of dendrimer ABP once per week starting at week 8 until week 20 of age (n = 4). CD11b+ (monocytes), CD19+ (B cells), CD3+ (T cells), and CD49b+ (NK) cells were counted in (A) the whole blood and in (B) a single-cell suspension of splenocytes. Control: arthritic mice. Normal: non-arthritic BALB/cA mice. Bars represent mean ± SD. *p < 0.05 vs respective cells from control at the age of 20 weeks, as calculated using Mann-Whitney test.

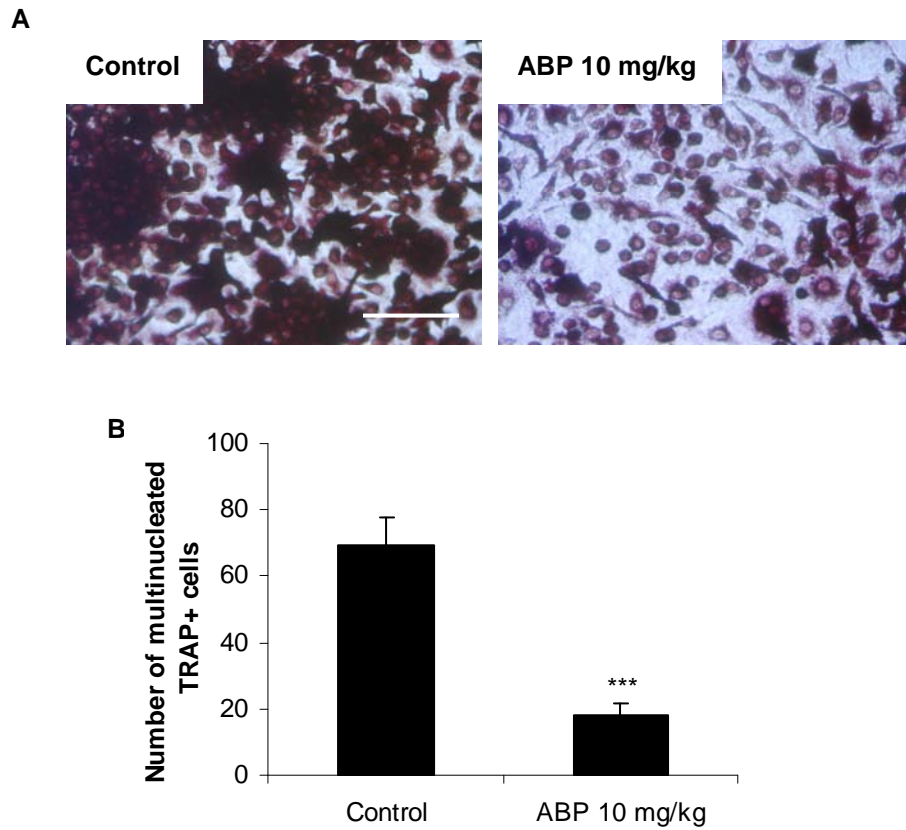


Fig. S6. *Ex vivo* differentiation of osteoclasts is inhibited after treatment of IL-1ra^{-/-} mice with dendrimer ABP. (A) IL-1ra^{-/-} mice were treated intravenously with 10 mg/kg of dendrimer ABP once per week starting at week 8 until week 20 of age (n = 6). Bone marrow precursor cells obtained from femora at week 20 were cultured with M-CSF and RANKL for 8 days and stained for TRAP+ multinucleated cells to identify osteoclasts. Control: bone marrow precursors of monocytes treated with M-CSF and RANKL. Scale bar: 50 μ m. (B) Quantification of TRAP+ multinucleated cells (osteoclasts). Bars represent mean \pm SD. *** p < 0.002 vs control, as calculated using Student's t test.

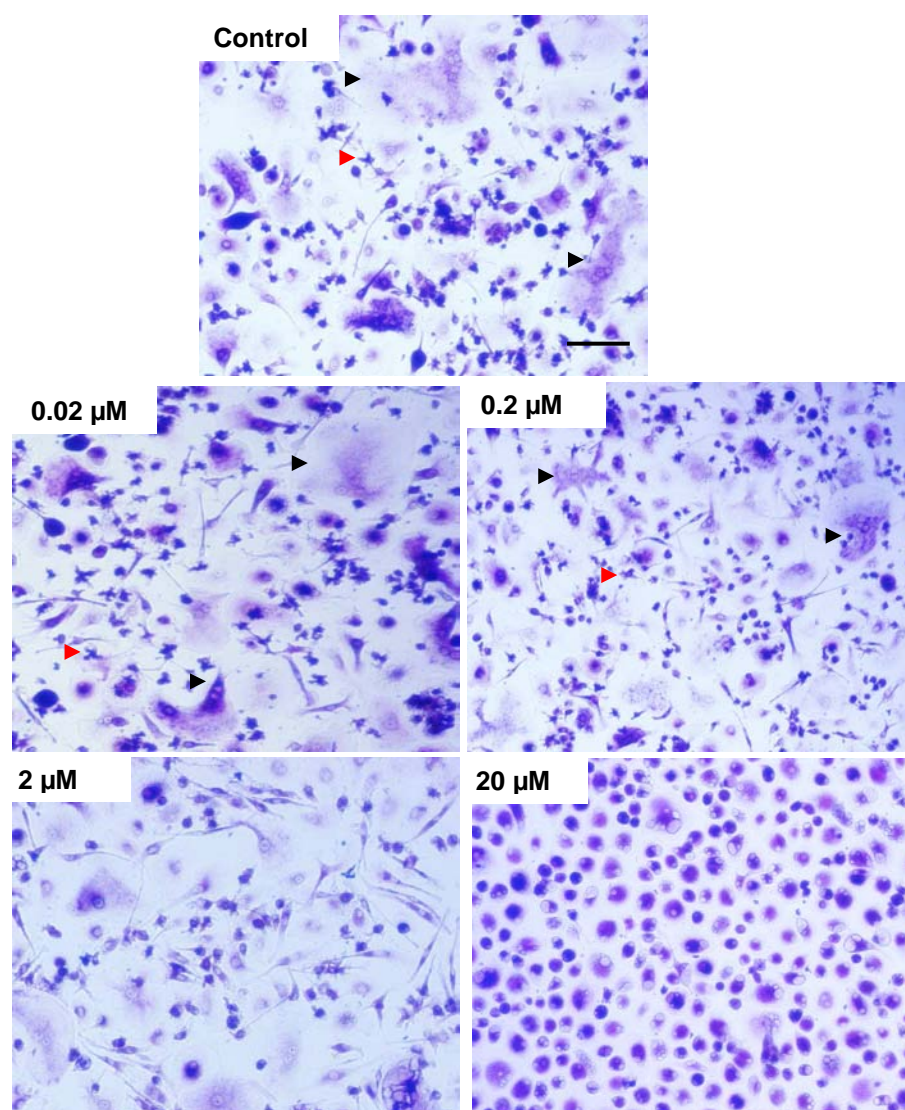
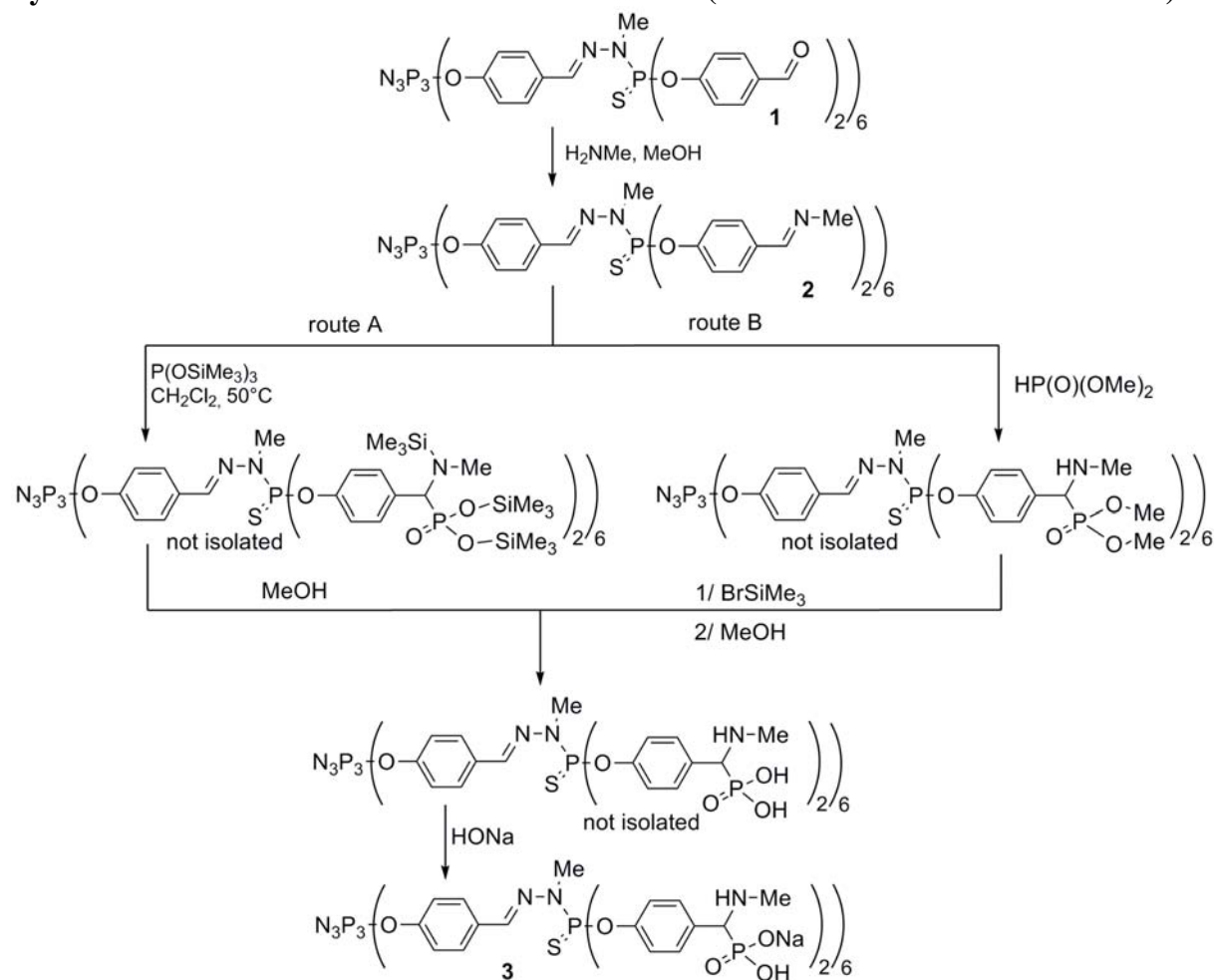


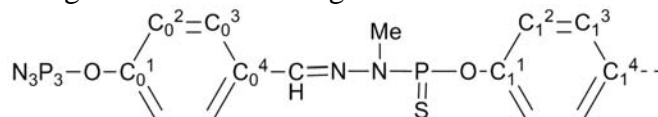
Fig. S7. Dendrimer ABP inhibits trans-differentiation of myeloid dendritic cells into osteoclasts. TRAP staining of osteoclasts obtained from human immature DCs cultured for 15 days with M-CSF and RANKL in the presence of dendrimer ABP at different concentrations (0.02 μM to 20 μM). Human immature DCs were obtained after culture of monocytes for 6 days with GM-CSF (50 ng/mL) and IL-4 (50 ng/mL). Control: human monocytes treated with M-CSF and RANKL. Black arrows indicate osteoclasts. Red arrows indicate non-differentiated dendritic cells. Scale bar: 120 μm . Representative of 3 independent experiments.

Experimental section for chemical syntheses

All manipulations were performed under argon using standard Schlenk techniques. All solvents were distilled from appropriate drying agents. ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ and two-dimensional NMR spectra were recorded on a Bruker 300 (DPX300), or 200 (AC200) MHz spectrometers. Chemical shifts are reported in ppm relative to external standards (TMS for ^1H and ^{13}C and 85% H_3PO_4 for ^{31}P) and coupling constants are given in Hz. All chemicals were purchased from Aldrich.

Synthesis and characterization of dendrimer AMP (dendrimer 3 in the scheme below)**Synthesis of dendrimers 2-3.**

Numbering used for NMR assignments of dendrimers 2 and 3:



Synthesis and characterization of dendrimer 2: To a solution of dendrimer **1**¹ (145 mg, 50.7 μmol) in THF (10 mL) were added methylamine (8M in MeOH, 110 μL , 0.88 mmol.) and 2 g

¹ Launay, N., Caminade, A.M. & Majoral, J.P. Synthesis of bowl-shaped dendrimers from generation 1 to generation 8. *J Organomet Chem* **529**, 51-58 (1997).

of MgSO₄. The suspension was stirred for 24 hours at RT and filtered. The solid was rinsed with 10 mL of THF and the clear solution was concentrated under reduced pressure. The resulting viscous solid was washed with diethylether, then dissolved in 2 mL of THF and precipitated with a large amount of pentane. The resulting solid was filtered and dissolved in dichloromethane, and the solution was filtered through micropore filter and evaporated to dryness to afford **2** as a white solid (95%).

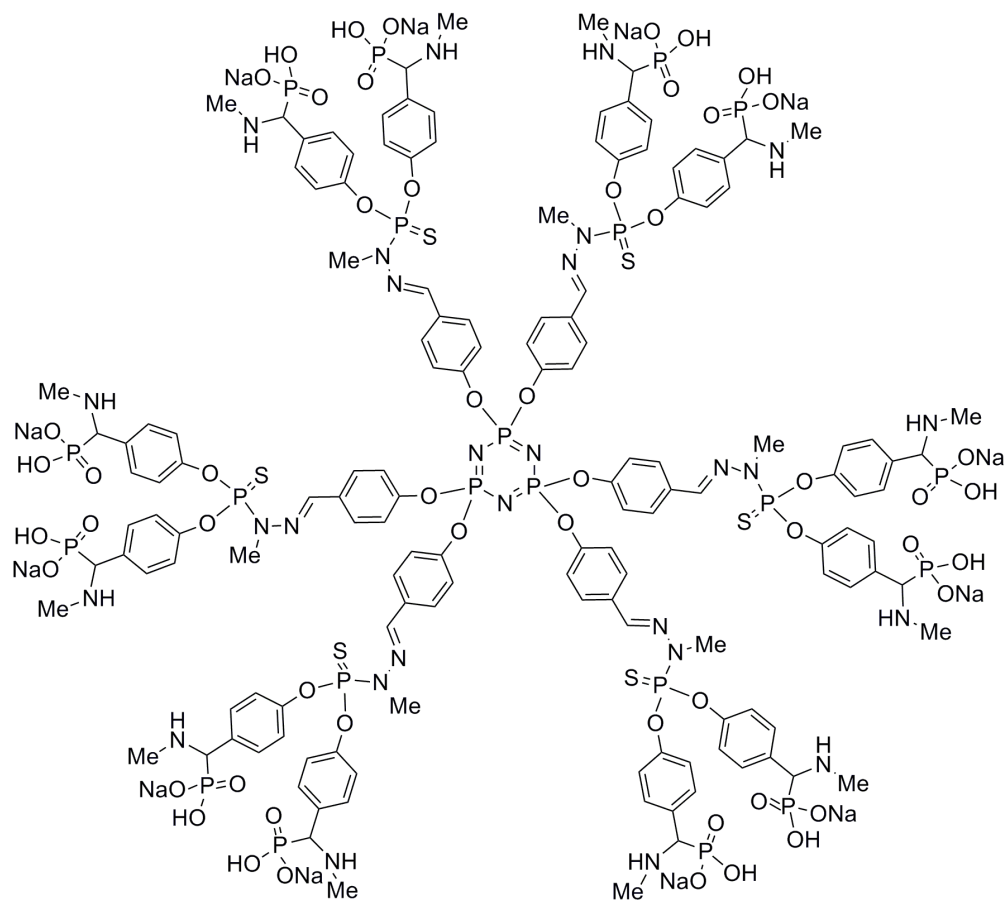
2: ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 81.01 MHz): δ = 11.7 (s, N₃P₃); 65.2 (s, P=S) ppm. ¹H NMR (CDCl₃, 200.13 MHz): δ = 3.24 (d, 18H, ³J_{HP} = 10.4 Hz, NNCH₃); 3.44 (br s, 36H, NMe); 6.97 (d, 12H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, Har); 7.21 (d, 24H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, Har); 7.58 (m, 42H, Har, CH=N); 8.16 (br s, 12H, CH=NMe) ppm. ¹³C {¹H} NMR (CDCl₃, 62.89 MHz): δ = 32.9 (d, ²J_{CP} = 13.0 Hz, NNCH₃); 48.2 (s, NCH₃); 121.6 (d, ²J_{CP} = 3.8 Hz, C₀², C₁²); 128.3 (s, C₀³); 129.2 (s, C₁³); 131.9 (s, C₀⁴); 133.6 (s, C₁⁴); 139.0 (m, CH=N); 151.3 (br s, C₀¹); 152.1 (s, C₁¹); 161.0 (s, CH=NMe) ppm.

Synthesis and characterization of dendrimer 3, route A: To a solution of dendrimer **2** (217 mg, 72.0 μmol.) in CHCl₃ or CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise P(OSiMe₃) (481 μL, 1.44 mmol.) at room temperature. The solution was stirred at 50°C for 72 hours until complete disappearing of the imine (³¹P and ¹H monitoring). The silylated intermediary dendrimer was rapidly analyzed by ³¹P {¹H} NMR, (C₆D₆, 81.01 MHz): δ = 9.0 (s, (O)P(OSiMe₃)₂); 11.6 (s, N₃P₃); 66.5 (s, P=S) ppm. The reaction mixture was cooled to room temperature, concentrated under reduced pressure and quenched with 5 mL of methanol under vigorous stirring. The suspension was stirred for 2 hours at room temperature and concentrated under reduced pressure. The solid residue was washed with distilled water until washings reached pH = 6, the resulting white solid was dried under reduced pressure, washed with diethylether (3x10 mL) and dried to afford the phosphonic acid terminated dendrimer as a white powder.

Route B: 2 mL of dimethylphosphite were added to dendrimer **2** (200 mg, 0.66 μmol) and the solution was stirred at room temperature for 72 hours. The aminodimethylphosphonate terminated dendrimer was precipitated upon addition of a large excess of diethylether in the reaction mixture, filtered off and washed with portions of diethylether (10-20 mL). The resulting solid was dissolved in the minimum amount of THF and precipitated with a large excess of pentane to afford a white powder which was dried under reduced pressure (80 %) and analyzed by ³¹P-{¹H} NMR (CDCl₃, 81.01 MHz): δ = 11.6 (s, N₃P₃); 28.8 (s, (O)P(OMe)₂); 65.7 (s, P=S) ppm. The aminodimethylphosphonate terminated dendrimer (160 mg, 37 μmol) was solubilized in acetonitrile (5 mL) and bromotrimethylsilane was added dropwise at 0°C under vigorous stirring. The solution was stirred at room temperature for 20 hours and the volatiles were removed under reduced pressure at 50°C. The residue was taken up in 20 mL of methanol and stirred for one hour. After solvent removal under reduced pressure the residue was washed with diethylether (2x20 mL) and dried to afford the phosphonic acid terminated dendrimer as a white powder.

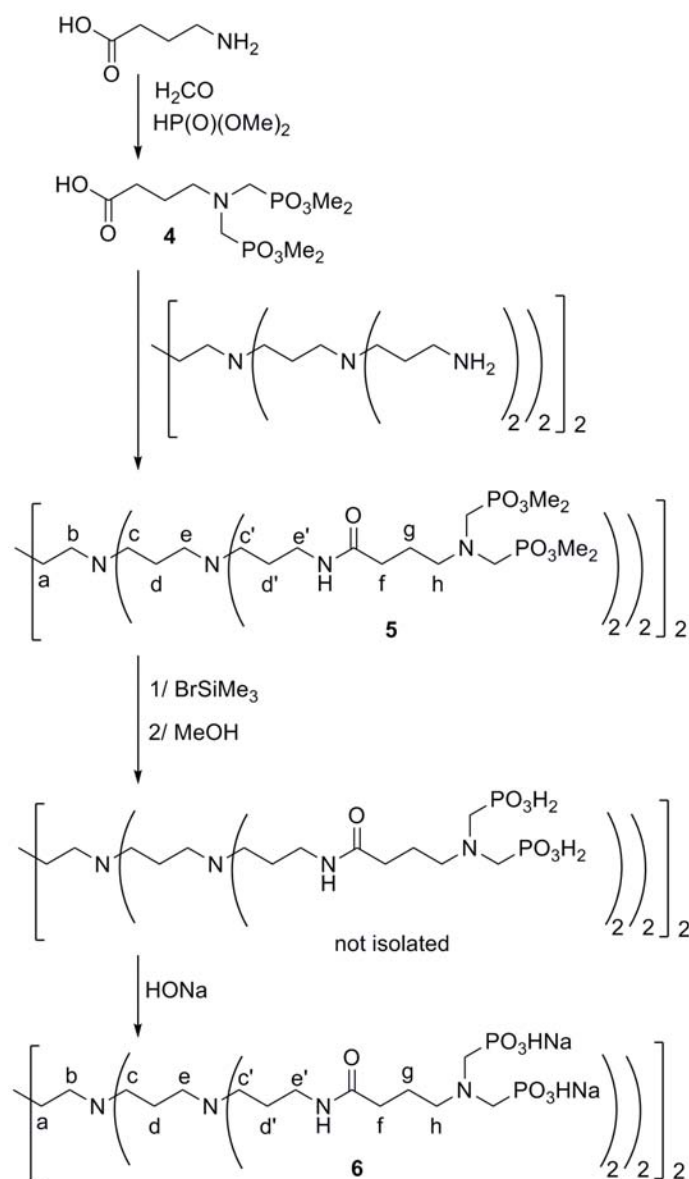
The sodium salt of the corresponding phosphonic acid was immediately prepared by adding a sodium hydroxide solution (0.1966 M, 4.39 mL) to the solid. The solution was filtered on micropore (0.2 μm) and lyophilized to afford **3** as a white powder (92%).

3: ³¹P NMR {¹H} (D₂O/CD₃CN, 81.01 MHz): δ = 12.6 (s, N₃P₃, P=O); 67.6 (s, P=S) ppm. ¹H NMR (D₂O/CD₃CN, 200.13 MHz): δ = 2.34 (br s, 36H, CH₃NH); 3.38 (br s, 18H, NNCH₃); 3.94 (br s, 12H, CH-P); 6.90-8.12 (m, 78H, Har, CH=N) ppm. ¹³C {¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 62.89 MHz): δ = 35.4 (br s, CH₃NH, N-NCH₃); 66.4 (d, ¹J_{CP} = 120.0 Hz, PCH); 124.0 (br s, C₀², C₁²); 131.2 (s, C₀³); 133.4 (s, C₁³); 135.0 (br s, C₀⁴, C₁⁴); 143.0 (br s, CH=N); 152.6 (m, C₀¹, C₁¹) ppm.



Chemical structure of dendrimer **3** (dendrimer AMP).

Synthesis and characterization of dendrimer PPI (dendrimer 6 in the scheme below)



Synthesis of dendrimers 4-6.

The numbering used for NMR assignments is shown on all dendrimers.

Synthesis and characterization of dendrimer 4: To a solution of aminobutyric acid (5g, 48.5 mmol) in THF (20 mL) was added dropwise a solution of formaldehyde (37% in water, 11.1 mL, 150 mmol). The solution was stirred for 30 minutes at room temperature and dimethylphosphite was added dropwise (17.70 mL, 194 mmol). The reaction mixture was stirred for 12 hours at room temperature, and 40 mL of distilled water were added. THF was removed under reduced pressure and the aqueous phase was extracted with CHCl_3 (3x100 mL). The combined organic phases were dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The crude residue was eluted on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95/5, $R_f = 0.35$), and compound 4 was isolated as a white powder after solvent removal (53%).

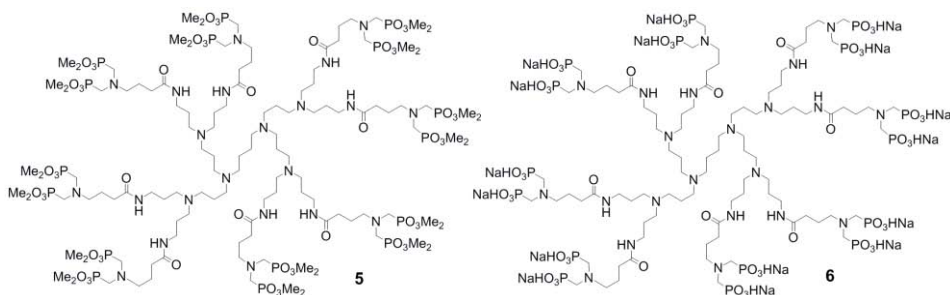
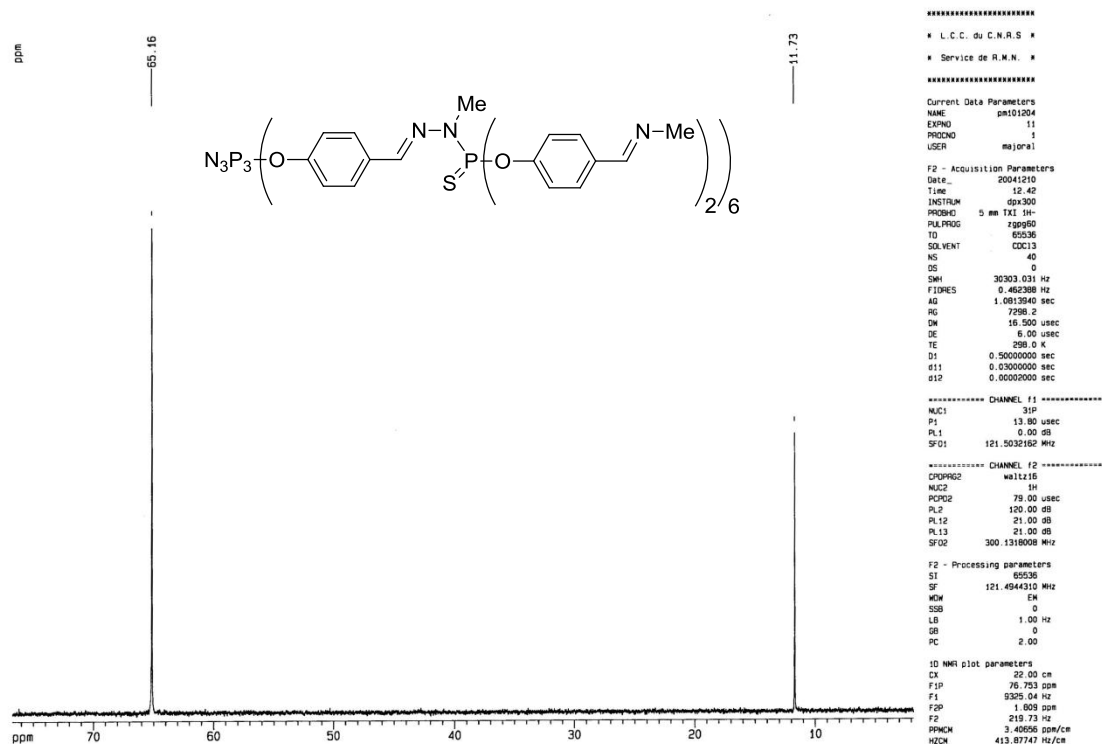
4: ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 81.01 MHz): $\delta = 30.7$ ppm. ^1H NMR (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 1.74$ (qt, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.36 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 2H, HOOC-CH_2); 2.78 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$); 3.10 (d, $^2J_{\text{HP}} = 8.8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-P}$); 3.74 (d, $^3J_{\text{HP}} = 10.7$ Hz, 12H, O-CH_3); 5.10 (br s, 1H, OH) ppm. ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 22.6$ (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 31.1 (s, HOOC-CH_2); 49.3 (dd, $^1J_{\text{CP}} = 158.0$ Hz, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$); 52.8 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-O}$); 56.0 (t, $^3J_{\text{CP}} = 7.5$ Hz, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$); 176.1 (s, COOH) ppm.

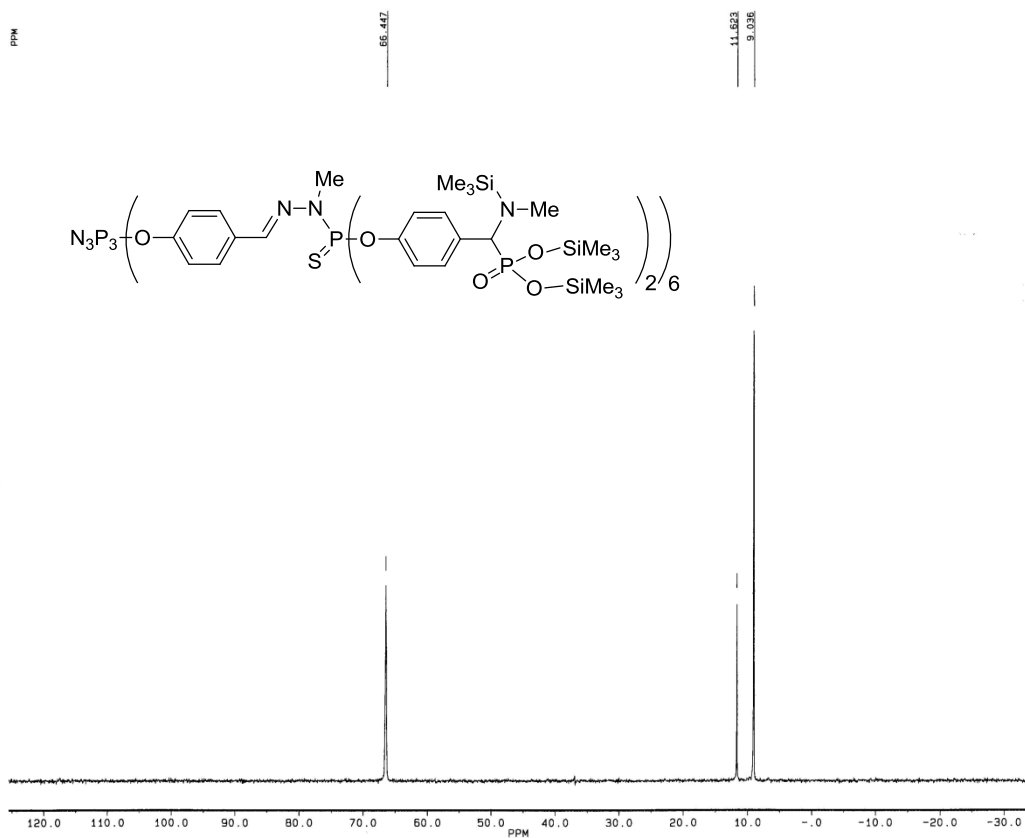
Synthesis and characterization of dendrimer 5: To a solution of **4** (700 mg, 2 mmol) in DMF (4 mL) was added at 0°C HOBt (351 mg, 2.6 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 30 minutes, DCC was added (535 mg, 2.6 mmol) and the reaction mixture was stirred at 0°C for another 30 minutes. The temperature was allowed to reach room temperature and the reaction mixture was stirred for one hour. A white precipitate formed and the suspension was then cooled to 0°C before adding generation 2 DAB-cored PPI dendrimer (131 mg, 0.17 mmol). The reaction mixture was stirred 30 minutes at 0°C and then 20 hours at room temperature. The white precipitate was removed by filtration on Millipore filters (2 μM) and the clear DMF solution was lyophilized. The resulting residue was dissolved in the minimum amount of dichloromethane, precipitated with a large amount of diethylether and filtered off and dried under reduced pressure. This procedure was repeated thrice to afford **5** as a white powder (75%).


5: ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 81.01 MHz): $\delta = 30.4$ ppm. ^1H NMR (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 1.70$ (br s, 44H, Ha, Hd, Hd', Hg); 2.16 (m, 24H, He, Hf); 2.67 (m, 20H, Hb, Hh); 2.87 (m, 16H, He'); 3.05 (d, $^2J_{\text{HP}} = 10$ Hz, 64H, CH_2P); 3.10 (m, 32H, Hc, Hc'); 3.69 (d, $^3J_{\text{HP}} = 10.5$ Hz, 96H, OMe); 7.80 (m, 8H, CONH) ppm. ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50.3 MHz): $\delta = 20.8$ (s, Ca); 23.6 (s, Cg); 24.4 (s, Cd, Cd'); 33.2 (s, Cf); 36.6 (s, Ce'); 49.3 (dd, $^1J_{\text{CP}} = 158.1$ Hz, $^3J_{\text{CP}} = 6.8$ Hz, CH_2P); 50.5 (s, Cc, Cc'); 52.4 (s, Cb, Ce); 52.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, OMe); 56.2 (t, $^3J_{\text{CP}} = 6.5$ Hz, Ch); 173.7 (s, CONH) ppm.

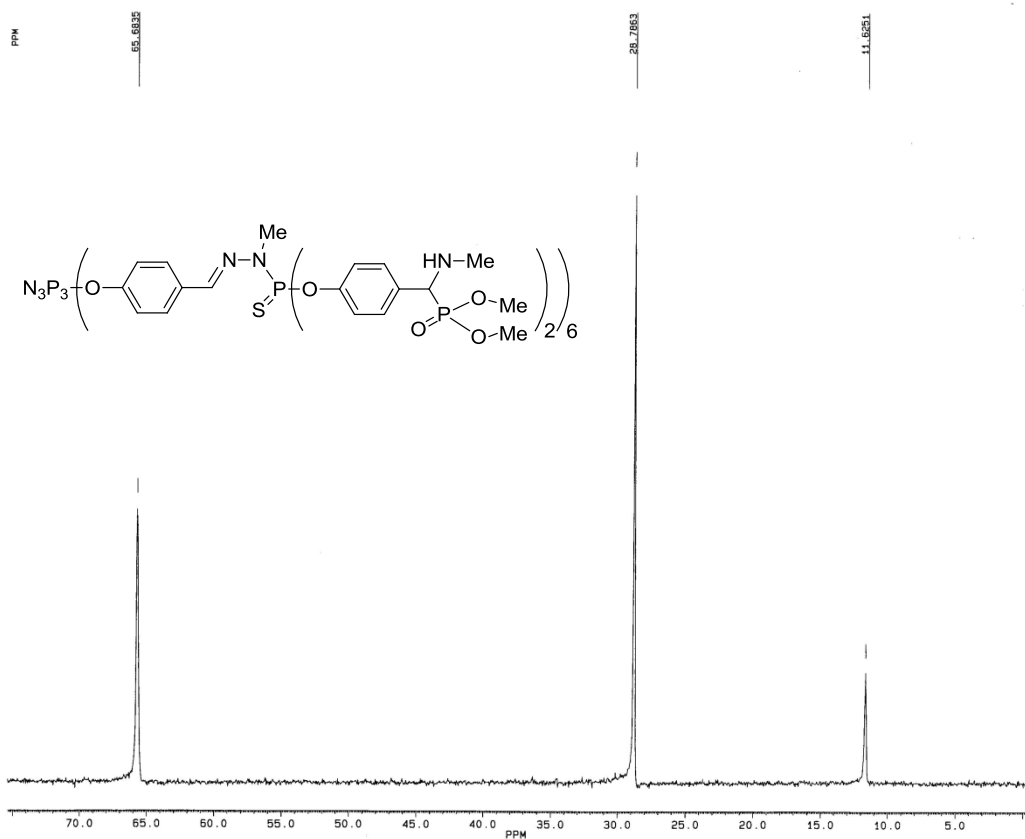
Synthesis and characterization of dendrimer 6: To a solution of **5** (680 mg, 0.2 mmol) in acetonitrile (4 mL) was added dropwise at 0°C bromotrimethylsilane (1.7 mL, 12.8 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 30 minutes, then at room temperature for 15 hours and the volatiles were removed under reduced pressure at 40°C . The residue was taken up in 20 mL of methanol and stirred for one hour. After solvent removal under reduced pressure the residue washed with THF/diethylether (1/9, 2x20 mL) and dried to afford the phosphonic acid terminated dendrimer as a white powder (75%). ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COCD}_3$, 3/1, 81.01 MHz) $\delta = 10.9$ ppm. The sodium salt of the corresponding phosphonic acid was immediately prepared by adding a sodium hydroxide solution (0.1966 M, 12.3 mL) to the solid. The solution was filtered on micropore (0.2 μm) and lyophilized to afford **6** as a white powder (65%, two steps).


6: ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COCD}_3$, 3/1, 81.01 MHz) $\delta = 10.1$ ppm. ^1H NMR (CDCl_3 , 200.1 MHz): $\delta = 1.84\text{-}2.25$ (m, 44H, Ha, Hd, Hd', Hg); 2.42 (m, 24H, He, Hf); 3.20-3.60 (m, 112H, Hb, Hc, Hc', He', Hh); 3.43 (d, $^2J_{\text{HP}} = 12\text{Hz}$, 64H, CH_2P) ppm. ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COCD}_3$, 3/1, 50.3 MHz) $\delta = 21.7$ (s, Ca); 22.8 (s, Cg); 25.8 (s, Cd, Cd'); 35.2 (s, Cf); 39.1 (s, Ce'); 52.4 (s, Cc, Cc'); 52.9 (s, Cb, Ce); 55.2 (d, $^1J_{\text{CP}} = 129.4$ Hz, CH_2P); 58.8 (s, Ch); 177.7 (s, CONH) ppm.

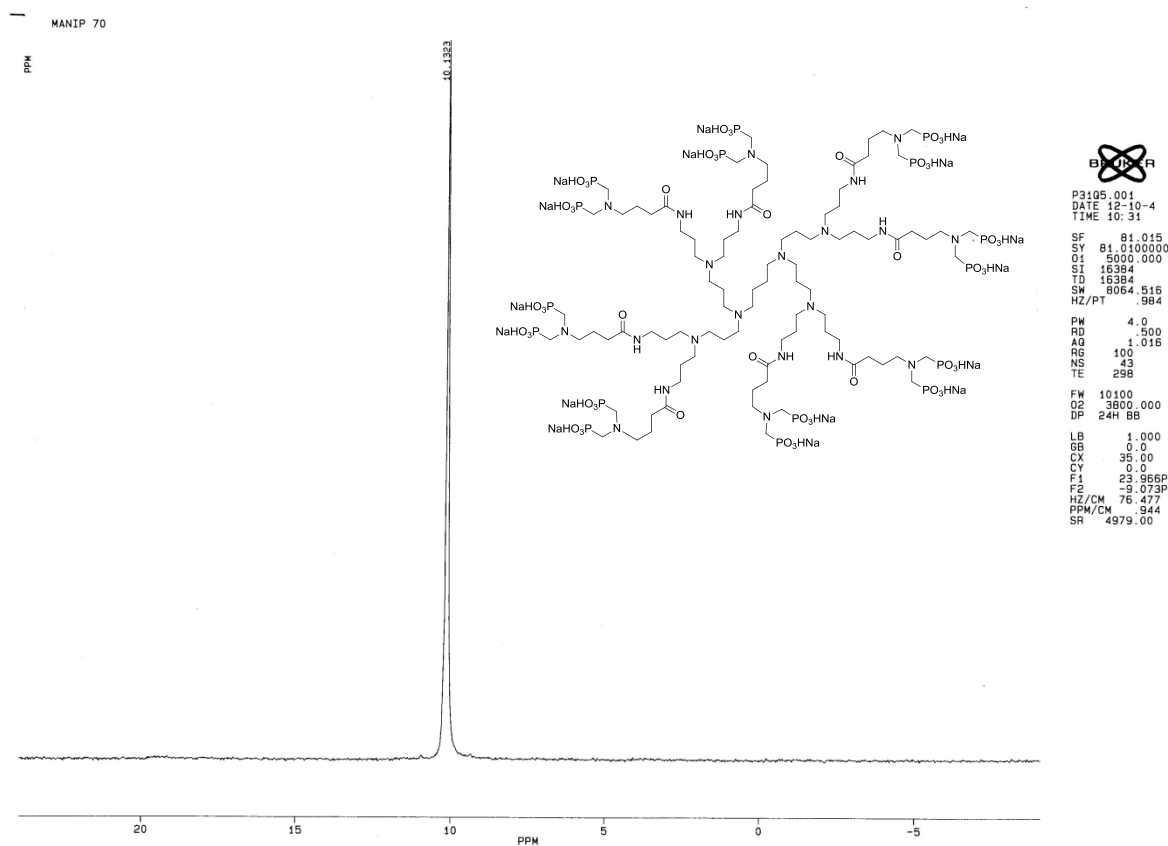
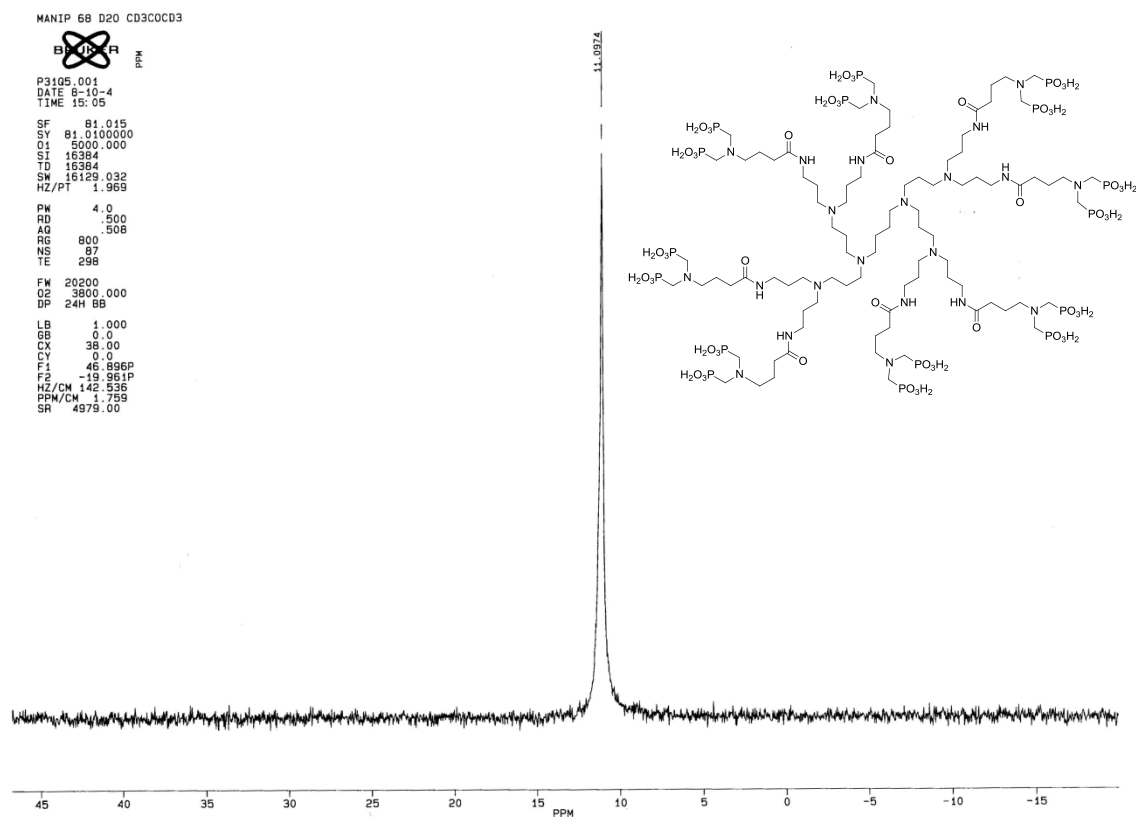
³¹P NMR spectra of all compounds




 P3105.001
 DATE 20-12-4
 TIME 12:06
 SF 81.015
 SY 81.0100000
 O1 5000.000
 SI 16384
 TD 16384
 SW 23809.524
 HZ/PT 2.906
 PW 4.0
 RD .200
 AQ .344
 RG 200
 NS 145
 TE 298
 FW 29800
 O2 3300.000
 DP 24H BB
 LB 1.000
 GB 0.0
 CX 35.00
 CY 0.0
 F1 125.481P
 F2 -34.077P
 HZ/CM 369.283
 PPM/CM 4.556
 SR 4770.00




 P3105.001
 DATE 4-11-4
 TIME 12:57
 SF 81.015
 SY 81.0100000
 O1 5000.000
 SI 16384
 TD 16384
 SW 23809.524
 HZ/PT 2.906
 PW 4.0
 RD .100
 AQ .344
 RG 160
 NS 127
 TE 298
 FW 29800
 O2 3300.000
 DP 24H BB
 LB 1.000
 GB 0.0
 CX 35.00
 CY 0.0
 F1 75.378P
 F2 -355P
 HZ/CM 175.300
 PPM/CM 2.164
 SR 4773.00



RESULTATS COMPLEMENTAIRES

I. Exploration du potentiel anti-arthritique et anti-inflammatoire du dendrimère ABP

I.1 Résultats

I.1.1 Paramètres d'administration du dendrimère ABP

I.1.1.1 Fréquence d'injection du dendrimère ABP

Afin de déterminer la fréquence à laquelle le dendrimère ABP devrait être injecté, nous avons traité des souris *IL-1ra*^{-/-} âgées de 8 semaines avec une dose de 1 mg/kg. Cette dose inhibe le gonflement des articulations et le score d'arthrite mais l'effet du dendrimère n'est maintenu que pendant une semaine. A la 2^{ème} semaine, l'arthrite évolue. Nous avons donc injecté le dendrimère ABP à une dose plus importante de 10 mg/kg, cette dose étant efficace pour supprimer totalement l'arthrite chez les souris *IL-1ra*^{-/-} au bout de 6 semaines de traitement hebdomadaire. Il est montré que l'effet de cette dose est maintenu plus longtemps, à savoir 2 semaines. En effet, à la 3^{ème} semaine après cette injection l'arthrite développée par les souris *IL-1ra*^{-/-} reprend. Des injections répétées du dendrimère ABP à chaque reprise de l'arthrite pendant 12 semaines de traitement permettent de stabiliser l'inflammation et de maintenir un score arthritique très faible (Figure 32).

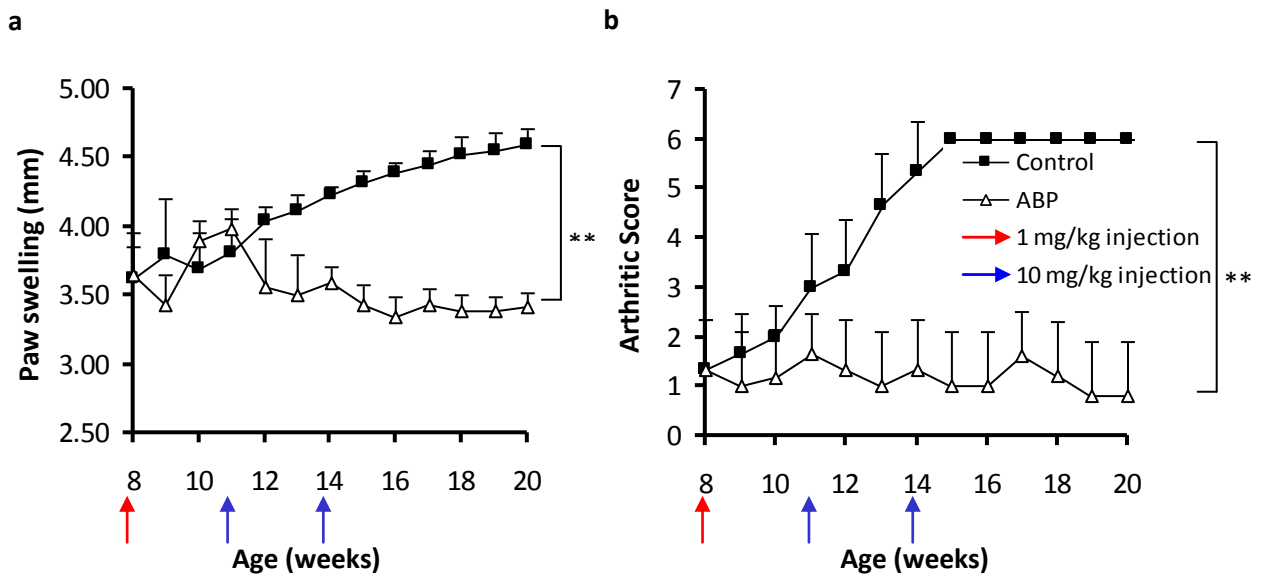


Figure 32 : Fréquence d'injection du dendrimère ABP (a) Evolution du score d'arthrite chez les souris *IL-1ra*^{-/-} (b) Evolution du gonflement des articulations des souris *IL-1ra*^{-/-}. (n = 6) Control : souris *IL-1ra*^{-/-} non traitées ; les flèches indiquent les injections en intraveineuse dans les sinus rétro-orbitaires. ***p* < 0.01 versus control.

Il est également important de noter que lorsque nous avons évalué la fréquence à laquelle le dendrimère ABP devait être injecté, le score d'arthrite établi atteint un maximum de 6. En effet, cette expérience a été réalisée sur la 1^{ère} génération de souris *IL-1ra*^{-/-} chez laquelle l'arthrite ne se

développait que sur les pattes arrières. A partir de la 3^{ème} génération, nous avons commencé à observer le développement de la maladie sur les 4 pattes. Par conséquent, nous avons étendu le score aux pattes avant ce qui explique le fait que dans les autres expériences décrites, nous avons établi un score d'arthrite qui atteint un maximum de 12.

I.1.1.2 Administration du dendrimère ABP par voie orale

Nous avons montré que le dendrimère ABP injecté de façon hebdomadaire par voie intraveineuse à une dose de 10 mg/kg supprime totalement l'arthrite développée spontanément chez les souris *IL-1ra*⁻⁴¹⁸. Cette suppression intervient au bout de 6 semaines de traitement.

Afin de déterminer si le dendrimère ABP pouvait être administrer par voie orale et s'il était aussi efficace que lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse, nous avons traité des souris *IL-1ra*^{-/-} âgées de 8 semaines par gavage au dendrimère ABP à une dose de 10 mg/kg de façon hebdomadaire pendant 12 semaines. Le gonflement des articulations ainsi que le score témoignant de l'évolution de l'arthrite commencent à régresser au bout de 2 semaines de traitement. L'arthrite est alors complètement supprimée au bout de 11 semaines (Figure 33).

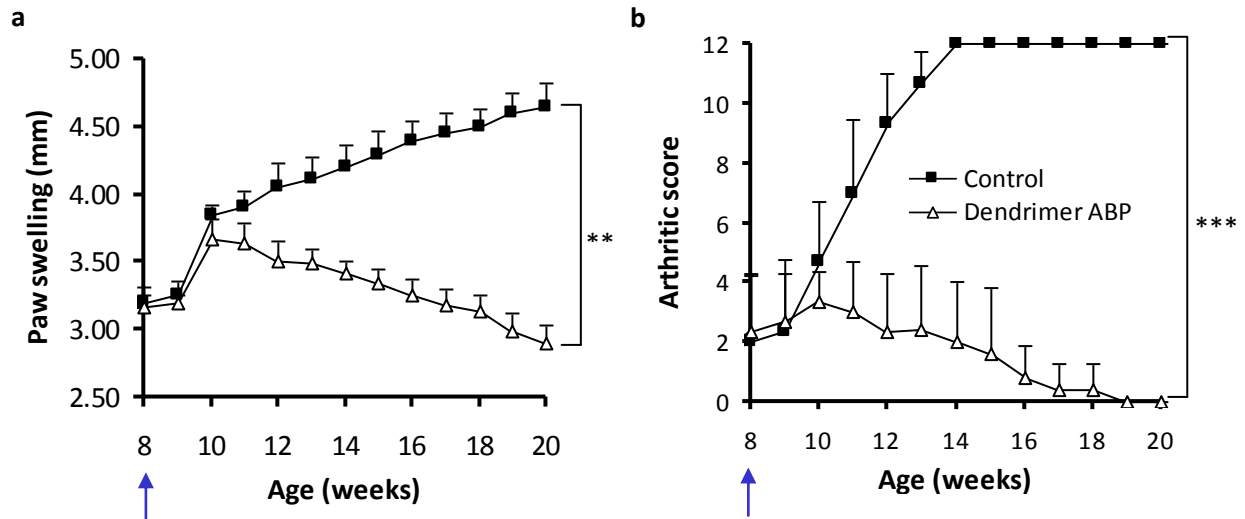


Figure 33 : Inhibition de l'arthrite par le dendrimère ABP administré par voie orale (a) Evolution du score d'arthrite chez les souris *IL-1ra*^{-/-} (b) Evolution du gonflement des articulations des souris *IL-1ra*^{-/-}. (n = 6) Control : souris *IL-1ra*^{-/-} non traitées ; la flèche indique le début du traitement. ***p* < 0.01, ****p* < 0.002 versus control.

I.1.2 Exploration du potentiel anti-arthritique du dendrimère ABP

I.1.2.1 Inhibition de l'infiltrat inflammatoire

Nous avons montré que la membrane synoviale des souris *IL-1ra*^{-/-} traitées au dendrimère ABP à 10 mg/kg pendant 12 semaines à partir de l'âge de 8 semaines ne présente ni hyperplasie ni infiltration par des cellules inflammatoires, contrairement à la membrane synoviale des souris arthritiques non traitées⁴¹⁸. Afin de déterminer l'action du dendrimère ABP sur chaque type cellulaire constituant l'infiltrat inflammatoire que présente la membrane synoviale des souris *IL-1ra*^{-/-}, plusieurs marquages ont été réalisés sur des coupes d'articulations de souris *IL-1ra*^{-/-} traitées ou non au dendrimère ABP. Les résultats obtenus montrent que l'infiltrat inflammatoire qui caractérise la membrane synoviale des souris *IL-1ra*^{-/-} est majoritairement constitué de polynucléaires neutrophiles (cellules CD45+) et de macrophages (cellules F4/80+) avec une plus faible proportion de lymphocytes (cellules CD3+). Le traitement au dendrimère ABP affecte l'ensemble de ces populations cellulaires de sorte qu'aucun marquage n'a été observé sur les coupes des articulations des souris *IL-1ra*^{-/-} traitées (Figure 34).

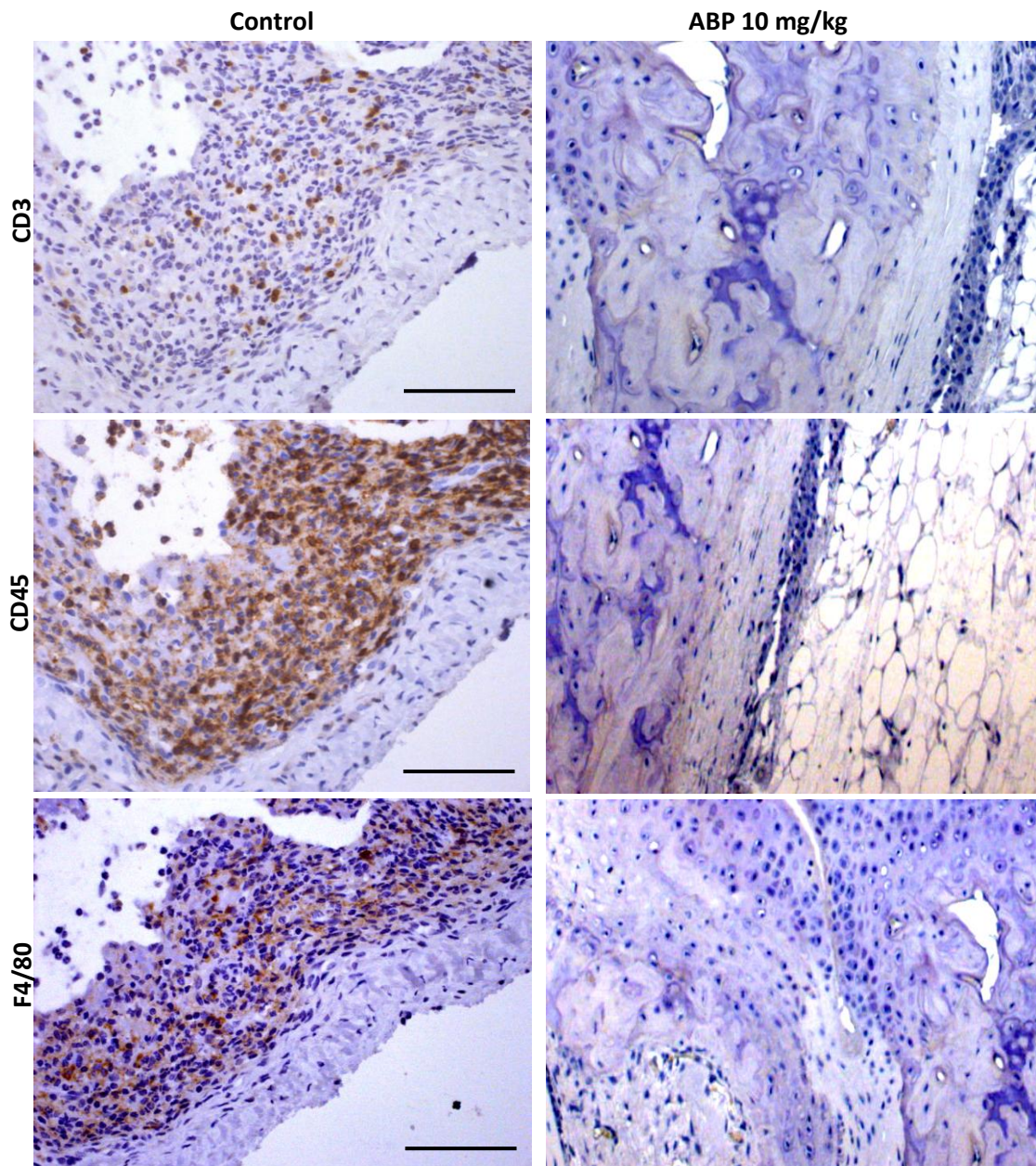


Figure 34 : Suppression de l'infiltrat inflammatoire par le dendrimère ABP. Les souris *IL-1ra^{-/-}* ont été traitées de façon hebdomadaire pendant 12 semaines à partir de l'âge de 8 semaines par le dendrimère ABP à 10 mg/kg injecté en intraveineuse (n = 6). Un marquage des cellules CD3+ (marron), CD45+ (marron) et F4/80+ (marron) a été réalisé ensuite sur des coupes d'articulation (Echelle : 7 μ m).

1.1.2.2 Inhibition de l'inflammation dans le modèle induit

Afin de tester l'effet du dendrimère ABP sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans un autre modèle d'arthrite, nous avons induit l'arthrite chez des souris BALB/cA naïves par transfert de sérum de souris K/BxN. La répétition d'un tel transfert permet d'obtenir une inflammation très importante qui provoque la résorption osseuse⁴¹⁹. Les résultats obtenus montrent que le dendrimère ABP injecté tous les 3 jours à une dose de 10 mg/kg prévient l'inflammation induite par le transfert de sérum arthritogène, puisque le gonflement des articulations se stabilise à une épaisseur de l'ordre de 2.9 mm, sachant que les pattes des souris BALB/cA naïves ont une épaisseur de l'ordre de 2.8 mm. De plus, les souris traitées au dendrimère ABP répondent de moins en moins au transfert de sérum arthritogène puisque le score d'arthrite établi après chaque transfert est de moins en moins important en comparaison avec les souris non traitées qui atteignent un plateau d'inflammation (Figure 35).

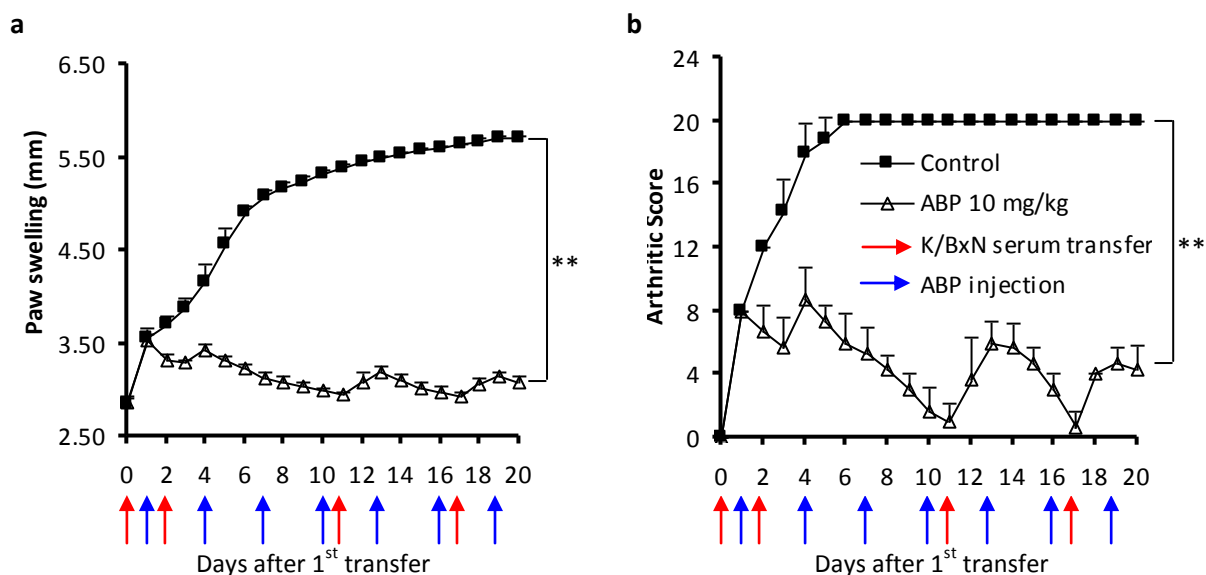


Figure 35 : Le dendrimère ABP prévient l'arthrite induite par des transferts répétés de sérum arthritogène. **(a)** Evolution du score d'arthrite chez les souris BALB/cA naïves transférées par le sérum de souris K/BxN **(b)** Evolution du gonflement des articulations des souris BALB/cA naïves transférées par le sérum de souris K/BxN (n = 6). Control : souris BALB/cA naïves transférées par le sérum de souris K/BxN tous les 7 jours; les flèches rouges indiquent les injections intrapéritonéales de sérum de souris K/BxN ; les flèches bleues indiquent les injections intraveineuses de dendrimère ABP à 10 mg/kg dans les sinus rétro-orbitaires. ***p* < 0.01 versus control.

L'effet du dendrimère ABP sur l'inflammation induite par le transfert de sérum arthritogène est confirmé par les dosages des cytokines sériques qui montrent que les souris traitées par le dendrimère ABP ont les mêmes taux de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-17 que les souris BALB/cA naïves (Figure 36).

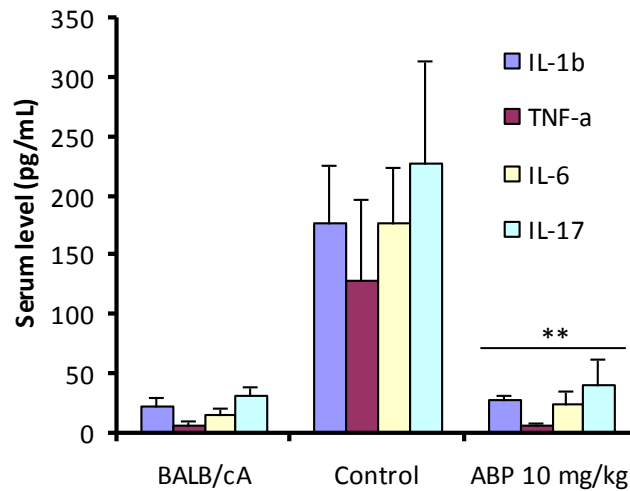


Figure 36 : Le dendrimère ABP inhibe l'inflammation induite par des transferts répétés de sérum arthritogène. Les dosages des cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-17 ont été réalisés par ELISA sur le sérum prélevé à J20 après le premier transfert (n = 6). Control : souris BALB/cA naïves transférées par le sérum de souris K/BxN tous les 7 jours. ** $p < 0.01$ versus control.

I.2 Matériels & Méthodes

I.2.1 Le dendrimère ABP

Le dendrimère ABP est synthétisé par l'équipe du Dr. Anne-Marie Caminade (UPR 8241 _ Laboratoire de Chimie de Coordination _ Toulouse).

I.2.2 Expérimentation animale

Des souris *IL-1ra*^{-/-} âgées de 8 semaines sont traitées par injection intraveineuse du dendrimère ABP à 1 et 10 mg/kg dans les sinus rétro-orbitaires à chaque poussée d'arthrite. Les souris sont par la suite euthanasiées à l'âge de 20 semaines par dislocation cervicale et leurs articulations sont prélevées.

Des souris *IL-1ra*^{-/-} âgées de 8 semaines sont traitées par le dendrimère ABP à 10 mg/kg administré par voie orale de façon hebdomadaire pendant 12 semaines. Les souris sont par la suite euthanasiées à l'âge de 20 semaines par dislocation cervicale et leurs articulations sont prélevées.

Pour ces 2 protocoles, le gonflement des articulations est mesuré de façon hebdomadaire à l'aide d'un pied à coulisse digital et un score est établi sur la base de l'évolution de l'arthrite (0 : patte normale ; 1 : gonflement faible et / ou rougeur ; 2 : gonflement évident avec rougeur ; 3 : arthrite sévère).

Dans le cas du modèle d'arthrite induite par transfert intrapéritonéal de 200 µL de sérum de souris K/BxN à J0 et J2 à des souris BALB/cA mâles âgées de 9 semaines (Charles River), des injections intraveineuses dans les sinus rétro-orbitaires du dendrimère ABP à 10 mg/kg sont répétées tous les 3 jours à partir de J1. Deux autres transferts de 200 µL de sérum de souris K/BxN sont réalisés à J11 et J17. Le gonflement des articulations est mesuré de façon journalière à l'aide d'un pied à coulisse digital et un score est établi sur la base de l'évolution de l'arthrite (0 : patte normale ; 1 : gonflement faible ; 2 : gonflement évident ; 3 : gonflement évident avec rougeur ; 4 : arthrite sévère ; 5 : arthrite sévère et immobilité de l'animal). A J20, une ponction cardiaque est pratiquée après anesthésie puis les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale.

I.2.3 Immunohistochimie

Les articulations fixées et décalcifiées dans l'EDTA à 10% sont incluses dans des blocs de paraffine. Un marquage des cellules CD3+ (*AbD Serotec*), F4/80+ (*AbD Serotec*), CD45+ (*BD Pharmingen*) et 5-Lipoxygénase+ (*Cell Signaling*) est réalisé sur des coupes de 4 µm.

I.2.4 Dosage des cytokines sériques

Le sang prélevé par ponction cardiaque à des souris BALB/cA transférées par le sérum de souris K/BxN est incubé à 37 °C pendant 15 min puis centrifugé à 13000 g pendant 6 min. La concentration des cytokines sériques est analysée ensuite sur le sérum obtenu en utilisant les kits Mouse Ready-SET-Go! ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) pour l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-17 (*eBioscience*).

I.2.5 Analyse statistique

Les résultats obtenus représentent la moyenne \pm SD. Ces résultats sont analysés par le logiciel Stata Statistical Software (StataCorp) et sont considérés comme significatifs avec un test Mann-Witney si $p < 0.05$.

II. Réponses cellulaires au dendrimère ABP

II.1 Résultats

Réponse des DCs au dendrimère ABP

Les ostéoclastes peuvent être formés *in vitro* selon 2 processus différents :

- Sous l'effet de M-CSF et de RANKL, les monocytes sanguins circulants se différencient en ostéoclastes : il s'agit du processus de **différenciation**.
- Sous l'effet de GM-CSF et d'IL-4, les monocytes sanguins circulants se différencient en DCs immatures qui se différencient à leur tour en ostéoclastes sous l'effet de M-CSF et de RANKL : il s'agit du processus de **trans-différenciation**⁴²⁰.

Nous avons précédemment montré que le dendrimère ABP inhibe de manière efficace aussi bien la différenciation des monocytes en ostéoclastes que la trans-différenciation des DCs immatures en ostéoclastes. Cette inhibition se traduit dans le cas des ostéoclastes formés à partir de monocytes sanguins circulants par la diminution de leur capacité à résorber la matrice osseuse *in vitro*⁴¹⁸. Nous avons alors évalué par la suite l'effet du dendrimère ABP sur l'activité de résorption des ostéoclastes formés à partir des DCs immatures et nous avons comparé cette activité à celle des ostéoclastes provenant des monocytes sanguins. Ainsi, à partir des PBMC de donneurs sains, nous avons isolé les monocytes et l'incubation de ces monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4 nous a permis de générer près de 85% de DCs immatures (Figure 37).

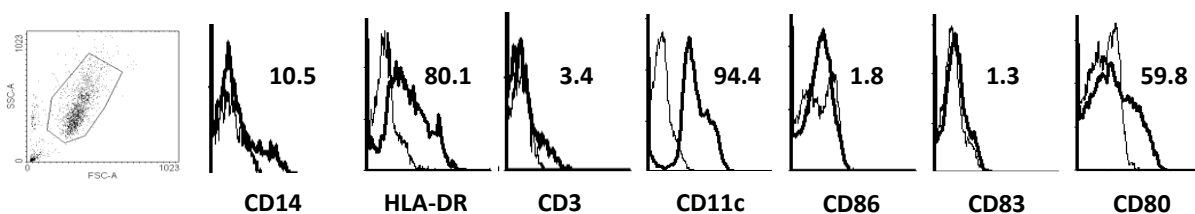


Figure 37 : Phénotype des DCs immatures. Trait épais : marquage ; trait fin : Contrôle isotypique. Le rapport des mfi (mfi marquage / mfi contrôle isotypique) est rapporté sur chaque graphe

Nos résultats montrent que le dendrimère ABP inhibe plus fortement la formation des ostéoclastes obtenus par différenciation des monocytes sanguins que la formation des ostéoclastes obtenus par trans-différenciation des DCs immatures. D'un point de vue activité de résorption, cette différence de sensibilité se traduit par un effet seuil à 0.02 μM de la capacité du dendrimère à inhiber la résorption osseuse due à l'activité des ostéoclastes issus de DCs immatures. Ceci implique qu'une concentration du dendrimère ABP nettement plus forte que 20 μM devrait permettre une inhibition totale de l'activité des ostéoclastes issus de DCs immatures (Figure 38).

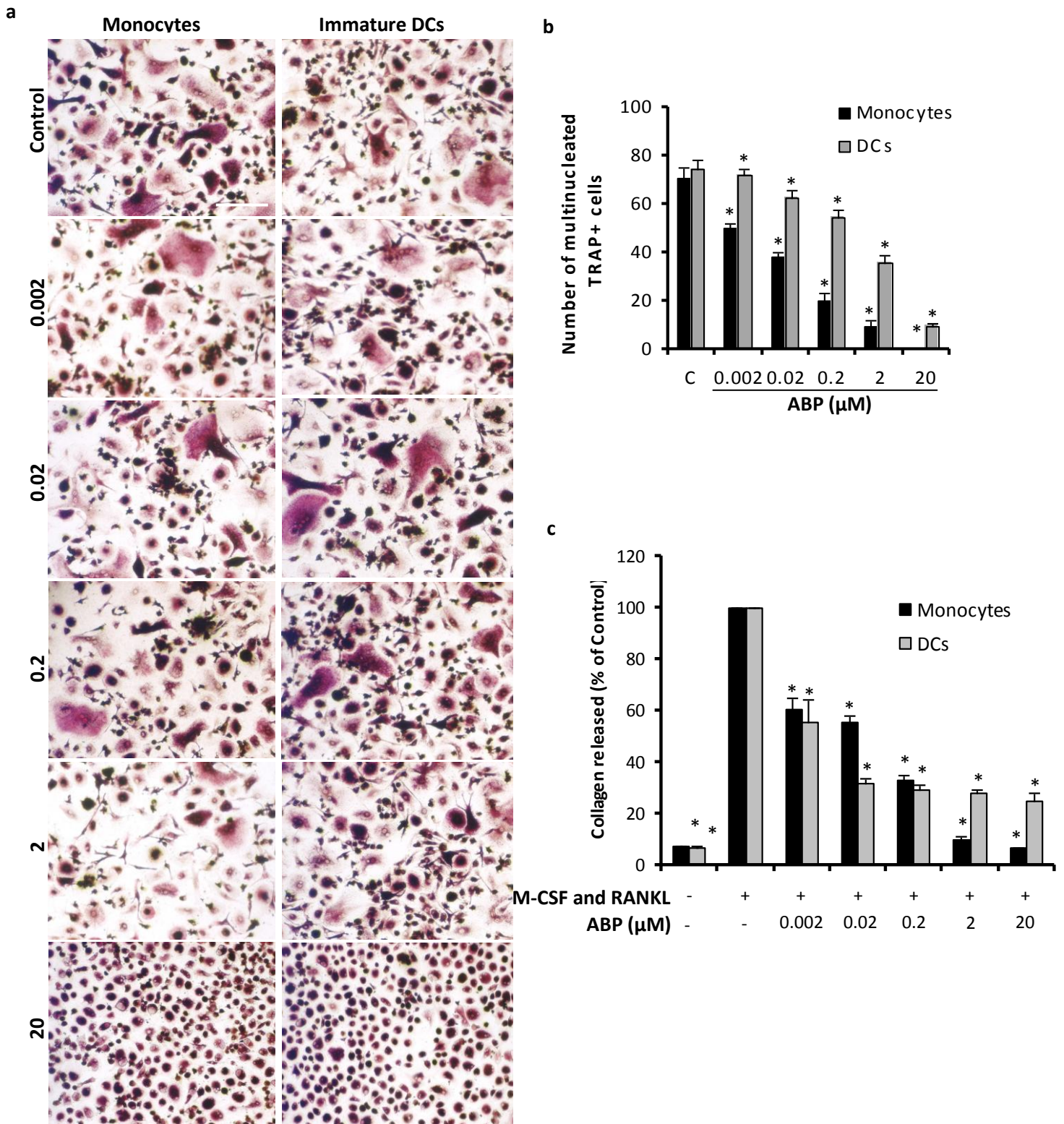


Figure 38 : Inhibition dose-dépendante de la formation et de l'activité des ostéoclastes par le dendrimère ABP (a) Coloration TRAP des ostéoclastes formés sous l'effet de M-CSF et de RANKL à partir de monocytes (à gauche) et de DCs immatures (à droite) cultivés en présence d'ABP à des doses croissantes (Echelle : 150 μM) (b) Quantification du nombre de cellules multinucléées TRAP+ (c) Quantification du collagène de type II libéré par la matrice osseuse après 12 jours de culture d'ostéoclastes en présence d'ABP à des doses croissantes. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. **p* < 0.05 versus control.

II.2 Matériels & Méthodes

II.2.1 Le dendrimère ABP

Le dendrimère ABP est synthétisé par l'équipe du Dr. Anne-Marie Caminade (UPR 8241 _ Laboratoire de Chimie de Coordination _ Toulouse).

II.2.2 Isolement des monocytes humains

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées à partir du sang frais de donateurs sains en utilisant un gradient de Ficoll-Hypaque (*Lymphoprep*). Le sang est ensuite centrifugé, pendant 30min à 1900 rpm. L'anneau de PBMC est alors lavé 2 fois au PBS et re-suspendu dans du milieu RPMI complet (RPMI 1640 (*Invitrogen*) supplémenté avec 10% SVF (*Invitrogen*), 1 mM de pyruvate de sodium (*Life Technologies*), 1 mM de L-glutamine, 1 mM de pénicilline et 1 mM streptomycine (*Cambrex Bioscience*)). Les monocytes CD14+ sont purifiés, par la suite, par tri magnétique négatif en utilisant le kit de déplétion « Dynabeads Untouched Human Monocytes » (*Invitrogen*).

II.2.3 Génération des DCs immatures

Les monocytes purifiés sont mis en culture pendant 6 jours à 37°C dans une atmosphère 5% CO₂ à une concentration de 10⁶ cellules/ml dans du milieu RPMI complet en présence de GM-CSF à 50 ng/ml et d'IL-4 à 50 ng/ml (*Peptotech*). La pureté et le phénotype des DCs immatures sont évalués à l'aide des anticorps suivants : CD3-APC, CD14-PE-Cy5 (*Beckman-Coulter*), CD11c-APC, CD80-PE-Cy5, CD83-FITC, CD86-PE, HLA-DR-FITC (*BD Biosciences*) par cytométrie de flux sur LSRII (Logiciel FACSDiva Scan).

II.2.4 Culture d'ostéoclastes à partir de monocytes humains

Les monocytes purifiés sont mis en culture en plaque 96 puits pendant 21 jours à 37°C dans une atmosphère 5% CO₂ à une concentration de 10⁵ cellules/ml dans du milieu α -MEM complet en présence de M-CSF à 50 ng/ml et de RANKL à 33 ng/ml (*Peptotech*). Le dendrimère ABP est rajouté à des doses croissantes allant de 2 nM à 20 μ M. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours en rajoutant du M-CSF à 25 ng/ml et du RANKL à 100 ng/ml mais sans rajout de dendrimère ABP.

II.2.5 Culture d'ostéoclastes à partir de DCs immatures

Les DCs immatures obtenues sont mises en culture en plaque 96 puits pendant 15 jours à 37°C dans une atmosphère 5% CO₂ à une concentration de 10⁵ cellules/ml dans du milieu RPMI complet en présence de M-CSF à 50 ng/ml et de RANKL à 33 ng/ml. Le dendrimère ABP est rajouté à des doses croissantes allant de 2 nM à 20 µM. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours en rajoutant du M-CSF à 25 ng/ml et du RANKL à 100 ng/ml mais sans rajout de dendrimère ABP.

II.2.6 Evaluation de la résorption osseuse

Les monocytes purifiés et les DCs immatures sont mis en culture en plaque 96 puits contenant une matrice osseuse d'origine humaine (OsteoAssay Human Bone Plate, *Lonza*) pendant 12 jours à 37°C dans une atmosphère 5% CO₂ à une concentration de 2 x 10⁵ cellules/ml dans du milieu α-MEM complet en présence de M-CSF à 50 ng/ml et de RANKL à 33 ng/ml (*Peprotech*). Le dendrimère ABP est rajouté à des doses croissantes allant de 2 nM à 20 µM. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours en rajoutant du M-CSF à 25 ng/ml et du RANKL à 100 ng/ml mais sans rajout de dendrimère. Le surnageant est par la suite récupéré et analysé à l'aide du kit « Elecsys β-CrossLaps / serum » (*Roche*).

II.2.7 Analyse statistique

Les résultats obtenus représentent la moyenne ± SD. Ces résultats sont analysés par le logiciel Stata Statistical Software (*StataCorp*) et sont considérés comme significatifs avec un test *t* de Student si $p < 0.05$.

DISCUSSION & CONCLUSION GENERALE

La PR est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une destruction du cartilage articulaire et une résorption de l'os sous-chondral. Les avancées réalisées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans le processus inflammatoire de la PR ont conduit au développement de nouvelles thérapies de la PR. En effet, la PR a été initialement traitée par des DMARDs, dont le plus utilisé est le méthotrexate, un inhibiteur de la voie de l'acide folique qui a rapidement montré ses limites en terme d'efficacité et d'effets secondaires^{235, 236}. Le développement des traitements basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, appelés « Biothérapies », a révolutionné la prise en charge de la maladie depuis la fin des années 1990. Parmi ces traitements, on retrouve en première place les anti-TNF- α . En dépit de leur efficacité clinique, ces anticorps ont montré des effets secondaires non négligeables, mais qui sont tout de même assez bien contrôlés, notamment l'augmentation du risque infectieux, en particulier de tuberculose²⁶¹. Le succès de ces anti-TNF- α mais aussi la non réponse d'un nombre conséquent de patients à ce type de traitement a conduit au développement d'une batterie de biothérapies ciblant d'autres cytokines inflammatoires impliquées dans la physiopathologie de la PR. Parmi ces nouvelles biothérapies, nous pouvons citer l'anti-IL-6R (Tocilizumab), l'anti-IL-17 ou le tout récent anti-IL-12. D'autres biothérapies, également utilisées dans le traitement de la PR, permettent de cibler des cellules immunitaires impliquées dans la pathogénie de la PR. Parmi ces biothérapies, on retrouve le CTLA4-Ig (Abatacept), une protéine de fusion recombinante qui inhibe l'activation des LT ; ou l'anti-CD20 (Rituximab), initialement utilisé pour traiter les lymphomes ; ou encore l'anti-RANKL (Denosumab), initialement utilisé pour le traitement de l'ostéoporose. Il est certain que toutes ces thérapies permettent de retarder et même d'abroger la destruction articulaire mais aussi d'apporter une meilleure qualité de vie aux patients. Cependant ces traitements ne permettent pas de guérir la maladie. Une des raisons de cet échec est que tous ces agents biologiques ciblent une seule cytokine ou une seule molécule de surface, qui certainement, joue un rôle très important dans la pathogénie de la PR mais ne régit pas, à elle seule, tout le processus inflammatoire mis en jeu dans cette maladie. En effet, ce processus inflammatoire fait intervenir l'ensemble des acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Le maintien de ces acteurs dans un état activé participe à l'entretien de l'inflammation et à la perturbation d'un réseau complexe de médiateurs comme les cytokines et les chimiokines. Ces médiateurs constituent le lien entre le système immunitaire et le système osseux. Dans les conditions physiologiques, l'homéostasie osseuse est basée sur un équilibre entre la formation de l'os, dirigée par les ostéoblastes, et la résorption de l'os par les ostéoclastes. Dans le cas de la PR, cette homéostasie est perturbée par la chronicité de l'inflammation. Par conséquent, il paraît invraisemblable qu'une thérapie qui ciblerait une seule cytokine pourrait permettre de guérir la PR. De plus, l'efficacité des biothérapies basées sur l'utilisation des anticorps monoclonaux décline au cours du traitement à cause de l'apparition d'anticorps dirigés contre les anticorps monoclonaux⁴¹⁴.

Les dendrimères sont des molécules de synthèse qui voient aujourd'hui leurs champs d'applications se diversifier, notamment dans le domaine biomédical. Très peu d'études ont pu mettre en évidence l'utilisation des dendrimères comme médicaments. En effet, un seul dendrimère, de type PAMAM, utilisé comme agent anti-viral est actuellement testé en Phase II⁴¹⁵. L'équipe du Dr. Anne-Marie Caminade a synthétisé une série de dendrimères, de type PMMH, présentant une surface anionique. L'équipe du Dr. Jean-Jacques Fournié et du Pr. Rémy Poupot a montré que, parmi ces dendrimères, le dendrimère à surface azabisphosphonate, appelé ABP, possède des propriétés inédites d'activation du système immunitaire. En effet, lorsqu'il est mis en culture avec des PBMC, il a la propriété de se fixer rapidement aux monocytes. Il s'ensuit une internalisation du dendrimère et une activation des monocytes vers une voie anti-inflammatoire.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux modèles murins d'arthrite afin d'explorer cette propriété anti-inflammatoire du dendrimère ABP et nous avons montré que le dendrimère ABP injecté à une dose de 10 mg/kg supprime l'arthrite développée par ces deux modèles. Cette suppression de l'arthrite se manifeste à la fois par l'inhibition de l'inflammation (diminution du gonflement des articulations et inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les 2 modèles) mais aussi par l'inhibition de la formation et de l'activité des ostéoclastes (observée *in vivo* et *in vitro*). Nous avons également montré que le dendrimère ABP inhibe la formation de ces ostéoclastes *in vitro* que ce soit à partir des monocytes ou des DCs immatures. De plus, nous avons montré qu'il inhibe la résorption osseuse due à l'activité des ostéoclastes issus des monocytes⁴¹⁸. Il a été montré que les ostéoclastes provenant de la trans-différenciation des DCs immatures avaient un pouvoir de résorption osseuse plus important que les ostéoclastes provenant de la différenciation des monocytes⁴¹⁶. Afin de vérifier son effet sur la résorption osseuse due à l'activité des ostéoclastes issus de DCs immatures, nous avons réalisé une étude comparative de l'effet du dendrimère ABP sur la libération du collagène de type II à partir d'une matrice osseuse sur laquelle nous avons cultivé des ostéoclastes à partir de ces 2 types cellulaires. Nous avons alors montré que le dendrimère ABP inhibe plus efficacement la résorption osseuse due à l'activité des ostéoclastes issus de monocytes. En effet, l'inhibition de la libération de collagène de type II à partir de la matrice osseuse sur laquelle nous avons cultivé des DCs immatures atteint un seuil minimal très rapidement et ne descend pas en dessous de celui-ci. Il est cependant possible qu'une augmentation de la concentration en dendrimère ABP au-delà de 20 μ M puisse inhiber totalement la résorption osseuse due à l'activité des ostéoclastes issus de DCs immatures. Par ailleurs, nous n'avons pas constaté une activité plus érosive des ostéoclastes provenant de la trans-différenciation des DCs immatures par rapport aux ostéoclastes provenant de la différenciation des monocytes. Nous apportons ainsi une série d'arguments selon lesquels le dendrimère ABP pourrait constituer une alternative innovante dans le traitement de la PR. L'inhibition par le dendrimère ABP de la formation d'ostéoclastes à partir des

cellules de la lignée myéloïde et plus spécifiquement l'inhibition de l'axe RANK/RANKL offre également de nouvelles perspectives thérapeutiques pour d'autres pathologies ostéolytiques comme le myélome osseux, par exemple. Deux études récentes ont en effet montré que les interactions entre les DCs immatures et les cellules du myélome augmentent d'une part, la capacité de prolifération de ces cellules tumorales⁴²¹ et d'autre part, la capacité des DCs immatures à se trans-différencier en ostéoclastes⁴²². Une troisième étude a montré que ces interactions sont régulées par l'axe RANK/RANKL⁴²³.

Avec les DCs, les monocytes et les macrophages constituent les phagocytes du système immunitaire inné. Dans ce système, les monocytes et macrophages se trouvent en première ligne de défense contre les micro-organismes et les infections bactériennes. Une modulation du système immunitaire en général et de ces cellules en particulier peut être associée à une augmentation du risque infectieux. L'équipe du Dr. Jean-Jacques Fournié et Du Pr. Rémy Poupot a montré que le dendrimère ABP active les monocytes / macrophages vers un phénotype immunomodulateur de type IL-4 (M2)⁴⁰⁸. L'activation classique des macrophages en réponse à des cytokines de type Th1 (IFN- γ) ou à des produits microbiens entraîne un phénotype inflammatoire (M1) des macrophages. Par contre, l'activation dite « alternative » des macrophages en réponse à des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-13, IL-10) ou à des glucocorticoïdes entraîne un phénotype immunomodulateur (M2). Contrairement au phénotype M1, le phénotype M2 présente une faible activité phagocytaire et microbicide⁴²⁴. Tout comme les dendrimères anioniques présentant des groupements sulfonates à leur surface³⁸⁸, le dendrimère ABP augmente de façon significative l'activité phagocytaire des macrophages⁴⁰⁸.

En complément des résultats que nous avons publiés, nous avons montré que ce traitement pouvait être injecté par voie intraveineuse à une dose de 10 mg/kg toutes les 3 semaines. De plus, nous avons montré que le dendrimère ABP pouvait également être administré par voie orale à raison de 1 fois par semaine. Ces paramètres sont comparables à ceux des thérapies actuelles de la PR puisque le méthotrexate est administré de façon hebdomadaire par voie orale ou par injection sous-cutanée ou intra-musculaire et les biothérapies sont administrées par injection sous-cutanée ou intraveineuse de façon hebdomadaire, bimensuelle ou mensuelle²³⁵. Il est également important de noter que des études de galénique pourraient certainement améliorer ces paramètres d'administration du dendrimère ABP.

Durant toute l'étude réalisée *in vivo*, 72 souris au total ont été traitées au dendrimère ABP à une dose de 10 mg/kg et aucune toxicité apparente n'a été détectée durant la période de traitement. En effet, ni l'examen macroscopique des différents organes de ces souris, ni l'examen microscopique réalisé sur des coupes histologiques de ces organes, n'ont révélé d'anomalies. Si les prochaines études de toxicité s'avèrent concluantes, les propriétés inédites que présente cette molécule

révolutionneraient le traitement de la PR. En effet, contrairement aux biothérapies actuelles qui réduisent l'inflammation et / ou la résorption osseuse, en agissant sur un seul acteur de l'immunité, le dendrimère ABP permet une attaque « bimodale » du processus rhumatoïde, en agissant à la fois sur le front de l'inflammation et sur celui de la résorption osseuse. De plus, le dendrimère ABP est une molécule synthétisée chimiquement ce qui apporte un intérêt économique par rapport aux biothérapies actuelles qui sont des anticorps ou des protéines de fusion, humanisés ou non, produits par génie génétique.

Il a été montré que l'activation des monocytes vers un phénotype anti-inflammatoire implique le TLR-2⁴⁰⁸. Cependant, ce récepteur ne constitue pas le récepteur du dendrimère ABP. La détermination du récepteur de cette molécule pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme par lequel elle permet l'attaque du processus rhumatoïde à la fois sur le plan inflammation et sur le plan résorption osseuse.

Enfin, des études de pharmacocinétique et de pharmacodynamique sur différentes espèces sont essentielles pour passer de l'étude pré-clinique aux premières phases des essais cliniques, notamment sur des patients en échec de thérapies anti-TNF- α .

A plus longterme, les différentes propriétés du dendrimère ABP pourraient permettre d'envisager son utilisation dans d'autres pathologies inflammatoires non liées à l'os comme la sclérose en plaque ou dans des pathologies ostéolytiques comme le myélome multiple.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Delrio, A.N. & Fadda, M. Ultrastructural characteristics of the human synoviocytes. *Boll Soc Ital Biol Sper* **66**, 209-214 (1990).
2. Athanasou, N.A. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* **54**, 392-394 (1995).
3. Benito, M.J. et al. Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **50**, 1781-1787 (2004).
4. Ospelt, C. & Gay, S. The role of resident synovial cells in destructive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 239-252 (2008).
5. Ospelt, C., Neidhart, M., Gay, R.E. & Gay, S. Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* **9**, 2323-2334 (2004).
6. Choy, E.H. & Panayi, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **344**, 907-916 (2001).
7. Fadda, M., Zirattu, G. & Marrone, A. [The ultrastructural aspects of the synovial intima and subintima in arthrosis]. *Arch Putti Chir Organi Mov* **38**, 195-205 (1990).
8. Ritchlin, C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res* **2**, 356-360 (2000).
9. Takemura, S. et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* **167**, 1072-1080 (2001).
10. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**, 173-182 (2006).
11. Cascao, R., Rosario, H.S., Souto-Carneiro, M.M. & Fonseca, J.E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev* **9**, 531-535 (2010).
12. Ashcroft, G.S. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med* **6**, 1147-1153 (2000).
13. Sweeney, S.E. & Firestein, G.S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 372-378 (2004).
14. Cedergren, J., Forslund, T., Sundqvist, T. & Skogh, T. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J Rheumatol* **34**, 2162-2170 (2007).
15. Weinmann, P. et al. Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clin Exp Rheumatol* **25**, 885-887 (2007).
16. Andersson, A.K., Li, C. & Brennan, F.M. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **10**, 204 (2008).
17. Raza, K. et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **8**, R120 (2006).

18. Bockermann, R. & Holmdahl, R. Type II collagen without adjuvant induces eosinophilic arthritis. *Eur J Immunol* **37**, 540-548 (2007).
19. Hallgren, R., Bjelle, A. & Venge, P. Eosinophil cationic protein in inflammatory synovial effusions as evidence of eosinophil involvement. *Ann Rheum Dis* **43**, 556-562 (1984).
20. Kargili, A., Bavbek, N., Kaya, A., Kosar, A. & Karaaslan, Y. Eosinophilia in rheumatologic diseases: a prospective study of 1000 cases. *Rheumatol Int* **24**, 321-324 (2004).
21. Permin, H. A study of autoimmune allergic type I reactions in rheumatoid arthritis. IgE autoantibodies and histamine release from basophil leukocytes. *Dan Med Bull* **32**, 54-60 (1985).
22. Denzel, A. et al. Basophils enhance immunological memory responses. *Nat Immunol* **9**, 733-742 (2008).
23. Bruhl, H. et al. Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 1352-1361 (2009).
24. Crisp, A.J. Mast cells in rheumatoid arthritis. *J R Soc Med* **77**, 450-451 (1984).
25. Bromley, M., Fisher, W.D. & Woolley, D.E. Mast cells at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joint. *Ann Rheum Dis* **43**, 76-79 (1984).
26. Gotis-Graham, I., Smith, M.D., Parker, A. & McNeil, H.P. Synovial mast cell responses during clinical improvement in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **57**, 664-671 (1998).
27. Juurikivi, A. et al. Inhibition of c-kit tyrosine kinase by imatinib mesylate induces apoptosis in mast cells in rheumatoid synovia: a potential approach to the treatment of arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**, 1126-1131 (2005).
28. Okayama, Y., Kirshenbaum, A.S. & Metcalfe, D.D. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol* **164**, 4332-4339 (2000).
29. Okamoto, H. & Nakano, K. Regulation of interleukin-1 synthesis by histamine produced by mouse peritoneal macrophages per se. *Immunology* **69**, 162-165 (1990).
30. Zhang, Y., Ramos, B.F. & Jakschik, B.A. Augmentation of reverse arthus reaction by mast cells in mice. *J Clin Invest* **88**, 841-846 (1991).
31. Eklund, K.K. Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev* **217**, 38-52 (2007).
32. Lee, D.M. et al. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* **297**, 1689-1692 (2002).
33. Eklund, K.K. et al. Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases. *J Immunol* **158**, 4373-4380 (1997).

34. Cohan, V.L. et al. Dexamethasone does not inhibit the release of mediators from human mast cells residing in airway, intestine, or skin. *Am Rev Respir Dis* **140**, 951-954 (1989).
35. Wolfe, F., Freundlich, B. & Straus, W.L. Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **30**, 36-40 (2003).
36. del Rincon, I.D., Williams, K., Stern, M.P., Freeman, G.L. & Escalante, A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* **44**, 2737-2745 (2001).
37. Sattar, N., McCarey, D.W., Capell, H. & McInnes, I.B. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* **108**, 2957-2963 (2003).
38. Boilard, E. et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583 (2010).
39. Gasparyan, A.Y., Stavropoulos-Kalinoglou, A., Mikhailidis, D.P., Douglas, K.M. & Kitas, G.D. Platelet function in rheumatoid arthritis: arthritic and cardiovascular implications. *Rheumatol Int* **31**, 153-164 (2011).
40. Endresen, G.K. Evidence for activation of platelets in the synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **9**, 19-24 (1989).
41. Waguri-Nagaya, Y. et al. Synovial inflammation and hyperplasia induced by gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor in rabbit knees. *Rheumatol Int* **20**, 13-19 (2000).
42. Weber, A.J. & De Bandt, M. Angiogenesis: general mechanisms and implications for rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **67**, 366-383 (2000).
43. Schmitt-Sody, M. et al. Platelet-endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 885-889 (2005).
44. Schmitt-Sody, M. et al. In vivo interactions of platelets and leucocytes with the endothelium in murine antigen-induced arthritis: the role of P-selectin. *Scand J Rheumatol* **36**, 311-319 (2007).
45. Kim, K.W. et al. Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum* **56**, 1076-1086 (2007).
46. Grisar, J. et al. Phenotypic characteristics of human monocytes undergoing transendothelial migration. *Arthritis Res* **3**, 127-132 (2001).
47. Kawanaka, N. et al. CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **46**, 2578-2586 (2002).

48. Fujikawa, Y., Sabokbar, A., Neale, S. & Athanasou, N.A. Human osteoclast formation and bone resorption by monocytes and synovial macrophages in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **55**, 816-822 (1996).
49. Ma, Y. & Pope, R.M. The role of macrophages in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* **11**, 569-580 (2005).
50. Bondeson, J., Wainwright, S.D., Lauder, S., Amos, N. & Hughes, C.E. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **8**, R187 (2006).
51. Mueller, R.B. et al. MHC class II expression on myeloid cells inversely correlates with disease progression in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 931-933 (2007).
52. Liu, Y.J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262 (2001).
53. Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* **1**, 305-310 (2000).
54. Voisine, C., Hubert, F.X., Trinite, B., Heslan, M. & Josien, R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* **169**, 2284-2291 (2002).
55. Pettit, A.R. et al. Identification and isolation of synovial dendritic cells. *Methods Mol Med* **136**, 165-181 (2007).
56. Lutzky, V., Hannawi, S. & Thomas, R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. *Arthritis Res Ther* **9**, 219 (2007).
57. Caux, C. et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* **180**, 1263-1272 (1994).
58. Sarkar, S. & Fox, D.A. Dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* **10**, 656-665 (2005).
59. Khan, S., Greenberg, J.D. & Bhardwaj, N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 566-571 (2009).
60. Robertson, M.J. & Ritz, J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* **76**, 2421-2438 (1990).
61. Moretta, L., Bottino, C., Cantoni, C., Mingari, M.C. & Moretta, A. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 387-391 (2001).
62. Takeda, K. & Dennert, G. The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive

- action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J Exp Med* **177**, 155-164 (1993).
63. Pridgeon, C. et al. Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56bright,CD94bright,CD158negative phenotype. *Rheumatology (Oxford)* **42**, 870-878 (2003).
64. Cooper, M.A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-3151 (2001).
65. Campbell, J.J. et al. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* **166**, 6477-6482 (2001).
66. Soderstrom, K. et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13028-13033 (2010).
67. Miellot, A. et al. Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway. *Eur J Immunol* **35**, 3704-3713 (2005).
68. Kim, H.Y. et al. NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production. *J Exp Med* **201**, 41-47 (2005).
69. Smolen, J.S. & Steiner, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 473-488 (2003).
70. Cheema, G.S., Roschke, V., Hilbert, D.M. & Stohl, W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* **44**, 1313-1319 (2001).
71. Zelenay, S., Moraes Fontes, M.F., Fesel, C., Demengeot, J. & Coutinho, A. Physiopathology of natural auto-antibodies: the case for regulation. *J Autoimmun* **29**, 229-235 (2007).
72. Chan, O.T., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P. & Shlomchik, M.J. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* **189**, 1639-1648 (1999).
73. Joao, C., Ogle, B.M., Gay-Rabinstein, C., Platt, J.L. & Cascalho, M. B cell-dependent TCR diversification. *J Immunol* **172**, 4709-4716 (2004).
74. Teng, Y.K., Levarht, E.W., Toes, R.E., Huizinga, T.W. & van Laar, J.M. Residual inflammation after rituximab treatment is associated with sustained synovial plasma cell infiltration and enhanced B cell repopulation. *Ann Rheum Dis* **68**, 1011-1016 (2009).
75. Thurlings, R.M. et al. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* **67**, 917-925 (2008).

76. Warrington, K.J., Takemura, S., Goronzy, J.J. & Weyand, C.M. CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum* **44**, 13-20 (2001).
77. Edwards, J.C. & Cambridge, G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* **40**, 205-211 (2001).
78. Tsokos, G.C. B cells, be gone--B-cell depletion in the treatment of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **350**, 2546-2548 (2004).
79. Fox, D.A. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. *Arthritis Rheum* **40**, 598-609 (1997).
80. Cantagrel, A., Alam, A., Coppin, H.L., Mazieres, B. & De Preval, C. Clonality of T lymphocytes expanded with IL-2 from rheumatoid arthritis peripheral blood, synovial fluid and synovial membrane. *Clin Exp Immunol* **91**, 83-89 (1993).
81. Moreland, L.W. et al. Double-blind, placebo-controlled multicenter trial using chimeric monoclonal anti-CD4 antibody, cM-T412, in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate. *Arthritis Rheum* **38**, 1581-1588 (1995).
82. Boissier, M.C., Bessis, N. & Falgarone, G. Options for blocking interleukin-1 in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **69**, 351-354 (2002).
83. Boissier, M.C., Assier, E., Falgarone, G. & Bessis, N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* **75**, 373-375 (2008).
84. Sato, K. & Takayanagi, H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. *Curr Opin Rheumatol* **18**, 419-426 (2006).
85. Pene, J. et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* **180**, 7423-7430 (2008).
86. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7**, 292-304 (2007).
87. Berek, C. & Kim, H.J. B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. *Semin Immunol* **9**, 261-268 (1997).
88. Boissier, M.C. et al. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **76**, 10-14 (2009).
89. Morgan, M.E. et al. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 1452-1460 (2003).
90. Morgan, M.E. et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum* **52**, 2212-2221 (2005).

91. Cao, D. et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* **33**, 215-223 (2003).
92. Bas, S. et al. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 809-814 (2002).
93. Vencovsky, J. et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **62**, 427-430 (2003).
94. Tighe, H., Heaphy, P., Baird, S., Weigle, W.O. & Carson, D.A. Human immunoglobulin (IgG) induced deletion of IgM rheumatoid factor B cells in transgenic mice. *J Exp Med* **181**, 599-606 (1995).
95. Borretzen, M., Chapman, C., Natvig, J.B. & Thompson, K.M. Differences in mutational patterns between rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line gene usage. *Eur J Immunol* **27**, 735-741 (1997).
96. Vossenaar, E.R. et al. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2489-2500 (2003).
97. Masson-Bessiere, C. et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* **166**, 4177-4184 (2001).
98. Nishimura, K. et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* **146**, 797-808 (2007).
99. Rantapaa-Dahlqvist, S. et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2741-2749 (2003).
100. Kuhn, K.A. et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* **116**, 961-973 (2006).
101. De Rycke, L. et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis* **63**, 1587-1593 (2004).
102. Vander Cruyssen, B. et al. Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Res Ther* **8**, R122 (2006).

103. Cordonnier, C. et al. Diagnostic value of anti-RA33 antibody, antikeratin antibody, antiperinuclear factor and antinuclear antibody in early rheumatoid arthritis: comparison with rheumatoid factor. *Br J Rheumatol* **35**, 620-624 (1996).
104. Nell-Duxneuner, V. et al. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis: a follow-up study. *Ann Rheum Dis* **69**, 169-174 (2010).
105. Hayer, S. et al. Aberrant expression of the autoantigen heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2 (RA33) and spontaneous formation of rheumatoid arthritis-associated anti-RA33 autoantibodies in TNF-alpha transgenic mice. *J Immunol* **175**, 8327-8336 (2005).
106. Hoffmann, M.H. et al. The rheumatoid arthritis-associated autoantigen hnRNP-A2 (RA33) is a major stimulator of autoimmunity in rats with pristane-induced arthritis. *J Immunol* **179**, 7568-7576 (2007).
107. Cook, A.D. et al. Antibodies to type II collagen and HLA disease susceptibility markers in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **42**, 2569-2576 (1999).
108. Cho, Y.G., Cho, M.L., Min, S.Y. & Kim, H.Y. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* **7**, 65-70 (2007).
109. Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. & Mathis, D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* **286**, 1732-1735 (1999).
110. Schubert, D., Maier, B., Morawietz, L., Krenn, V. & Kamradt, T. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* **172**, 4503-4509 (2004).
111. Schaller, M., Burton, D.R. & Ditzel, H.J. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* **2**, 746-753 (2001).
112. Matsumoto, I. et al. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* **48**, 944-954 (2003).
113. Brennan, F.M. & McInnes, I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **118**, 3537-3545 (2008).
114. Li, P. et al. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum* **50**, 265-276 (2004).
115. Kaneki, H. et al. Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem* **281**, 4326-4333 (2006).
116. Kuroki, T., Shingu, M., Koshihara, Y. & Nobunaga, M. Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. *Br J Rheumatol* **33**, 224-230 (1994).

117. Ackermann, C. & Kavanaugh, A. Tumor necrosis factor as a therapeutic target of rheumatologic disease. *Expert Opin Ther Targets* **11**, 1369-1384 (2007).
118. Taylor, P.C. & Feldmann, M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 578-582 (2009).
119. Walsh, N.C. & Gravallese, E.M. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev* **233**, 301-312 (2010).
120. Dayer, J.M. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42 Suppl 2**, ii3-10 (2003).
121. Suda, T. et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20**, 345-357 (1999).
122. Ji, H. et al. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* **196**, 77-85 (2002).
123. Furst, D.E. et al. Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases, 2005. *Ann Rheum Dis* **64 Suppl 4**, iv2-14 (2005).
124. Horai, R. et al. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* **187**, 1463-1475 (1998).
125. Fonseca, J.E., Santos, M.J., Canhao, H. & Choy, E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* **8**, 538-542 (2009).
126. Nishimoto, N., Kishimoto, T. & Yoshizaki, K. Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis* **59 Suppl 1**, i21-27 (2000).
127. Mihara, M., Ohsugi, Y. & Kishimoto, T. Evidence for the role of Th17 cell inhibition in the prevention of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Biofactors* **35**, 47-51 (2009).
128. Wilson, N.J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* **8**, 950-957 (2007).
129. Hueber, A.J. et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* **184**, 3336-3340 (2010).
130. Kotake, S. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* **103**, 1345-1352 (1999).
131. Chabaud, M. et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* **42**, 963-970 (1999).

132. Ogura, H. et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* **29**, 628-636 (2008).
133. Yoshida, H., Hashizume, M. & Mihara, M. IL-6 blockade preferentially inhibits Th17 differentiation in collagen-induced arthritis. *Rheumatol Int* **31**, 127-131 (2011).
134. Herman, S., Kronke, G. & Schett, G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med* **14**, 245-253 (2008).
135. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533-544 (2008).
136. Metcalf, D., Lindeman, G.J. & Nicola, N.A. Analysis of hematopoiesis in max 41 transgenic mice that exhibit sustained elevations of blood granulocytes and monocytes. *Blood* **85**, 2364-2370 (1995).
137. Hamilton, J.A. Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages--some controversies. *Immunol Today* **14**, 18-24 (1993).
138. Niki, Y. et al. Administration of cyclooxygenase-2 inhibitor reduces joint inflammation but exacerbates osteopenia in IL-1 alpha transgenic mice due to GM-CSF overproduction. *J Immunol* **179**, 639-646 (2007).
139. Campbell, I.K., Hamilton, J.A. & Wicks, I.P. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* **30**, 1568-1575 (2000).
140. Ando, W. et al. Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). *J Bone Miner Metab* **24**, 274-282 (2006).
141. Theill, L.E., Boyle, W.J. & Penninger, J.M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* **20**, 795-823 (2002).
142. Kong, Y.Y. et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**, 304-309 (1999).
143. Simonet, W.S. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).
144. Tsuda, E. et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 137-142 (1997).
145. Cohen, S.B. 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* **58**, 1299-1309 (2008).
146. Terato, K. et al. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* **148**, 2103-2108 (1992).

147. Kaplan, C. et al. Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res* **4**, 54-58 (2002).
148. Brennan, F.M., Maini, R.N. & Feldmann, M. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **20**, 133-147 (1998).
149. Okamura, H. et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**, 88-91 (1995).
150. Bresnihan, B. et al. Serum interleukin 18 and interleukin 18 binding protein in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **61**, 726-729 (2002).
151. Miossec, P. & van den Berg, W. Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum* **40**, 2105-2115 (1997).
152. Moreno, J.L., Kaczmarek, M., Keegan, A.D. & Tondravi, M. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood* **102**, 1078-1086 (2003).
153. Lubberts, E. et al. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest* **105**, 1697-1710 (2000).
154. Persson, S., Mikulowska, A., Narula, S., O'Garra, A. & Holmdahl, R. Interleukin-10 suppresses the development of collagen type II-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats. *Scand J Immunol* **44**, 607-614 (1996).
155. Joosten, L.A. et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* **40**, 249-260 (1997).
156. Schulze-Koops, H. & Kalden, J.R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **15**, 677-691 (2001).
157. Heo, Y.J. et al. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunol Lett* **127**, 150-156 (2010).
158. Keystone, E., Wherry, J. & Grint, P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **24**, 629-639 (1998).
159. Hershey, G.K. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 677-690; quiz 691 (2003).
160. Bessis, N. & Boissier, M.C. Novel pro-inflammatory interleukins: potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **68**, 477-481 (2001).
161. Haas, C.S. et al. In vivo inhibition of angiogenesis by interleukin-13 gene therapy in a rat model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **56**, 2535-2548 (2007).
162. Kunkel, S.L., Lukacs, N., Kasama, T. & Strieter, R.M. The role of chemokines in inflammatory joint disease. *J Leukoc Biol* **59**, 6-12 (1996).

163. Szekanecz, Z., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. & Koch, A.E. Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **20**, 115-132 (1998).
164. Blaschke, S. et al. Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 1858-1872 (2003).
165. Woessner, J.F., Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* **5**, 2145-2154 (1991).
166. Takizawa, M. et al. Production of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **43**, 812-820 (2000).
167. Takaishi, H., Kimura, T., Dalal, S., Okada, Y. & D'Armiento, J. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol* **9**, 47-54 (2008).
168. Yamanaka, H. et al. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid synovium. *Lab Invest* **80**, 677-687 (2000).
169. Yoshihara, Y. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **59**, 455-461 (2000).
170. Yamanaka, H. et al. Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 852-858 (2000).
171. Mudgett, J.S. et al. Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* **41**, 110-121 (1998).
172. Gruber, B.L. et al. Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol* **78**, 161-171 (1996).
173. Goldring, S.R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42 Suppl 2**, ii11-16 (2003).
174. Ritchlin, C.T. Mechanisms of erosion in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **31**, 1229-1237 (2004).
175. Adamopoulos, I.E. & Bowman, E.P. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res Ther* **10**, 225 (2008).
176. Nakashima, T. & Takayanagi, H. Osteoclasts and the immune system. *J Bone Miner Metab* **27**, 519-529 (2009).

177. Arai, F. et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med* **190**, 1741-1754 (1999).
178. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118 (1994).
179. Caux, C. et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* **184**, 695-706 (1996).
180. Miyamoto, T. et al. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* **98**, 2544-2554 (2001).
181. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, A.K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* **1**, 510-514 (2000).
182. Servet-Delprat, C. et al. Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC Immunol* **3**, 15 (2002).
183. Ishii, M. & Saeki, Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol* **18**, 220-227 (2008).
184. Ross, F.P. & Teitelbaum, S.L. alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* **208**, 88-105 (2005).
185. Ashmun, R.A. et al. Monoclonal antibodies to the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) detect epitopes on normal mononuclear phagocytes and on human myeloid leukemic blast cells. *Blood* **73**, 827-837 (1989).
186. Nienhuis, A.W. et al. Expression of the human c-fms proto-oncogene in hematopoietic cells and its deletion in the 5q- syndrome. *Cell* **42**, 421-428 (1985).
187. Sherr, C.J. et al. The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* **41**, 665-676 (1985).
188. Baker, A.H. et al. Expression of the colony-stimulating factor 1 receptor in B lymphocytes. *Oncogene* **8**, 371-378 (1993).
189. Yeung, Y.G., Wang, Y., Einstein, D.B., Lee, P.S. & Stanley, E.R. Colony-stimulating factor-1 stimulates the formation of multimeric cytosolic complexes of signaling proteins and cytoskeletal components in macrophages. *J Biol Chem* **273**, 17128-17137 (1998).
190. Speck, N.A. & Gilliland, D.G. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* **2**, 502-513 (2002).

191. Dahl, R. et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* **4**, 1029-1036 (2003).
192. Tenen, D.G. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* **3**, 89-101 (2003).
193. McGill, G.G. et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**, 707-718 (2002).
194. Yoshida, H. et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* **345**, 442-444 (1990).
195. Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4828-4832 (1990).
196. Dai, X.M. et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111-120 (2002).
197. Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. CSF-1 deficiency in the op/op mouse has differential effects on macrophage populations and differentiation stages. *Exp Hematol* **20**, 1004-1010 (1992).
198. Lum, L. et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* **274**, 13613-13618 (1999).
199. Hikita, A. et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* **281**, 36846-36855 (2006).
200. Lacey, D.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176 (1998).
201. Quinn, J.M. et al. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res* **16**, 1787-1794 (2001).
202. Brandes, M.E., Allen, J.B., Ogawa, Y. & Wahl, S.M. Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest* **87**, 1108-1113 (1991).
203. Kim, N. et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med* **202**, 589-595 (2005).
204. Sakuma, M. et al. TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. *Int Immunol* **19**, 117-126 (2007).
205. Kim, N., Odgren, P.R., Kim, D.K., Marks, S.C., Jr. & Choi, Y. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and

- partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10905-10910 (2000).
206. Dougall, W.C. et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**, 2412-2424 (1999).
207. Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D. & Dougall, W.C. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* **273**, 34120-34127 (1998).
208. Wong, B.R. et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* **273**, 28355-28359 (1998).
209. Mocsai, A. et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6158-6163 (2004).
210. Jimi, E. & Ghosh, S. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev* **208**, 80-87 (2005).
211. Iotsova, V. et al. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* **3**, 1285-1289 (1997).
212. Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H. & Tsujimoto, M. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem* **275**, 31155-31161 (2000).
213. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40 (2001).
214. Wagner, E.F. & Eferl, R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* **208**, 126-140 (2005).
215. Wang, Z.Q. et al. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* **360**, 741-745 (1992).
216. Matsuo, K. et al. Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat Genet* **24**, 184-187 (2000).
217. David, J.P., Sabapathy, K., Hoffmann, O., Idarraga, M.H. & Wagner, E.F. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* **115**, 4317-4325 (2002).
218. Kenner, L. et al. Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol* **164**, 613-623 (2004).
219. Asagiri, M. & Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**, 251-264 (2007).

220. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**, 2205-2232 (2003).
221. Asagiri, M. et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* **202**, 1261-1269 (2005).
222. Takayanagi, H. et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* **3**, 889-901 (2002).
223. Yagi, M. et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* **202**, 345-351 (2005).
224. Kim, K. 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* **280**, 35209-35216 (2005).
225. Lee, S.K., Goldring, S.R. & Lorenzo, J.A. Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology* **136**, 4572-4581 (1995).
226. Gravallese, E.M. et al. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* **152**, 943-951 (1998).
227. Pap, T., Muller-Ladner, U., Gay, R.E. & Gay, S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**, 361-367 (2000).
228. Klareskog, L., Catrina, A.I. & Paget, S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **373**, 659-672 (2009).
229. Scott, D.L., Wolfe, F. & Huizinga, T.W. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **376**, 1094-1108 (2010).
230. O'Dell, J.R. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications. *N Engl J Med* **334**, 1287-1291 (1996).
231. Boers, M. et al. Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet* **350**, 309-318 (1997).
232. Mottonen, T. et al. Comparison of combination therapy with single-drug therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised trial. FIN-RACo trial group. *Lancet* **353**, 1568-1573 (1999).
233. Svensson, B. et al. Low-dose prednisolone in addition to the initial disease-modifying antirheumatic drug in patients with early active rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate: a two-year randomized trial. *Arthritis Rheum* **52**, 3360-3370 (2005).

234. van Dongen, H. et al. Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **56**, 1424-1432 (2007).
235. van Vollenhoven, R.F. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 531-541 (2009).
236. Combe, B. Early rheumatoid arthritis: strategies for prevention and management. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **21**, 27-42 (2007).
237. Dayer, J.M. & Cutolo, M. Is there a rationale to using leflunomide in early rheumatoid arthritis? *Clin Exp Rheumatol* **23**, 404-412 (2005).
238. Smolen, J.S. et al. The efficacy of leflunomide monotherapy in rheumatoid arthritis: towards the goals of disease modifying antirheumatic drug therapy. *J Rheumatol Suppl* **71**, 13-20 (2004).
239. Ostensen, M. & Forger, F. Management of RA medications in pregnant patients. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 382-390 (2009).
240. Brasington, R. Disease-modifying antirheumatic drugs. *J Hand Surg Am* **34**, 347-348 (2009).
241. Liptay, S. et al. Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol* **128**, 1361-1369 (1999).
242. Drosos, A. Methotrexate intolerance in elderly patients with rheumatoid arthritis: what are the alternatives? *Drugs Aging* **20**, 723-736 (2003).
243. Willkens, R.F., Sharp, J.T., Stablein, D., Marks, C. & Wortmann, R. Comparison of azathioprine, methotrexate, and the combination of the two in the treatment of rheumatoid arthritis. A forty-eight-week controlled clinical trial with radiologic outcome assessment. *Arthritis Rheum* **38**, 1799-1806 (1995).
244. Brooks, P. Current issues of methotrexate and cyclosporine. *Curr Opin Rheumatol* **4**, 309-313 (1992).
245. Vadillo Font, C. et al. [Incidence and characteristics of tuberculosis in patients with autoimmune rheumatic diseases]. *Rev Clin Esp* **203**, 178-182 (2003).
246. Robert, N., Wong, G.W. & Wright, J.M. Effect of cyclosporine on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007893 (2010).
247. Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A.M., Maini, R.N. & Feldmann, M. Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J Autoimmun* **2 Suppl**, 177-186 (1989).
248. Elliott, M.J. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* **36**, 1681-1690 (1993).

249. Elliott, M.J. et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**, 1105-1110 (1994).
250. Roberts, L. & McColl, G.J. Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med J* **34**, 687-693 (2004).
251. Kaushik, V.V. & Moots, R.J. CDP-870 (certolizumab) in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 601-606 (2005).
252. Maini, R. et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* **354**, 1932-1939 (1999).
253. Weinblatt, M.E. 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* **48**, 35-45 (2003).
254. Bathon, J.M. et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **343**, 1586-1593 (2000).
255. Fleischmann, R. The clinical efficacy and safety of certolizumab pegol in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* **10**, 773-786 (2010).
256. Smolen, J.S. et al. Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study. *Arthritis Rheum* **52**, 1020-1030 (2005).
257. Klareskog, L. et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **363**, 675-681 (2004).
258. Navarro-Sarabia, F., Ariza-Ariza, R., Hernandez-Cruz, B. & Villanueva, I. Adalimumab for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005113 (2005).
259. Kuriya, B., Arkema, E.V., Bykerk, V.P. & Keystone, E.C. Efficacy of initial methotrexate monotherapy versus combination therapy with a biological agent in early rheumatoid arthritis: a meta-analysis of clinical and radiographic remission. *Ann Rheum Dis* **69**, 1298-1304 (2010).
260. Maini, R.N. et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **41**, 1552-1563 (1998).
261. Gomez-Reino, J.J., Carmona, L., Valverde, V.R., Mola, E.M. & Montero, M.D. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant

- increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum* **48**, 2122-2127 (2003).
262. Baecklund, E. et al. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 692-701 (2006).
263. Askling, J. & Bongartz, T. Malignancy and biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **20**, 334-339 (2008).
264. Oldfield, V. & Plosker, G.L. Golimumab: in the treatment of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *BioDrugs* **23**, 125-135 (2009).
265. Burger, D., Dayer, J.M., Palmer, G. & Gabay, C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**, 879-896 (2006).
266. Schiff, M.H. Lack of response to anakinra in rheumatoid arthritis following failure of tumor necrosis factor alpha blockade: comment on the article by Buch et al. *Arthritis Rheum* **52**, 364-365; author reply 365 (2005).
267. Aksentijevich, I. et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med* **360**, 2426-2437 (2009).
268. Reddy, S., Dolzhanskaya, N., Krogh, J. & Velinov, M. A novel 1.4 Mb de novo microdeletion of chromosome 1q21.3 in a child with microcephaly, dysmorphic features and mental retardation. *Eur J Med Genet* **52**, 443-445 (2009).
269. Kotake, S. 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* **11**, 88-95 (1996).
270. Takagi, N. et al. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **41**, 2117-2121 (1998).
271. Mihara, M. et al. Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in cynomolgus monkeys. *Clin Immunol* **98**, 319-326 (2001).
272. Smolen, J.S. 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* **371**, 987-997 (2008).
273. Schiff, M. et al. Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann Rheum Dis* **67**, 1096-1103 (2008).
274. Johnson, P.W. & Glennie, M.J. Rituximab: mechanisms and applications. *Br J Cancer* **85**, 1619-1623 (2001).

275. Emery, P. et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* **54**, 1390-1400 (2006).
276. Leandro, M.J., Cambridge, G., Ehrenstein, M.R. & Edwards, J.C. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 613-620 (2006).
277. Suresh, E. Recent advances in rheumatoid arthritis. *Postgrad Med J* **86**, 243-250 (2010).
278. Weinblatt, M.E. et al. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **363**, 1303-1312 (2010).
279. Genovese, M.C. et al. An oral syk kinase inhibitor in the treatment of rheumatoid arthritis: A 3 month randomized placebo controlled phase 2 study in patients with active RA who had failed biologic agents. *Arthritis Rheum* **63**, 337-345 (2011).
280. Weinblatt, M.E. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **58**, 3309-3318 (2008).
281. Ghoreschi, K., Laurence, A. & O'Shea, J.J. Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nat Immunol* **10**, 356-360 (2009).
282. Kremer, J.M. et al. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum* **60**, 1895-1905 (2009).
283. Hammaker, D. & Firestein, G.S. "Go upstream, young man": lessons learned from the p38 saga. *Ann Rheum Dis* **69 Suppl 1**, i77-82 (2010).
284. Cohen, S.B. et al. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 335-344 (2009).
285. Damjanov, N., Kauffman, R.S. & Spencer-Green, G.T. Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum* **60**, 1232-1241 (2009).
286. Bendele, A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **1**, 377-385 (2001).
287. Kim, W.U. et al. Type II collagen autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Am J Med Sci* **327**, 202-211 (2004).
288. Wooley, P.H. & Chapedelaine, J.M. Immunogenetics of collagen-induced arthritis. *Crit Rev Immunol* **8**, 1-22 (1987).
289. Durie, F.H., Fava, R.A. & Noelle, R.J. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* **73**, 11-18 (1994).

290. Holmdahl, R. et al. Collagen induced arthritis: an experimental model for rheumatoid arthritis with involvement of both DTH and immune complex mediated mechanisms. *Clin Exp Rheumatol* **7 Suppl 3**, S51-55 (1989).
291. Hegen, M., Keith, J.C., Jr., Collins, M. & Nickerson-Nutter, C.L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**, 1505-1515 (2008).
292. De Franco, M., Gille-Perramant, M.F., Mevel, J.C. & Couderc, J. T helper subset involvement in two high antibody responder lines of mice (Biozzi mice): HI (susceptible) and HII (resistant) to collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* **25**, 132-136 (1995).
293. Kannan, K., Ortmann, R.A. & Kimpel, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* **12**, 167-181 (2005).
294. Brand, D.D., Kang, A.H. & Rosloniec, E.F. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **25**, 3-18 (2003).
295. Ricklin, D. & Lambris, J.D. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* **25**, 1265-1275 (2007).
296. Terato, K. et al. Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of E. coli lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen. *Autoimmunity* **22**, 137-147 (1995).
297. Ditzel, H.J. The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol Med* **10**, 40-45 (2004).
298. Korganow, A.S. et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* **10**, 451-461 (1999).
299. Ji, H. et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* **16**, 157-168 (2002).
300. van de Loo, F.A., Kuiper, S., van Enkevort, F.H., Arntz, O.J. & van den Berg, W.B. Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol* **151**, 177-191 (1997).
301. Ohshima, S. et al. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8222-8226 (1998).
302. Jacobs, J.P., Wu, H.J., Benoist, C. & Mathis, D. IL-17-producing T cells can augment autoantibody-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21789-21794 (2009).
303. Williams, R.O. Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol* **114**, 330-332 (1998).
304. Busso, N. et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest* **102**, 41-50 (1998).

305. Satoh, M., Treadwell, E.L. & Reeves, W.H. Pristane induces high titers of anti-Su and anti-nRNP/Sm autoantibodies in BALB/c mice. Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera. *J Immunol Methods* **182**, 51-62 (1995).
306. Adarichev, V.A. et al. Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci. *J Immunol* **170**, 2283-2292 (2003).
307. Zhang, X. et al. Experimental chronic arthritis and granulomatous inflammation induced by bifidobacterium cell walls. *Scand J Immunol* **54**, 171-179 (2001).
308. Li, P. & Schwarz, E.M. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **25**, 19-33 (2003).
309. Keffer, J. et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* **10**, 4025-4031 (1991).
310. Puzas, J.E. et al. Degradative pathways in tissues of the temporomandibular joint. Use of in vitro and in vivo models to characterize matrix metalloproteinase and cytokine activity. *Cells Tissues Organs* **169**, 248-256 (2001).
311. Douni, E. et al. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* **47**, 27-38 (1995).
312. Probert, L., Plows, D., Kontogeorgos, G. & Kollias, G. The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice. *Eur J Immunol* **25**, 1794-1797 (1995).
313. Butler, D.M. et al. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol* **159**, 2867-2876 (1997).
314. Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G. & Kontoyiannis, D. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* **58 Suppl 1**, I32-39 (1999).
315. Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W. & Weiss, A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-662 (1992).
316. Sakaguchi, N. et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* **426**, 454-460 (2003).
317. Deighton, C.M., Walker, D.J., Griffiths, I.D. & Roberts, D.F. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* **36**, 178-182 (1989).
318. Taneja, V. & David, C.S. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J Clin Invest* **101**, 921-926 (1998).

319. Gregersen, P.K., Silver, J. & Winchester, R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **30**, 1205-1213 (1987).
320. Constantin, A. et al. Interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* **358**, 2051-2052 (2001).
321. Kanazawa, S. et al. Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extraarticular manifestations similar to rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14465-14470 (2006).
322. Fugger, L., Michie, S.A., Rulifson, I., Lock, C.B. & McDevitt, G.S. Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region beta-chain T-cell repertoire and mediates an HLA-DR-restricted immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6151-6155 (1994).
323. Walser-Kuntz, D.R., Weyand, C.M., Weaver, A.J., O'Fallon, W.M. & Goronzy, J.J. Mechanisms underlying the formation of the T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Immunity* **2**, 597-605 (1995).
324. Backlund, J. et al. Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263-270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9960-9965 (2002).
325. Hill, J.A. et al. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* **205**, 967-979 (2008).
326. Chang, X. et al. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 40-50 (2005).
327. De Rycke, L. et al. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum* **52**, 2323-2330 (2005).
328. Kouskoff, V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**, 811-822 (1996).
329. Wipke, B.T., Wang, Z., Kim, J., McCarthy, T.J. & Allen, P.M. Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography. *Nat Immunol* **3**, 366-372 (2002).
330. Hirano, T. Revival of the autoantibody model in rheumatoid arthritis. *Nat Immunol* **3**, 342-344 (2002).
331. Kyburz, D. & Corr, M. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **25**, 79-90 (2003).

332. Huang, H., Benoist, C. & Mathis, D. Rituximab specifically depletes short-lived autoreactive plasma cells in a mouse model of inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4658-4663 (2010).
333. Arend, W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 323-340 (2002).
334. Dinarello, C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**, 1627-1652 (1991).
335. Hannum, C.H. et al. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* **343**, 336-340 (1990).
336. Iwakura, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 341-355 (2002).
337. Fukumoto, T., Matsukawa, A., Ohkawara, S., Takagi, K. & Yoshinaga, M. Administration of neutralizing antibody against rabbit IL-1 receptor antagonist exacerbates lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Inflamm Res* **45**, 479-485 (1996).
338. Allen, J.B., Wong, H.L., Costa, G.L., Bienkowski, M.J. & Wahl, S.M. Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *J Immunol* **151**, 4344-4351 (1993).
339. Lubberts, E., Joosten, L.A., Helsen, M.M. & van den Berg, W.B. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine* **10**, 361-369 (1998).
340. Bendele, A. et al. Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. *Arthritis Rheum* **42**, 498-506 (1999).
341. Ma, Y. et al. Altered susceptibility to collagen-induced arthritis in transgenic mice with aberrant expression of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* **41**, 1798-1805 (1998).
342. Arend, W.P. & Gabay, C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res* **2**, 245-248 (2000).
343. Horai, R. et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 313-320 (2000).
344. Somm, E. et al. Decreased fat mass in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice: impact on adipogenesis, food intake, and energy expenditure. *Diabetes* **54**, 3503-3509 (2005).

345. Palmer, G., Talabot-Ayer, D., Kaya, G. & Gabay, C. Type I IL-1 receptor mediates IL-1 and intracellular IL-1 receptor antagonist effects in skin inflammation. *J Invest Dermatol* **127**, 1938-1946 (2007).
346. Gabay, C., Lamacchia, C. & Palmer, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 232-241 (2010).
347. Horai, R. et al. TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest* **114**, 1603-1611 (2004).
348. Matsuki, T. et al. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the development of T cell-dependent aortitis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* **112**, 1323-1331 (2005).
349. Lee, C.C., MacKay, J.A., Frechet, J.M. & Szoka, F.C. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* **23**, 1517-1526 (2005).
350. Tomalia, D.A., Naylor, A.M. & Goddard, W.A. Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew Chem Int Ed Engl* **29**, 138-175 (1990).
351. Hawker, C.J.F., J.M.J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc* **112**, 7638-7647 (1990).
352. Sebestik, J., Niederhafner, P. & Jezek, J. Peptide and glycopeptide dendrimers and analogous dendrimeric structures and their biomedical applications. *Amino Acids* **40**, 301-370 (2011).
353. Mammen, M., Choi, S.K. & Whitesides, G.M. Polyvalent interactions in biological systems : implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **37**, 2754-2794 (1998).
354. Lundquist, J.J. & Toone, E.J. The cluster glycoside effect. *Chem Rev* **102**, 555-578 (2002).
355. Andre, S., Liu, B., Gabius, H.J. & Roy, R. First demonstration of differential inhibition of lectin binding by synthetic tri- and tetravalent glycoclusters from cross-coupling of rigidified 2-propynyl lactoside. *Org Biomol Chem* **1**, 3909-3916 (2003).
356. Jiang, Y.H. et al. SPL7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 207-213 (2005).
357. Kojima, C., Kono, K., Maruyama, K. & Takagishi, T. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. *Bioconjug Chem* **11**, 910-917 (2000).
358. Drobnik, J.R., F. Soluble synthetic Polymers in biological systems. *Adv Polym Sci* **57**, 1-50 (1984).

359. Malik, N. et al. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release* **65**, 133-148 (2000).
360. Jevprasesphant, R. et al. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm* **252**, 263-266 (2003).
361. Roberts, J.C., Bhalgat, M.K. & Zera, R.T. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res* **30**, 53-65 (1996).
362. Neerman, M.F., Zhang, W., Parrish, A.R. & Simanek, E.E. In vitro and in vivo evaluation of a melamine dendrimer as a vehicle for drug delivery. *Int J Pharm* **281**, 129-132 (2004).
363. Chen, H.T., Neerman, M.F., Parrish, A.R. & Simanek, E.E. Cytotoxicity, hemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery. *J Am Chem Soc* **126**, 10044-10048 (2004).
364. Astruc, D., Boisselier, E. & Ornelas, C. Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem Rev* **110**, 1857-1959 (2010).
365. Grinstaff, M.W. Biodendrimers: new polymeric biomaterials for tissue engineering. *Chemistry* **8**, 2839-2846 (2002).
366. Seebach, D., Herrmann, G.F., Lengweiler, U.D., Bachmann, B.M. & Amrein, W. Synthesis and enzymatic degradation of dendrimers from (R)-3-hydroxy-butanoic acid and trimesic acid. *Angew Chem Int Ed Engl* **35**, 2795-2797 (1996).
367. Bracci, L. et al. Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J Biol Chem* **278**, 46590-46595 (2003).
368. Hussain, M. et al. A novel anionic dendrimer for improved cellular delivery of antisense oligonucleotides. *J Control Release* **99**, 139-155 (2004).
369. Amir, R.J., Pessah, N., Shamis, M. & Shabat, D. Self-immolative dendrimers. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 4494-4499 (2003).
370. Gillies, E.R., Dy, E., Frechet, J.M. & Szoka, F.C. Biological evaluation of polyester dendrimer: poly(ethylene oxide) "bow-tie" hybrids with tunable molecular weight and architecture. *Mol Pharm* **2**, 129-138 (2005).
371. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol* **24**, 1211-1217 (2006).
372. Malik, N., Evagorou, E.G. & Duncan, R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* **10**, 767-776 (1999).
373. Ramaswamy, S. & Perou, C.M. DNA microarrays in breast cancer: the promise of personalised medicine. *Lancet* **361**, 1576-1577 (2003).

374. Seib, F.P., Jones, A.T. & Duncan, R. Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *J Control Release* **117**, 291-300 (2007).
375. Guillot-Nieckowski, M. et al. Self-assembly, DNA complexation, and pH response of amphiphilic dendrimers for gene transfection. *Langmuir* **23**, 737-746 (2007).
376. Kobayashi, H. & Brechbiel, M.W. Dendrimer-based macromolecular MRI contrast agents: characteristics and application. *Mol Imaging* **2**, 1-10 (2003).
377. Dunphy, I., Vinogradov, S.A. & Wilson, D.F. Oxyphor R2 and G2: phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *Anal Biochem* **310**, 191-198 (2002).
378. Ziemer, L.S., Lee, W.M., Vinogradov, S.A., Sehgal, C. & Wilson, D.F. Oxygen distribution in murine tumors: characterization using oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *J Appl Physiol* **98**, 1503-1510 (2005).
379. Fu, Y. et al. Dendritic iodinated contrast agents with PEG-cores for CT imaging: synthesis and preliminary characterization. *Bioconjug Chem* **17**, 1043-1056 (2006).
380. Lowe, M., Spiro, A., Zhang, Y.Z. & Getts, R. Multiplexed, particle-based detection of DNA using flow cytometry with 3DNA dendrimers for signal amplification. *Cytometry A* **60**, 135-144 (2004).
381. Benters, R., Niemeyer, C.M. & Woehle, D. Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays. *ChemBiochem* **2**, 686-694 (2001).
382. Benters, R., Niemeyer, C.M., Drutschmann, D., Blohm, D. & Woehle, D. DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems. *Nucleic Acids Res* **30**, E10 (2002).
383. Lim, S.Y., Kim, B.J., Lee, M.K. & Kim, K. Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of Mycobacterium species. *Lett Appl Microbiol* **46**, 101-106 (2008).
384. Newman, J.D. & Turner, A.P. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens Bioelectron* **20**, 2435-2453 (2005).
385. Armada, M.P. et al. Electrocatalytic properties of polymethylferrocenyl dendrimers and their applications in biosensing. *Bioelectrochemistry* **69**, 65-73 (2006).
386. Supattapone, S., Nguyen, H.O., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. & Scott, M.R. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14529-14534 (1999).
387. Mumper, R.J. et al. Formulating a sulfonated antiviral dendrimer in a vaginal microbicide gel having dual mechanisms of action. *Drug Dev Ind Pharm* **35**, 515-524 (2009).

388. McCarthy, T.D. et al. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol Pharm* **2**, 312-318 (2005).
389. Patton, D.L., Cosgrove Sweeney, Y.T., McCarthy, T.D. & Hillier, S.L. Preclinical safety and efficacy assessments of dendrimer-based (SPL7013) microbicide gel formulations in a nonhuman primate model. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1696-1700 (2006).
390. Wathier, M., Jung, P.J., Carnahan, M.A., Kim, T. & Grinstaff, M.W. Dendritic macromers as in situ polymerizing biomaterials for securing cataract incisions. *J Am Chem Soc* **126**, 12744-12745 (2004).
391. Velazquez, A.J. et al. New dendritic adhesives for sutureless ophthalmic surgical procedures: in vitro studies of corneal laceration repair. *Arch Ophthalmol* **122**, 867-870 (2004).
392. Shaunak, S. et al. Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. *Nat Biotechnol* **22**, 977-984 (2004).
393. Chauhan, A.S., Diwan, P.V., Jain, N.K. & Tomalia, D.A. Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules* **10**, 1195-1202 (2009).
394. Rengan, K.E., R. Phosphonium cascade molecules. *J Chem Soc Chem Commun*, 1084-1085 (1990).
395. Launay, N., Caminade, A.-M., Lahana, R. & Majoral, J.-P. A general synthetic strategy for neutral phosphorus containing dendrimers. *Angew Chem Int Ed Engl* **33**, 1589-1592 (1994).
396. Majoral, J.P., Caminade, A.M. & Maraval, V. The specific contribution of phosphorus in dendrimer chemistry. *Chem Commun (Camb)*, 2929-2942 (2002).
397. Lartigue, M.L., Donnadieu, B., Galliot, C., Caminade, A.-M., Majoral, J.-P. & Fayet, J.-P. Chiroptical properties of dendrimers with stereogenic end groups. *Macromolecules* **30**, 7335-7337 (1997).
398. Caminade, A.M., Turrin, C.-O. & Majoral, J.-P. Biological properties of phosphorus dendrimers. *New J Chem* **34**, 1512-1524 (2010).
399. Le Berre, V. et al. Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, e88 (2003).
400. Solassol, J. et al. Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie. *J Gen Virol* **85**, 1791-1799 (2004).
401. Blanzat, M. et al. Dendritic catanionic assemblies: in vitro anti-HIV activity of phosphorus-containing dendrimers bearing galbeta1cer analogues. *Chembiochem* **6**, 2207-2213 (2005).
402. Klajnert, B. et al. Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185-208. *Biochem Biophys Res Commun* **364**, 20-25 (2007).

403. Yu, Y., Feng, C., Caminade, A.M., Majoral, J.P. & Knoll, W. The detection of DNA hybridization on phosphorus dendrimer multilayer films by surface plasmon field enhanced-fluorescence spectroscopy. *Langmuir* **25**, 13680-13684 (2009).
404. Spataro, G. et al. Designing dendrimers for ocular drug delivery. *Eur J Med Chem* **45**, 326-334 (2010).
405. Feng, C.L. et al. DNA hybridization induced selective encapsulation of small dye molecules in dendrimer based microcapsules. *Analyst* **135**, 2939-2944 (2010).
406. Slany, M., Bardaji, M., Caminade, A.M., Chaudret, B. & Majoral, J.P. Versatile Complexation Ability of Very Large Phosphino-Terminated Dendrimers. *Inorg Chem* **36**, 1939-1945 (1997).
407. Marmillon, C. et al. Organophosphorus Dendrimers as New Gelators for Hydrogels. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**, 2626-2629 (2001).
408. Poupot, M. et al. Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. *Faseb J* **20**, 2339-2351 (2006).
409. Rolland, O. et al. Tailored control and optimisation of the number of phosphonic acid termini on phosphorus-containing dendrimers for the ex-vivo activation of human monocytes. *Chemistry* **14**, 4836-4850 (2008).
410. Fruchon, S. et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. *J Leukoc Biol* **85**, 553-562 (2009).
411. Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **73**, 209-212 (2003).
412. Portevin, D. et al. Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4+ T cell proliferation enhances ex-vivo expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy. *J Transl Med* **7**, 82 (2009).
413. Abstract, G. *Angew Chem Int Ed Engl* **14**, 2523-2526 (2007).
414. Griffe, L. et al. Multiplication of human natural killer cells by nanosized phosphonate-capped dendrimers. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 2523-2526 (2007).
415. Born, W.K., Reardon, C.L. & O'Brien, R.L. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **18**, 31-38 (2006).
416. Kunzmann, V. et al. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* **96**, 384-392 (2000).
417. Hayder, M., Fruchon, S., Fournie, J.J., Poupot, M. & Poupot, R. Anti-Inflammatory Properties of Dendrimers per se. *ScientificWorldJournal* **11**, 1367-1382 (2011).
418. Hayder, M. et al. A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci Transl Med* **3**, 81ra35 (2011).
419. Pettit, A.R. et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* **159**, 1689-1699 (2001).

420. Rivollier, A. et al. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* **104**, 4029-4037 (2004).
421. Chauhan, D. et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* **16**, 309-323 (2009).
422. Kukreja, A., Radfar, S., Sun, B.H., Insogna, K. & Dhodapkar, M.V. Dominant role of CD47-thrombospondin-1 interactions in myeloma-induced fusion of human dendritic cells: implications for bone disease. *Blood* **114**, 3413-3421 (2009).
423. Kukreja, A. et al. Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J Exp Med* **203**, 1859-1865 (2006).
424. Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* **181**, 3733-3739 (2008).

