



THÈSE présentée par :

Lucas PHILIPPE

soutenue le : 06 avril 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité :

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Domaine : Immunologie

**LE CLUSTER MIR-1792, ROLE DANS LA REGULATION DE LA REPONSE
INFLAMMATOIRE AU COURS DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE**

THÈSE dirigée par :

Mme WACHSMANN Dominique
Mr SIBILIA Jean

Professeur, université de Strasbourg
Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BRANLANT Christiane
Mme MICELI-RICHARD Corinne

Docteur, université de Lorraine
Docteur, université Paris 11

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme QUESNIAUX Valérie
Mme ROMBY Pascale

Docteur, université d'Orléans
Docteur, université de Strasbourg



THÈSE présentée par :

Lucas PHILIPPE

soutenue le : 06 avril 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité :

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Domaine : Immunologie

**LE CLUSTER MIR-1792, ROLE DANS LA REGULATION DE LA REPONSE
INFLAMMATOIRE AU COURS DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE**

THÈSE dirigée par :

Mme WACHSMANN Dominique
Mr SIBILIA Jean

Professeur, université de Strasbourg
Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BRANLANT Christiane
Mme MICELI-RICHARD Corinne

Docteur, université de Lorraine
Docteur, université Paris 11

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme QUESNIAUX Valérie
Mme ROMBY Pascale

Docteur, université d'Orléans
Docteur, université de Strasbourg

Remerciements

Je remercie les Docteurs *Christiane Branlant*, *Valérie Quesniaux*, et *Pascale Romby* ainsi que le Professeur *Corinne Miceli-Richard* pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie tout d'abord le Professeur *Dominique Wachsmann* pour la qualité de son encadrement, de son enseignement, sa rigueur scientifique, son sens de la synthèse mais aussi pour sa confiance et l'opiniâtreté qui m'a été enseignée dans les travaux de recherche, ainsi que sa grandeur d'âme tellement précieuse à tous les membres du laboratoire.

Je remercie le Professeur *Jean Sibia* pour son soutien, ses conseils, sa gentillesse et sa bienveillance dans la direction de cette thèse.

Je les remercie chaleureusement tous deux pour leur enseignement de l'immunologie et de la rhumatologie tellement précieux pour le végétaliste que j'étais à mon arrivée et la confiance qu'ils m'ont témoignée lors de mon recrutement.

Je remercie le Professeur *Jacques-Eric Gottenberg* pour son entrain et le dynamisme apporté lors de nos entretiens.

J'aimerais également remercier le Professeur *Philippe Georgel* et le Docteur *Sébastien Pfeffer*, pour leurs inestimables conseils, mais aussi pour leur regard sur la recherche et leur dynamisme, l'exemple donné pour le travail difficile de présentation orale et d'écriture, ainsi que pour le charisme qu'ils donnent à cette discipline et l'envie de persévérer.

J'aimerais également remercier les membres de notre équipe :

Ghada pour ton aide de tous les instants, ton incroyable polyvalence, ton dynamisme ravageur et ton ardeur au travail. Je ne compte plus les kilomètres parcourus à te courir après. C'était également très agréable et réconfortant de discuter avec toi, rassurant et synonyme de sérénité. Merci aussi pour ta cuisine, qui m'a fait saliver toutes ces matinées.

Antoine, je ne sais pas par quoi commencer par ton l'humour ou ta rigueur scientifique et le véritable scanner analyseur numérique qui est caché je ne sais où dans ton cerveau. Tes dons de pâtissier donnèrent un goût de sucre aux lab meetings du mercredi.

Yazhuo, pour ta fantaisie qui est pour beaucoup dans la bonne ambiance qui planait au dessus de la paillasse, et ton humilité face à toutes les techniques que tu as utilisées et maîtrisées, ton calme face à l'adversité qui a trait à notre travail de thésard, et ton enseignement ludique de la cuisine chinoise.

Angélique pour ta compétence, ton calme et ta bonne humeur tellement réconfortante.

Je remercie également les membres passés et présents de notre équipe : *Alain*, *Etienne*, *Arnaud*, merci merci merci du fond du cœur, j'en ris encore. *Noha*, pour ta disponibilité lors de mon arrivée. *Cécile* et *Gaël*, la bonne humeur et la diplomatie !!, et *Khadija*, les leçons d'orthographe, *Alexandre*, *Jean-Hugues* et *Justine*, pour votre curiosité et votre

générosité au travail. *Laurent* et *Christelle* pour votre bonne humeur. *Quentin* pour son assiduité et son efficacité en tant que commis de clonage. *Manon*, *Carole* et *Alice*, pour leur entrain et leur joie !

J'aimerais aussi remercier mes amis et collègues de chez *Sébastien*, *Mélanie* et *Guillaume* pour avoir sauvé le soldat *Ryan*, et *Lee* pour les déformations réciproques qu'on a imposé à nos langues respectives, mais je crois que sur ce terrain là je gagne largement. *Guillaume*, Vienne, ça bourdonne encore !

J'aimerais remercier enfin ma grand-mère *Claudia Haffen* pour la transmission de son goût pour la biologie qu'elle partageait avec sa sœur lors de nos traversées les plus improbables dans notre redoutable chaîne de montagnes vosgiennes.

J'aimerais remercier également ma mère, *Caroline Stenger Philippe* pour tout l'amour et le soutien qu'elle m'a apportés, et le courage qu'elle m'a enseigné. Pour ses conseils tellement efficaces aussi.

Mon père, *Jean-Jacques Philippe*, pour son regard critique sur la vie et la sagesse de ses analyses.

J'aimerais remercier tout particulièrement ma femme, *Basma Naouri Philippe*, pour son amour, sa confiance, l'importance qu'elle m'a donné ainsi que sa philosophie qui m'a aidé à avancer.

J'aimerais enfin remercier l'ensemble de ma famille alsacienne, et marocaine, mes oncles, mes tantes et mes cousins, beaux parents et belle sœur ainsi que ma sœur *Diane* et mon frère *Robin*, de même que mes amis, pour tous ces plaisirs, ces moments de rire et de détente, ô combien nécessaires pour arriver au bout.

Merci à tous du fond du cœur.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	7
INTRODUCTION	9
I. LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE	9
1. Présentation de la maladie	9
2. Rôle particulier des FLS dans la pathogénie de la PR	12
II. LES TOLL-LIKE RECEPTORS	15
1. Structure et ligands	16
a. Les TLRs membranaires	16
b. Les TLRs cytosoliques	17
c. Les ligands endogènes des TLRs ou DAMPs	18
2. Les voies de signalisation des TLRs	19
a. La voie MyD88-dépendante	20
b. La voie TRIF-dépendante	20
3. Les régulateurs négatifs des TLRs	21
4. Les TLRs dans la PR	23
5. TLRs et modèles expérimentaux de PR	23
III. LES MAPKs	25
1. TAK1	26
2. MEKK3	27
3. ASK1	27
a. Structure et fonctions	27
b. ASK2	28
c. La mise en jeu d'ASK1	29
d. ASK1 et les réponses immunes innées	29
e. ASK1, réponses au stress et différenciation cellulaire	30
f. Régulation de l'activité et de l'expression d'ASK1	31
• Régulation de son activité et de sa dégradation	31
• Régulation de sa dégradation	32
• Régulation de son expression au niveau transcriptionnel	32
g. ASK1 et pathologies	32
• ASK1 et la PR	32
• ASK1 et les maladies cardiovasculaires	33
• ASK1 et les maladies neurodégénératives	33
• ASK1 et le diabète	34
• Phénotypes des souris ASK1 -/- dans les modèles de pathologies étudiés	35
4. La propagation du signal en aval des MAPKs	35
5. Régulations négatives des MAPKs par les MKPs	36
a. MKP-1, un régulateur négatif de la réponse aux TLRs	36
b. MKP-5	37
c. DUSP2 (PAC-1)	37
IV. REGULATION EPIGENETIQUE PAR LES miARNs DANS LA PR	39
1. La biogénèse des miARNs	39
2. La voie effectrice des miARNs	42
a. Les protéines Argonautes	42
b. Protéines associées au complexe	43
c. L'appariement	43

d.	La répression de la traduction des ARNm	44
•	Inhibition de l'initiation de la traduction	45
•	Inhibition de l'élongation	46
e.	La dégradation des ARNm par les miARNs	46
f.	Mode de régulation non canonique	47
3.	Les miARNs et les TLRs	47
4.	Les miARNs et la PR	50
5.	Les miARNs, futurs biomarqueurs pour la PR ?	52
6.	Les miARNs une nouvelle stratégie thérapeutique	53
V.	LE CLUSTER miR-17~92	55
1.	Organisation du cluster miR-17~92	55
2.	La régulation du cluster miR-17~92 par c-MYC/MYCN	56
3.	Le cluster miR-17~92 et le développement	57
a.	L'appareil cardio-pulmonaire	57
b.	Le cluster miR-17~92 et son rôle dans la spermatogénèse	58
4.	Le cluster miR-17~92 et la voie TGF- β	58
5.	Le cluster miR-17~92 dans l'immunité	59
6.	Le cluster miR-17~92 et son implication dans les cancers	60
	OBJECTIFS DE LA THESE	62
	RESULTATS	
I.	PUBLICATION 1 : Régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de TLR2 par miR-19 en réponse au BLP dans les FLS rhumatoïdes.	63
II.	PUBLICATION 2 : Régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm d'ASK1 par miR-20a en réponse au LPS dans les FLS rhumatoïdes.	73
III.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES	
1.	...sur les données des miARNs modulés par TLR4 dans les FLS rhumatoïdes	105
2.	... sur le cluster miR-17~92.	107
3.	...étude du rôle potentiel de la régulation de DNMT1 par les miARNs dans les FLS rhumatoïdes	110
4.	...miR-29b et régulation de l'apoptose et de la prolifération des FLS dans la PR	119
	CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	126
	BIBLIOGRAPHIE	135

LISTE DES ABREVIATIONS

5-aza c	Azacitidine
ACD	Artère Coronaire Droite
ADN	Acide Desoxyribonucléique
Ago	Argonaute
ALS	Sclérose Amyotrophique Latérale
AP-1	Activator Protein 1
ARN	Acide Ribonucléique
ARNsb	ARN simple brin
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATF1	Activating Transcription Factor 1
A β	Amyloid beta
BAFF	B-cell Activating Factor
BLP	Bacterial Lipopeptid
BTK	Burton's Tyrosine Kinase
CCL2	Chemokine Ligand 2
KC	Keratinocyt Chemoattractant
CCP	Citrunillated Peptid
CD14	Cluster of Differentiation 14
CDF	Cellules Dendritiques Folliculaires
CDK	Cyclin-dependant Kinase
CIAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CREB	CAMP Responsive Element Binding Protein 1
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAMPs	Damage Molecular Patterns
Dcl-1	DEC-205-associated C-type lectin-1
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DNMT	DNA Méthyltransférase
DR3	Death Receptor 3
DRBP	dsRNA Binding Protein
DUSP	Dual Specificity Phosphatase
ETS	External Transcribed Sequence
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FLS	Fibroblast-like Synoviocyte

H5N1	Hémagglutinine 5 Neuraminidase 1
HDAC	Histone Déacétylase
HDL	High Density Lipoprotein
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMBG1	High-mobility Group Protein Box-1
Hsp	Heatshock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
CDH1	Cadhérine 1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IKK	IkappaB kinase
IL	Interleukine
IL1-RA	Récepteur alpha de l'interleukine 1
IPP	Interphalangiennes Proximales
IRAK	Interleukin-1 Receptor-associated Kinase
IRF	Interféron
IRS	Insulin Receptor Substrate
JDP	Jun Dimerization Protein
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KO	Knock Out
LB	Lymphocyte B
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich Repeat
LT	Lymphocyte T
LTH1	Lymphocyte T Helper 1
MAL	MyD88 Adapter-like Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBD	Methyl Cytosine Binding Protein
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MD2	Myeloid Differentiation Protein-2
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
miARN	MicroARN
MK	MAPK-activated protein Kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
MNK	MAPK-interacting kinases
MSK	Mitogen- and Stress Activated Kinases
NEMO	NF-kappa-B essential modulator

NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NFκB	Nuclear Factor KappaB
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PADI4	Peptidyl Arginine Deiminase, type IV
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PABP-1	Polyadenylate-binding Protein 1
PAZ	Polyubiquitin Associated Zinc finger
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE2	Prostaglandine E2
Poly(I:C)	Polyinosinic-polycytidylic Acid Double-stranded RNA
PP5	Serine/threonine-protein Phosphatase 5
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTC1	Patched Homolog 1
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PTN 22	Pleiotrophine 22
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RANK	Receptor of Nuclear Factor NF kappa B
RIP1	Receptor-interacting Protein 1
ROS	Reactive Oxygen Species
RsK	Ribosomal Protein S6 Kinase
RT-qPCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SHIP	SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase
siARN	small interfering, petit ARN interférant
SOCS1	Suppressor of Cytokine Signaling 1
SRA	SET and RING-associated Domain
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STZ	Streptozotocine.
SUMO-1	SMT3 Suppressor of Mif Two 3 Homolog 1
TAB	TAK1-binding Protein 2
TAK1	TGF-beta Activated Kinase 1
TGF	Transforming Growth Factor
TIPAP	Toll-interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein

TNF- α	Tumor Necrosis Factor
TOLLIP	Toll Interacting Protein
TRADD	TNFRSF1A-associated via Death Domain
TRAF	TNF Receptor-associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAM	TRIF-related Adaptor Molecule
TRBP	TAR RNA Binding Protein 2
TRIF	TIR Domain Containing Adaptor Inducing Interferon-beta
TTP	Tristetraproline
UHRF1	Ubiquitin-like with PHD and Ring Finger Domains 1
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1	Déformations caractéristiques des mains au cours de la PR	9
Figure 2	Pathogénie de la PR	10
Figure 3	Phases de la pathogénie de la PR	12
Figure 4	Le synoviocyte : une cellule agressive et agressive	14
Figure 5	Les TLRs et leur répartition cellulaire	16
Figure 6	Les voies de signalisation TLRs dépendantes	21
Figure 7	Organisation des MAPKS dans le système immunitaire inné	25
Figure 8	MAP3Ks et récepteurs de l'immunité innée	26
Figure 9	Régulation du signalosome ASK1 par la thiorédoxine	28
Figure 10	Mise en jeu d'ASK1 par les voies TLR4 et du TNF- α dans les réponses immunes innées.	30
Figure 11	Régulation post traductionnelle d'ASK1	31
Figure 12	Les MAPK phosphatases, régulateurs négatifs des MAPKS	38
Figure 13	La biogénèse des miARNs	41
Figure 14	Structure et organisation d'une protéine Argonaute	42
Figure 15	Organisation du cluster miR-17-92 et de ses paralogues	56
Figure 16	Rôle du cluster miR-17~92 et de ses paralogues dans l'apoptose et la croissance tumorale via l'inhibition de leurs gènes cibles.	57
Figure 17	RT-qPCR préliminaire sur un groupe de miARNs abaissés au cours du microarray en réponse au LPS.	106
Figure 18	Sites de fixation de c-MYC en amont et en aval du cluster miR-17~92.	107
Figure 19	Expression de c-Myc évaluée par RT-qPCR.	107
Figure 20	Expression de miR-18a, miR-19a, miR-19b et miR-92 en réponse au BLP à 6h et 24h et au LPS à 6h.	108
Figure 21	Effet de l'inhibition de miR-20a sur la régulation du gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle de la 3'-UTR d'Ask1 (MAP3K5), Tak1 (MAP3K7) et Irak4 dans des cellules HEKGrip.	109
Figure 22	Maintien de la méthylation de l'ADN au cours de la réplication de l'ADN.	111
Figure 23	Expression de l'ARNm de DNMT1 évaluée par RT-qPCR dans les FLS issus de membranes synoviales de patients atteints d'arthrose (OA) ou de PR.	113
Figure 24	Expression de l'ARNm de DNMT3A par RT-qPCR dans des FLS issus de PR et d'OA.	114
Figure 25	Expression de mir-148a, mir-148b et mir-152 par qRT-PCR dans les FLS issus de 3 patients OA et PR.	115

Figure 26	Expression de Dnmt1 et Dicer par RT-qPCR dans les FLS rhumatoïdes après transfection d'un siRNA ciblant Dicer.	116
Figure 27	Site de régulation de miR-29b sur le messenger de c-Fos prédit par MicroCosmTargets Version 5.	121
Figure 28	Expression de l'ARNm, dans les FLS de PR, de Mcl-1 et c-Fos.	121
Figure 29	Etude de l'ADN mono- et oligonucléosomal dans les FLS rhumatoïdes non transfectés ou transfectés par miR-29b	123
Figure 30.	Effet de la transfection de miR-29b sur la régulation du gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle de la 3'UTR de c-Fos dans des cellules HEKGrip.	125
Figure 31.	Site de fixation de miR-19 sur la 3'UTR de Tlr2 de l'homme (Hsa) et de l'orang outan (Pab).	127
Figure 32.	Comparaison entre les paralogues miR-92a et miR-363.	129
Figure 33	Schéma de régulation potentielle de la signalisation et l'expression d'ASK1 au niveau post-transcriptionnel.	131
Figure 34	Conservation du site de fixation de la "seed-sequence" de miR-20a, d'après le site de prédiction TargetScan.	132

TABLEAUX

Tableau 1	Les régulateurs négatifs des voies de signalisation des TLRs.	22
Tableau 2	Etude des phénotypes de souris ASK1 -/- dans des modèles de pathologies faisant intervenir ASK1.	35
Tableau 3	Les miARNs et les voies TLRs	50
Tableau 4.	Régulation des miARNs au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Expression comparée aux contrôles ou induites par l'activation des TLRs.	53
Tableau 5	Cibles du cluster miR-17~92 dans les tumeurs	61
Tableau 6	miARNs sélectionnées à la suite d'un microarray effectué sur des FLS activés par le LPS pendant 6h.	105

INTRODUCTION

I. LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

1. Présentation de la maladie

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est actuellement considérée comme le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires (prévalence = 1% de la population mondiale). Il y a environ 150 000 à 250 000 malades en France. Elle se caractérise par une atteinte inflammatoire des synoviales articulaires et tendineuses, prédominante aux mains, aux pieds et aux genoux. Elle se définit comme un rhumatisme inflammatoire polyarticulaire, évoluant de façon chronique par poussées, pouvant entraîner des déformations et destructions articulaires. La PR peut également être une maladie systémique entraînant des manifestations extra-articulaires pouvant compromettre le pronostic vital. Elle touche plus fréquemment les femmes (3 femmes pour 1 homme) et débute le plus souvent vers 30 à 50 ans, mais peut aussi se déclarer aux extrêmes de la vie.

La PR peut débuter de façon insidieuse, progressive ou aiguë. Les manifestations initiales sont le plus souvent des polyarthrites (au moins 4 arthrites) symétriques, concernant les articulations des mains [poignets, métacarpophalangiennes (MCP), interphalangiennes proximales (IPP)] et des avant-pieds [métatarsophalangiennes (MTP)]. Cependant des mono- ou oligoarthrites (jusqu'à 3 arthrites) peuvent être observées. L'inflammation articulaire se caractérise par le gonflement et l'augmentation de la température des articulations touchées. Elle s'accompagne d'une douleur d'horaire inflammatoire, prédominante en fin de nuit et en début de journée, ainsi que d'une raideur articulaire matinale prolongée (déroutillage matinal).

Au cours de l'évolution de la pathologie, qui se fait de façon progressive sur plusieurs années, le nombre d'articulations touchées augmente, le cartilage, l'os et les structures périarticulaires (capsule, tendons) sont détruits, ce qui conduit aux déformations caractéristiques de la PR. La maladie évolue par poussées inflammatoires, plus ou moins rapprochées selon les patients (**Figure 1**).



Figure 1 : Déformations caractéristiques des mains au cours de la PR

Il est actuellement acquis que de nombreux facteurs interviennent dans l'étiopathogénie de la PR : facteurs génétiques, environnementaux, hormonaux et psychologiques qui contribuent à l'activation d'une réponse immunitaire innée et acquise, incontrôlée.

La réaction auto-immune qui se manifeste par la présence d'auto-anticorps anti-IgG, les facteurs rhumatoïdes et anti-peptides citrullinés (anti-CCP), précède, parfois de plusieurs années, l'apparition des manifestations cliniques. On parle alors de phase pré-articulaire. Les mécanismes impliqués dans cette rupture de la tolérance au niveau des lymphocytes B (LB) et des lymphocytes T (LT) ne sont pas identifiés. Ils résultent probablement d'anomalies de la sélection thymique ou de la tolérance périphérique. Des facteurs environnementaux, tels les microorganismes, le stress et surtout le tabac associés à des facteurs génétiques pourraient être à la fois inducteurs et agir sur la gravité de la maladie. Parmi les facteurs génétiques, des loci de susceptibilité ont été identifiés. Les antigènes HLA ont été les premiers facteurs de susceptibilité décrits dans la PR et l'association avec des allèles HLA-DRB1 (0405) est actuellement bien admise.

D'autres loci incluant les gènes codant la protéine tyrosine phosphatase non réceptrice type 22 (PTPN22), la peptidyl arginase déiminase de type IV (PADI4), NOTCH4, la ténascine XB (Tamiya et al., 2005), CTLA-4, les récepteurs du fragment Fc des IgG (RFcy), de nombreuses cytokines (TNF- α , IL-1, IL-10, IL-21) ou leurs récepteurs, ont été également associés à des degrés divers au déclenchement et à la sévérité de la maladie.

Sur cette base auto-immune, des facteurs vont alors initier la réponse au niveau articulaire et déclencher la phase clinique de la maladie. Des facteurs microbiens pourraient jouer un rôle important. La cavité synoviale va alors être le siège d'une réaction inflammatoire excessive qui touche plus particulièrement la membrane synoviale (**Figure 2**).

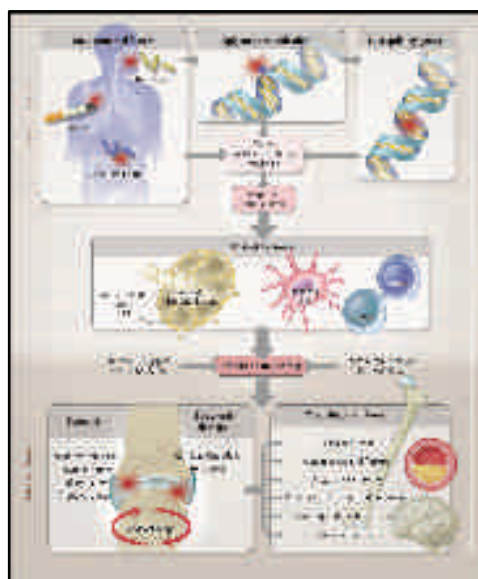


Figure 2 : Pathogénie de la PR (McInnes and Schett, 2011)

La membrane synoviale, constituée de macrophages (synoviocytes de type A) et de fibroblastes (synoviocytes « fibroblast-like » (FLS) ou synoviocytes de type B) est habituellement paucicellulaire avec une couche bordante (intimale) composée de 1 à 2 couches de cellules. Au cours de la PR, elle devient hyperplasique : la couche bordante s'épaissit pour comprendre 4 à 10 couches de cellules, parfois même plus de 20. La membrane synoviale rhumatoïde est le siège d'une inflammation chronique caractérisée par une infiltration cellulaire où prédominent les macrophages, les LB et les LT. On trouve également des cellules dendritiques (CD), des mastocytes et des plasmocytes (pannus rhumatoïde). Takemura et al. ont montré que dans 56% des cas, les LT, les LB, les macrophages et les CD sont présents en infiltrats diffus sans structure spécifique (Takemura et al., 2001). Dans les autres cas, les LT et LB infiltrés peuvent s'organiser en microstructures de deux types qui s'excluent mutuellement : i) en follicules secondaires avec un centre germinatif caractérisé par une prolifération cellulaire et la présence d'un réseau de CD folliculaires (CDF) ou ii) en agrégats de LT et LB sans centre germinatif et sans CDF, ce qui distingue cet agrégat d'un follicule primaire. Dans les deux cas, on observe la présence de plasmocytes qui s'accumulent sous la couche bordante.

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle que pourraient jouer ces différentes cellules présentes dans l'articulation rhumatoïde. Actuellement, on considère que la pathogénie de la PR au niveau articulaire peut être schématiquement subdivisée en 3 phases, qui ne sont pas mutuellement exclusives : la phase d'initiation, la phase chronique et la phase de destruction. **(Figure 3)**.

-La phase d'initiation : conformément à ce modèle et chez des sujets prédisposés génétiquement, l'initiation de la PR a longtemps été considérée comme résultant d'une immunisation contre un auto-antigène spécifique qui en réalité n'a jamais été identifié. En fait, il est vraisemblable que l'initiation dépende essentiellement d'une activation locale de la membrane synoviale et donc des cellules de l'immunité innée qui résident dans l'articulation telles les CD, les macrophages et les FLS (Zvaifler, 2006). Cette activation peut être due à des agents microbiens ubiquistes responsables de bactériémies intra-articulaires. Ces germes peuvent libérer des PAMPs (pathogen associated molecular patterns) qui vont activer ces cellules de l'immunité innée via des récepteurs transmembranaires, les PRRs ou pattern recognition receptors. Cette activation peut-être aussi due à des DAMPs ou damage-associated molecular patterns libérés au cours de la réaction inflammatoire.

-La pérennisation de la synovite rhumatoïde est la conséquence d'une réaction immunitaire intra-articulaire liée surtout à la migration des LT et des LB (Firestein and Zvaifler, 2002). Si on a longtemps attribué aux LT un rôle central dans l'étiopathologie de la phase chronique de la PR, il semble qu'aujourd'hui un rôle prépondérant puisse être attribué aux LB à l'origine de la

synthèse de nombreux auto-anticorps dont certains sont spécifiques de la PR, tels les anticorps anti-peptides citrullinés. Les LB peuvent aussi agir comme des cellules présentatrices d'antigène aux LT.

-La phase de destruction est liée à l'intervention de différents systèmes dont le système RANK-RANK-ligand et à la libération de nombreuses métalloprotéases qui vont détruire le cartilage et l'os.

La phase de destruction est essentiellement médiée par les ostéoclastes et des effecteurs, tels des protéases, libérés par les FLS qui acquièrent un phénotype agressif.

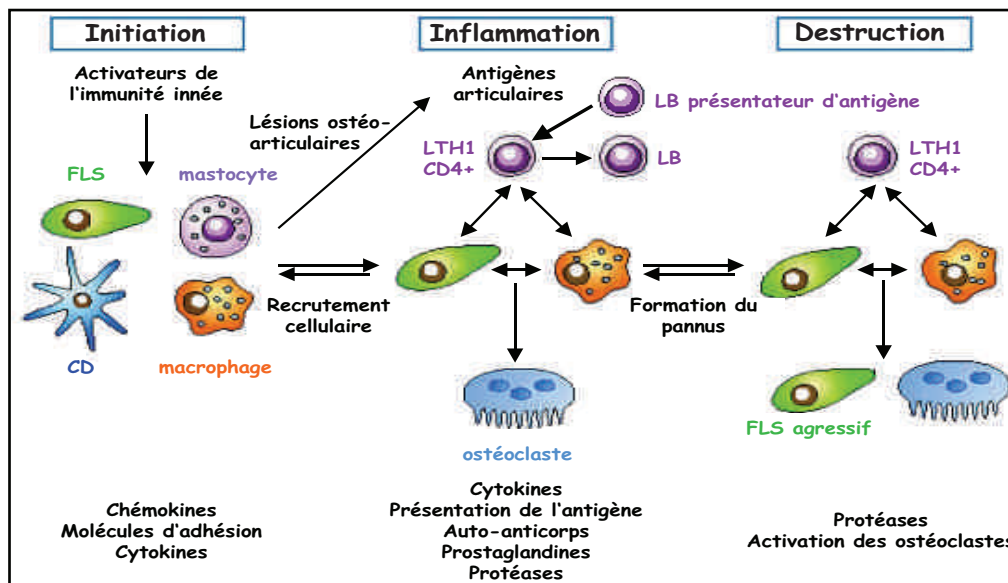


Figure 3: Phases de la pathogénie de la PR (Firestein, 2003; Firestein and Zvaifler, 2002).

Au cours de notre travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux cellules résidentes de la membrane synoviale, les FLS qui ne sont pas des acteurs classiques de la réponse inflammatoire et auto-immune. Activés de façon intrinsèque ou extrinsèque par l'environnement rhumatoïde, ils jouent un rôle essentiel dans la pathogénie de la PR.

2. Rôle particulier des FLS dans la pathogénie de la PR

Les FLS se définissent comme des cellules dérivant de précurseurs mésenchymateux qui sont ensuite renouvelés par divisions au sein de la membrane synoviale. Ils expriment la cadhérine 11, l'uridine diphosphoglucodéshydrogénase, VCAM-1 et ICAM-1, $\alpha 4\beta 1$ et le CD55. La fonction essentielle de ces cellules est d'approvisionner la cavité synoviale en protéines nutritives et lubrifiantes tel l'acide hyaluronique. Ces cellules participent également au remodelage continu de la matrice extra-cellulaire en synthétisant du collagène et des hyaluronidases ainsi que des

métalloprotéases (Muller-Ladner et al., 2007). La membrane synoviale humaine normale comporte des FLS de deux phénotypes, les FLS de la couche bordante (intimaux) et les FLS de la couche plus profonde (sub-intimaux).

Les FLS de PR possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, les distinguant des FLS de patients atteints d'arthrose et des FLS de personnes saines. Ces cellules acquièrent un phénotype agressif qui est la résultante de modifications intrinsèques et d'activations d'origine extrinsèque. Parmi les facteurs extrinsèques, les interactions entre les récepteurs Toll-like (TLRs) et les composants d'agents infectieux ou PAMPs ou les produits libérés lors de la réaction inflammatoire ou DAMPs jouent un rôle essentiel. Les cytokines, présentes au niveau synovial, les contacts cellules/cellules vont également participer à l'activation des FLS.

En ce qui concerne les facteurs intrinsèques, les FLS sont des cellules qui prolifèrent et ne meurent pas. Différents facteurs impliqués dans la progression cellulaire sont augmentés. Il s'agit de c-FOS, c-MYC, c-JUN, JUN-b et ERG-1. On observe également une diminution de l'expression d'inhibiteurs de cyclines tels Cip/Kip et INK4. Il semble cependant que l'hyperplasie synoviale puisse plutôt s'expliquer par le fait que les synoviocytes présentent une grande résistance à l'apoptose, notamment par la régulation de protéines régulatrices de l'apoptose. Ainsi, des facteurs anti-apoptotiques sont surexprimés dans les FLS rhumatoïdes, tel BCL-2 et MCL-1. L'IL-15 déclenche la surexpression de BCL-2 et BCL-X. SUMO-1 est également surexprimé dans les synoviocytes rhumatoïdes et protège de l'apoptose par sumoylation de protéines nucléaires. Dans les sites invasifs, la phosphatase PTEN est diminuée (Wachsmann and Sibilia, 2011).

D'autres facteurs intrinsèques vont jouer un rôle dans l'acquisition du phénotype agressif des FLS. En effet, des études récentes ont mis en évidence des anomalies de la régulation épigénétique dans les FLS rhumatoïdes.

Karouzakis et al. ont montré que les FLS rhumatoïdes présentent un niveau globalement plus bas de méthylation de l'ADN par rapport aux FLS d'arthrose (Karouzakis et al., 2009b). Cette hypométhylation est associée à une diminution de l'expression de DNMT1. Une hypométhylation induite par la 5-aza C, donne aux FLS normaux un profil de FLS rhumatoïdes et entraîne la surexpression d'un certain nombre gènes codant des cytokines, des MMPs, des protéines de la MEC, des kinases, des facteurs de transcription qui jouent un rôle majeur dans la PR.

L'acétylation des histones est également un mécanisme de contrôle épigénétique qui pourrait jouer un rôle dans l'activation intrinsèque des FLS rhumatoïdes. Huber et al. ont montré que dans le tissu synovial, il y avait une nette augmentation de l'acétylation avec une diminution de l'expression des HDACs 1 et 2, diminution qui n'a cependant pas été retrouvée dans les FLS de

PR lorsqu'on les compare à des FLS isolés de patients atteints d'arthrose (Huber et al., 2007). Toutefois, des inhibiteurs de déacétylases tels le FK228, ou la Trichostatine A se sont révélés protecteurs en inhibant l'inflammation synoviale (Nishida et al., 2004) et en rétablissant l'apoptose (Nakamura et al., 2008). Il existe donc une contradiction entre la diminution des HDACs dans la synoviale des patients atteints de PR et le fait que leur inhibition exerce un effet favorable sur l'évolution de la maladie dans des modèles animaux et sur la réponse inflammatoire *in vitro*. Les HDACs ayant différentes cibles, les mécanismes impliqués seraient donc plus complexes.

Un dernier mécanisme de contrôle épigénétique est constitué par les petits ARN interférents ou microARNs (miARNs) (voir paragraphe IV.4).

Sous l'influence de ces différents facteurs, les FLS vont intervenir dans les différentes phases de la maladie par la sécrétion de cytokines variées, ils vont participer à la néoangiogenèse, à la destruction ostéo-articulaire et collaborer avec les LT et LB, en favorisant le développement de la réponse chronique auto-immune (**Figure 4**).

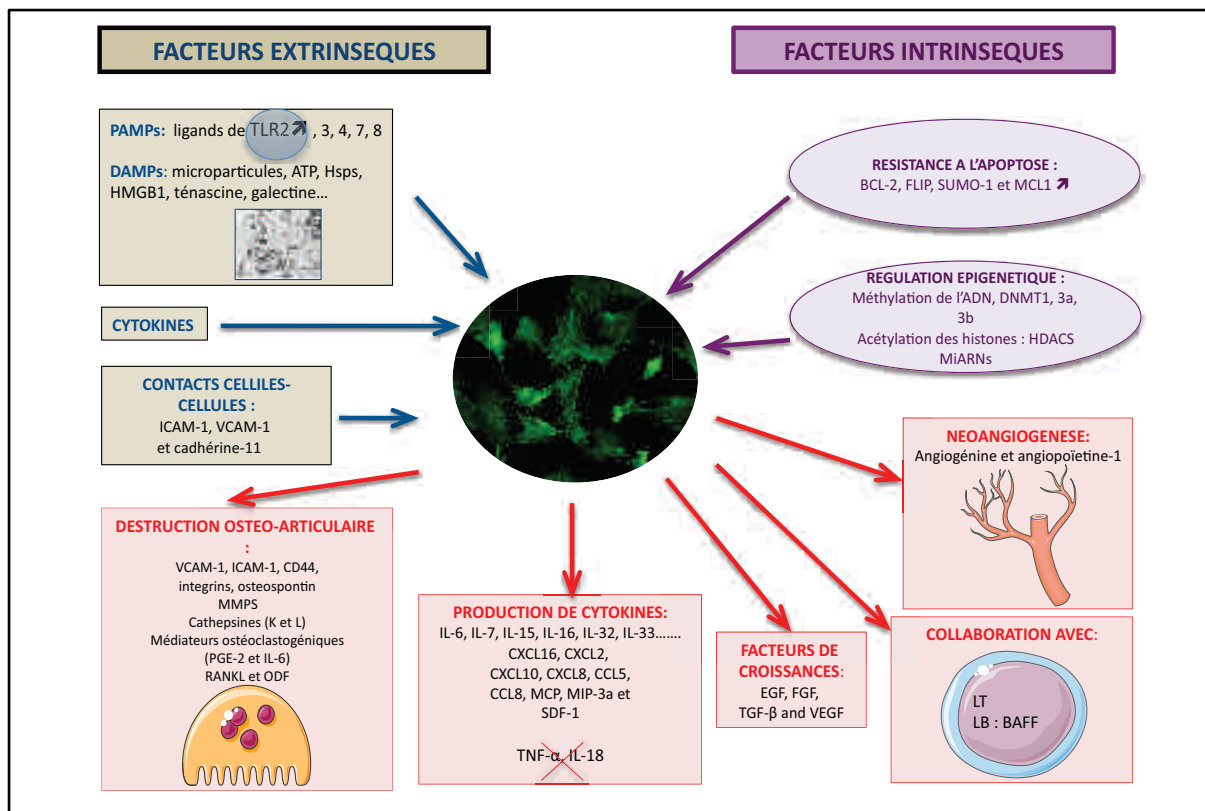


Figure 4. Le synoviocyte : une cellule agressée et agressive

II. LES TOLL-LIKE RECEPTORS

Au cours des années 1990, la découverte des TLRs a contribué à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire innée. Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I comportant une partie extracellulaire riche en résidus leucine (LRR) qui permet la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire contenant le domaine TIR impliqué dans la transduction du signal intracellulaire. Le domaine extra-cellulaire est en général composé de 16 à 28 modules LRRs (Matsushima et al., 2007). Chaque module est constitué de 20 à 30 acides aminés présentant la séquence « LxxLxLxxN », où x est n'importe quel acide aminé et N le nombre de répétitions et une partie variable (Kajava, 1998; Kobe and Kajava, 2001). Les parties N et C terminales des modules LRRs possèdent souvent des groupes de résidus cystéine permettant la formation de ponts disulfures.

10 TLRs fonctionnels ont été identifiés chez l'homme et 12 chez la souris, chez qui les orthologues de TLR1 à TLR9 sont conservés. Le récepteur TLR10 murin n'est pas fonctionnel ceci étant dû à une insertion rétrovirale. TLR11 est présent chez l'homme sous forme de pseudogène. TLR12 et 13 n'existent pas chez l'homme. Des études de souris KO pour chacun des TLRs ont permis de montrer que chaque membre de la famille a un rôle bien distinct dans la reconnaissance des ligands. Cette reconnaissance se déroule dans différents compartiments cellulaires, comme la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes ou les endolysosomes (Kawai and Akira, 2010). Chez l'homme, les TLRs sont actuellement classés en deux groupes bien distincts, cette classification étant basée sur leur localisation cellulaire. Elle est également fonction de la nature des ligands reconnus.

- Un premier groupe est composé de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, qui sont exprimés à la surface cellulaire et qui reconnaissent principalement des composants des parois microbiennes, comme des lipides, des lipoprotéines et des protéines, qui sont des composés majoritairement lipophiles.
- L'autre groupe est constitué de TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, exprimés exclusivement dans les vésicules intracellulaires où ils reconnaissent des acides nucléiques microbiens **(Figure 5)**.

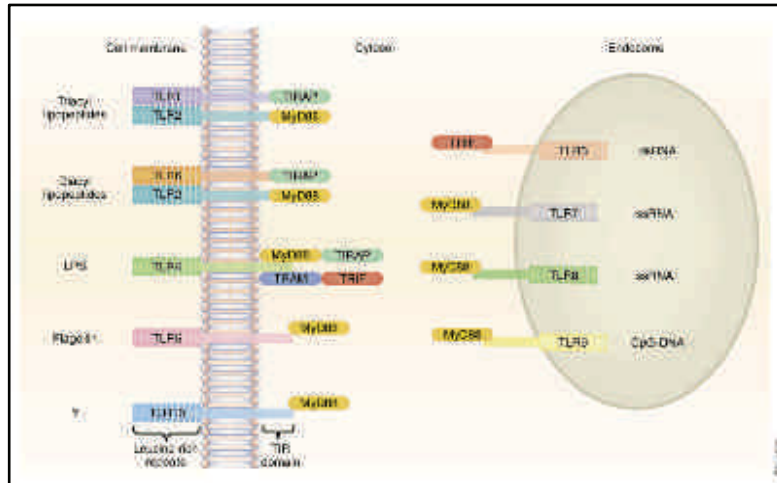


Figure 5. Les TLRs et leur répartition cellulaire (Kanzler et al., 2007).

1. Structure et ligands

a. Les TLRs membranaires

TLR4 fut identifié comme le récepteur permettant la reconnaissance du LPS (lipopolysaccharide), composant de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Poltorak et al., 1998). TLR4 forme au niveau extracellulaire un complexe avec la protéine MD2 (Akashi-Takamura and Miyake, 2008). Des études structurales ont permis de montrer que 5 des 6 chaînes lipidiques du LPS se fixent à la poche hydrophobe de MD2, la chaîne lipidique restante exposée à la surface de MD2 s'associe à TLR4 (Kim et al., 2007; Park et al., 2009). Les groupes phosphates interagissent également avec les résidus chargés négativement de TLR4. L'initiation de la transduction du signal est induite par la formation du multimère composé de deux copies du complexe TLR4-MD2-LPS qui permet le recrutement des protéines adaptatrices intracellulaires. La LBP (LPS-binding protein) et le CD14 sont aussi impliqués dans la reconnaissance du LPS (Akashi-Takamura and Miyake, 2008). Ils permettent son interaction avec le complexe MD2-TLR4. TLR4 peut reconnaître également d'autres ligands, comme des protéines d'enveloppe du virus respiratoire syncytial et des cytomégalo virus, le mannane de *Candida albicans*, la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae* et le Paclitaxel (Akira et al., 2006; Kawai and Akira, 2010). Sur le plan structural, le mode de fixation de ces composés à TLR4 n'est pas identifié.

TLR2 est impliqué dans la reconnaissance d'un très grand nombre de PAMPs issus de bactéries, de virus, de champignons et de parasites (Kawai and Akira, 2010). Ce sont essentiellement des lipopeptides, le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques des bactéries à Gram-positif, le lipoarabinomannane des mycobactéries, le zymosan et les mannanes des levures, la mutine-tGPI de *Trypanosome cruzi*, et l'hémagglutinine du virus de la rougeole. TLR2 forme des

hétérodimères avec TLR1 ou TLR6. Ainsi, TLR2 complexé à TLR1 reconnaît des lipopeptides triacylés alors que les complexes TLR2-TLR6 reconnaissent des lipopeptides diacylés. Des études structurales ont permis de définir les interactions impliquées dans la reconnaissance des lipopeptides par les dimères TLR2/TLR6 ou TLR2/TLR1 (Jin et al., 2007; Kang et al., 2009). Dans les complexes TLR2/TLR1-ligands, deux des trois chaînes lipidiques du Pam₃CSK₄, qui est un lipopeptide synthétique triacylé, interagissent avec TLR2, tandis que la troisième chaîne interagit avec un canal hydrophobe de TLR1. TLR6 ne comportant pas de canal hydrophobe, le complexe TLR2-TLR6 ne peut reconnaître la troisième chaîne lipidique, ce qui explique que ce complexe ne reconnaisse que des lipopeptides diacylés. TLR2 interagit avec d'autres protéines membranaires, co-récepteurs qui contribuent à l'interaction avec les différents ligands. On peut citer CD36 (Hoebe et al., 2005), la dectine-1, lectine de type C qui fixe les β-glucanes fongiques (Goodridge and Underhill, 2008).

TLR5 reconnaît la flagelline, composant des flagelles bactériens (Hayashi et al., 2001).

b. Les TLRs cytosoliques

TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés dans le réticulum endoplasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes. Cette situation leur permet de reconnaître les acides nucléiques d'origine virale ou bactérienne présents au niveau de ces compartiments à l'inverse des acides nucléiques « du soi » qui sont rapidement dégradés au niveau extracellulaire. Leur trafic intracellulaire est régulé par une protéine UNC93B1 qui leur permet de rejoindre les endosomes. D'autres protéines ont été impliquées dans ce processus : PRAT4A et la gp96.

TLR3 forme un homodimère grâce au domaine C-terminal de son ectodomaine. Le premier ligand identifié de TLR3 est un ARN double brin synthétique, l'acide polyinosinique-polycytidylique ou poly(I:C). TLR3 fixe également l'ARN génomique des réovirus, l'ARN double brin produit lors de la réplication d'un ARN simple brin (ARN sb) de virus comme le virus respiratoire syncytial, le virus de l'encéphalomyocardite, le virus West Nile (Kawai and Akira, 2010).

TLR7 et TLR8 reconnaissent des composés anti-viraux synthétiques tels l'imiquimod et le resiquimod (R-848) ainsi que des analogues de la guanosine comme la loxoribine et également l'ARN simple brin (ARN sb) des virus à ARN comme le virus de la stomatite vésiculaire, le virus de l'influenza A H5N1 et le VIH (Kawai and Akira, 2010). Mancuso et al. ont montré que l'ARN des streptocoques du groupe B est également un ligand de TLR7 (Mancuso et al., 2009).

TLR9 reconnaît des motifs 2'déoxyribo-cytidine-phosphate-guanosine (CpG) non méthylés de l'ADN, motifs fréquents dans le monde bactérien et viral mais rares dans les cellules de mammifères. Ainsi TLR9 est impliqué dans la reconnaissance de virus tels le HSV-1, HSV-2 et les

cytomégalovirus. TLR9 reconnaît aussi l'hémozoïne produite lors de la digestion de l'hémoglobine par *Plasmodium falciparum* (Coban et al., 2010).

c. Les ligands endogènes des TLRs ou DAMPs

Des études récentes ont montré que les TLRs reconnaissent également des ligands endogènes libérés au cours de l'inflammation ou lors de la mort cellulaire: les DAMPs appelés aussi alarmines. Ces données suggèrent que les TLRs peuvent donc répondre à des ligands du soi et induire des réponses inflammatoires en l'absence d'infection microbienne. TLR4 lie de nombreux constituants de la matrice extracellulaire : extradomaine A de la fibronectine, des hyaluronanes ainsi que le fibrinogène ou la fibrine. Midwood et al. ont montré que la ténascine, glycoprotéine de la matrice extracellulaire libérée dans les zones inflammatoires, induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires via TLR4 (Midwood et al., 2009). Les protéines de heat-shock, incluant Hsp60, Hsp70, Hsp22 et gp96, libérées par les cellules nécrotiques ou sécrétées par l'intermédiaire d'exosomes, interagissent avec TLR2. Enfin parmi les protéines S100 ou calgranulines sécrétées au niveau des sites inflammatoires, S100A8/9 ont pour récepteur TLR4 (Foell et al., 2007; Goh et al., 2010; Vogl et al., 2007). Il a été également montré que dans l'athérosclérose les LDL oxydés sont reconnus par TLR4 et que dans la maladie d'Alzheimer le peptide β -amyloïde interagit avec TLR6 (Stewart et al., 2010).

Dans les conditions normales les acides nucléiques dérivés du soi n'activent pas les PRRs car ils sont dégradés par des nucléases sériques. Ainsi la localisation intracellulaire de TLR7 et de TLR9 permet d'éviter toute stimulation par les acides nucléiques endogènes extracellulaires (Barton et al., 2006). Cependant il a été montré que la fixation d'acides nucléiques à des protéines endogènes les protège de l'action des nucléases et permet leur accession aux TLRs présents dans les endosomes (Ganguly et al., 2009). Ainsi dans le lupus érythémateux disséminé, les complexes auto-immuns contenant des acides nucléiques du soi, internalisés via les récepteurs Fc γ RIIa activent TLR7 et TLR9 (Means et al., 2005; Vollmer et al., 2005). HMBG1 qui fixe l'ADN endogène va interagir avec les récepteurs RAGE et permettre la libération de l'ADN dans les endosomes précoces (Tian et al., 2007). La cathélicidine (LL37) est un peptide antimicrobien qui forme des agrégats avec l'ADN et l'ARN endogènes libérés par des cellules nécrotiques et ces agrégats sont endocytés et retenus dans les endosomes précoces où ils vont activer TLR7 et TLR9 (Ganguly et al., 2009; Lande et al., 2007).

2. Les voies de signalisation des TLRs.

Deux voies principales sont activées par l'interaction des TLRs avec leurs ligands : la première conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et à la synthèse de cytokines inflammatoires, la seconde à l'activation de différents facteurs IRF et à la synthèse d'interférons de type 1. Mais d'autres voies sont aussi concernées, comme la voie des MAPKs : ERK1/2, p38 et les JNKs.

La liaison des TLRs à leur ligand entraîne leur dimérisation (homo : TLR4 ou hétéro TLR2/TLR6) ce qui induit un changement conformationnel des domaines TIR qui peuvent alors interagir avec des protéines adaptatrices cytoplasmiques qui sont au nombre de 4 : MyD88, TRIF, TIRAP/MAL, TRAM. Ces protéines adaptatrices seront responsables de la spécificité des réponses induites selon qu'elles seront recrutées isolément ou associées : ainsi l'activation de TLR3 et TLR4 entraîne une synthèse d'interféron de type I et la production de cytokines pro-inflammatoires, alors que l'activation de TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 et TLR5 (MyD88) conduit principalement à la production de cytokines pro-inflammatoires. La première protéine adaptatrice identifiée de la famille TIR fut MyD88, utilisée par tous les TLRs connus actuellement à l'exception de TLR3. Elle active la voie NF- κ B et celle des MAPKs. TRIF qui est uniquement utilisé par TLR3 et TLR4 permet la stimulation de voies alternatives conduisant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 et à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I. TRAM et TIRAP fonctionnent comme des « sorting adaptors » permettant le recrutement de TRIF à TLR4 et de MyD88 à TLR2 et TLR4. Ainsi, les voies de signalisation des TLRs peuvent être classées selon qu'elles font intervenir MyD88, TRIF ou les deux (Kawai and Akira, 2010).

TLR4 constitue une exception car il s'agit du seul récepteur utilisant les 4 protéines adaptatrices à domaines TIR. TLR4 recrute initialement TIRAP à la membrane plasmique ce qui favorise le recrutement de MyD88 puis l'activation de NF- κ B et des MAPKs (Kagan and Medzhitov, 2006). TLR4 est ensuite internalisé dans les endosomes grâce à une endocytose dynamine-dépendante, où il forme un complexe de signalisation avec TRAM et TRIF initiant la voie TRIF-dépendante conduisant à l'activation d'IRF3 ainsi qu'à une activation tardive de NF- κ B et des MAPKs (Kagan et al., 2008; Rowe et al., 2006; Tanimura et al., 2008). Ainsi TLR4 active la voie MyD88 avant la voie TRIF. Pour des raisons inexplicées, l'activation de ces deux voies est nécessaire à la production de cytokines par TLR4 à la différence des autres TLRs dont l'activation d'une des voies suffit à la production de cytokines.

a. La voie MyD88 dépendante

Après interaction avec leurs ligands, les TLRs interagissent par leur domaine TIR avec la protéine adaptatrice MyD88. MyD88 va recruter ensuite par son "death domain" IRAK4, IRAK1 et IRAK2. IRAK4 est la première kinase activée. La stimulation de ces kinases permet ensuite leur interaction avec TRAF6, une ligase E3 qui catalyse la synthèse d'une chaîne polyubiquitine sur un certain nombre de protéines telles TRAF6 elle-même, IRAK1 ainsi que sur TAB2 et TAB3, protéines régulatrices du complexe TAK1 et NEMO protéine du complexe IKK. Cette polyubiquitination se fait en collaboration avec un dimère enzymatique composé des enzymes E2 Ubc13 et Uev1A. La polyubiquitination de TAK1 permet son recrutement au complexe IKK, ce qui induit la phosphorylation d'IKK- β et l'activation de NF- κ B (Bhoj and Chen, 2009).

TAK1 stimule également la voie des MAPKs ERK1/2, p38 et JNKs par un mécanisme de phosphorylation des MAPKs plutôt que par un mécanisme d'ubiquitination, ce qui permet l'activation de différents facteurs de transcription dont AP-1. Cependant Yamamoto et al. ont montré que les cellules déficientes pour Ubc13 sont incapables d'activer la voie des MAPKs, mais la cible d'Ubc13 responsable de l'activation des MAPKs reste inconnue (Yamamoto et al., 2006).

b. La voie TRIF dépendante

Cette voie aboutit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3. TRIF recrute TRAF6 et active TAK1 ce qui conduit à l'activation de NF- κ B, vraisemblablement par des mécanismes d'ubiquitination similaires à ceux intervenant dans la voie MyD88 (Kawai and Akira, 2008). TRIF recrute également la protéine adaptatrice RIP1, qui est ubiquitinylée ce qui permet ensuite l'activation de la voie NF- κ B après stimulation de TLR3 (Chang et al., 2009). En réalité dans ce dernier cas c'est un complexe multiprotéique composé de TRAF6, TRADD, Pellino-1 et RIP1 qui permet l'activation de TAK1 et par voie de conséquence celle des MAPKs et de NF- κ B.

La voie TRIF active aussi le facteur de transcription IRF3 et la transcription des interférons. TRIF recrute un complexe de signalisation impliquant TRAF3 et les IKKs non canoniques TBK1 et IKKi (IKK ϵ), qui catalysent la phosphorylation d'IRF3 ce qui induit la translocation d'IRF3 dans le noyau (Hacker and Karin, 2006). L'activation de cellules déficientes pour TRAF3 ne permet pas l'induction d'interférons après activation de TLR3, TLR7 et TLR9, ce qui suppose un rôle ubiquitaire de TRAF3 dans la production d'interférons (Hacker et al., 2006; Oganessian et al., 2006).

TRAF3 intervient aussi dans la voie MyD88 TLR4-dépendante et conduit à la synthèse d'interférons.

Les voies de signalisation activées par TLR7 et TLR9 dans les CD plasmocytoïdes sont uniques dans la mesure où elles font intervenir un complexe de signalisation composé de MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF6, TRAF3, IKK α et IRF7 (Kawai and Akira, 2006). IRF7 phosphorylé est alors

transporté dans le noyau. Son activation nécessite probablement également une ubiquitination par TRAF6. Shinohara et al. ont montré que d'autres facteurs sont impliqués dans ce système : l'ostéopontine intracellulaire (Opn-i), qui fonctionne comme un élément du complexe MyD88-IRF7 (Shinohara et al., 2006) ou les voies PI(3)K-mTOR, IRF5 et IRF8.

Les voies de signalisations MyD88- et TRIF- dépendantes sont résumées **Figure 6**.

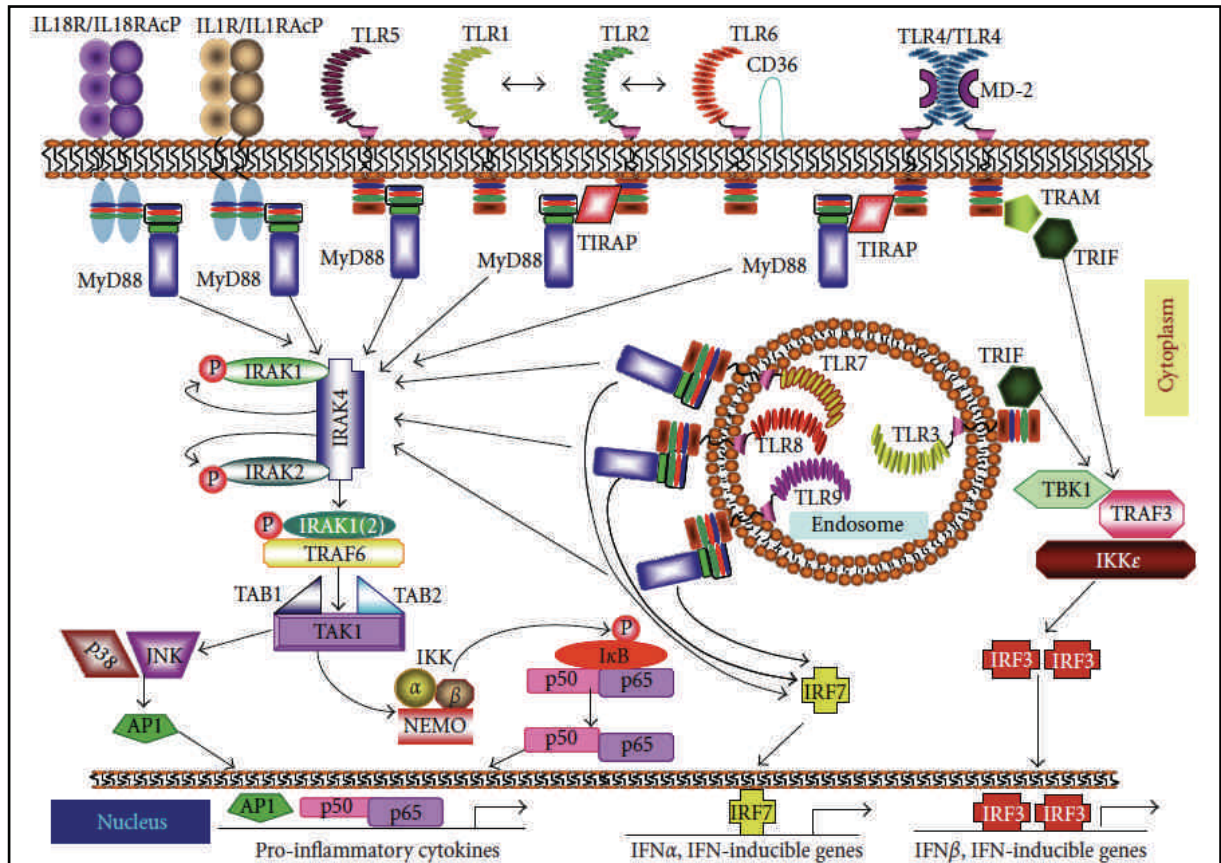


Figure 6 : Les voies de signalisation TLRs dépendantes (Loiarro et al., 2010).

3. Les régulateurs négatifs des TLRs

De très nombreux régulateurs négatifs des TLRs et des voies de signalisation activées par leur interaction avec leurs ligands ont été identifiées. Ils sont décrits dans le tableau suivant.

Régulateurs	Voie affectée	Mécanisme	Références
TLR2 soluble	TLR2	Antagoniste de TLR2	(LeBouder et al., 2003)
TLR4 soluble	TLR4	Compétition avec l'interaction TLR4-MD2	(Iwami et al., 2000)
MyD88 soluble	TLR2, 4, 5, 7, 8, 9	Antagoniste de MyD88	(Burns et al., 2003; Janssens et al., 2002)
IRAKM	TLR2, 4, 5, 7, 8, 9	Inhibition d'IRAK	(Kinjyo et al., 2002; Nakagawa et al., 2002)
SOCS1	TLR2, 4, 9	Inhibition de TIRAP	(Kinjyo et al., 2002)
NOD2	TLR2	Inhibition de l'induction de TLR2, inhibition de NF- κ B	(Dahiya et al.; Watanabe et al., 2006)
PI3K	TLR2, 4, 9	Inhibition des fonctions de NF- κ B, p38, JNK	(Fukao et al., 2002)
TOLLIP	TLR2, 4, 5, 7, 8, 9	Inhibition d'IRAK	(Bulut et al., 2001; Burns et al., 2000; Zhang and Ghosh, 2002)
A20	TLR2, 3, 4, 9	Inhibition de RIP1, RIP2, TRAF6, MALT1	(Coornaert et al., 2009)
ST2L	TLR2, 4, 9	Inhibition de TIRAP	(Brint et al., 2004)
SIGIRR	TLR4, 9	Inhibition de MyD88, IRAK1, TRAF6	(Garlanda et al., 2004; Wald et al., 2003)
TRAILR	TLR2, 3, 4	Stabilisation d'I κ B α	(Diehl et al., 2004)
TRIAD3A	TLR4, 9	Inhibition de TIRAP	(Chuang and Ulevitch, 2004)
TANK	TLR2, 4, 5, 7, 8, 9	Déubiquitination de TRAF6	(Kawagoe et al., 2009)
Atg16L1	TLR3, TLR4	Inhibition de TRIF	(Saitoh et al., 2008)
Zc3h12a		Inhibition de l'IL-6 et de l'IL-12	(Matsushita et al., 2009)
TTP		Inhibition de la sécrétion de TNF- α	(Carrick et al., 2004)
SHP-1	TLR2, 4, 5, 7, 8, 9	Inhibition de MyD88, d'IRAK1 et d'IRAK2	(An et al., 2008)
IKK1	TLR2, 3, 4, 5, 7, 8, 9	Activation d'IKK2, dégradation de I κ B α , phosphorylation de STAT1	(Lawrence et al., 2005; Liu et al., 2007a)
CYLD	TLR2, 3, 4, 5, 7, 8, 9	Déubiquitination de RIP1, RIP2, TRAF6, MMLTI	(Jin et al., 2008; Sun, 2010)
TRAF1	TLR2, 3, 4, 5, 7, 8, 9	Inhibition de l'induction de NF- κ B en réponse au TNF- α et au CD40	(Song et al., 1996; Tsitsikov et al., 2001)
TNIP 1/2/3		Interaction avec A20	(Verstrepen et al., 2009)
SARM	TLR3, 4	Inhibition de TRIF	(Carty et al., 2006; Peng et al., 2010)

Tableau 1 : Les régulateurs négatifs des voies de signalisation des TLRs

4. Les TLRs dans la PR

TLR2 est le TLR dont l'expression est la plus augmentée au cours de la PR dans les FLS (Kyburz et al., 2003). TLR2 est plus particulièrement exprimé dans la couche bordante de la membrane synoviale rhumatoïde ainsi qu'aux sites d'invasion du cartilage alors que son expression est plus faible dans la membrane synoviale de patients atteints d'arthrose (Seibl et al., 2003), suggérant que ce PRR et son ligand, le peptidoglycane, pourraient contribuer de façon prépondérante à l'activation des FLS rhumatoïdes.

Le deuxième récepteur de cette famille qui est également surexprimé au cours de la PR est TLR4. L'IL-1 β , le TNF- α , le LPS et le PG augmentent l'expression de TLR2 à la surface de FLS mais pas celle de TLR4 (Kyburz et al., 2003; Seibl et al., 2003). TLR5 est également exprimé par les FLS mais à des taux faibles, sa stimulation par la flagelline induit la synthèse d'IL-6, d'IL-8 et des métalloprotéases MMP3 et MMP1 (Agarwal et al., 2010).

La présence de TLR3 dans les FLS a été également démontrée. Son expression est augmentée dans les FLS de PR (Ospelt et al., 2008).

Les FLS expriment également TLR7 dont la co-stimulation avec TLR3 induit la libération d'IFNs de type I qui de façon autocrine augmentent l'expression de TLR3 et TLR7 (Roelofs et al., 2005). Cette co-stimulation conduit également à une synthèse significative de chémokines et de MMPs (Roelofs et al., 2009). Sacre et al. ont montré que la co-stimulation de TLR3 et TLR8 augmente la synthèse du TNF- α (Sacre et al., 2008).

L'expression de TLR9 par les FLS reste controversée. Les motifs CpG n'induisent pas la synthèse d'IL-6, d'IL-8 ou de MMPs par les FLS. Les FLS exprimeraient des quantités très faibles d'ARNm de TLR9 qui ne seraient pas modifiées après stimulation par les CpG (Kyburz et al., 2003). Cependant, des travaux réalisés au laboratoire par Alsaleh et al. ont montré que si les CpG n'induisent pas la synthèse d'IL-6 ou de BAFF par les FLS rhumatoïdes, ils inhibent la synthèse de BAFF induite par l'IFN- γ ce qui indiquerait que TLR9 est exprimé par les FLS rhumatoïdes (Alsaleh et al., 2007).

5. TLRs et modèles expérimentaux de PR

De nombreux modèles expérimentaux d'arthrite ont impliqué l'administration de ligands de TLRs pour l'induction de la maladie : ADN bactérien, parois cellulaires de streptocoques, zymosan, (Cromartie et al., 1977; Deng et al., 1999; Williams et al., 2005). Chez les souris KO

pour des TLRs particuliers ou des protéines adaptatrices, on observe une progression plus faible de la maladie (Frasnelli et al., 2005; Joosten et al., 2003; Lee et al., 2005).

Ainsi, dans le modèle d'arthrite par transfert de sérum de souris K/BxN, la durée de l'arthrite est raccourcie chez des souris KO pour TLR4 (Choe et al., 2003). Des souris KO pour l'IL-1RA développent des arthrites spontanées dues à l'augmentation de la production d'IL-17 (Koenders et al., 2008; Nakae et al., 2003). Ces mêmes arthrites spontanées sont réduites chez des souris double KO pour l'IL-1RA et TLR4 ou chez des souris KO pour l'IL-1RA en présence d'antagonistes de TLR4 (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008). Meng et al. ont observé dans le modèle de l'arthrite induite au pristane, une augmentation de l'expression de TLR3 durant les premières phases de l'induction de l'arthrite, sa stimulation conduit à une augmentation de la sévérité de la maladie et à l'inverse son inhibition par des siARNs spécifiques réduit la sévérité de la maladie (Meng et al., 2010).

De façon surprenante, des souris double KO pour l'IL-1RA et TLR2 présentent une arthrite plus sévère suggérant un rôle protecteur de TLR2, alors que l'absence de TLR9 n'affecte pas l'évolution de la maladie (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008).

Cet effet a été également observé en ce qui concerne TLR7. L'administration à faible dose de ligands synthétiques de TLR7, supprime l'inflammation articulaire dans le modèle d'arthrite par transfert de sérum de souris K/BxN (Hayashi et al., 2009). TLR7 semble donc jouer également un rôle protecteur.

En ce qui concerne TLR8 qui est surexprimé dans les tissus synoviaux rhumatoïdes chez l'homme, le modèle murin ne peut être employé car Heil et al. ont montré que chez la souris, TLR8 n'est pas activé par son ligand naturel, l'ARN viral simple brin et serait donc non fonctionnel (Heil et al., 2004).

III. LES MAPKS

Les voies des MAPKs font partie des voies activées par les récepteurs de l'immunité innée et plus particulièrement les TLRs. On distingue 3 classes de MAPKs (**Figure 7**)

- Les kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases)
- Les kinases JNK-1/2/3 (c-JUN NH₂-terminal kinases)
- Les kinases p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$)

Les MAPKs ont été impliquées dans la régulation de nombreux événements cellulaires clé: la transcription de gènes, la survie et la mort cellulaire, la prolifération, la différenciation ainsi que le stress cellulaire et la réponse inflammatoire (Kyriakis and Avruch, 2001).

Les MAPKs sont des sérine/thréonine kinases dont la stimulation nécessite l'activation en amont de MAPK kinases (MAPKK ou MAP2K, MEK ou MKK) et de MAPK kinases kinases (MAPKKK ou MAP3K, MEKK ou MKKK). Les MAP3Ks sont des sérine/thréonine kinases qui phosphorylent et activent les MAP2Ks alors que les MAP2Ks sont des kinases qui phosphorylent des résidus thréonine et tyrosine d'une séquence conservée des MAPKs: -TXY-, T et Y étant respectivement des résidus thréonine et tyrosine, X pouvant être l'acide glutamique chez ERK1/2, une proline chez les JNKs ou une glycine chez p38 (Kyriakis and Avruch, 2001).

L'activation des MAPKs permettra ensuite la phosphorylation d'un vaste répertoire de protéines cytoplasmiques et nucléaires incluant des facteurs de transcription.

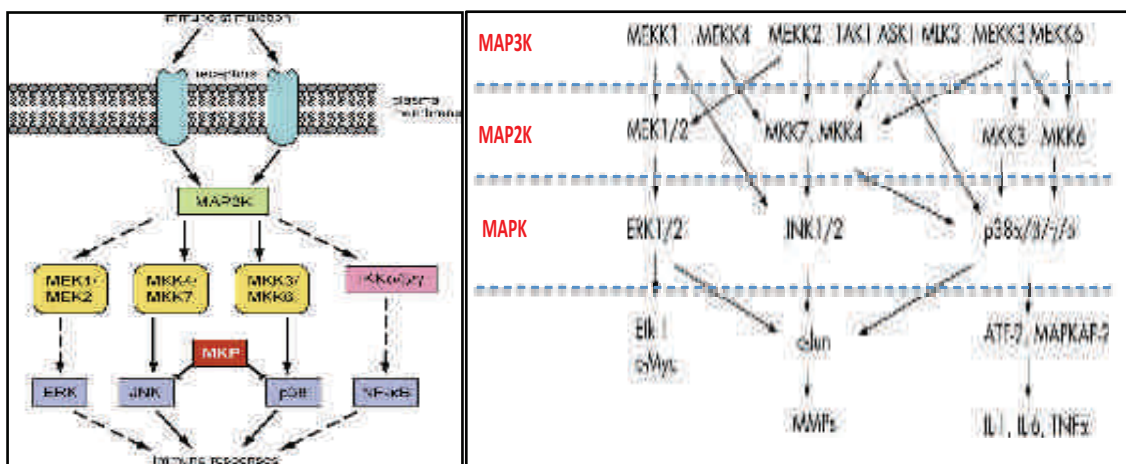


Figure 7. Organisation des MAPKS dans le système immunitaire inné (Huang et al., 2009; Sweeney and Firestein, 2006).

Les MAP2Ks principales permettant l'activation des JNKs sont MKK4 et MKK7, MKK1 et MKK2 pour ERK1/2. P38 peut être activée par MKK3 et MKK6 et indépendamment des MAP2Ks par TAB1 et ZAP70 (Ashwell, 2006).

Il existe également un grand nombre de MAP3Ks: 21 ont été identifiées à ce jour (Symons et al., 2006; Winter-Vann and Johnson, 2007). Ce grand nombre de MAPKs suggère que plusieurs

MAP3Ks peuvent être sollicitées pour chaque stimulus. Ainsi, des études réalisées sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) déficients pour différentes MAP3Ks ont montré que l'activation des JNKs par le TNF- α est inhibée dans les cellules KO pour TPL-2, ASK1, TAK1, MLK3, MEKK1 ou MEKK3 (Symons et al., 2006). De même, dans les cellules de drosophile, qui expriment un nombre plus réduit de MAP3Ks, l'activation maximale de p38 en réponse au LPS nécessite l'intervention de 4 MAP3Ks : MEKK1, TAK1, ASK1 et MLK (Zhang et al., 1999). Cette complexité n'est actuellement pas expliquée.

A l'inverse, certains récepteurs ne vont mobiliser qu'une seule MAP3K (ASK1 pour TLR4, MEKK3 pour TLR6) qui pourra cependant être parfois commune à plusieurs récepteurs c'est le cas de TAK1 recrutée en aval des TLRs, des récepteurs du TNF- α et de l'IL-1 (Adhikari et al., 2007).

Trois MAP3Ks jouent un rôle important dans l'immunité innée: TAK1 ou MAP3K7, MEKK3 ou MAP3K3 et ASK1 ou MAP3K5 (**Figure 8**).

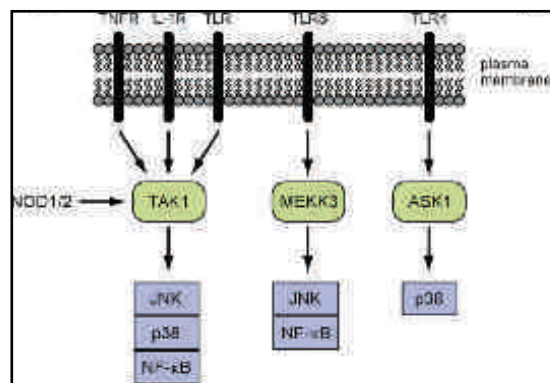


Figure 8. MAP3Ks et récepteurs de l'immunité innée (Huang et al., 2009).

1. TAK1

TAK1, assure la transduction du signal à partir de plusieurs récepteurs, tels les TLRs, le TNFR et l'IL-1R, ce qui permet l'activation de p38, des JNKs et de la voie NF- κ B. (**Figure 8**) (Sato et al., 2005; Shim et al., 2005). Si l'activation des JNKs par des cytokines pro-inflammatoires est totalement abolie dans les cellules déficientes pour TAK1, l'activité d'IKK n'est que diminuée ce qui suggère que des mécanismes indépendants de TAK1 contribuent également à l'activité d'IKK. TAK1 intervient aussi dans la signalisation induite par l'activation des récepteurs NOD1/NOD2 (Hasegawa et al., 2008; Kim et al., 2008), mais il ne joue aucun rôle en aval de TLR8 (Qin et al., 2006).

2. MEKK3

MEKK3 (MAP3K3) est très proche d'une autre MAP3K, MEKK2 (MAP3K2). Ces deux MAP3Ks ont la propriété d'activer ERK1/2 et les JNKs (Blank et al., 1996). Dans des MEFs KO pour MEKK3 on observe une diminution de l'activation des JNKs et également de p38 et de la voie NF- κ B en réponse à TLR4 et à l'IL-1R. En réponse au TNF- α on observe également une inhibition de la voie NF- κ B (Huang et al., 2004a; Yang et al., 2001). MEKK3 est indispensable à la réponse TLR8 ce qui n'est pas le cas pour TAK1 (Qin et al., 2006). MEKK3 et TAK1 jouent donc un rôle important dans les voies MAPKs et NF- κ B au cours de la réponse immunitaire innée mais leur contribution respective en réponse à des stimuli spécifiques n'est pas encore clairement déterminée actuellement.

3. ASK1

Au cours de ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ASK1 ou MAP3K5 qui joue un rôle central dans la réponse au stress et dans la réponse immunitaire (Matsuzawa, 2004).

a. Structure et fonction

ASK1 est un polypeptide de 1374 résidus comportant dans sa partie centrale un domaine sérine/thréonine kinase très conservé, flanqué de deux longs domaines régulateurs en N et C terminal. Ces deux domaines qui présentent une structure "coiled-coil", jouent un rôle important dans les interactions homophiles entre les molécules d'ASK1. L'homodimérisation d'ASK1 via son extrémité C-terminale est indispensable à son activation (Bunkoczi et al., 2007).

Il a été récemment montré qu'ASK1 interagit avec un grand nombre de partenaires, formant un complexe de haut poids moléculaire (1500 à 2000 kDa) dénommé le signalosome ASK1 (Noguchi et al., 2005; Tobiume et al., 2001). Une protéine joue un rôle important dans l'activation d'ASK1, il s'agit de la thioredoxine (TRX). Seule la forme réduite [TRX-(SH₂)] et non la forme oxydée (TRX-S₂) ou des mutants du site actif se fixent à ASK1 et ceci au niveau N-terminal : domaine NCC pour « N-terminal coiled-coil ». L'activité d'ASK1 est donc dépendante de l'état de TRX (Liu et al., 2000; Saitoh et al., 1998) (**Figure 9**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui oxydent TRX induisent sa dissociation (Liu and Min, 2002; Saitoh et al., 1998; Zhang et al., 2004a). Cette dissociation conduit à un changement conformationnel du dimère d'ASK1 qui va permettre la phosphorylation du site actif au niveau de la thréonine 838 par autophosphorylation ou transphosphorylation par une kinase non identifiée (Tobiume et al., 2002). TRAF2 et TRAF6 contribueraient à la forme active du dimère

ASK1 (Nishitoh et al., 2002; Noguchi et al., 2005). Des MEFs KO pour TRAF2 et TRAF6 montrent une inhibition de l'activation d'ASK1 en présence de ROS. Ces données suggèrent que la production de ROS conduit à une dissociation de TRX et au recrutement de TRAF2 et TRAF6. (Bunkoczi et al., 2007) ont caractérisé par des études cristallographiques, d'autres sites de phosphorylation, la thréonine 813 et la thréonine 842 (Bunkoczi et al., 2007). La mutation de chacun de ces sites conduit à une baisse significative de la signalisation de l'axe ASK1-p38 dans la cellule. Cependant, ces auteurs, utilisant un complexe minimal *in vitro* n'impliquant que les protéines ASK1, MAP2K6 et p38, ont montré que la mutation ponctuelle de chacune des thréonines 813, 838 et 842 n'affectait pas la phosphorylation de p38, ce qui suggérerait que ces phosphorylations joueraient plutôt un rôle dans le recrutement des partenaires du signalosome que dans la régulation de l'activité catalytique.

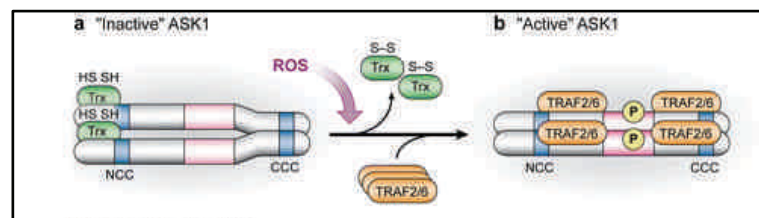


Figure 9. Régulation du signalosome ASK1 par la thiorédoxine (Takeda et al., 2008).

Activée ASK1 phosphoryle alors directement les MAP2Ks, MKK3/MKK6 et MKK4/MKK7, ce qui conduit à l'activation de p38 et des JNKs. Une séquence consensus de 24 acides aminés, ou domaine DVD localisé dans les régions terminales des MKKs serait reconnue par le domaine kinase d'ASK1, permettant ainsi le ciblage spécifique des kinases en aval (Takekawa et al., 2005). Matsuzawa et al. ont cependant montré que chez les souris ASK1 $-/-$, seule la phosphorylation de p38 et non des JNKs est affectée après activation au LPS, suggérant que plusieurs voies MAPKs sont recrutées après l'activation de TLR4 (Matsuzawa et al., 2005).

b. ASK2

ASK2 est une protéine paralogue d'ASK1. ASK2 n'activerait que faiblement les JNKs et pas du tout ERK1/2 ni p38 (Wang et al., 1998). Cette faible activité serait liée à son instabilité (Takeda et al., 2007). ASK1 jouerait un rôle stabilisateur pour ASK2 comme l'ont montré Takeda et al. : ASK2 est extrêmement instable dans les MEFs ASK1 $-/-$. ASK1 et ASK2 forment un hétérodimère à l'état basal et la formation de ce dimère permet une stimulation des JNKs et de p38 par ASK2. Cet effet est également observé en présence d' H_2O_2 . De ce fait, ASK2 semble être un élément du signalosome d'ASK1, contribuant à l'activation de la voie des MAPKs.

Le domaine kinase d'ASK1 ne contribue pas à la stabilité et à l'activité d'ASK2 (Takeda et al., 2007), cependant ASK2 est capable d'activer ASK1 directement sur la thréonine 838, ceci

démontre l'existence d'une régulation réciproque d'ASK1 et d'ASK2 par des mécanismes distincts dans le signalosome. Cependant ASK2 n'est pas nécessaire à la stabilisation d'ASK1. Deux types de signalosomes vont donc se former, un hétérodimère ASK1-ASK2 dont dépend la stabilité d'ASK2 et en partie l'activation d'ASK1, et un homodimère ASK1-ASK1. De l'utilisation alternative de ces différents dimères dépend probablement la sensibilité des cellules à répondre au stress.

c. La mise en jeu d'ASK1

ASK1 est activée par des stimuli très divers, comme le LPS, le TNF- α , FAS ligand, le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique, l'influx d'ions calcium et les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Chen et al., 1999; Ichijo et al., 1997; McDonald et al., 2000).

d. ASK1 et les réponses immunes innées

Les travaux de Matsuzawa et al. ont montré qu'ASK1 contribue à l'activation de p38 en réponse à TLR4. Dans ces conditions, les JNKs et la voie NF- κ B ne sont pas stimulées. Cette réponse est spécifique de la voie TLR4, car p38 reste activée après stimulation de TLR2, TLR3 et TLR9 par leurs ligands respectifs, le PGN (peptidoglycane), le poly (I:C) les motifs CpG non méthyles, dans les cellules ASK1 -/- (Matsuzawa et al., 2005). Un autre argument confirmant le rôle joué par ASK1 dans la voie TLR4 est que les souris KO pour ASK1, qui ne présentent pas de phénotype particulier, produisent des taux réduits de cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β en réponse au LPS et sont résistantes au choc septique induit par ce ligand (Matsuzawa et al., 2005).

Cette réponse spécifique est liée au fait que le LPS permet d'une part le recrutement de TRAF6 (Dunne and O'Neill, 2003) et induit d'autre part la production de ROS (Matsuzawa et al., 2005). Les mécanismes permettant la production des ROS en réponse à l'activation de TLR4 ne sont pas parfaitement déterminés. NOX4 est un membre de la famille des NADPH oxydases qui catalysent le transfert d'électrons du NADPH à l'O₂ et génèrent des anions superoxydes (Bedard and Krause, 2007). Park et al. ont montré que la production des ROS par le LPS est dépendante d'une interaction directe entre la partie C-terminale de NOX4 avec la partie intra-cytoplasmique de TLR4 (Park et al., 2004). L'activation de la voie IRF3, dépendante du LPS, est aussi dépendante de NOX4 et de l'axe ASK1-p38 (Chiang et al., 2006). Ces études soulignent l'importance de la production des ROS dans l'activation de l'immunité par le signalosome ASK1.

Il a été également montré dans des MEFs KO pour ASK1 que l'activation de p38 et des JNKs par le TNF- α était dépendante d'ASK1 (Osaka et al., 2007). Dans ce cas, l'activation est dépendante des ROS induits par le TNF- α (Goossens et al., 1995; Lin et al., 2004).

Ainsi, les interactions d'ASK1 avec p38 et les JNKs varient suivant les récepteurs stimulés (**Figure 10**) (Park et al., 2004).

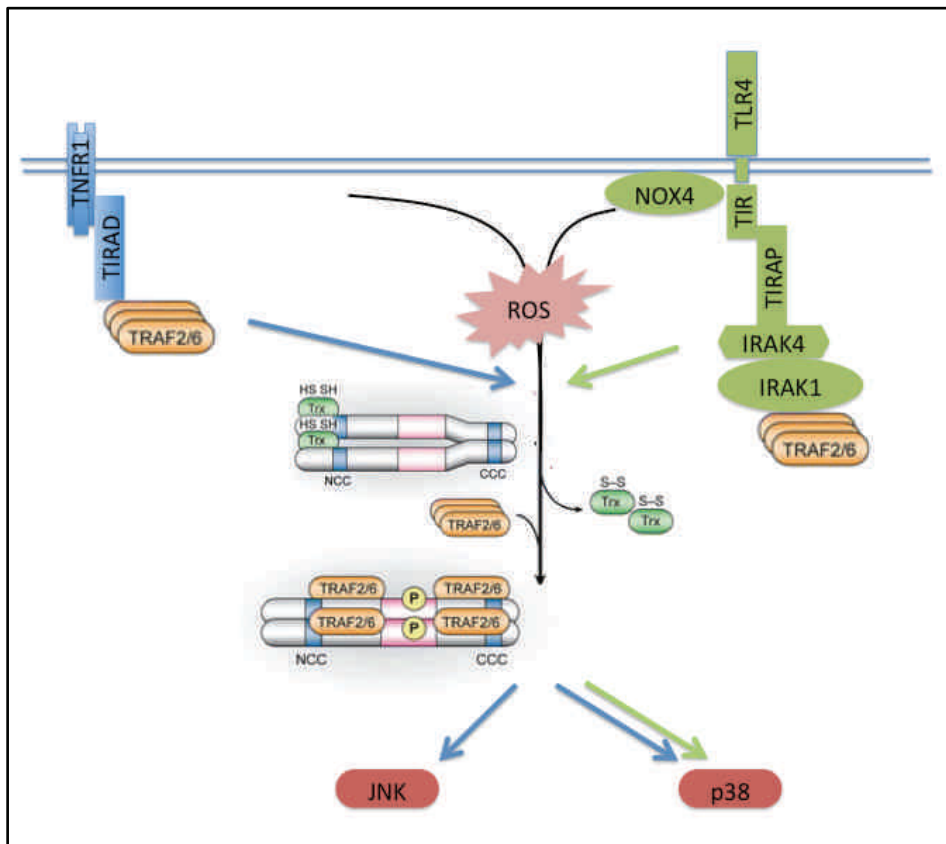


Figure 10. Mise en jeu d'ASK1 par les voies TLR4 (flèches vertes) et du TNF- α (flèches bleues) dans les réponses immunes innées.

e. ASK1, réponses au stress et différenciation cellulaire

Outre son rôle pro-inflammatoire, ASK1 induit l'apoptose en activant la voie intrinsèque mitochondriale (Hatai et al., 2000; Kanamoto et al., 2000; Saitoh et al., 1998). Les cellules ASK1^{-/-} sont résistantes à la mort cellulaire induite par le stress oxydatif et le TNF- α (Nishitoh et al., 2002; Tobiume et al., 2001).

Le stress du réticulum endoplasmique qui peut conduire à la mort cellulaire, implique également l'axe IRE1-TRAF2-ASK1 et active principalement la voie des JNKs (Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000).

ASK1 jouerait également un rôle dans la différenciation et la survie cellulaire. L'expression d'un mutant constitutivement actif d'ASK1, ASK1 Δ N, dans des cellules de rat PC12 qui présentent un phénotype proche des neurones sympathiques en réponse au NGF, leur permet d'acquérir ce phénotype en l'absence de NGF. (Takeda et al., 2000). Ces cellules sont également capables de survivre en l'absence de sérum. Des résultats identiques ont été obtenus avec des kératinocytes ce qui indiquerait, qu'ASK1 pourrait jouer un rôle dans l'auto-renouvellement de l'épiderme

(Sayama et al., 2001; Sayama et al., 2005). L'érythropoïèse ferait également intervenir l'axe ASK1-JNK/p38 (Nagata et al., 1999; Rubiolo et al., 2006) (**Figure 11**).

f. Régulation de l'activité et de l'expression d'ASK1.

Il existe de nombreux mécanismes de régulation de l'activité et de l'expression d'ASK1.

- **Régulation de son activité et de sa dégradation**

La protéine PP5 (proteïn phosphatase 5), membre de la famille des sérine/thréonine phosphatases, joue un rôle central dans la régulation d'ASK1 (Morita et al., 2001). Elle se fixe spécifiquement sur la forme active d'ASK1 et permet la déphosphorylation de la thréonine 838 (**Figure 11**). Cette activité phosphatase est inhibée par la rapamycine (Huang et al., 2004b), ainsi que par des polyamines naturelles telles la spermidine et la spermine (Kutuzov et al., 2005). La transcription de PP5 est induite en condition d'hypoxie (Zhou et al., 2004). Cette régulation d'ASK1 au niveau protéique par PP5 inhibe la voie de signalisation ASK1-p38 et constitue donc une approche anti-inflammatoire intéressante.

D'autres sites de phosphorylation, les sérines Ser83, Ser966 et Ser1033 ont été identifiées comme des sites de phosphorylation induisant une régulation négative d'ASK1. AKT, sérine/thréonine kinase qui a la propriété de phosphoryler un grand nombre de protéines pro-apoptotiques et de favoriser la survie cellulaire, phosphoryle ASK1 au niveau de la sérine 83 et supprime son activité (Kim et al., 2008; Yuan et al., 2003). Bien que la kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 966 n'ait pas été identifiée, cette phosphorylation permet le recrutement des protéines 14-3-3 qui suppriment l'activité d'ASK1 (Goldman et al., 2004; Subramanian et al., 2004; Zhang et al., 1999). Cet effet est rétabli par la phosphatase 2B qui déphosphoryle directement la sérine 966 et permet la dissociation des protéines 14-3-3 d'ASK1 (Liu et al., 2006). La phosphorylation de la sérine 1033 induit aussi l'inactivation d'ASK1 par des mécanismes qui ne sont pas déterminés actuellement (Fujii et al., 2004) (**Figure 11**).

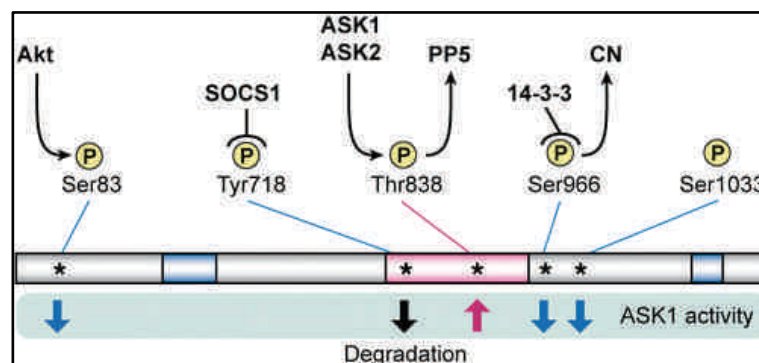


Figure 11. Régulation post traductionnelle d'ASK1 (Takeda et al., 2008).

- **Régulation de sa dégradation**

L'ubiquitination induisant la dégradation par le protéasome, constitue également un mécanisme régulateur important de l'activité d'ASK1. L'interaction TNF- α /TNFR2 induit l'ubiquitination et la dégradation d'ASK1, dans les LB par l'intermédiaire de la protéine c-IAP (cellular inhibitor of apoptosis 1) qui est une ubiquitine ligase (E3).

Dans les cellules endothéliales, en conditions basales, SOCS1 se fixe à la tyrosine 718 phosphorylée et induit la dégradation d'ASK1 par le protéasome de façon ubiquitine-dépendante. L'activation par le TNF- α , élimine SOCS1 et conduit à l'activation des MAPKs (He et al., 2006).

La protéine CHIP (C-terminus of Heat-shock protein 70-interacting protein) est aussi capable d'ubiquitiner ASK1, mais les conditions dans lesquelles cette protéine intervient ne sont pas connues (Hwang et al., 2005).

- **Régulation de son expression au niveau transcriptionnel**

Muller et al. ont montré par microarray qu'*Ask1* est une cible des membres de la famille des facteurs de transcription E2F qui jouent un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire (Muller et al., 2001). Ces résultats ont été confirmés par Kherrouche et al. dans des cellules de neuroblastome démontrant qu'E2F1, E2F2, E2F3 et E2F4 se lient directement à son promoteur (Kherrouche et al., 2006), cette régulation est abolie par mutation des séquences promotrices concernées.

Au cours de ce travail nous avons démontré que l'expression d'ASK1 pouvait être également régulée au niveau post-transcriptionnel.

g. ASK1 et pathologies

En conditions normales, les souris KO pour ASK1 ne présentent pas de signes particuliers. Cependant l'induction de pathologies dans ce modèle conduit à une augmentation de la sévérité des symptômes (Tableau 2). L'étude de souris KO pour ASK1 a ainsi permis de mieux comprendre son rôle dans des pathologies telles les maladies auto-immunes, cardiovasculaires, neurodégénératives ou le diabète.

- **ASK1 et la PR**

En ce qui concerne les maladies auto-immunes et plus particulièrement la PR, les souris KO pour ASK1 sont résistantes aux arthrites induites par le collagène et par le sérum de souris K/BxN (Mnich et al., 2010). Elles présentent une diminution de la réponse inflammatoire et des atteintes ostéo-cartilagineuses. La transcription des gènes de cytokines, de chémokines, d'enzymes responsables de la dégradation de la MEC reste à l'état basal. Les cellules sanguines (PBMC) répondent moins bien à la stimulation par le TNF- α ou le LPS. On observe une

diminution de la production de chémokines telles CCL2, KC et l'IL-6. L'inhibition d'ASK1 par un siARN dans les FLS rhumatoïdes inhibe la synthèse d'IL-6 et de PGE₂ en réponse au TNF- α . Cette étude démontre qu'ASK1 joue un rôle probablement déterminant dans la PR.

- **ASK1 et maladies cardiovasculaires**

ASK1 est impliquée dans l'hypertrophie cardiaque et le remodelage vasculaire induits par l'angiotensine II (Izumiya et al., 2003). Chez des souris KO pour ASK1, l'activation des JNKs et de p38 par l'angiotensine II est significativement réduite, ainsi que le remodelage vasculaire et l'hypertrophie cardiaque. Dans l'infarctus du myocarde, ASK1 jouerait un rôle analogue en favorisant le remodelage ventriculaire gauche (Yamaguchi et al., 2003),

Dans les lésions d'ischémie-reperfusion cardiaque, ASK1 participerait également à l'apoptose et à la nécrose des cellules myocardiques, dues à la production de ROS par les monocytes, les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles présents dans les zones ischémiques (Watanabe et al., 2005). Les souris ASK1^{-/-} présentent une baisse de la mort cellulaire et sont plus résistantes à la nécrose induite par H₂O₂. ASK1 est également impliqué dans le développement de l'hyperplasie intimale artérielle (Izumi et al., 2003).

- **ASK1 et maladies neurodégénératives**

ASK1 régule l'apoptose dans diverses pathologies telles la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les maladies à polyglutamines, la sclérose amyotrophique latérale (ALS) ou les maladies induites par les prions.

Les maladies à polyglutamines comprennent plusieurs maladies héréditaires, la maladie d'Huntington, l'amyotrophie spino-bulbaire, l'atrophie dentatorubropallidoluysienne, les ataxies spino-cérébelleuses et la maladie de Machado-Joseph. Au cours de ces maladies, des peptides appelés fragments polyQ s'agrègent dans la cellule conduisant à des stress cellulaires et à la mort neuronale via ASK1 (Kariya et al., 2005; Nishitoh et al., 2002; Sekine et al., 2006). ASK1 est aussi une cible potentielle pour le traitement des histiocytomes fibreux malins (Chibon et al., 2004).

La production de ROS par les peptides β amyloïdes- (A β) conduit à la mort cellulaire dans la maladie d'Alzheimer (Behl et al., 1994; Hensley et al., 1994; Nakagawa et al., 2000). Kadowaki et al. ont montré que l'activation d'ASK1 par les ROS induits par les A β est un mécanisme important de la neurotoxicité induite par ces peptides (Hashimoto et al., 2003; Kadowaki et al., 2005; Song et al., 2003). Les neurones ASK1^{-/-} sont résistants à l'activation par les A β (Kadowaki et al., 2005).

L'étude de Cha et al. chez la drosophile a permis d'établir un lien entre la protéine Parkin qui est une ubiquitine ligase qui protège les neurones dopaminergiques et la voie des JNKs (Cha et al.,

2005). Parkin régule négativement la voie des JNKs qui contribue à la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Ainsi, la perte de fonction de Parkin activerait des protéines en amont de la voie des JNKs, telle D-ASK1 ce qui conduit à la dégénérescence neuronale. De manière très intéressante la régulation de Parkin sur la voie des JNKs est conservée dans les cellules de mammifères, suggérant un rôle important de l'axe ASK1-JNKs dans la maladie de Parkinson.

- **ASK1 et le diabète**

Le TNF- α inhibe l'action de l'insuline en favorisant la phosphorylation des protéines IRS-1 (Aguirre et al., 2000). Cette phosphorylation est dépendante de la production des ROS et fait intervenir ASK1 et les JNKs. Des souris déficientes pour l'isoforme JNK1, ont une sensibilité accrue à l'insuline (Hirosumi et al., 2002). ASK1 interviendrait en phosphorylant IRS-1 sur un résidu sérine et en diminuant la phosphorylation sur un résidu tyrosine dépendante de l'insuline (Imoto et al., 2006).

Cibler ASK1 permettrait également de lutter contre la sénescence des cellules endothéliales due à l'hyperglycémie. Ainsi l'induction d'un diabète par la streptozotocine chez des souris ASK1-/- conduit à une baisse significative de la sénescence des cellules endothéliales due à l'hyperglycémie, ainsi qu'à une baisse de l'expression de PAI-1, facteur de risque dans les maladies cardiovasculaires.

De par son appartenance à deux axes de signalisation cellulaire, contrôlant l'un la mort cellulaire et l'autre la réponse inflammatoire, ASK1 constitue donc une nouvelle cible thérapeutique et peut représenter une alternative aux thérapeutiques ciblant p38, dont l'utilisation est actuellement très controversée du fait des nombreux effets secondaires induits par ces molécules.

- **Phénotypes des souris ASK1 -/- dans les modèles de pathologie étudiés**

Modèle	Phénotype	Références
Traitement par l'Angiotensine II	Hypertrophie et remodelage cardiaque diminués	(Izumiya et al., 2003)
Infarctus du myocarde induit par la ligation de l'ACD.	Hypertrophie et remodelage cardiaque diminués	(Yamaguchi et al., 2003)
Ischémie-reperfusion (ligation de l'ACD suivie d'une re-perfusion)	Infarctus du myocarde réduit	(Watanabe et al., 2005)
Croisement avec souris Raf-C KO	Les dysfonctions cardiaques (dilatation, fibrose cardiaque, apoptose) observées chez les souris Raf-C KO sont atténuées.	(Yamaguchi et al., 2004)
Modèle de lésion induit par une manchette carotidienne	Formation néointimale diminuée	(Izumi et al., 2003)
Ischémie unilatérale des membres postérieurs	Vaisseaux collatéraux et angiogenèse moins développés, diminution de l'infiltration des macrophages et des LT et de la production de VEGF et de MCP1	(Izumi et al., 2005)
Traitement par STZ (modèle diabétique)	Diminution de la sénescence des cellules endothéliales de l'aorte Diminution des concentrations plasmatiques de PAI-1	(Yokoi et al., 2006)
Ischémie rétinale	Augmentation de la survie des neurones rétiniens	(Harada et al., 2006)
Arthrite induite par le sérum de souris K/BxN	Diminution de la destruction ostéoarticulaire et de l'inflammation	(Mnich et al., 2010)

ACD : artère coronaire droite, Ang : angiotensine, CAT : constriction de l'aorte transversale, MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1, PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène, STZ : streptozotocine.

Tableau 2. Etude des phénotypes de souris ASK1 -/- dans des modèles de pathologies faisant intervenir ASK1.

4. La propagation du signal en aval des MAPKs

Les MAPKs induisent la réponse inflammatoire principalement par l'activation de l'expression de gènes. AP-1 qui est un complexe constitué d'homodimères ou d'hétérodimères de facteurs de transcription des familles JUN et FOS, ATF et JDP, est le substrat classique des JNKs et de p38. Cependant p38 et les JNKs peuvent également phosphoryler de très nombreuses protéines intracellulaires, comme des co-régulateurs de la transcription, des protéines du cytosquelette, des composants de la machinerie traductionnelle et d'autres protéines intervenant dans des voies de signalisation (Kyriakis and Avruch, 2001).

Des études récentes ont mis en évidence de nouvelles cibles susceptibles de propager le signal en aval des MAPKs : il s'agit des MKs (MAPK-activated protein kinases). Les MKs qui sont régulées par p38 sont MK2 et MK3 (MAPKAP-K2 et MAPKAP-K3), les MSK1 et MSK2 (mitogen and stress activated kinases) ainsi que MNK1 et MNK2 (MAPK-interacting kinases) qui contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires. En ce qui concerne les voies TLRs il a été démontré que p38 par l'intermédiaire de MK2 et MK3 contrôle l'activité de Rsk (p90 ribosomal S6 kinases) qui régule l'endocytose induite par les TLRs. Des cellules dendritiques KO pour ces 2 kinases présentent une inhibition de l'endocytose médiée par le LPS (Zaru et al., 2007).

Un autre groupe de MKs dépendantes de p38 incluant MSK1 et MSK2 exerce un effet régulateur négatif : ces MKs ont la propriété de phosphoryler les facteurs de transcription CREB et ATF1 et l'histone H3 en réponse à des stress mitogènes et cellulaires (Soloaga et al., 2003; Wiggin et al., 2002) et limitent l'inflammation TLR-dépendante en induisant l'expression de régulateurs négatifs incluant MKP-1 et l'IL-10 (Ananieva et al., 2008).

5. Régulations négatives des MAPKs par les MKPs

L'inhibition de l'activation des MAPKs se fait principalement par les MAPK phosphatases (MKPs), un groupe composé d'environ 10 DUSP (dual-specificity phosphatases) déphosphorylant les résidus thréonine et tyrosine des MAPKs cibles (Dickinson and Keyse, 2006; Liu et al., 2007b; Owens and Keyse, 2007). Les analyses génétiques ont révélés que trois MPKs, MKP-1, MKP-2 et DUSP2, sont impliquées dans la réponse immunitaire innée (**Figure 12**).

a. MKP-1, un régulateur négatif de la réponse aux TLRs.

MKP-1 est le premier membre de la famille MKP, initialement identifié comme un élément de la réponse précoce aux facteurs de croissance et au stress. MKP-1 localisé dans le noyau déphosphoryle préférentiellement p38 et les JNKs (Franklin et al., 1998). L'utilisation de souris KO pour MKP-1 a permis de démontrer que MKP-1 est un régulateur négatif de la signalisation des TLRs et de la réponse immunitaire innée (Chi et al., 2006; Hammer et al., 2006; Salojin et al., 2006; Zhao et al., 2006). Les macrophages MKP-1 ^{-/-} présentent une activation plus forte et plus durable de p38 et des JNKs après stimulation des TLRs, et produisent plus de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-6 et le TNF- α et de chémokines telles CCL3, CCL4 et CXL2 (Hammer et al., 2006). De plus, les souris déficientes pour MKP-1 sont beaucoup plus sensibles au choc septique et développent plus facilement une arthrite (Chi et al., 2006; Hammer et al., 2006; Salojin et al., 2006; Zhao et al., 2006).

En réponse à la stimulation des TLRs, on observe une induction forte et rapide du messager de MKP-1 et de sa protéine, atteignant un pic une heure après activation (Chen et al., 2002; Franklin et al., 1998; Hu et al., 2007; Zhao et al., 2005; Zhao et al., 2006).

MKP-1 est aussi induite par des immunosuppresseurs comme les glucocorticoïdes et les cytokines anti-inflammatoires et cette induction explique en grande partie les effets inhibiteurs de ces agents sur l'activation des MAPKs et sur l'inflammation (Abraham et al., 2006). Cependant un stimulus comme l'IFN- γ , atténue l'expression de MKP-1 pour faciliter l'effet inducteur des MAPKs (Zhao et al., 2006). Ainsi, l'induction de MKP-1 semble être un mécanisme commun par lequel les agents immunomodulateurs régulent les réponses immunitaires innées (Chi et al., 2006).

Un certain nombre de modifications jouent un rôle important dans son activité et sa stabilité. Ces modifications incluent la phosphorylation de la partie C terminale (Brondello et al., 1999; Lin et al., 2003; Lin and Yang, 2006) et l'oxydation ROS-dépendante du résidu cystéine du site catalytique (Chi and Flavell, 2008; Kamata et al., 2005). Cao et al. ont récemment démontré que l'acétylation de MKP-1 sur la lysine 57 localisée dans le domaine de fixation du substrat favorise son interaction avec p38 et ainsi sa déphosphorylation (Cao et al., 2008).

b. MKP-5

MKP-5 qui présente une localisation cytoplasmique et nucléaire a la propriété de déphosphoryler p38 et les JNKs. Des souris MKP-5 $-/-$, se développent normalement mais présentent des anomalies de la réponse immunitaire innée et adaptative. En réponse au LPS, les macrophages MKP-5 $-/-$ montrent une augmentation de l'activité des JNKs, celle de p38 n'étant pas modifiée et une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires (Zhang et al., 2004b). L'injection de LPS chez ces souris conduit aussi à une production plus élevée de TNF- α mais inférieure à celle obtenue dans les souris MKP-1 $-/-$, ceci reflétant probablement le fait que MKP-5 agit uniquement sur les JNKs et pas sur p38 ou ERK1/2.

c. DUSP2 (PAC-1)

DUSP2 est une MKP nucléaire principalement exprimée dans les cellules immunitaires. Son transcrite est surexprimé dans les leucocytes activés (Jeffrey et al., 2006). A l'inverse de ce qui est observé dans les cellules MKP-1 $-/-$ et de MKP-5 $-/-$, les cellules DUSP2 $-/-$ présentent une réponse inflammatoire diminuée. Ainsi dans les macrophages KO pour DUSP2, la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-12, de PGE2 et de NO est diminuée. Les souris KO pour DUSP2 présentent une résistance à l'arthrite induite par le sérum de souris K/BxN (Jeffrey et al., 2006). L'absence de DUSP2, conduit à une baisse de l'activité de p38 et de ERK1/2 dans les macrophages activés par le LPS, qui est associée à une inhibition de l'activité de Elk-1 et de NFAT-AP1 et à l'inverse à

une augmentation de l'activité des JNKs. L'inhibition pharmacologique des JNKs inhibe l'activation d'ERK1/2 dans les cellules DUSP2 ^{-/-}, ceci impliquant qu'en l'absence de DUSP2 l'augmentation de l'activation des JNKs conduit à l'inhibition de ERK1/2 (Shen et al., 2003; Zhang et al., 2001). DUSP2 supprimerait l'effet inhibiteur des JNKs sur la signalisation de ERK1/2 dans les macrophages afin de réguler positivement la réponse immunitaire innée (Jeffrey et al., 2006).

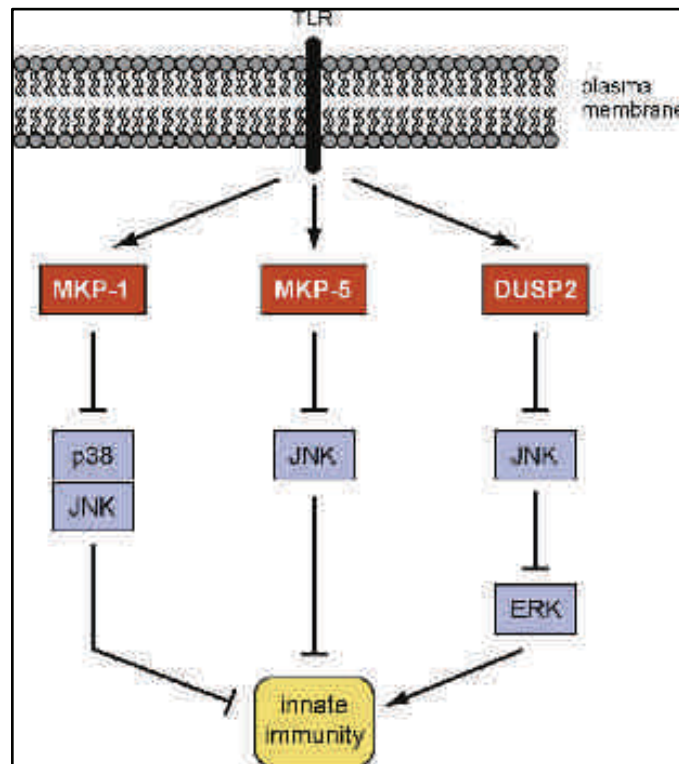


Figure 12 : Les MAPK phosphatases, régulateurs négatifs des MAPKs (Huang et al., 2009).

Une des fonctions centrales des MAPKs est donc d'orchestrer les réponses immunitaires. L'inhibition pharmacologique de voies de signalisation de p38 et des JNKs s'est révélée efficace dans différentes situations inflammatoires (Jeffrey et al., 2007; Kumar et al., 2003; Manning and Davis, 2003). Cependant, la toxicité et les effets indésirables de ces inhibiteurs bloquent leur utilisation. D'autres stratégies peuvent donc être envisagées, comme l'inhibition au niveau post-transcriptionnel par la voie des miARNs.

IV. REGULATION EPIGENETIQUE PAR LES MIARNs DANS LA PR

1. La biogénèse des miARNs

Les miARNs sont exprimés dans les branches animales et végétales des eucaryotes et codés par un grand nombre de gènes. Ce sont des petits ARNs de 20 à 24 nucléotides régulant l'expression de gènes de façon post-transcriptionnelle. Actuellement, plus de 1200 miARNs ont été identifiés chez l'homme et plus de 1000 chez la souris. Les prédictions informatiques estiment que 3% du génome correspondent à des séquences attribuées aux miARNs (Bentwich et al., 2005; Berezikov et al., 2005). Un ARNm peut être régulé par plusieurs miARNs et un miARN est prédit cibler une centaine de messagers, ainsi 30 à 90% du génome pourraient être régulés par des miARNs directement ou indirectement (Engels and Hutvagner, 2006; Griffiths-Jones, 2004; Lewis et al., 2005; Miranda et al., 2006). Cependant une très faible proportion de ces cibles ont été validées à ce jour.

Les miARNs sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II et leurs transcrits sont coiffés et polyadénylés comme ceux d'un ARNm classique (Kim, 2005). Bien que certains miARNs soient produits individuellement, la majorité des miARNs sont issus d'unités de transcription codant pour plusieurs produits (Bartel, 2004). Un transcrit peut ainsi coder pour des groupes de plusieurs miARNs, ou pour un miARN et une protéine. Ce dernier type de transcrit code des miARNs situés dans les séquences introniques.

Le transcrit primaire ou pri-miRNA borde la séquence du miARN en 5' et en 3' et deux étapes de maturation permettent la genèse du miARN mature. Un pri-miARN typique consiste en une tige boucle d'une séquence double brin d'environ 33 paires de base imparfaitement appariées, flanquées de segments d'ARN simple brin (Bartel, 2004). Un seul pri-miARN peut contenir jusqu'à 6 précurseurs de miARNs. La première étape de maturation consiste en l'excision de la tige boucle dans le noyau et génère un produit appelé pre-miARN. Pour la plupart des miARNs, c'est une RNase de type III nucléaire qui permet la génération du pre-miRNA, DCL1 chez les plantes et DROSHA chez l'animal (Kim, 2005). Ce premier clivage exercé par DROSHA se fait à l'aide d'une protéine à domaine de liaison à l'ARN, appelée DGCR8. DROSHA se fixe à DGCR8 qui interagit directement avec la tige boucle du pri-miRNA et les fragments simple brin bordant (Han et al., 2006). Les séquences bordant la tige boucle sont nécessaires car le clivage dépend de la distance de la jonction tige boucle-ARN simple brin, qui mesure précisément un tour d'hélice ARN de 11 paires de bases qui représente la distance minimale nécessaire à l'activité catalytique d'une RNase III (Denli et al., 2004).

Cependant, le clivage induit par ce complexe n'est pas le seul mécanisme connu pour produire des pre-miRNAs. L'épissage de pri-miARNs peut aussi libérer des introns semblables aux

structures des pre-miARNs (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007), appelés mirtrons. Ces mirtrons intègrent alors la voie de la biogénèse des miARNs, indépendamment du complexe DROSHA et DGCR8.

La seconde étape consiste en l'excision de la boucle terminale du pre-miRNA et la genèse d'un duplex de miARNs matures de 22 nucléotides de long (Bartel, 2004). Chez les plantes, c'est la même protéine, DCL-1, qui catalyse cette deuxième étape dans le noyau. Chez les animaux, le pre-miARN est d'abord exporté hors du noyau par l'exportine 5, Ran-GTP dépendante, pour être clivé par DICER associé à TRBP dans le cytoplasme (Kim, 2005).

TRBP (Tar Binding Protein) et DICER sont des protéines appartenant à la famille des DRBP pour dsRNA binding protein. TRBP est une protéine qui permet le recrutement du complexe DICER à AGO2, permettant la maturation du miARN par DICER et le silencing par le complexe RISC via AGO2 (Chendrimada et al., 2005; Daniels et al., 2009; Haase et al., 2005). TRBP fonctionne ainsi comme une protéine d'interaction à l'ARN et une protéine permettant un lien fonctionnel entre le complexe DICER et le complexe RISC.

La seconde excision médiée par DICER définit l'autre extrémité du duplex miARN mature. DICER peut cliver n'importe où le long d'un ARN double brin mais présente une affinité supérieure pour les extrémités des ARNs double brin (Kim, 2005; Vermeulen et al., 2005). Le domaine PAZ de DICER interagit avec les extrémités 3' terminales et détermine le site de clivage de manière dirigée, le site catalytique étant situé à deux tour d'hélice ARN, soit 22 paires de base du domaine PAZ du complexe DICER-ARN. Cependant, il a été identifié un miARN qui subit une maturation indépendante de DICER mais dépendante de AGO2, il s'agit de miR-451, ce qui ouvre de nouvelles perspectives sur d'autres voies de biogénèse des miARNs (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010).

Les voies de biogénèse classique des miARNs sont résumées **figure 13**.

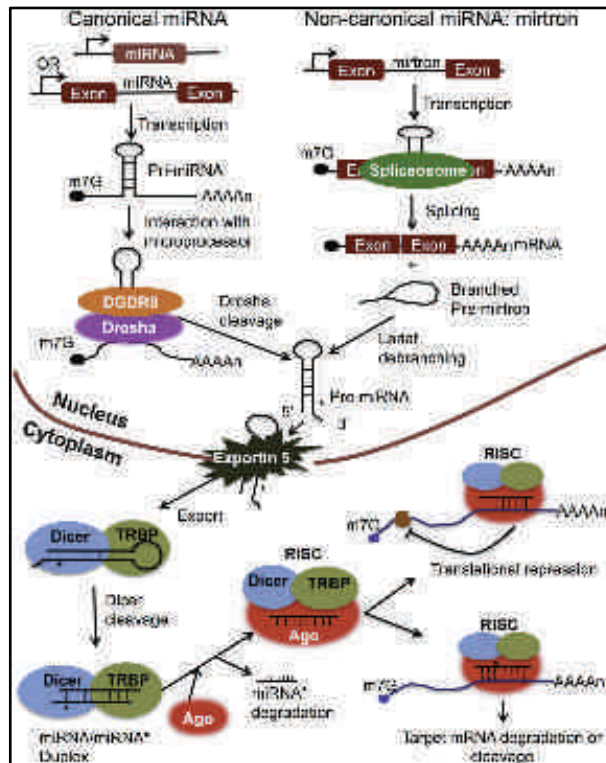


Figure 13. La biogénèse des miARNs (Dai and Ahmed, 2011).

Une manière de réguler la concentration d'un miARN est de contrôler sa maturation. La production d'un nombre important de miARNs est modulée par certaines de leurs cibles. Chez la drosophile l'expression de miR-7 qui réprime la traduction du facteur de transcription Yan, est également régulée par l'ETS (External Transcribed Sequence) de Yan (Li and Carthew, 2005). Ceci démontre l'existence d'une double boucle de régulation négative entre miR-7 et Yan. Un autre exemple de double régulation négative concerne let-7. Chez *C. elegans*, l'expression de la protéine LIN28 est réprimée par let-7 (Seggerson et al., 2002). LIN28 a également la propriété de s'associer avec les ARN pri-let-7 et pre-let-7 (Heo et al., 2008; Newman et al., 2008; Rybak et al., 2008), ceci impliquant probablement les séquences de la boucle terminale, spécifiques des précurseurs de let-7 (Newman et al., 2008). Lin28 va alors inhiber le clivage des précurseurs de let-7 par DROSHA (Heo et al., 2008; Newman et al., 2008; Viswanathan et al., 2008) et par DICER (Heo et al., 2008 ; Rybak et al, 2008). LIN28 induit également la polyuridylation en 3' de pre-let-7 (Heo et al., 2008), ce qui inhibe le clivage par DICER, mais cette polyuridylation peut aussi être la conséquence de l'incapacité de DICER à cliver des miRNAs couplés à LIN28.

2. La voie effectrice des miARNs

a. Les protéines Argonaute

Un duplex de miARNs mature possède une demi-vie assez courte car il est rapidement dissocié par sa liaison avec les protéines AGO. La famille des protéines Argonaute peut être séparée en trois sous-groupes, le groupe des Piwi qui fixent les piRNAs, le groupe des AGO qui fixent les miARNs et les siARNs, et un troisième groupe qui n'a été décrit pour l'instant que chez les nématodes (Yigit et al., 2006). Si certaines espèces comme *Schyzosaccharomyces pombe*, n'expriment qu'une seule protéine AGO, d'autres en expriment plusieurs : la drosophile code cinq protéines AGO, *Arabidopsis thaliana*, dix, l'homme huit et *C. elegans* vingt-sept. Chez l'homme, cinq des huit protéines AGO s'associent avec des siARNs et des miRNAs (Meister and Tuschl, 2004; Tomari and Zamore, 2005).

Les protéines AGO sont définies par quatre domaines : un domaine PAZ, un domaine PIWI et les domaines Mid et N (**Figure 14**).

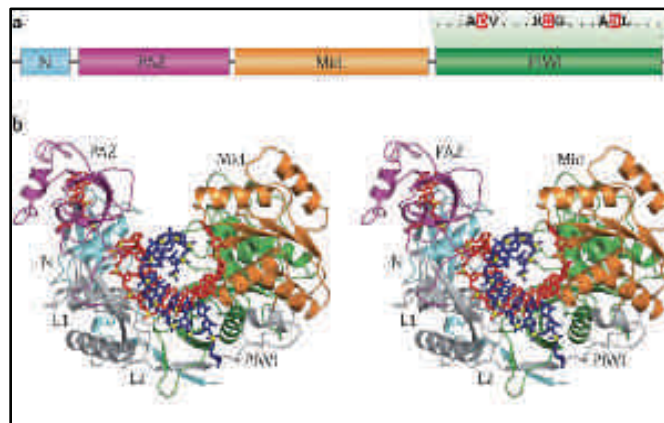


Figure 14. Structure et organisation d'une protéine Argonaute (Czech and Hannon, 2011).

Le domaine PAZ chez Ago présente un site de fixation des extrémités 3' de l'ARN et des études de co-cristallographie ont permis de montrer que ce domaine était indispensable à la fixation du brin guide. L'extrémité en 5' se fixe au domaine Mid, et le reste du brin ARN est lié grâce à des charges positives portées par les deux domaines d'Ago.

Le domaine PIWI adopte une forme analogue à la RNase-H, capable dans certaines conditions de cliver le messenger cible (Parker et al., 2004; Song et al., 2004). Cette étape est un des mécanismes du silencing par déstabilisation de la cible. Cependant toutes les protéines Ago n'ont pas d'activité catalytique. Cette activité a été démontrée pour SpAGO1 chez *Saccharomyces pombe* (Irvine et al., 2006), DmAGO1 et DmAGO2 et DmPIWI chez la drosophile (Miyoshi et al., 2005; Rand et al., 2005; Saito et al., 2006), AtAGO1, AtAGO4 et AtAGO7 chez *Arabidopsis* (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi et al., 2005; Qi et al., 2006) et pour une seule protéine

Ago humaine, HsAGO2 (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). L'expression des protéines Ago peut varier : chez *Arabidopsis*, AtAGO1 est la protéine Ago la plus exprimée et la plus utilisée (Baumberger and Baulcombe, 2005), tandis que chez l'homme, c'est la protéine hsAGO2, alors que hsAGO4 est à peine détectable (Sasaki et al., 2003). Chez l'homme les protéines Ago présentent des différences de régulations et de fonctions qui ne sont encore pas bien définies (Johnston and Hutvagner, 2011).

Les protéines AGO jouent un rôle important dans la formation des complexes RISC. Les miARNs double brin produits par DICER entrent dans le complexe RISC, ce qui nécessite la dissociation du duplex et le recrutement d'un seul des 2 brins en association avec la protéine AGO effectrice (Meister and Tuschl, 2004; Tomari and Zamore, 2005). Le brin recruté, appelé guide, permet la reconnaissance de la cible par appariement Watson-Crick, tandis que l'autre brin est écarté.

Comme pour les siARNs, l'association d'un miARN avec AGO est sélective : un brin est sélectionné tandis que l'autre est en général perdu. Cette sélection est basée sur la stabilité thermodynamique relative de chacune des extrémités du duplex. Le brin retenu est celui qui est le moins solidement apparié en 5' (Kim, 2005). Cependant, cette règle n'est pas générale, le deuxième brin appelé star, pouvant être également recruté dans certaines conditions (Okamura et al., 2007). Le fait que la dissociation du duplex ne soit pas accompagnée d'un clivage pour le brin non recruté comme c'est le cas pour les siARNs, n'est pas encore expliqué, mais peut être lié à la fréquence des nucléotides non appariés et de structure "bulges" inhérentes au duplex (Matranga et al., 2005).

b. Protéines associées au complexe

Chez les mammifères, le complexe DICER/AGO/miARN est associé à d'autres protéines. GEMIN3, GEMIN4, MOV10 et IMP8 s'associent à AGO2 (Bartel, 2004; Meister and Tuschl, 2004; Weinmann et al., 2009). La protéine GW182 s'associe également à AGO2 (Liu et al., 2005b; Meister and Tuschl, 2004; Till et al., 2007). Chez la drosophile, l'orthologue de GW182 s'associe avec Ago1 (Behm-Ansmant et al., 2006). Des analyses fonctionnelles réalisées chez l'homme, chez *C. elegans*, et chez la drosophile indiquent que GW182 est nécessaire et suffisant pour fixer les miARNs à AGO et réprimer l'expression des gènes (Ding and Grosshans, 2009; Eulalio et al., 2008; Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005b). Ainsi, l'interaction de GW182 avec AGO2 lié au miARN peut être assimilée au complexe RISC.

c. L'appariement

Les miARNs vont permettre au sein du complexe miRISC, la reconnaissance et la répression d'ARNm ciblés de manière séquence-spécifique. Cependant Pillai et al. (2004) ont montré que le complexe miRISC peut aussi reconnaître des ARNm qui ne contiennent pas de sites de fixation

pour les miARNs. Les sites de fixation dans les ARNm de mammifères sont en général situés dans les séquences 3'UTR et souvent présents en plusieurs copies. Il existe également des sites de fixation de miARNs en 5'UTR conduisant à la répression des cibles (Lytle et al., 2007).

Ces dernières années plusieurs études ont décrit une répression de l'expression par des miARNs se fixant dans la région codante. C'est le cas de miR-24 qui cible l'ARNm de p16 ou de la famille let-7 qui cible Dicer. Des dizaines d'autres cibles ont été décrites depuis, ce qui pose un problème en ce qui concerne les algorithmes de prédiction, qui se basent majoritairement sur des sites situés en 3'UTR des ARNm (e.g., TargetScan, PicTar, miRBase, etc.). De plus des analyses récentes par séquençage de masse du transcriptome ont révélé que les séquences codantes pouvaient contenir de nombreux sites de fixation : la méthode HITS-CLIP a montré que 25% des associations AGO/ARNm se faisaient dans les régions codantes, cependant ces résultats nécessitent d'être confirmés individuellement.

La plupart des appariements des miARNs sont imparfaits, comportant des appariements imparfaits et des « bulges » bien qu'en grande majorité une séquence nommée "seed" soit nécessaire à la fixation d'un miARN. Cette séquence « seed » constitue l'un des critères de sélection des algorithmes de prédiction. Il s'agit d'un appariement Watson-Crick du miARN concernant les nucléotides 2 à 8, pouvant tolérer des appariements non canoniques, tels les « wobble pairing », consistant en un appariement uracile/guanine.

Chez les plantes, la plupart des sites d'appariements des miARNs sont situés dans la séquence codante des ARNm et présentent un appariement presque parfait.

Le degré d'appariement miARN-ARNm a été longtemps considéré comme un facteur déterminant du mécanisme de régulation. Un appariement parfait va conduire au clivage de la cible par Ago, alors que des appariements imparfaits entre les nucléotides 9 et 12 ne permettent pas le clivage et conduisent à la répression traductionnelle des ARNm. Le clivage et la répression traductionnelle constituent deux modes de régulation dans le règne animal alors que le clivage est le mode de régulation préférentiel dans le monde végétal. Cependant, des analyses génétiques chez *Arabidopsis* ont permis de montrer qu'en l'absence de clivage, on pouvait également observer une répression traductionnelle (Brodersen et al., 2008), ce qui suggère que la répression de la traduction serait un mécanisme de silencing conservé chez les végétaux et les animaux et qu'un appariement parfait permet un effet additionnel par clivage de la cible.

d. La répression de la traduction des ARNm

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'arguments permettant d'affirmer que la répression de la traduction se fait lors de l'initiation de la traduction de la protéine ou après l'initiation. L'initiation démarre lors de la reconnaissance de la coiffe fixée sur la 7-méthyl-guanosine en 5' par eIF4E, une sous-unité du complexe d'initiation eIF4F. Ce complexe comporte aussi eIF4A et

eIF4G. L'interaction de eIF4G avec eIF3 va permettre le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. Le complexe de pré-initiation 40s interagit avec la sous unité 60S au niveau du codon AUG pour initier l'élongation. EIF4G interagit également avec les protéines PABP-1 (poly-A binding protein 1) fixées en 3' des ARNm. La capacité d'eIF4G à interagir avec eIF4E et PABP-1 va permettre la circularisation de l'ARNm, ce qui accroît considérablement l'efficacité de traduction de la protéine.

- **Inhibition de l'initiation de la traduction.**

Pour certains auteurs, l'inhibition de la traduction pourrait se faire au niveau de l'initiation (Ding and Grosshans, 2009; Humphreys et al., 2005; Kiriakidou et al., 2007; Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2004; Wakiyama et al., 2007).

Un premier modèle propose une compétition entre miRISC et eIF4E pour l'interaction avec la coiffe en 5'. EIF4E se fixe à la coiffe en partie par des liaisons "stacking" à la base méthylée de la coiffe entre deux résidus tryptophane. (Mathonnet et al., 2007). L'hypothèse serait qu'il existe une analogie de structure entre le domaine Mid de la protéine Ago2 et eIF4E. En effet, deux résidus phénylalanine dans le domaine Mid adoptent des positions équivalentes aux résidus tryptophane d'eIF4E (Kiriakidou et al., 2007).

Il a été aussi suggéré que la protéine GW182 ou un facteur en aval seraient des compétiteurs d'eIF4E (Eulalio et al., 2008).

Un second modèle proposé est la stimulation de la déadénylation de la queue des ARNm. Dans ce modèle, la traduction est inhibée car la coiffe et la queue déadénylée donc dépourvue de PABP-1 ne permettent plus la circularisation de l'ARNm (Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Wakiyama et al., 2007; Wu et al., 2006). La déadénylation n'est pas simplement la conséquence d'un défaut d'initiation car les ARNm contenant des IRES sont aussi déadénylés même s'ils sont résistants à la répression induite par le complexe miRISC (Wakiyama et al., 2007). Dans ce cas, la déadénylation est initiée par la protéine GW182, qui induit la déadénylation et la répression de traduction chez les cellules de drosophile (Behm-Ansmant et al., 2006).

Ce modèle reste controversé car plusieurs auteurs ont montré que les ARN polyadénylés sont aussi réprimés par les miARNs (Pillai et al., 2005, Wu et al., 2006, Eulalio et al., 2008). Cette régulation est dépendante d'AGO et de la protéine GW182 puisque la délétion de ces deux facteurs ou la surexpression d'un dominant négatif de GW182 l'annule (Eulalio et al., 2008). De plus, l'abrogation d'un composant de l'enzyme déadénylase concernée n'a que peu d'effet sur la répression induite par GW182.

Un dernier modèle proposé est le blocage par miRISC de l'association entre la sous-unité ribosomale 60S et le complexe de pré-initiation 40S. La protéine AGO2 s'associe avec eIF6 et la

sous-unité ribosomale 60S *in vitro* (Chendrimada et al., 2007). eIF6 est impliquée dans la biogénèse et la maturation des sous-unités 60S ribosomiques et prévient l'association des sous-unités 60S immatures au complexe 40S. La régulation des ARNm par les miRNAs est perdue dans des cellules déficientes pour eIF6 chez l'homme et chez *C. elegans*, ce qui n'est pas le cas chez la drosophile (Eulalio et al., 2008). Dans un milieu enrichi en réticulocytes, Wang et al. ont montré que les ARNm cibles étaient purifiés avec des sous-unités ribosomiques 40S et non 60S (Wang et al., 2008a). Des analyses de "toe-printing" montrent que la séquence autour du codon d'initiation est protégée, ce qui corrèle avec le positionnement des sous-unités 40S au codon d'initiation. Ainsi, le recrutement d'eIF6 par le complexe miRISC pourrait inhiber la traduction en empêchant l'association des ribosomes au codon d'initiation.

- **Inhibition de l'élongation**

Pour d'autres, le complexe RISC agirait plus, tardivement après l'initiation (Mathonnet et al., 2007; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006; Seggerson et al., 2002). Petersen et al. ont ainsi proposé un modèle de répression par le complexe miRISC, suggérant que les miARNs induisent une dissociation prématurée des ARNm des ribosomes. Le blocage rapide de l'initiation de la traduction par l'hippuristanol conduit à une dissociation rapide des ribosomes de façon miRNA-dépendante.

- e. La dégradation des ARNm par les miARNs**

Les premières études concernant les miARNs indiquaient que la répression de la traduction des ARNm n'était pas accompagnée d'une déstabilisation des ARNm. Cependant pour certains appariements miARN-ARNm, la quantité des ARNm est significativement réduite probablement en raison de leur dégradation (Bagga et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Lim et al., 2005; Wu et al., 2006). Cette dégradation est provoquée par une déadénylation, une dégradation de la coiffe et des digestions exonucléolytiques plutôt que par un clivage dépendant des protéines AGO (Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Lim et al., 2005; Wu et al., 2006). La déstabilisation nécessite les protéines AGO, GW182, et la machinerie cellulaire de décoiffage et de déadénylation (Behm-Ansmant et al., 2006).

Certaines études montrent que la dégradation peut être couplée à la traduction des ARNm en question. Les messagers dont la traduction est bloquée sont déadénylés par un mécanisme miARN-dépendant (Wakiyama et al., 2007; Wu et al., 2006). Cette déadénylation miARN-dépendante peut s'observer *in vitro* sans engager les mécanismes de la traduction (Wakiyama et al., 2007), ce qui suggère que la dégradation et la répression de la traduction sont deux mécanismes indépendants de la régulation de certaines cibles.

Le fait que certaines cibles soient dégradées et d'autres non n'est pas parfaitement expliqué. Le nombre, le type et les positionnements des mismatch dans les duplex miARNs/ARNm pourraient intervenir comme l'ont suggéré Aleman et al. , soulignant l'importance de l'appariement dans le déclenchement de la dégradation (Aleman et al., 2007). Récemment, Braun et al. ont montré chez l'homme et la drosophile, que le recrutement par certains miARNs, des complexes de déadénylases PAN2-PAN3 et CCR4-CAF1-NOT par une interaction directe avec GW182, favoriserait la dégradation des ARNm (Braun et al., 2011).

f. Mode de régulation non canonique

Il a été récemment démontré que certains miARNs ont un rôle activateur qui dépend de leur positionnement sur l'ARNm cible. Ainsi, l'interaction de miR-10a avec les séquences 5'UTR des ARNm de certaines sous unités ribosomiques conduit à l'activation de leur expression, tandis que sa fixation en 3'UTR conduit à la répression (Orom et al., 2008). Plusieurs autres miARNs régulent leurs cibles par ce même mécanisme : la fixation de miR-122 sur la région 5'UTR des ARNm du virus de l'hépatite C augmente leur expression alors qu'il joue un rôle inhibiteur en se liant à leur région 3'UTR (Jopling et al., 2008).

A l'inverse, mir-34a inhibe Axin2 en se fixant en 5'UTR ou en 3'UTR (Lee et al., 2009). De même miR-365-3 active la traduction de l'ARNm du TNF- α en se fixant en 3'UTR et en recrutant la protéine FXR1 (Vasudevan and Steitz, 2007; Vasudevan et al., 2007).

Les études concernant les miARNs ont permis déterminer certaines de leurs fonctions physiologiques et plus particulièrement en ce qui concerne la réponse immunitaire innée (Baltimore et al., 2008; Gantier et al., 2007; Lodish et al., 2008; Sonkoly et al., 2008; Taganov et al., 2007; Xiao and Rajewsky, 2009). Il a été également montré qu'une modulation de leur expression peut être associée au développement de pathologies variées : cancer, maladies métaboliques, neurodégénératives, infectieuses, inflammatoires ou auto-immunes comme la PR (Eacker et al., 2009; Krutzfeldt and Stoffel, 2006; Pauley et al., 2009; Zhang and Farwell, 2008; Zhang et al., 2007). Ces deux aspects du rôle des miARNs seront développés dans le paragraphe suivant.

3. LES MIARNs ET LES TLRs.

Les miARNs constitueraient un nouveau mode de régulation de l'expression des TLRs et de leur activité. D'après le site de prédiction TargetScan, basé sur la conservation des sites de fixation entre les espèces, il existerait une faible conservation des 3'UTR des TLRs. Il n'est pas exclu que la régulation des TLRs par les miARNs ait évolué de manière espèce spécifique, expliquant la

faible conservation des sites de fixation inter-espèces (Mestas and Hughes, 2004; Palsson-McDermott et al., 2009).

Il existe actuellement deux TLRs ciblés directement par des miARNs. : Tlr4 et Tlr2.

L'expression de TLR4 est régulée directement par les miARNs de la famille let-7. Let-7i est sous-exprimé dans les cholangiocytes infectés par *Cryptosporidium parvum*, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de TLR4 (Chen et al., 2007). L'ARNm de Tlr4 peut également être ciblé par d'autres isoformes de la famille let-7 tel let-7e (Androulidaki et al., 2009). Dans les macrophages péritonéaux humains, l'induction de let-7e réduit l'expression membranaire de TLR4, tandis que son inhibition par des oligonucléotides anti-sens augmente la réponse TLR4-dépendante (Androulidaki et al., 2009).

La modulation de l'expression de TLR2 par miR-105 a été récemment démontrée dans des kératinocytes de patients répondant faiblement à TLR2. Ces cellules caractérisées par une production faible de cytokines (Benakanakere et al., 2009) surexpriment miR-105 (Benakanakere et al., 2009). Cette régulation s'effectue par un ciblage direct de la région 3'UTR de l'ARNm de Tlr2, conduisant à une inhibition de la traduction.

Plusieurs miARNs jouant un rôle dans le contrôle de l'expression de protéines impliquées dans les voies de signalisation TLR dépendantes qu'ils s'agissent de protéines activatrices ou régulatrices, ont été récemment identifiés. La plupart de ces protéines participant à différentes voies de signalisation TLR/dépendantes, un miARN ciblant l'une de ces protéines pourrait donc jouer un rôle régulateur important dans le contrôle d'une stimulation excessive de ces voies.

Il s'agit des miR-146, miR-155, miR-145 et miR-346, miR-9 et miR-132.

IRAK1 et TRAF6 sont des protéines kinases dont l'expression est régulée directement par miR-146 (Taganov et al., 2006). Ces deux protéines jouent un rôle clé dans la signalisation MyD88-dépendante conduisant à l'activation de NF- κ B en réponse à TLR2, TLR4, TLR5, TLR7-8, et TLR9, qui ont également la propriété d'induire l'expression de miR-146 (cellules THP-1) (Taganov et al., 2006). Ainsi, miR-146 serait un régulateur négatif de la voie MyD88/NF- κ B après stimulation par des PAMPs. La kinase IRAK2, a été aussi décrite comme une cible de miR-146 chez la souris (Hou et al., 2009), bien que son rôle dans la signalisation TLR dépendante ne soit pas encore bien défini.

MiR-155 jouerait aussi un rôle régulateur négatif de l'inflammation en contrôlant l'expression de TAB2, protéine recrutée en aval de TRAF6, inhibant ainsi la voie de signalisation des MAPKs. En effet, l'inhibition de miR-155 dans des cellules dendritiques conduit à une surexpression de p38 (Ceppi et al., 2009).

Tang et al. ont montré dans la lignée cellulaire ACS (cellules gastriques) infectée par *Helicobacter pylori* que MyD88 est également une cible directe de miR-155 (Tang et al.). Ces résultats ont été

confirmés dans les cellules spumeuses activées par des HDL oxydées (Ceppi et al., 2009; Tang et al.).

SHIP-1 est également une cible bien caractérisée de miR-155 (O'Connell et al., 2009). C'est un régulateur négatif des réponses induites par les TLRs (An et al., 2005; Gabhann et al., 2010; Sly et al., 2003). Plusieurs études ont permis de montrer que l'augmentation de mir-155 en réponse au LPS conduit à une baisse de l'expression de SHIP-1 (Costinean et al., 2009; Cremer et al., 2009; McCoy et al.; O'Connell et al., 2009), ce qui va favoriser la réponse inflammatoire. A l'inverse, une inhibition de l'expression de miR-155 par le biais de l'IL-10 conduit à une augmentation de l'expression de SHIP-1 (McCoy et al., 2010). AKT qui régule négativement l'expression de miR-155 permet ainsi l'augmentation de l'expression de SHIP-1 et par un rétrocontrôle négatif sa propre inhibition (Androulidaki et al., 2009).

Le modèle de régulation suivant a été proposé : la surexpression de miR-155 suite à l'activation de TLR4 a pour conséquence la baisse de l'expression du régulateur négatif des voies TLR, SHIP-1, permettant l'activation de la voie TLR4. La sécrétion ultérieure d'IL-10 a pour conséquence l'inhibition de miR-155, permettant alors la restauration de l'expression de SHIP-1 et l'inhibition de l'activation de TLR4.

MAL/TIRAP qui est un « sorting adaptor » permettant le recrutement de MyD88 à TLR2 et TLR4 est une cible de miR-145 (Starczynowski et al., 2010).

MiR-9 est surexprimé dans les polynucléaires neutrophiles et les monocytes humains activés par des ligands de TLR2, TLR4, TLR7/8 ainsi que par le TNF- α et l'IL-1 β . La cible identifiée est NF κ B1, faisant de miR-9 un autre miARN agissant comme rétrocontrôle négatif de l'inflammation (Bazzoni et al., 2009).

Des travaux effectués par Alsaleh et al. ont montré que l'activation des FLS de PR par le LPS augmente l'expression de miR-346. MiR-346 est un miARN anti-inflammatoire qui inhibe la synthèse de TNF- α et de l'IL-18. En agissant sur un facteur de transcription non identifié, miR-346 réprime l'expression de la Bruton's tyrosine kinase (BTK) dans les FLS. Dans les conditions normales, Btk, déstabilise l'expression de la tristétrapoline (TTP), protéine impliquée dans la dégradation de l'ARNm du TNF- α . En l'absence de Btk on observe une dégradation rapide de l'ARNm du TNF- α et une inhibition de sa sécrétion (Semaan et al., 2011). L'expression de miR-346 par transfection de son mimique dans les macrophages bloque la synthèse de TNF- α après activation par le LPS.

L'étude du rôle des miARNs dans la régulation des TLRs a permis d'identifier de nouvelles protéines jouant un rôle dans ces processus de régulation. C'est le cas de l'acétylcholinestérase (ACHE), un régulateur clé des voies TLRs. L'acétylcholine bloque la translocation de NF- κ B dans le noyau. Son hydrolyse par l'ACHE permet l'activation de la voie NF- κ B. L'augmentation de miR-132 dans les macrophages en réponse à l'activation de TLR4 a pour conséquence la répression

d'ACHE et favorise la régulation négative exercée par l'acétylcholine sur la translocation de NF- κ B. Des macrophages murins dont la 3'UTR du transcrite de l'ACHE a été délétée présentent une sécrétion importante d'IL-6, IL-12 et de TNF- α (Shaked et al., 2009).

Les principaux miARNs et leurs cibles connues sont résumés dans le tableau 3.

Cibles	miARN	Espèce	Effet inhibiteur (I)/activateur (A)
ACHE	miR-132	Mmu	I
IRAK1	miR-146	Cons.	I
IRAK2	miR-146	Mmu	I
MAL/TIRAP	miR-145	Hsa	I
MyD88	miR-155	Hsa	I
NFKB1	miR-9	Hsa	I
SHIP-1	miR-155	Cons.	A
TAB2	miR-155	Cons.	A
TLR2	miR-105	Hsa	I
TLR4	Let-7	Hsa	I
TRAF6	miR-146	Cons.	I

Tableau 3. Les miARNs et les voies TLRs

4. LES MIARNs ET LA PR

Des approches transcriptomiques réalisées sur des prélèvements (PBMC, tissus synoviaux, FLS, macrophages) de patients atteints de PR et comparés à ceux isolés des patients atteints d'arthrose ou de sujets sains, ont permis d'identifier un certain nombre de miARNs dont l'expression est modulée soit augmentée soit diminuée : miR-203, miR-15a, miR-16, miR-146 et miR-155, miR-124a, miR-132, miR-133a, miR-142, miR-363, miR-498, miR-223, miR-346 (Iliopoulos et al., 2008; Jones et al., 2009; Murata et al., 2010; Nakamachi et al., 2009; Nakasa et al., 2008; Sonkoly et al., 2007; Stanczyk et al., 2011; Stanczyk et al., 2008).

Stanczyk et al. ont montré que miR-203 est surexprimé à l'état basal dans les FLS rhumatoïdes. Son expression n'est pas modifiée après stimulation par le TNF- α , l'IL-1 β et le LPS. La déméthylation induite par le 5-azaC qui donne aux fibroblastes sains un phénotype agressif conduit à une surexpression de miR-203 (Stanczyk et al., 2011). La surexpression de miR-203 par transfection conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et de MMP-1. MiR-203 aurait donc un effet pro-inflammatoire dans la PR.

Une surexpression de miR-16 a été également mise en évidence dans les PBMC ainsi que dans les tissus synoviaux de patients atteints de PR. De façon intéressante l'augmentation de son expression est corrélée à la sévérité de la maladie (Murata et al., 2010; Pauley et al., 2008).

Deux autres miARNs pourraient jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire au cours de la PR. MiR-146 est surexprimé dans le tissu synovial et plus particulièrement dans les FLS, les

macrophages et certaines catégories de LT et de LB dans la PR (Nakasa et al., 2008; Stanczyk et al., 2008). L'expression de miR-146 est augmentée dans les FLS rhumatoïdes en réponse au LPS, aux motifs CpG, au TNF- α et à l'IL-1 β . Murata et al. ont également démontré la présence de taux élevés de miR-146a dans le sang et le liquide synovial et ces taux élevés ont été corrélés à la gravité de l'atteinte synoviale (Murata et al., 2010). Les cibles de miR-146 sont Traf6, Irak1 et Irak2, Fadd, Irf-5, Stat-1 et Ptc1 (Curtale et al., 2010; Hou et al., 2009; Jazdzewski et al., 2008; Tang et al., 2009). Bien que des études *in vitro* aient montré que la surexpression de miR-146 dans les cellules THP-1 diminue de 86% la production de TNF- α , cet effet n'a pas été confirmé *in vivo*, ce qui laisse supposer que miR-146 ne fonctionnerait pas de façon adéquate *in vivo*. Cependant Nahid et al. ont montré récemment que ce miARN joue un rôle important dans l'induction de la tolérance au choc septique en réponse au LPS (Nahid et al., 2009).

Un aspect intéressant de l'implication des miARNs dans la PR réside dans le polymorphisme de sites de fixation à des miARNs. Ainsi, un polymorphisme du site de fixation de miR-146 à la région 3'UTR du transcrit Irak1 a été associé à la susceptibilité à la PR (Chatzikyriakidou et al., 2010).

MiR-155 est un miRNA dont l'expression est également augmentée dans les FLS de PR comparés à des FLS isolés d'arthrose (Stanczyk et al., 2008) et dans les macrophages du tissu et du liquide synovial. L'activation des FLS rhumatoïdes par des cytokines pro-inflammatoires telles l'IL- β , le TNF- α ou encore les ligands des TLRs augmente l'expression de miR-155. L'augmentation de son expression est corrélée à la diminution de celle de SHIP-1, un inhibiteur de l'inflammation. MiR-155 est impliqué dans la régulation de la synthèse des métalloprotéases MMP-3 et MMP-1, en conditions basales et inflammatoires. Il jouerait un rôle modulateur de l'effet destructeur au cours de la PR. A l'inverse, l'inhibition de miR-155 dans les cellules synoviales CD14(+) de PR, conduit à une réduction de la sécrétion de TNF- α . Les souris KO pour miR-155 sont résistantes à l'arthrite induite par le collagène, cette résistance est caractérisée par une diminution de l'inflammation au niveau articulaire, une suppression des LTh17 et de la réponse auto-anticorps. Ces résultats démontrent un rôle complexe de miR-155 dans la pathogénie de la PR.

Murata et al ont observé une augmentation de l'expression de miR-15a dans les tissus synoviaux de PR (Murata et al., 2010) mais ces résultats restent controversés dans la mesure où ce miARN a été retrouvé diminué dans des modèles murins d'arthrites (Nagata et al., 2009). En outre des résultats obtenus par microarray et RT-qPCR ont montré que miR-15a est abaissé dans les FLS rhumatoïdes activés par le LPS (Al Saleh et al (non publiés). MiR-15a régule l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 qui est surexprimée dans les FLS rhumatoïdes, ce qui serait plutôt en faveur d'une diminution de son expression (Perlman et al., 2000).

MiR-124a est diminué dans les FLS de PR. Sa surexpression inhibe leur caractère prolifératif et les bloque en phase G1 (Nakamachi et al., 2009). Cet effet pourrait s'expliquer en partie par le

ciblage direct de la 3'UTR des ARNm Cdk-2 et de Mcl-1 et l'inhibition de leur traduction. MiR-124a régulerait également directement I κ B ζ , impliqué dans la voie NF- κ B (Lindenblatt et al., 2009).

MiR-133a et miR-142 sont surexprimés. mais ni leurs effets régulateurs ni leurs cibles potentielles dans la PR ne sont connus (Nakamachi et al., 2009).

Différents miRNAs ont été également identifiés dans les LT de PR.

En comparant le profil de miARNs des LT du sang périphérique de patients PR et de sujets sains, Fulci et al. ont montré qu'un seul miARN est surexprimé de façon significative dans les LT CD4 naïfs de sujets PR, il s'agit de miR-223 (Fulci et al., 2010). Comme les LT CD4 des sujets sains n'expriment pas miR-223 même après stimulation, ceci suggère que la surexpression de miR-223 est une caractéristique des LT de PR et ne résulte pas simplement de l'activation des LT. Les conséquences de l'induction de miR-223 dans ces cellules ne sont pas claires. Des études ont cependant montré que la surexpression de miR-223 réprime la différenciation des macrophages murins RAW264.7 en ostéoclastes.

Le recrutement et l'infiltration de la membrane synoviale par des LT est une caractéristique de la phase chronique de la maladie (Panayi et al., 1992). Les LT présentent un phénotype activé et sont résistants à l'apoptose (Schirmer et al., 1998). Le fait que les LT meurent peu, explique en partie leur persistance et leur accumulation dans la synoviale. Par une approche transcriptomique, le profil des miARNs a été établi dans des LT CD4 présents dans la synoviale et dans le sang de patients atteints de PR (Niimoto et al., 2010). Cette approche a permis de montrer une surexpression de miR-146 qui inhibe l'apoptose en ciblant FAS tandis que miR-363 et miR-498 sont sous-régulés.

Il a été également établi que les souris déficientes pour ICOS (inducible T-cell costimulator) sont résistantes à l'arthrite induite au collagène (Murata et al., 2010). miR-101 cible directement l'ARNm Icos, ce qui permettrait d'envisager un traitement en inhibant en partie ICOS dans les LT par administration de miR-101.

5. Les miARNs, futurs biomarqueurs pour la PR?

L'utilisation des microARNs en tant que marqueurs précoces de la maladie a été envisagée à la fois dans le cadre d'un diagnostic précoce mais aussi pour la mise en place d'un traitement plus adapté donc plus efficace.

Murata et al. n'ont pas identifié dans le plasma de miRNAs spécifiques de la PR et donc pouvant être intéressants pour le diagnostic (Murata et al., 2010). Ils ont cependant montré que les taux plasmatiques des miR-16, miR-146a, miR-155 et miR-223 pouvaient être corrélés à la sévérité de la maladie. Au niveau du liquide synovial, les taux des miR-16, miR-146a, miR-155 et miR-223

permettent de faire la différence entre arthrose et PR et donc pourraient être utilisés comme biomarqueurs. Il existe donc une différence entre l'expression plasmatique et synoviale des miRNAs traduisant probablement une origine différente de ces miARNs.

miARN	Expression PR/OA, SA	Expression après activation des TLRs	Cible(s)
miR-15	↗ tissus synoviaux	↘ FLS	/
miR-16	↗ PBMC		/
miR-203	↗ FLS	/ (Stanczyk et al., 2010) ↘ FLS (Alsaleh et al.) unpublished data	/
miR-124a	↘ FLS		CDK-2, MCP-1
miR-146	↗ FLS, macrophages, LT, LB, sang, liquide synovial	↗ FLS, macrophages, LT, LB	TRAF6, IRAK1, FADD, IRF5, STAT-1, PTC
miR-155	↗ FLS, liquide synovial	↗ FLS	MMP, SHIP-1, STAT-1
miR-223	↗ LT CD4 naïf	/	/
miR-346	/	↗ FLS	Effet indirect sur BTK, IL-18, TNF- α

Tableau 4. Régulation des miARNs au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Expression comparée aux contrôles ou induites par l'activation des TLRs.
(augmenté ↗, abaissé ↘, inchangé /)

6. Les miARNs une nouvelle stratégie thérapeutique

Les miARNs apparaissent actuellement comme une alternative intéressante en ce qui concerne le traitement de certaines pathologies dans la mesure où ils sont capables de cibler un ensemble de gènes, souvent liés par leurs fonctions. Il existe cependant de nombreux obstacles liés à leur utilisation dont le plus important est la possibilité de déréguler d'autres gènes que les gènes d'intérêt ou pour certains miARNs de jouer un rôle d'oncomiR.

Le mode d'administration permettant un ciblage efficace des tissus ou cellules concernées est également actuellement un obstacle important à surmonter.

La première étude clinique basée sur l'utilisation de miARNs en thérapeutique a été initiée par Santaris Pharma dans l'hépatite C.

En ce qui concerne la PR des essais ont été effectués dans des modèles murins d'arthrite (Bluml et al., 2011; Nagata et al., 2009; Nakasa et al., 2008). L'administration intra-articulaire d'ARN double brin codant pour miR-15a incorporé dans des complexes d'atélocollagène ont permis d'induire une apoptose des cellules synoviales par inhibition de Bcl-2 (Nagata et al., 2009).

La surexpression de miR-146 dans le modèle murin d'arthrite au collagène conduit également à la prévention de la destruction articulaire sans toutefois affecter l'inflammation (Nakasa et al., 2008). miR-146 a dans cette étude également été administré à l'aide d'un complexe d'atélocollagène. Les souris KO pour miR-155 sont protégées d'une arthrite induite au collagène et incapables de générer des LB et LT auto-réactifs, comme le montre la réduction marquée de la réponse anticorps anti-collagène et de la réponse spécifique des LT (Bluml et al., 2011). Cependant, dans le modèle d'arthrite de souris K/BxN, la délétion de miR-155 conduit uniquement à une atteinte réduite de l'érosion osseuse, sans jouer sur l'inflammation, suggérant un rôle pour miR-155 sur la différenciation des ostéoclastes.

V. LE CLUSTER MIR-17~92

1. Organisation du cluster miR-17~92

Chez les mammifères, les miARNs sont fréquemment transcrits en groupe de miARNs associés sur des transcrits polycistroniques primaires qui sont ensuite générés en miARNs individuels matures (Stefani and Slack, 2008). La conservation génomique de ces organisations en cluster suggère l'importance de ces groupes de miARNs pour des régulations coordonnées.

Le cluster miR-17~92, est un cluster codant 6 miARNs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, et miR-92-1) groupés dans une séquence de 800 paires de base sur le chromosome 13. L'organisation et la séquence des miARNs sont hautement conservées chez les vertébrés (**Figure 15**). Chez l'homme, ce cluster se trouve dans le 3^{ème} intron d'un transcrit de 7 kb connu sous le nom de *C13orf25* (Ota et al., 2004). La séquence intronique de ce transcrit ne possède pas le même degré de conservation que le cluster lui-même, suggérant que la fonction de ce transcrit est de produire ce cluster. Bien que décrit amplifié dans plusieurs types de tumeurs solides, il joue un rôle important dans la contrôle du cycle et de la mort cellulaire, son rôle physiologique est encore mal connu. Plusieurs auteurs ont démontré récemment l'implication de ce cluster dans le développement du cœur, des poumons, dans la différenciation des spermatogonies et des LB (Hayashi et al., 2008; Koralov et al., 2008; Spierings et al., 2011; Tong et al., 2011; Ventura et al., 2008).

Des duplications de gènes et des délétions ont permis l'émergence de nouveaux paralogues. Le cluster miR-17~92 possède deux paralogues : le cluster miR-106a~363 localisé dans le chromosome X et le cluster miR-106b~25 dans le chromosome 7. A l'inverse des deux autres, le cluster miR-106a~363 est très peu exprimé dans la plupart des tissus (Ventura et al., 2008), ce qui suggère qu'il s'agit soit d'un pseudogène non fonctionnel soit qu'il ait un rôle très spécialisé.

La famille miR-17 comprend les miARNs miR-17, miR-20a dans le cluster miR-17~92, les miARNs miR-106a et miR-20b dans le cluster miR-106a~363 et le miARN miR-93 dans le cluster miR-106b~25.

La famille miR-18 comprend miR-18a dans le cluster miR-17~92 et miR-18b dans le cluster miR-106a~363.

La famille miR-19 comprend les miR-19a et miR-19b-1 dans le cluster miR-17~92, ainsi que miR-19b-2 dans le cluster miR-106a~363.

Enfin la famille mir-25 comprend les miR-25 et miR-92a dans le cluster miR-17~92, miR-92b et miR-363 dans le cluster miR-106a~363.

Les paralogues des différents membres du cluster miR-17~92 sont résumés **figure 15**.

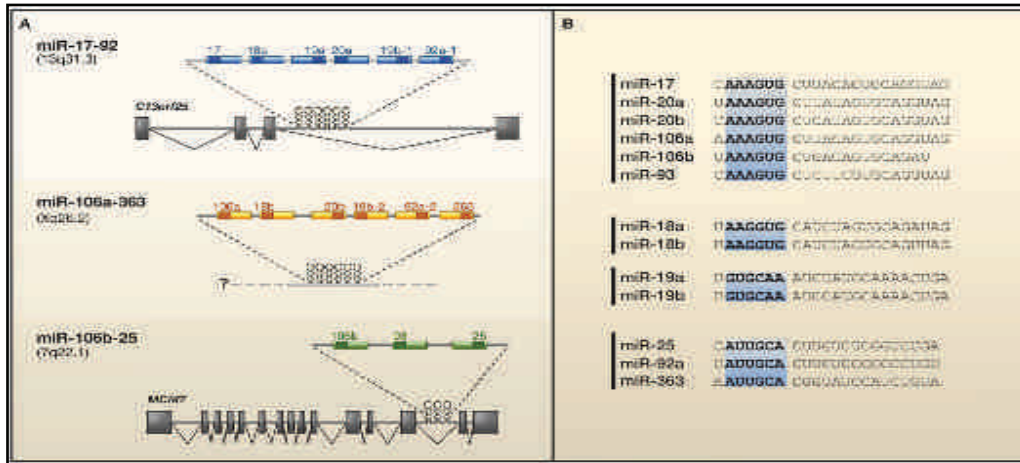


Figure 15. Organisation du cluster miR-17-92 et de ses paralogues (Mendell, 2008)

2. La régulation du cluster miR-17~92 par c-MYC/MYCN

Le proto-oncogène *c-MYC* code un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, la croissance et l'apoptose. O'Donnell et al. ont montré que *c-MYC* peut réguler directement la transcription du cluster miR-17~92 et d'un de ses paralogues, le cluster miR-106a-363 (O'Donnell et al., 2005). Cependant ce dernier est peu exprimé même en présence de *c-MYC*, ceci pouvant être dû à l'intervention d'un régulateur négatif dont la détermination serait importante pour un contrôle de l'expression de son paraglogue, le cluster miR-17~92.

L'expression de *c-MYC* est régulée négativement par le TGF- β et ceci de façon indirecte via les facteurs de transcription SMAD (SMAD2/3/4). Le cluster miR 17-92 qui est un inhibiteur puissant de la voie de signalisation du TGF- β en agissant sur Smad2 et Smad4, exerce donc un contrôle positif sur l'expression de *c-MYC*. Le facteur E2F1 est également une cible de *c-MYC* et favorise la progression dans le cycle cellulaire (Polager and Ginsberg, 2009). Comme *c-MYC*, il régule positivement l'expression du cluster miR-17~92 mais il est lui-même inhibé par deux miRNAs du cluster : miR-17-5p et miR-20a (Sylvestre et al., 2007; Woods et al., 2007). Ceci montre que *c-MYC* favorise la transcription de E2F1 mais limite sa traduction (**Figure 16**).

A l'inverse de *c-MYC* et de E2F1, p53 régule négativement l'expression du cluster miR-17~92, en se fixant sur un site en aval du cluster, en condition d'hypoxie (Yan et al., 2009).

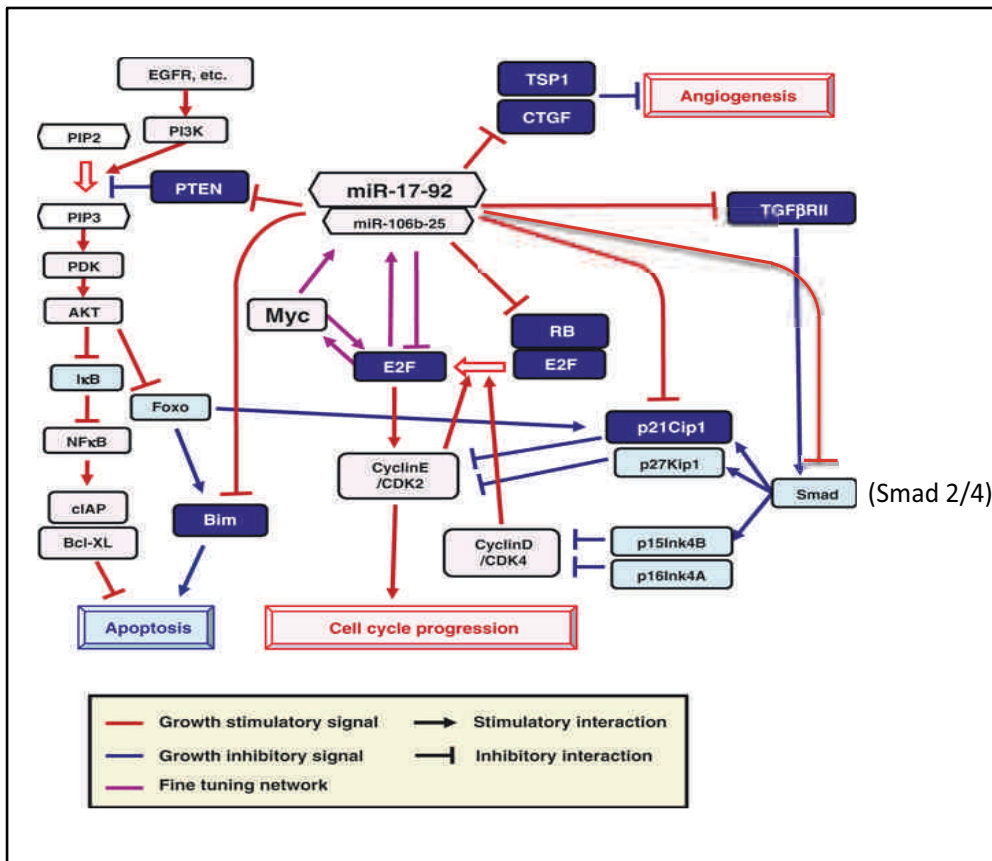


Figure 16. Rôle du cluster miR-17~92 et de ses paralogues dans l'apoptose et la croissance tumorale via l'inhibition de leurs gènes cibles (bleu foncé). Les régulations impliquant c-MYC, E2F et RB sont marquées en violet (Osada and Takahashi, 2011).

3. Le cluster miR-17~92 et le développement

a. L'appareil cardio-pulmonaire

Les travaux de Ventura et al., Koratov et al., et Xiao et al., ont permis de montrer que des souris KO pour le cluster et ses paralogues présentaient des défauts sévères du développement de l'appareil cardio-respiratoire (Koralov et al., 2008; Ventura et al., 2008; Xiao and Rajewsky, 2009).

La délétion simultanée ou séquentielle des clusters miR-106a~363 et miR-106b~25 n'a que peu de conséquences, tandis que la délétion du cluster miR-17~92 conduit à la formation d'embryons plus petits qui meurent rapidement à la naissance en raison d'un développement insuffisant du cœur et des poumons.

Bien qu'il ait été démontré que le cluster miR-17~92 soit surexprimé dans les poumons des embryons de souris (Lu et al., 2007) et que son expression diminue au cours de la maturation, son rôle précis n'est pour l'instant pas connu.

La cadhérine E (CDH1) est une molécule d'adhésion impliquée dans la morphogenèse pulmonaire. Elle permet le regroupement et l'adhésion des cellules épithéliales à la matrice extra-cellulaire au cours du développement pulmonaire. Un contrôle précis de son expression joue un rôle important dans ce processus. Le cluster miR-17~92 (miR-17, 20a et 106b) cible directement l'ARNm de deux protéines STAT3 et MAPK14 qui régulent la distribution de la cadhérine E. (Carraro et al., 2009)

b. Le cluster miR-17~92 et son rôle dans la spermatogenèse

La différenciation des spermatogonies est une des étapes clé de la spermatogénèse. Si les mécanismes moléculaires impliqués dans cette différenciation ne sont pas encore parfaitement définis, des régulations post-transcriptionnelles pourraient jouer un rôle important. Tong et al. ont montré que les miARNs de la famille let-7 interviennent dans la différenciation des spermatogonies. Des spermatogonies indifférenciées THY+, présentent un taux élevé de miARNs appartenant aux clusters miR-17~92 et miR-106a~363. L'acide rétinoïque qui induit la différenciation diminue l'expression des membres du cluster miR-17~92, diminution qui est associée à une surexpression de BIM, KIT, SOCS3 et STAT3. Bim et Stat3 sont des cibles reconnues de ces miARNs. De manière très intéressante, ces auteurs ont observé un effet compensatoire du cluster mir-106b-25 en l'absence du cluster miR-17~92 (Tong et al., 2011).

4. Le cluster miR-17~92 et la voie du TGF- β

Mestdagh et al. ont utilisé un modèle cellulaire dans lequel le cluster miR-17~92 est inductible par la tétracycline (SHEP-TR-miR-17-92) (Mestdagh et al., 2010). Ils ont ainsi montré que la surexpression du cluster miR-17~92 entraîne une diminution de l'expression de 144 protéines parmi lesquelles des protéines appartenant à la voie de signalisation du TGF- β comme les protéines SMAD2 et SMAD4 ainsi que le TGF- β R2, une sous-unité du récepteur du TGF- β . La surexpression des protéines SMAD2 et SMAD4 dans des lignées de neuroblastome, inhibe de 25% la prolifération cellulaire. Ces résultats ont été confirmés par Dews et al. qui ont montré que les miARNs de la famille miR-17 ciblent directement le messager de TGF- β R2 et que miR-18a cible directement Smad4 (Dews et al., 2010).

Ces auteurs ont également montré que ce cluster régulait l'expression d'un groupe de gènes activés lors de la stimulation de la voie du TGF- β . La famille miR-17 régule directement l'expression des protéines CDKN1A et BCL2L11, induites en réponse au TGF- β .

Ce rôle régulateur du cluster miR-17~92 est intéressant car le TGF- β est un polypeptide qui contrôle de très nombreuses fonctions telles la prolifération, la différenciation, le développement embryonnaire, l'angiogénèse, la réponse immunitaire, la cicatrisation. Des

anomalies de son expression sont associées à de nombreuses pathologies, cancers, atteintes cardiaques, fibrose, diabète...

Le TGF- β joue un rôle suppresseur de tumeur dans les cellules épithéliales saines et dans les premières phases de la progression des tumeurs. Dans les phases avancées, le TGF- β n'a plus de rôle inhibiteur, il favorise alors la prolifération et le caractère invasif.

5. Le cluster miR-17~92 dans l'immunité

Les souris KO pour le cluster miR-17~92 présentent un défaut de maturation des LB caractérisé chez l'embryon et chez l'adulte par une déficience en cellules pré-B, les cellules pro-B étant présentes (Ventura et al., 2008) et une augmentation significative de l'apoptose des cellules pro-B. Ces résultats démontrent l'implication du cluster miR-17~92 dans le signal de survie permettant le passage du stade pro-B au stade pré-B, signal de survie qui fait intervenir une diminution de l'expression du gène pro-apoptotique Bcl2/11/Bim, cible du cluster.

Le développement des autres cellules d'origine hématopoïétique : monocytes, hématies, LT, granulocytes n'est pas affecté.

Jiang et al. ont montré récemment que ce cluster et plus particulièrement miR-17 jouait un rôle dans le développement de la réponse Th1 en régulant l'expression de différentes protéines telles PTEN, TGF- β 2 et CREB1 (Jiang et al., 2011).

Ces travaux ont démontré que le cluster induit la prolifération des LT, la production d'IFN- γ et inhibe la différenciation en LTreg. La perte de l'expression du cluster miR-17-92 favoriserait l'évasion tumorale ce qui suggère que l'élévation de son expression augmenterait l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses liées aux cellules T.

Bien qu'appartenant à la même famille et ne différant que de 2 nucléotides en position 1 et 12 miR-20a ne présente pas de propriétés activatrices sur les LT. Ce qui est le cas également de miR-19a et miR-19b qui diffèrent d'un nucléotide en position 11. Selon Jiang et al. ces différences fonctionnelles pourraient s'expliquer par des niveaux d'expression différents. Cependant cette hypothèse n'est pas valable pour miR-20a et miR-17 qui sont exprimés de façon équivalente. Ces résultats démontrent pour la première fois des différences de régulation entre paralogues du cluster miR-17~92.

En ce qui concerne la réponse immunitaire innée, deux cibles ont été identifiées. Liu et al. ont montré dans des cellules ESCC (Esophageal squamous cell carcinoma), miR-19a est surexprimé et cible directement le TNF- α (Liu et al., 2011). Son inhibition par des oligonucléotides anti-sens diminue de la prolifération et augmente l'apoptose.

Brock et al., en 2009, ont mis en évidence un site de fixation du facteur de transcription STAT3 dans la région promotrice du cluster miR-17~92 (Brock et al., 2009), cible confirmée dans les

cellules myéloïdes suppressives (Zhang et al., 2011). L'IL-6 active STAT3 qui induit une augmentation de l'expression du cluster miR-17~92. L'inhibiteur de l'histone déacétylase, ITF2357 qui inhibe la transcription et l'expression de la sous-unité α du récepteur de l'IL-6 (CD126), bloque la voie de signalisation de l'IL-6 et diminue l'expression des pri-miRNA du cluster miR-17~92 (Todoerti et al., 2010).

Brock et al. ont également montré que miR-18a cible Pias3, un inhibiteur de STAT3 (protein inhibitor of activated STAT3) (Brock et al., 2011). Ces résultats identifient ainsi deux modes de régulation de Stat3 par le cluster, directement par mir-17 (Carraro et al., 2009) et indirectement par miR-18a.

6. Le cluster miR-17~92 et son implication dans les cancers

La première preuve impliquant le cluster miR-17~92 dans la tumorigenèse a été apportée par l'observation que le locus *C13orf25*, codant le transcrit primaire du cluster, est souvent amplifié dans différents lymphomes et tumeurs solides : sein, colon, poumon, pancréas, prostate et estomac (Hayashita et al., 2005; Ota et al., 2004; Tagawa et al., 2007; Venturini et al., 2007). Ce cluster pourrait jouer un rôle important dans la mesure où la plupart des miRNAs qui le composent exercent un effet inhibiteur sur l'apoptose et favorisent la prolifération, en régulant l'expression de protéines membres de la voie du TGF- β .

D'autres cibles du cluster miR-17~92 jouent un rôle important dans la régulation d'oncogènes comme c-MYC ou son homologue MYCN, E2F ou p53. Dans des leucémies murines il a été montré que le locus codant ce cluster est également un site fréquent d'insertion rétrovirale.

La famille miR-19 a également la propriété de réguler la voie de la PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase), très vraisemblablement par un ciblage direct de PTEN (Olive et al., 2009), ce qui conduit à une activation de cette voie PI3K, impliquée dans la différenciation cellulaire et le développement de cancers.

Actuellement, les cibles connues des différents membres du cluster miR-17~92 pouvant jouer un rôle dans le développement des tumeurs, sont les suivantes :

microARN	tumeur	cible	Oncogènes (O)/ Suppresseurs de tumeur (S)	Auteurs
miR-17	Cellules tumorales thyroïdiennes	RB1	O	(Takakura et al., 2008)
miR-17	Neuroblastome	P21, BIM	O	(Fontana et al., 2008)
miR-17	Cellules Hek293T	Jnk2	O	(Cloonan et al., 2008)
miR-17	Cancer du sein (MCF- 7)	A1B1, E2F1	S	(Hossain et al., 2006)
miR-17	Cellules de leucémie, Hela	E2F1	S	(O'Donnell et al., 2005; Scherr et al., 2007)
miR-17	Cancer du sein (MCF- 7)	Cyclin D1	S	Yu et al., 2008
miR-19	Myélome multiple	SOCS-1	O	Fontana et al., 2008
miR-19	Lymphome	BIM	O	(Pichiorri et al., 2008; Ventura et al., 2008)
miR-19	Lymphome	PTEN	O	(Olive et al., 2009)
miR-92a	Développement des LB	BIM	?	(Ventura et al., 2008; Xiao and Rajewsky, 2009)

Tableau 5. Cibles du cluster miR-17~92 dans les tumeurs.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

La cellule résidente de la cavité articulaire, le synoviocyte est considérée actuellement comme un acteur majeur dans l'initiation et la pérennisation de la polyarthrite rhumatoïde. Comme nous l'avons énoncé dans l'introduction de cette thèse, de très nombreuses études ont été consacrées à la compréhension du rôle de cette cellule résidente dans la physiopathologie de la PR et les travaux réalisés au laboratoire au cours des dernières années se sont inscrits dans cette thématique. Ils ont plus particulièrement contribué à démontrer le rôle important de l'activation extrinsèque en particulier des PAMPs et des cytokines dans l'acquisition du phénotype agressif des synoviocytes rhumatoïdes et ont donc conforté l'hypothèse d'un rôle déterminant de l'immunité innée, dans l'activation de la cellule résidente synoviale dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde.

Dans la continuité de ce qui avait été réalisé au laboratoire notre objectif a été d'évaluer le rôle de facteurs intrinsèques et plus particulièrement les facteurs épigénétiques dans l'acquisition du phénotype agressif des FLS. Les synoviocytes développant des réponses cytokiniques tout à fait spécifique en réponse à l'environnement extrinsèque (cytokines, PAMPs, DAMPs), nous avons cherché à identifier des miARNs dont l'expression était abaissée en réponse à des stimuli de l'immunité innée, miARNs pouvant être impliqués dans la réponse inflammatoire au cours de la PR. L'objectif était également d'identifier leurs cibles et de démontrer *in vitro* les conséquences fonctionnelles de leur surexpression.

PUBLICATION 1

Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de protéines de signalisation des voies TLRs dépendantes au cours de l'immunité innée dans les synoviocytes rhumatoïdes : implication du cluster miR-17~92

Publication 1 :

Régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de TLR2 par miR-19 en réponse au BLP dans les FLS rhumatoïdes

La régulation d'un ARNm est un mécanisme qui permet à toute cellule d'exercer un contrôle au niveau post-transcriptionnel. Un grand nombre de travaux ont récemment montré que les miARNs pouvaient jouer un rôle régulateur important dans le contrôle de la réponse inflammatoire induite par l'activation des TLRs. Dans la PR, les synoviocytes rhumatoïdes expriment divers TLRs dont l'activation par des PAMPs mais aussi par des DAMPs, produits de la destruction tissulaire conduit d'une part au développement de la réponse inflammatoire et à l'initiation de la réponse auto-immune et d'autre part à la destruction ostéo-articulaire. Activés, les FLS surexpriment TLR2 en réponse au BLP, LPS et Poly(I :C) ligands de TLR2, TLR4 et TLR3. TLR2 est un récepteur important dans la physiopathologie de la maladie, il pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique et de nouveaux traitements le concernant sont actuellement évalués. L'objectif de ces travaux a été de déterminer si la modulation de l'expression de TLR2 dans les synoviocytes rhumatoïdes était dépendante d'un contrôle épigénétique et plus particulièrement si des miARNs étaient impliqués dans l'augmentation de son expression en réponse à des PAMPs. Nous basant sur des prédictions bioinformatiques, nous avons étudié le rôle de miR-19a et miR-19b dont l'expression était diminuée en réponse au BLP et qui étaient susceptibles de cibler de Tlr2. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Docteur Sébastien PFEFFER (CNRS UPR 9002, Strasbourg, France).

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Immunology* (2012) : TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes

Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibilia J, Wachsmann D, Pfeffer S. J. Immunol 2012 188(1):454-61.



OVER 200 ACTIVE HUMAN, MOUSE and RAT PROTEINS in 4 CONVENIENT SIZES

Phone: 877.613.6020 • Fax: 877.617.9530
www.shenandoah-bt.com



TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes

This information is current as of February 23, 2012

Lucas Philippe, Ghada Alsaleh, Guillaume Suffert, Alain Meyer, Philippe Georgel, Jean Sibilia, Dominique Wachsmann and Sébastien Pfeffer

J Immunol 2012;188:454-461; Prepublished online 21 November 2011;
doi:10.4049/jimmunol.1102348
<http://www.jimmunol.org/content/188/1/454>

-
- | | |
|----------------------|--|
| References | This article cites 45 articles , 14 of which can be accessed free at: http://www.jimmunol.org/content/188/1/454.full.html#ref-list-1 |
| Subscriptions | Information about subscribing to <i>The Journal of Immunology</i> is online at http://www.jimmunol.org/subscriptions |
| Permissions | Submit copyright permission requests at http://www.aai.org/ji/copyright.html |
| Email Alerts | Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at http://www.jimmunol.org/etoc/subscriptions.shtml/ |

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright ©2012 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes

Lucas Philippe,^{*,†} Ghada Alsaleh,^{*,†} Guillaume Suffert,[‡] Alain Meyer,^{*,†} Philippe Georget,[§] Jean Sibilia,^{*,†} Dominique Wachsmann,^{*,†} and Sébastien Pfeffer[‡]

Resident cells, such as fibroblast-like synoviocytes (FLS), play a crucial role in rheumatoid arthritis (RA). They are implicated in the inflammatory response and play a key role in osteoarticular destruction. Moreover, RA FLS spread RA to unaffected joints. Pathogen-associated molecular patterns and damage-associated molecular patterns have been found to activate RA FLS by interacting with pattern recognition receptors, such as TLR. RA FLS express a large number of TLR, and TLR2 was demonstrated to be involved in RA inflammation. Because microRNA have emerged as important controllers of TLR expression and signaling, the aim of this study was to evaluate their potential involvement in the control of TLR2 expression by RA FLS. We first showed that *Tlr2* expression is strongly upregulated in RA FLS in response to TLR2 ligands. Using a microRNA microarray analysis, we identified one miRNA in activated RA FLS, miR-19b, which was downregulated and predicted to target *Tlr2* mRNA. Downregulation of miR-19b and miR-19a, which belongs to the same cluster, was confirmed by real-time quantitative PCR. Transfection of RA FLS with miR-19a/b mimics decreased TLR2 protein expression. In parallel, we found that both IL-6 and matrix metalloproteinase 3 secretion was significantly downregulated in activated FLS transfected with either mimic. Moreover, using a luciferase assay, we showed that miR-19a/b directly target *Tlr2* mRNA. Taken together, our data point toward an important role for miR-19a/b in the regulation of IL-6 and matrix metalloproteinase 3 release by controlling TLR2 expression, as well as provide evidence that miR-19a/b can act as negative regulators of inflammation in humans. *The Journal of Immunology*, 2012, 188: 454–461.

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease that predominantly affects multiple peripheral joints. It is characterized by synovial inflammation, as well as bone and cartilage destruction. The development of RA is thought to result from interactions between genetic and environmental factors. Molecules of microbial origin have been found in the joints of patients (1, 2), where they trigger inflammation by activating various pattern recognition receptors. In addition, these pattern recognition receptors can be activated by noninfectious molecular patterns or damage-associated molecular pattern mol-

ecules, which are generated upon tissue injury. These include cellular components released from necrotic cells (HMGB1, micro-particles), extracellular molecules upregulated upon injury (Hsps, ATP, S100 proteins), or extracellular matrix fragments, such as tenascin (3).

The TLR family is one of the best-characterized groups of innate immune receptors in term of described ligands, signaling pathways, and functional relevance. TLRs are expressed both by immune cells and by resident cells of the joint, such as fibroblast-like synoviocytes (FLS), which play a crucial role in RA. FLS are implicated in the inflammatory response essentially by synthesizing cytokines, chemokines, prostanoids, NO, and proangiogenic factors (4–6). FLS also play a key role in osteoarticular destruction and take part in the differentiation and activation of osteoclasts by the RANK-RANK ligand pathway and through the release of PGE₂ and IL-6 (7). Moreover, synovial fibroblasts spread RA to unaffected joints (8, 9). RA FLS express a large number of TLRs, such as TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, and TLR7. In basal conditions, RA FLS express *Tlr3* and *Tlr4*, as well as *Tlr2* and *Tlr6* mRNAs (10).

With the assistance of the scavenger receptor CD36, TLR2 is implicated in cytokine and matrix metalloproteinase (MMP) release in response to ligands from Gram⁺ bacteria, such as glycolipids, lipopeptides, or GPI-anchored structures. Interestingly, TLR2 is the most significantly induced TLR in FLS treated with cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , or with TLR ligands, such as polyinosinic-polycytidylic acid, bacterial lipoprotein (BLP), and LPS (11). In addition, TLR2 levels are higher in macrophages isolated from RA synovium compared with macrophages isolated from control synovium (12). Further evidence for the involvement of TLR2 in RA was obtained in a mouse model of arthritis induced by streptococcal cell wall, in which animals deficient for *Tlr2* were shown to develop reduced symptoms (13). Recent data

*Laboratoire de Physiopathologie des Arthrites, EA4438, Unité de Formation et Recherche de Sciences Pharmaceutiques, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch Cedex, France; [†]Departement de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67098 Strasbourg Cedex, France; [‡]Architecture et Réactivité de l'Acide Ribo Nucléique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg Cedex, France; and [§]Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire Humaine, EA4438, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 67085 Strasbourg Cedex, France

Received for publication August 12, 2011. Accepted for publication October 20, 2011.

This work was supported by grants from Bristol Myers Squibb, Roche, Pfizer, Curtin Foundation, and Caisse d'Assurance Maladie des Professions Libérales-Provinces (to D.W.). S.P.'s work was supported by Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Agence Nationale de la Recherche, and the European Research Council (ERC Starting Grant 260767).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Sébastien Pfeffer, Architecture et Réactivité de l'Acide Ribo Nucléique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. E-mail address: s.pfeffer@ibmc-cnrs.unistra.fr

Abbreviations used in this article: BLP, bacterial lipoprotein; FLS, fibroblast-like synoviocyte; miRNA, microRNA; MMP, matrix metalloproteinase; RA, rheumatoid arthritis; RT-qPCR, real-time quantitative PCR; siRNA, small interfering RNA; UTR, untranslated region.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

suggested a potential role for TLR2 as a therapeutic target. Indeed, Rabeximod suppresses arthritis downstream of TLR2 stimulation by preventing the activation of inflammatory cells, most likely macrophages, in a time-dependent fashion (14). OPN301, a TLR2-specific mAb inhibits TLR2-mediated proinflammatory cytokine production (15). AP177, a molecule selected by the systematic evolution of ligands by exponential enrichment method, was demonstrated to antagonize TLR2 signaling by binding directly to TLR2 and to suppress IL-6 and IL-8 release by activated cells (16).

It appears that the level of TLR2 needs to be tightly controlled to avoid a scenario where its deregulated expression will amplify the deleterious effect of inflammation on cell integrity. The modulation of gene expression can take place at several levels, among which regulation by microRNAs (miRNA) has gained increased interest in the recent years. miRNA are an evolutionarily conserved class of endogenous small noncoding RNAs. They are produced from long precursor molecules by the consecutive action of the RNase III enzymes Droscha and Dicer, before being loaded on an Argonaute protein within the RNA-induced-silencing complex. The mature miRNA acts a guide for RNA-induced-silencing complex to mediate destabilization and/or translational repression of target mRNAs (17, 18). The regulation of miRNA expression is itself controlled at various levels, such as transcription, processing, or stability (19), and can be influenced by various stress factors, including inflammation (20). In addition, emerging data have identified an important contribution of miRNA to the development and control of the inflammatory response that position these small noncoding RNAs at the heart of feedback and feed-forward loops controlling the inflammation process in both immune and non-immune cells. Thus, inflammatory stimuli in pulmonary cells induce expression of miR-146a, which, in turn, promotes translational silencing of IL-8 and RANTES (21). Overexpression of miR-9 by activation of NF- κ B leads to a feedback control of NF- κ B-dependent acute inflammatory response (22). miR-147, which is induced by multiple TLR stimulation, attenuates TLR-induced inflammatory response in macrophages (23).

These data indicated that miRNA can exert negative effects in inflammatory pathways and this prompted us to look for miRNA directly targeting TLR2 and controlling cytokine release in response to TLR2 stimulation. In this article, we show that stimulation of RA FLS with BLP and LPS induces a decrease in expression of miR-19a and -19b and that this decrease is associated with upregulation of TLR2. Furthermore, we demonstrate that TLR2 is a direct target of miR-19a and -19b and that the downregulation of miR-19b in BLP-activated RA FLS is associated with an increase in IL-6 and MMP3 release.

Materials and Methods

Reagents

Cell culture media (RPMI 1640, M199, and DMEM), FCS, L-glutamine, penicillin, streptomycin, amphotericin B, and TRIzol reagent were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). LPS from *Salmonella abortus equi* was obtained from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Synthetic bacterial lipopeptide Pam₃CSK₄ (BLP) was obtained from EMC Microcollections (Tübingen, Germany). The Lightcycler Faststart DNA Master SYBR Green and the miScript System, miRNA mimics, and AllStars negative control small interfering RNA (siRNA) were obtained from Qiagen (Courtabeuf, France). Human Dermal Fibroblast Nucleofector kit was from Amaxa (Cologne, Germany). The enzyme immunoassay kits for human IL-6 and MMP3 detection were from R&D (Lille, France). Throughout this study, buffers were prepared with apyrogenic water obtained from Braun Medical (Boulogne, France). Anti-TLR2 mouse IgG mAbs were from Imgenex, and anti-GAPDH mouse IgG mAbs were from Millipore (Molsheim, France).

Cell culture

Human FLS were isolated from synovial tissues from four RA patients at the time of knee joint arthroscopic synovectomy, as described previously, after informed consent was obtained (24). The diagnosis conformed to the revised criteria of the American College of Rheumatology (25). FLS cultures were done, as previously described (26). Experiments were performed between passages three and nine. During that time, cultures consisted of a homogeneous population of fibroblastic cells, negative for CD16 as determined by FACS analysis. HEK293 cells were purchased from the American Type Culture Collection and maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 40 U/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin. Cell number and cell viability were checked by the MTT assay.

Stimulation of cells for total RNA extraction

FLS (10^6 cells) were stimulated with 2 ml medium alone or medium containing LPS (1 μ g/ml) and BLP (1 μ g/ml). After a 6- and 24-h incubation period, total RNA was extracted using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instruction.

Luciferase reporter constructs

To generate luciferase-based reporter plasmids, psiCHECK-2 (Promega) was modified by inserting the Gateway cassette C.1 (Invitrogen) at the 3' end of the firefly luciferase gene (*f-luc*) into the Xba I site of psiCHECK-2. The 3' untranslated region (UTR) sequence of Tlr2 was amplified from HEK293 cell genomic DNA; after addition of attB1 and 2 sequences, the resulting PCR products were cloned into pDONR/Zeo and then recombined in the modified psiCHECK-2 vector using Gateway technology (Invitrogen). The following primer sequences were used (sense and antisense primers are indicated in this respective order, and the anchor sequence used for the nested PCR is underlined): TLR2: 5'-AAAAAG-CAGGCTTCCCATATTTAAGACCAGTCTTTGT-3' and 5'-AGAAAGC-TGGGTTGTAAAGTTTAAATAGGAAATACACAGC-3' and attB1/2: 5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3' and 5'-ACCACTTTGTAC-AAGAAAGCTGGGT-3'.

The target seed sequence was modified using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and the following primers: 5'-GATCAAGTCCCTTATAAGAGTGGCATAGTAAACGTAATAACC-TGTGTACATTCT-3' and 5'-AGAATGTACACAGGTTATTACGTTTATCATGCCACTCTTATAAGGGACTTGATC-3'.

Real-time quantitative PCR

Total RNA isolated from FLS was reverse transcribed using the First-Strand cDNA Synthesis Kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed in a total volume of 20 μ l using SensiMix Plus SYBR kit (Quantace; Corbett Life Science) and gene-specific primers: *Tlr2*, 5'-GGCCAGCAAATTACCTGTGT-3' and 5'-CTCCAGTCCTGGACCATAA-3'; *Gapdh*, 5'-GGTG-AAGGTCGGAGTCAACGGA-3' and 5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGA-AGA-3'; *pri-miRNA 17-92*, 5'-TGGTTTATAGTTGTTAGAGTTTGA-GG-3' and 5'-TCAGTTTACAAGGTGATGTTCTCTT-3'; *Tlr4*, 5'-GGT-GGGAATGCTTTTTTCAGA-3' and 5'-AATTGCCAGCCATTTTCAAG-3'; and *Il-6*, 5'-TCACTGGTCTTTTGGAGTTTGA-3' and 5'-AGAGCCCTC-AGGCTGGACT-3'.

After an initial denaturing at 96°C for 10 min, the temperatures used were 95°C for 10 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 25 s for *Gapdh* and *Tlr2* using a Rotor-Gene 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science). Amplification products were detected as an increased fluorescent signal of SYBR Green during the amplification cycles. Results were obtained using SDS Software (Perkin Elmer) and evaluated using Excel (Microsoft). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products.

RT-qPCR analyses for miRNA were performed using the miScript System and the primers (Qiagen). RNA concentrations were determined with a NanoDrop instrument (NanoDrop Technologies). Five hundred nanograms of RNA/sample was used for the assays. Reverse-transcriptase reactions and RT-qPCR were performed according to the manufacturer's protocols. Expression of endogenous U6snRNA was used for normalization. Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle method.

Transfections and luciferase assay

Transient transfection of FLS with miR-19a and miR-19b mimics and Dicer siRNA (20 pM/sample) or with the AllStars negative-control siRNA was performed using the Human Dermal Fibroblast Nucleofector kit

from Amaxa, as previously described (27). FLS were then plated in 24-well plates (2×10^5 cells per well). All assays were performed at 48 h post-transfection. Transfection efficiency was evaluated with the PmaxGFP vector.

Transfection of HEK293 cells plated in 24-well plates (2×10^5 cells per well) with reporter constructs and miR-19b/a mimics (200 nM) was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 48 h, cells were washed and lysed with passive lysis buffer (Promega), and firefly luciferase (*f-luc*) and *Renilla* luciferase (*r-luc*) activities were determined using the dual-luciferase reporter assay system (Promega) and a luminometer (Glomax; Promega). The relative reporter activity was obtained by normalization to *r-luc* activity.

IL-6 and MMP3 release was measured in culture supernatants by a heterologous two-site sandwich ELISA, according to the manufacturer's instructions.

Western blot

A total of 10^6 cells (FLS) was incubated for 24 h with BLP (1 μ g/ml). Controls were performed with cells maintained in medium with 5% heat-inactivated FCS for 24 h. After stimulation, cells were centrifuged, and the pellets were suspended for 20 min on ice in 300 μ l ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl [pH 8], 130 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, and protease inhibitors). Lysates were centrifuged for 10 min at $14,000 \times g$ at 4°C, and supernatants were subjected to SDS-PAGE and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked using 1% BSA in TBS (20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl) for 1 h at 25°C. The blots were incubated with anti-TLR2 mouse IgG1 mAbs (IMG-319, clone 1030A5.138; Imgenex) for 2 h at 25°C, followed by incubation with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG mAbs (1 h at 25°C) and detection by ECL (Amersham ECL Plus Western blotting Detection Reagents), according to the manufacturer's instructions. To confirm the presence of equal amounts of proteins, bound Abs were removed from the membrane by incubation in 0.2 M glycine [pH 2.8] 0.5 M NaCl for 10 min at room temperature and re-probed with anti-GAPDH mouse mAbs (clone 6C5; Millipore).

Statistical analysis was performed using the Student *t* test. Values were compared between different groups in the experiment. The *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

LPS and BLP treatments increase expression of TLR2 in RA FLS

We first showed that the expression of Tlr2 mRNA is significantly enhanced in RA FLS treated with LPS and BLP. RA FLS were stimulated for 6 h with LPS from *S. abortus equi* (1 μ g/ml) or with BLP (1 μ g/ml), and RT-qPCR was performed on RNA isolated from both control and activated cells. We observed a 17–20-fold increase in Tlr2 transcripts in response to LPS and BLP treatment (Fig. 1A). In accordance with previous observations from other investigators (11), Tlr4 mRNA expression was only slightly af-

ected by LPS or BLP treatment (Fig. 1B). To determine whether increased Tlr2 mRNA expression correlated with enhanced TLR2 protein expression, we performed Western blotting experiments. As shown in Fig. 1C, stimulation of RA FLS with either LPS or BLP led to an increased expression of TLR2. As expected from the moderate modification of Tlr4 mRNA expression after LPS and BLP activation, TLR4 protein expression was not modified (data not shown).

Role of miRNA in the regulation of TLR2 expression in RA FLS

To investigate the importance of miRNA in the control of TLR2 expression in RA FLS, we first used a global approach by evaluating the role of Dicer. Dicer is a cytoplasmic RNase III type endonuclease, required for the generation of most miRNA (28). RA FLS were transfected with an siRNA targeting Dicer at a concentration of 100 nM. A plasmid encoding the GFP protein was used to evaluate transfection efficiency. As assessed by RT-qPCR, Dicer mRNA expression level was efficiently downregulated upon transfection of Dicer-specific siRNA (Fig. 2A). Transfection of Dicer siRNA, but not of a nontargeting control siRNA, upregulated Tlr2 mRNA expression in RA FLS (Fig. 2B). Interestingly, Dicer knockdown did not impact Tlr4 mRNA (Fig. 2C).

miR-19b is downregulated in LPS- and BLP-activated RA FLS

Next, we searched for miRNA exhibiting misregulated expression in activated versus nonactivated RA FLS. For this, we analyzed the miRNA-expression profile of LPS-activated RA FLS using a DNA microarray containing 409 nucleotide probes complementary to miRNA of human origin, which was performed previously in our laboratory. The microarray data were submitted to the Minimum Information About Microarray Experiment database under accession number E-MEXP-1970 (<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/aer/login>) (27). After LPS challenge, this initial screening identified 17 downregulated miRNA, which are listed in Table I. An online search of the miRNA target database microCosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5>) predicted several miRNA candidates involved in Tlr2 targeting. miR-19b (indicated in gray in Table I) was the only miRNA predicted to target Tlr2 and downregulated on the microarray analysis. Interestingly, miR-19b, together with miR-19a, which differs by only one nucleotide, was among the top 10 predictions of the algorithm.

We first performed an RT-qPCR analysis to confirm the downregulation of miR-19b observed with the microarray analysis. As

FIGURE 1. Effect of BLP and LPS on TLR2 and TLR4 expression by RA FLS. Tlr2 mRNA (A) and Tlr4 mRNA (B) expression was determined by quantitative RT-PCR in RA FLS stimulated with BLP (1 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), and medium (C) for 6 h. Results were normalized to Gapdh and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium (C). C, TLR2 and TLR4 expression in RA FLS, 24 h after stimulation with BLP, LPS, and medium (C), was determined by Western blotting with anti-TLR2 Abs. For protein loading control, membranes were re-probed with anti-GAPDH Abs. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

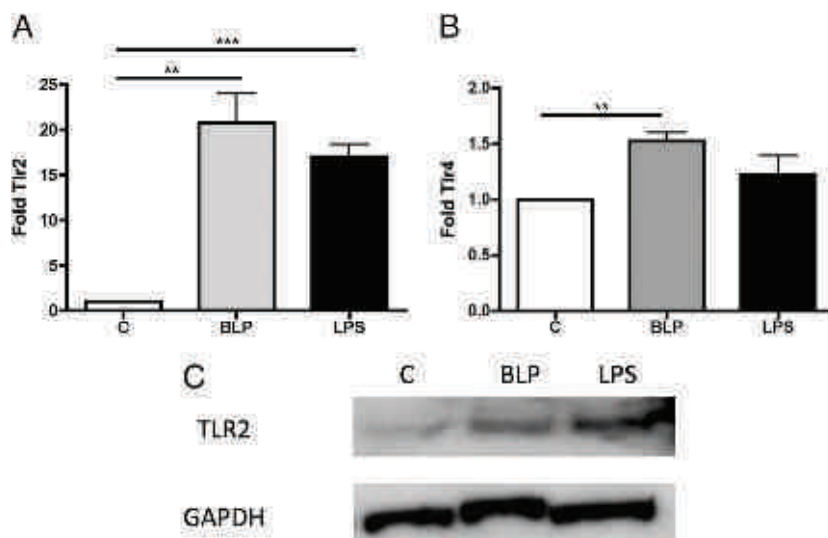
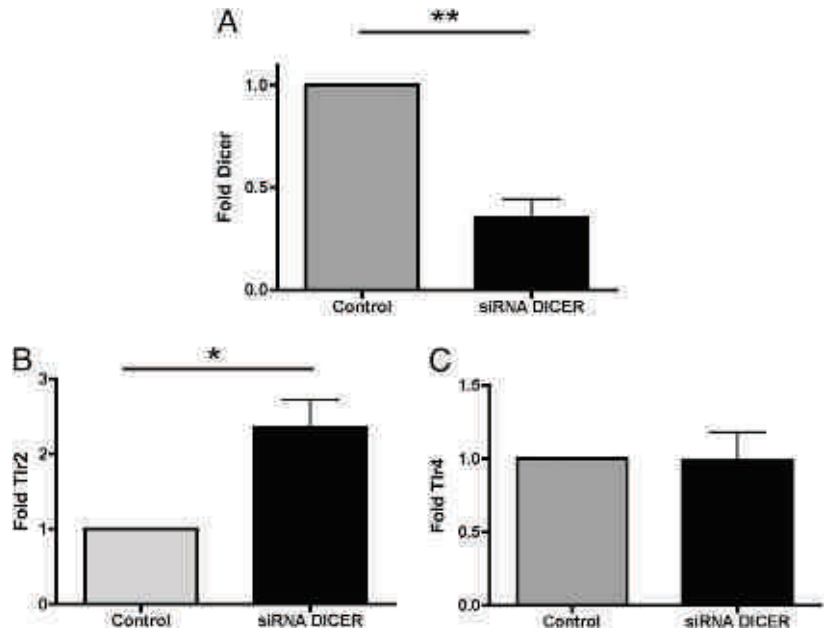


FIGURE 2. miRNA regulate Tlr2 expression in RA FLS. RA FLS were transfected with siRNA Dicer or siRNA control and then incubated 48 h post-transfection with medium for 6 h. A, Dicer mRNA levels were determined using RT-qPCR. Tlr2 (B) and Tlr4 (C) mRNA expression was determined by RT-qPCR in RA FLS transfected with siRNA Dicer or siRNA control. Results were normalized to Gapdh and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



shown in Fig. 3A, miR-19b was strongly downregulated in response to both LPS and BLP (Fig. 3A). Given the high sequence homology between miR-19a and miR-19b, it is difficult to estimate which of the two was detected by PCR. The primary transcript containing miR-19b derives from two genomic loci, which give rise to two miRNA clusters: mir-17-92 on chromosome 13 and mir-106a-363 on chromosome X (Fig. 3B). To confirm the specific downregulation of miR-19b, we measured the expression of its pre-miRNA, pre-miR-19b-1, and found that it was also significantly downregulated upon BLP or LPS treatment (Fig. 3C). To assess whether the regulation of miR-19b was occurring at a transcriptional level, we used RT-qPCR to measure the expression level of pri-miRNA 17-92 in RA FLS and found that it was downregulated in response to BLP and LPS (Fig. 3D). This result also indicated that both miR-19a and -19b must be downregulated after LPS and BLP treatment. We failed to detect the cluster 106a-363 or the pre-miR-19b-2 (data not shown), which indicated that only the cluster on chromosome 13 is expressed in FLS cells.

In oral keratinocytes stimulated with heat-inactivated *Porphyromonas gingivalis*, miR-105 inversely regulates Tlr2 expression;

this was demonstrated to occur through binding to the 3'-UTR of Tlr2 mRNA, thereby inhibiting its translation (29). miR-105 was not expressed in unstimulated RA FLS, as assessed by RT-qPCR, and activation with LPS or BLP did not modulate its expression (data not shown).

miR-19a and miR-19b modulate TLR2 expression in BLP-activated RA FLS

miRNA mediate posttranscriptional regulation via either mRNA destabilization or translation inhibition. To test whether miR-19b and miR-19a have an effect on the level of Tlr2 mRNA, we measured its expression by RT-qPCR in RA FLS transfected with miR-19b or miR-19a mimics. A plasmid encoding GFP was cotransfected to evaluate transfection efficiency. Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with BLP for 24 h. No significant difference in Tlr2 mRNA expression was found in cells transfected with the miR-19a or -19b mimics compared with cells transfected with the control mimics (Fig. 4A). The upregulation of Tlr2 mRNA after BLP treatment was not affected by the overexpression of miR-19a or -19b (Fig. 4A). We also measured the stability of Tlr2 mRNA by incubating BLP-treated cells for 2-4 h with 5 μ g/ml actinomycin D. After 4 h of actinomycin D treatment, Tlr2 mRNA was still detectable in BLP-activated FLS treated with either control or miR-19b mimics (Fig. 4B).

We next tested whether expression of miR-19b and miR-19a affected TLR2 protein levels in RA FLS. We transfected control or miR-19b mimics in RA FLS, activated them with BLP or LPS, and measured TLR2 protein expression by Western blotting. As can be seen in Fig. 4C, we found that overexpression of miR-19b led to a global decrease in TLR2 protein in protein extracts from BLP- and LPS-activated cells (2- and 3-fold, respectively, as determined by densitometry analysis). These results indicated that miR-19a and miR-19b likely regulate the expression of TLR2 at the translational level.

miR-19a and miR-19b repress IL-6 and MMP3 production in BLP-activated RA FLS

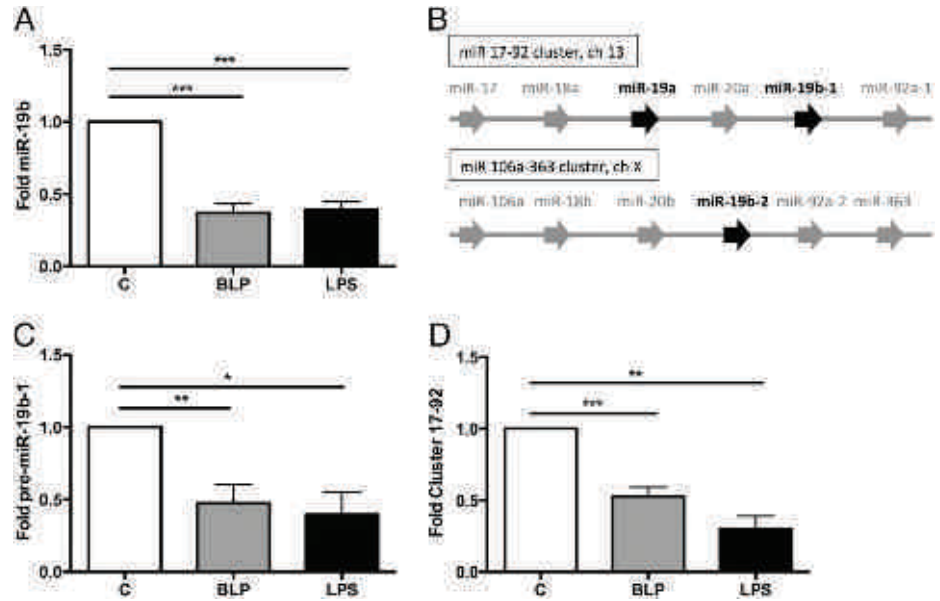
To examine the consequence of Tlr2 regulation by miR-19a and -19b, we next tested whether their overexpression could affect IL-6 mRNA expression and IL-6 release in BLP-activated RA FLS. IL-6 is a cytokine with widespread activities, is one of the central

Table I. Downregulated miRNA following LPS activation of RA FLS

Name	Mean
hsa-mir-494	0.679
hsa-mir-335	0.556
hsa-mir-633	0.467
hsa-mir-29b	0.645
hsa-let-7a	0.374
hsa-mir-99a	0.695
hsa-mir-22	0.684
hsa-mir-21	0.657
hsa-mir-299	0.719
hsa-mir-24	0.714
hsa-mir-19b	0.675
hsa-mir-203	0.609
hsa-mir-222	0.690
hsa-mir-656	0.517
hsa-let-7e	0.760
hsa-mir-620	0.549
hsa-mir-320	0.325

Mean expression was obtained from microarray data collected previously (38).

FIGURE 3. miR-19b is downregulated in LPS- and BLP-activated RA FLS. *A*, MiR-19b expression was determined by RT-qPCR in RA FLS stimulated with BLP (1 μ g/ml) and LPS (1 μ g/ml) for 6 h. U6snRNA was used as endogenous control for data normalization. The control (C) corresponded to untreated cells. *B*, Schematic representation of mir-17–92 cluster on chromosome 13 and mir-106a–363 cluster located on chromosome X. pre-miR-19b1 (*C*) and mir-17–92 cluster (*D*) expression was determined by RT-qPCR in RA FLS stimulated with BLP (1 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), or medium (C) for 6 h. Results were normalized to U6snRNA and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.



mediators of inflammation, plays a major role in RA, and is an important therapeutic target (30). We measured IL-6 mRNA levels in RA FLS transfected with either miR-19a or miR-19b mimics for 48 h and then activated with BLP for 6 h. Compared with the control, we observed that transfection of miR-19a and miR-19b mimics impaired the induction of IL-6 mRNA expression in response to BLP (Fig. 5A). A similar experiment was performed with LPS instead of BLP; however, in this case, cells transfected with the miR-19a and -19b mimics showed no alteration in IL-6 mRNA expression in response to LPS (Fig. 5B). In parallel, we measured the secretion of IL-6 by ELISA and found that it was

significantly downregulated in BLP-activated FLS transfected with miR-19a and -19b mimics (Fig. 5C) but was not modified in LPS-activated FLS (Fig. 5D). We also measured the secretion of MMP3, which is one of the major MMPs involved in invasion and cartilage destruction in RA. We found that, as for IL-6, MMP3 secretion was downregulated in BLP-activated FLS transfected with miR-19a and -19b mimics (Fig. 5E) but was not modified in LPS-activated FLS (Fig. 5F). Taken together, these data demonstrated that the Tlr2 regulation by miR-19a and -19b has an effect on IL-6 and MMP3 release by BLP-activated RA FLS.

miR-19a and miR-19b directly regulate TLR2 expression

To verify whether the predicted binding site for miR-19a or -19b within Tlr2 mRNA was functional (Fig. 6A), we generated luciferase reporter constructs (psiCHECK-2) that contain the firefly luciferase gene fused to the entire 3'-UTR of Tlr2 and the *Renilla* luciferase for normalization. We also generated luciferase reporter constructs in which we inserted a mutant version of Tlr2 3'-UTR to disrupt the predicted binding site for miR-19a or -19b. Before testing these constructs in HEK293 cells, we measured the expression levels of miR-19a and -19b in these cells. As can be seen in Fig. 6B, HEK293 cells express much higher levels of both miRNA than RA FLS. Therefore, we cotransfected the psiCHECK-2 constructs with control or miR-19a and -19b antisense 2'-O-methylated oligonucleotides. In the presence of specific antisense oligonucleotides, we observed an upregulation of the Tlr2 3'-UTR-controlled luciferase sensor but not of the luciferase sensor fused to the mutated Tlr2 3'-UTR (Fig. 6C). Altogether, these data suggested that Tlr2 mRNA is a direct target for posttranscriptional regulation by miR-19a and miR-19b.

Discussion

We and other investigators reported that in RA FLS, TLR2 signaling was increased in response to LPS and BLP and that this could be involved in the inflammatory response in RA (31). Because the most obvious point to control this pathway is at the level of receptor expression, this study was aimed at identifying whether miRNAs might be involved in the control of Tlr2 expression. Our results established that stimulation of RA FLS with BLP and LPS decreases miR-19a and -19b expression, which correlates with upregulation of Tlr2. Furthermore, our results in-

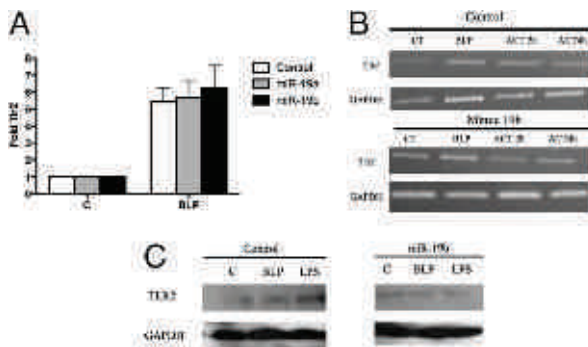


FIGURE 4. miR-19a and -19b transfection affects Tlr2 mRNA translation in RA FLS. *A*, FLS were transfected with miR-19a and -19b mimics or with a negative control (control). Forty-eight hours later, cells were activated with BLP (1 μ g/ml) for 24 h. Control cells were incubated for 24 h with medium (C). Tlr2 mRNA expression was determined by RT-qPCR. Results were normalized to Gapdh and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium. *B*, Tlr2 mRNA expression was determined by RT-qPCR in RA FLS transfected with miR-19b mimics or with a negative control. Transfected cells were activated with BLP 48 h posttransfection for 6 h and then incubated for another 2 and 4 h with actinomycin D. *C*, TLR2 expression was detected using Western blotting with anti-TLR2 Abs in FLS transfected with miR-19a and -19b mimics or with an AllStars negative control siRNA (control). Forty-eight hours posttransfection, FLS were either incubated in medium (C) or activated with BLP (1 μ g/ml) or LPS (1 μ g/ml) for 24 h. For protein-loading control, membranes were reprobed with anti-GAPDH Abs. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments.

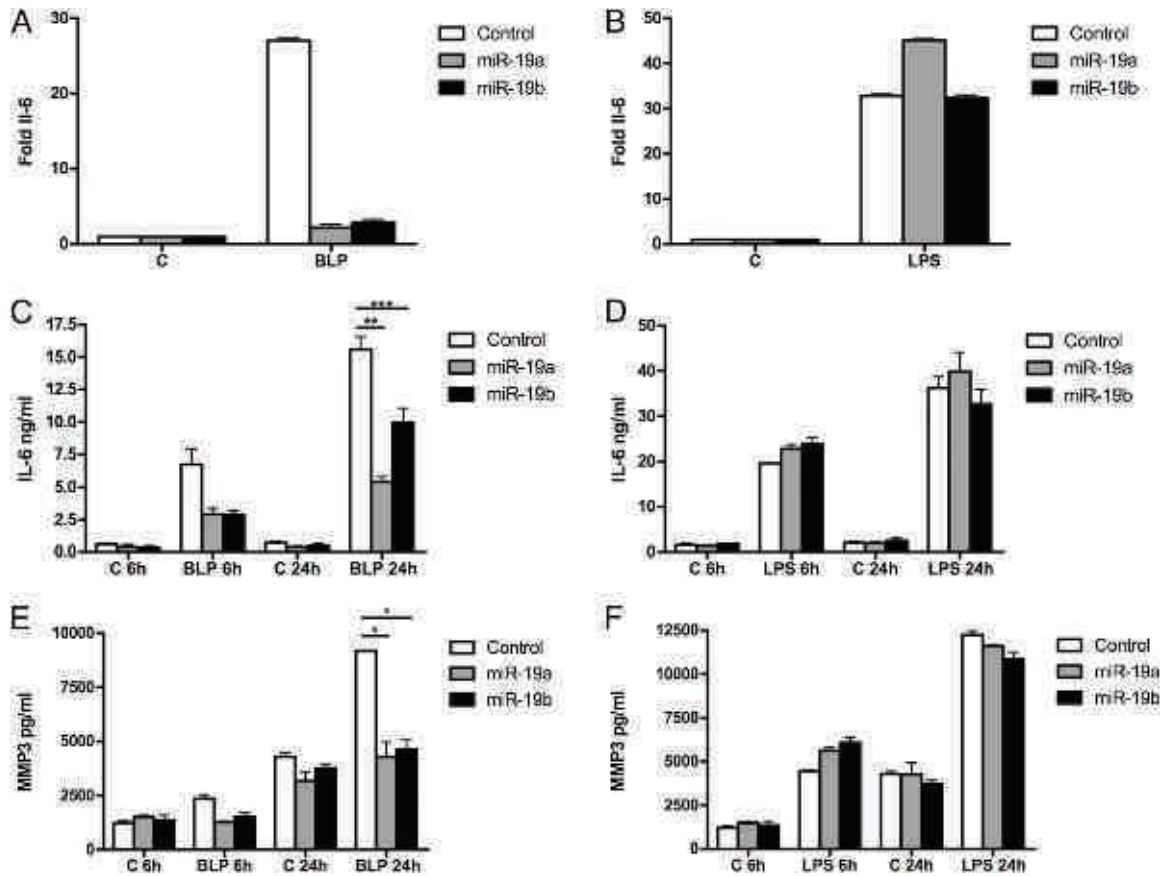


FIGURE 5. miR-19a/b repress IL-6 and MMP3 production in BLP-activated RA FLS. IL-6 mRNA expression was determined by RT-qPCR in RA FLS transfected with miR-19a and -19b mimics or with an AllStars negative control siRNA (control) and then activated (for 6 and 24 h) with BLP (1 μ g/ml) (A) or LPS (1 μ g/ml) (B) for 48 h posttransfection. Control cells were incubated with medium (C). Results were normalized to Gapdh and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium (C). C and D, IL-6 release was determined by ELISA in culture supernatants after stimulation of RA FLS in the same conditions as in A and B. E and F, MMP3 release was determined by ELISA in culture supernatants after stimulation of RA FLS in the same conditions as in A and B. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

indicated that suppression or induction of miR-19a and -19b caused reciprocal alterations in IL-6 release induced by BLP-mediated TLR2 activation.

Many studies showed that TLR stimulation can modulate miRNA expression. Usually, miRNA are upregulated in response to TLR2 and TLR4 activation, and this is the case for miR-155,

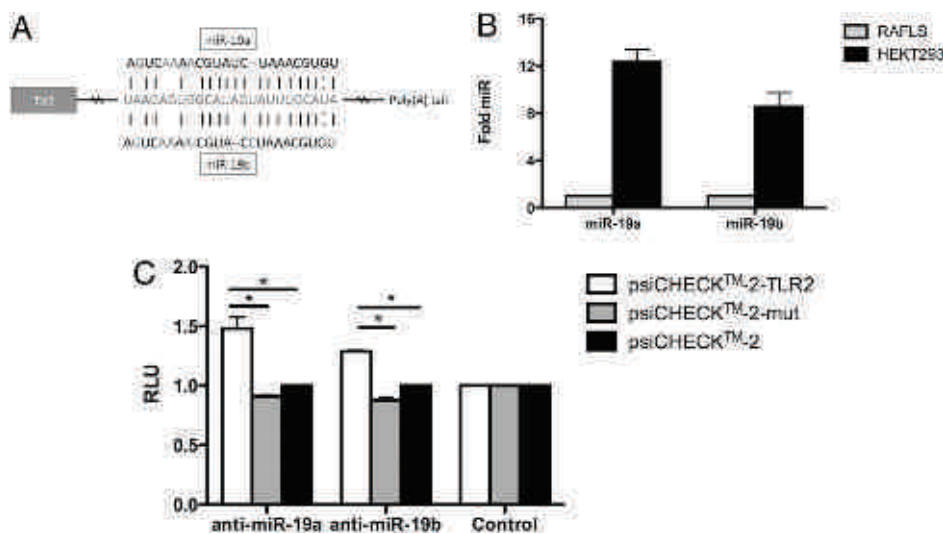


FIGURE 6. miR-19a and -19b directly regulate TLR2 expression. A, Sequence alignment of miR-19a and -19b and their target sites in the 3'-UTR of Tlr2 mRNA. B, miR-19a and -19b relative expression levels were determined by RT-qPCR in RA FLS and HEK293 cells. U6snRNA was used as endogenous control for data normalization. C, miR-19a and -19b directly target the 3'-UTR of Tlr2 mRNA. Luciferase reporter constructs with wild-type or mutated sequence (for miR-19a and -19b binding sites) were generated. HEK293 cells were transiently cotransfected with reporter constructs and either miR-19a or -19b antisense molecules. Luciferase activities were measured 48 h after transfection and normalized to luciferase expressed by the control psiCHECK-2 vector devoid of 3'-UTR sequences. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments. * p < 0.05.

miR-146, miR-147, and miR-9 (32). Moreover, we previously demonstrated that miR-346 is upregulated in RA FLS in response to LPS and that this upregulation participated in the control of IL-18 and Tnf- α mRNA stability and cytokine release (27, 33). Conversely, we found in this study that activation of TLR2 and TLR4 by their respective ligands led to a downregulation of miRNA, including miR-19a and miR-19b, by a currently unidentified mechanism. This regulation has a proinflammatory effect because it allows an increase in TLR2 expression. Such a decrease was also observed for other miRNA, such as let-7i, miR-125b, and miR-98, in response to TLR4 stimulation (32).

An important observation in this study is that the effect of miR-19a and -19b on TLR2 expression occurs at a translational level in RA FLS. Although transfection of miR-19a and -19b mimics had no significant impact on Tlr2 mRNA levels, it caused a decrease at the protein level, as shown by Western blotting. In addition, inhibition of miR-19a and -19b with antisense oligonucleotides significantly increased the activity of a luciferase reporter containing the 3'-UTR of Tlr2. A mutation in the binding sequence completely abrogated the regulation of the luciferase reporter by miR-19a and -19b. These results indicated that, in BLP-activated RA FLS, miR-19a and miR-19b play a role in the control of TLR2 expression by regulating mRNA translation.

There is only limited evidence that TLR are directly regulated by miRNA (32). Nevertheless, it was shown that Tlr4 mRNA is regulated by members of the let-7 miRNA family. let-7i was downregulated in cholangiocytes in response to *Cryptosporidium parvum*, which resulted in upregulation of TLR4 expression (34). The mRNA-encoding TLR4 can also be targeted by others isoforms of the let-7 family, such as let-7e (35).

Modulation of TLR2 expression in human gingival epithelial cells by miR-105 was reported recently (29). The investigators showed that regulation occurs via binding to the 3'-UTR of Tlr2 mRNA, leading to translational inhibition. They also found that miR-19b was differentially expressed but to a lesser extent than miR-105. In contrast to this study, we could not detect expression of miR-105 in nonactivated or activated RA FLS. Tlr2 3'-UTR has overlapping binding sites for miR-19 and miR-105 (miR-19: nt 335–358 and miR-105: nt 331–355), indicating that this binding site is accessible in vivo and plays a critical role in the post-transcriptional regulation of Tlr2 mRNA. Why is miR-105 not expressed in FLS? miR-105 is located on Xq28 in the intronic region of *Gabra3A* gene. Lee et al. (36) reported that miR-105 belongs to a group of miRNA that are detectable in their mature form only in certain cell types and tissues, whereas their precursors are expressed in all or most cell/tissues. This could explain the differential expression of miR-105 between epithelial cells and FLS.

miR-19 belongs to the cluster mir-17–92, which is located within the nonprotein-coding gene *C13orf25* at 13q31.3. Essential roles for this cluster in the development of heart, lungs, and B cells were recently established. Mouse embryos lacking this cluster are characterized by a deficiency of pre-B cells but not earlier B cell progenitors, whereas other hematopoietic cells are largely unaffected (37). In humans, the cluster mir-17–92 is amplified in several types of lymphoma, solid tumors, and neuroblastoma and plays a key role in the control of cell cycle and cell death (38). In particular, miR-17 and miR-20a target p21 and the proapoptotic factor Bim (39), and recent data from Mestdagh et al. (40) indicated that this cluster is a potent inhibitor of TGF- β signaling by acting on TGFBR2, SMAD2, and SMAD4.

In this study, we found that the expression of the mir-17–92 cluster was downregulated in BLP-activated RA FLS and that the expression of one of its paralogs, the mir-106a–363 cluster,

is undetectable. Unlike the mir-17–92 cluster, this cluster is most often undetectable or expressed at trace levels in various cell types, which indicates that it might have more cell-specific functions. This also suggests that the mir-106a–363 cluster plays no role in regulating the expression of TLR2 in RA FLS. It is also worth noting that the mir-17–92 cluster contains multiple miRNA of the miR-19 family; according to in silico predictions, these miRNA should have a redundant activity. Indeed, both miR-19a and miR-19b acted on TLR2 protein expression, as observed in our experiments. This raises the possibility that the expression of Tlr2 mRNA may be subjected to a regulation by multiple miRNA of a same cluster, which might increase the efficiency of this regulation.

The role of the mir-17–92 cluster in inflammation is largely unknown. miR-19a, which is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma, was recently shown to directly target Tnf- α mRNA (41). Results obtained in our study demonstrated that miR-19a and miR-19b negatively regulate the synthesis of IL-6, because their overexpression leads to a strong reduction in IL-6 synthesis in BLP-activated RA FLS. These data indicated that these two miRNAs are anti-inflammatory and that their downregulation in response to TLR2 stimulation is crucial for the development of an inflammatory response. This effect is exclusively dependent of TLR2 regulation, because the transfection of miR-19a and -19b in FLS stimulated with LPS (which triggers TLR4 signaling) had no effect on IL-6 synthesis. IL-6 is a major cytokine implicated in RA and a current therapeutic target (30). This cytokine was recently shown to be directly targeted by two miRNA: let-7 and miR-365 (42–44). IL-6 can also be indirectly regulated, as demonstrated by Stanczyk et al. (45), who linked the expression levels of IL-6 to that of miR-203. Moreover, we also showed that miR-19a and miR-19b regulate the expression of MMP3 and that their downregulation will promote cartilage invasion and destruction. Our results demonstrated a new way of controlling the synthesis of IL-6 and MMP3 by modulating the expression of TLR2.

Taken together, our data point toward an important role for miR-19a and miR-19b in the regulation of IL-6 and MMP3 release by controlling TLR2 expression. Our findings provide clear evidence that miR-19a and miR-19b, which are induced by bacterial ligands, can act as negative regulators of inflammation in humans.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Kempell, K. E., C. J. Cox, M. Hurle, A. Wong, S. Wilkie, E. D. Zanders, J. S. Gaston, and J. S. Crowe. 2000. Reverse transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritic synovial tissue. *Infect. Immun.* 68: 6012–6026.
- van der Heijden, I. M., B. Wilbrink, I. Tchvetverikov, I. A. Schrijver, L. M. Schouls, M. P. Hazenberg, F. C. Breedveld, and P. P. Tak. 2000. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.* 43: 593–598.
- Midwood, K., S. Sacre, A. M. Piccinini, J. Inglis, A. Trebaul, E. Chan, S. Drexler, N. Sofat, M. Kashiwagi, G. Orend, et al. 2009. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat. Med.* 15: 774–780.
- Bartok, B., and G. S. Firestein. 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 233: 233–255.
- Firestein, G. S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356–361.
- Müller-Ladner, U., C. Ospelt, S. Gay, O. Distler, and T. Pap. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* 9: 223.
- Noss, E. H., and M. B. Brenner. 2008. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 223: 252–270.
- Lefèvre, S., A. Knedla, C. Tennie, A. Kampmann, C. Wunrau, R. Dinsler, A. Korb, E. M. Schnäker, I. H. Turner, P. D. Robbins, et al. 2009. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* 15: 1414–1420.

9. Neumann, E., S. Lefèvre, B. Zimmermann, S. Gay, and U. Müller-Ladner. 2010. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol. Med.* 16: 458–468.
10. Seibl, R., D. Kyburz, R. P. Lauener, and S. Gay. 2004. Pattern recognition receptors and their involvement in the pathogenesis of arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16: 411–418.
11. Ospelt, C., F. Brentano, Y. Rengel, J. Stanczyk, C. Kolling, P. P. Tak, R. E. Gay, S. Gay, and D. Kyburz. 2008. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 3684–3692.
12. Huang, Q. Q., R. Sobkoviak, A. R. Jockheck-Clark, B. Shi, A. M. Mandelin, II, P. P. Tak, G. K. Haines, III, C. V. Nicchitta, and R. M. Pope. 2009. Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J. Immunol.* 182: 4965–4973.
13. Joosten, L. A., M. I. Koenders, R. L. Smeets, M. Heuvelmans-Jacobs, M. M. Helsen, K. Takeda, S. Akira, E. Lubberts, F. A. van de Loo, and W. B. van den Berg. 2003. Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 171: 6145–6153.
14. Hultqvist, M., K. S. Nandakumar, U. Björklund, and R. Holmdahl. 2010. Rabe-ximod reduces arthritis severity in mice by decreasing activation of inflammatory cells. *Ann. Rheum. Dis.* 69: 1527–1532.
15. Nic An Ultaigh, S., T. P. Saber, J. McCormick, M. Connolly, J. Dellacasagrande, B. Keogh, W. McCormack, M. Reilly, L. A. O'Neill, P. McGuirk, et al. 2011. Blockade of Toll-like receptor 2 prevents spontaneous cytokine release from rheumatoid arthritis ex vivo synovial explant cultures. *Arthritis Res. Ther.* 13: R33.
16. Chang, Y. C., W. C. Kao, W. Y. Wang, W. Y. Wang, R. B. Yang, and K. Peck. 2009. Identification and characterization of oligonucleotides that inhibit Toll-like receptor 2-associated immune responses. *FASEB J.* 23: 3078–3088.
17. Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
18. Bartel, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233.
19. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11: 597–610.
20. Leung, A. K., and P. A. Sharp. 2010. MicroRNA functions in stress responses. *Mol. Cell* 40: 205–215.
21. Perry, M. M., A. E. Williams, E. Tsiatsiou, H. M. Larner-Svensson, and M. A. Lindsay. 2009. Divergent intracellular pathways regulate interleukin-1beta-induced miR-146a and miR-146b expression and chemokine release in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.* 583: 3349–3355.
22. Bazzoni, F., M. Rossato, M. Fabbri, D. Gaudiosi, M. Miolo, L. Mori, N. Tamassia, A. Mantovani, M. A. Cassatella, and M. Locati. 2009. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 5282–5287.
23. Liu, G., A. Friggeri, Y. Yang, Y. J. Park, Y. Tsuruta, and E. Abraham. 2009. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 15819–15824.
24. Dechanet, J., J. L. Taupin, P. Chomarat, M. C. Risoan, J. F. Moreau, J. Banchereau, and P. Miossec. 1994. Interleukin-4 but not interleukin-10 inhibits the production of leukemia inhibitory factor by rheumatoid synovium and synovocytes. *Eur. J. Immunol.* 24: 3222–3228.
25. Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, III, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, et al. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62: 2569–2581.
26. Neff, L., M. Zeisel, J. Sibilia, M. Schöller-Guinard, J. P. Klein, and D. Wachsmann. 2001. NF-kappaB and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci. *Cell. Microbiol.* 3: 703–712.
27. Alsaleh, G., G. Suffert, N. Semaan, T. Juncker, L. Frenzel, J. E. Gottenberg, J. Sibilia, S. Pfeffer, and D. Wachsmann. 2009. Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* 182: 5088–5097.
28. Meister, G., and T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349.
29. Benakanakere, M. R., Q. Li, M. A. Eskan, A. V. Singh, J. Zhao, J. C. Galicia, P. Stathopoulou, T. B. Knudsen, and D. F. Kinane. 2009. Modulation of TLR2 protein expression by miR-105 in human oral keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 284: 23107–23115.
30. Assier, E., M. C. Boissier, and J. M. Dayer. 2010. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine* 77: 532–536.
31. Pierer, M., J. Rethage, R. Seibl, R. Lauener, F. Brentano, U. Wagner, H. Hantzschel, B. A. Michel, R. E. Gay, S. Gay, and D. Kyburz. 2004. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J. Immunol.* 172: 1256–1265.
32. O'Neill, L. A., F. J. Sheedy, and C. E. McCoy. 2011. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 163–175.
33. Semaan, N., L. Frenzel, G. Alsaleh, G. Suffert, J. E. Gottenberg, J. Sibilia, S. Pfeffer, and D. Wachsmann. 2011. miR-346 controls release of TNF- α protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization. *PLoS ONE* 6: e19827.
34. Chen, X. M., P. L. Splinter, S. P. O'Hara, and N. F. LaRusso. 2007. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J. Biol. Chem.* 282: 28929–28938.
35. Androulidaki, A., D. Iliopoulos, A. Arranz, C. Doxaki, S. Schworer, V. Zacharioudaki, A. N. Margioris, P. N. Tsihliis, and C. Tsatsanis. 2009. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 31: 220–231.
36. Lee, E. J., M. Baek, Y. Gusev, D. J. Brackett, G. J. Nuovo, and T. D. Schmittgen. 2008. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 14: 35–42.
37. Ventura, A., A. G. Young, M. M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S. J. Erkeland, J. Newman, R. T. Bronson, D. Crowley, J. R. Stone, et al. 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132: 875–886.
38. Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, et al. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 2257–2261.
39. Fontana, L., M. E. Fiori, S. Albin, L. Cifaldi, S. Giovannazzi, M. Forloni, R. Boldrini, A. Donfrancesco, V. Federici, P. Giacomini, et al. 2008. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS ONE* 3: e2236.
40. Mestdagh, P., A. K. Boström, F. Impens, E. Fredlund, G. Van Peer, P. De Antonellis, K. von Stedingk, B. Ghesquière, S. Schulte, M. Dewes, et al. 2010. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- β pathway in neuroblastoma. *Mol. Cell* 40: 762–773.
41. Liu, M., Z. Wang, S. Yang, W. Zhang, S. He, C. Hu, H. Zhu, L. Quan, J. Bai, and N. Xu. 2011. TNF- α is a novel target of miR-19a. *Int. J. Oncol.* 38: 1013–1022.
42. Xu, Z., S. B. Xiao, P. Xu, Q. Xie, L. Cao, D. Wang, R. Luo, Y. Zhong, H. C. Chen, and L. R. Fang. 2011. miR-365, a novel negative regulator of IL-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 286: 21401–21412.
43. Schulte, L. N., A. Eulalio, H. J. Mollenkopf, R. Reinhardt, and J. Vogel. 2011. Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. *EMBO J.* 30: 1977–1989.
44. Iliopoulos, D., H. A. Hirsch, and K. Struhl. 2009. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139: 693–706.
45. Stanczyk, J., C. Ospelt, E. Karouzakis, A. Filer, K. Raza, C. Kolling, R. Gay, C. D. Buckley, P. P. Tak, S. Gay, and D. Kyburz. 2011. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.* 63: 373–381.

PUBLICATION 2

Publication 2 : REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE L'ARNM D'ASK1 PAR miR-20A EN REPOSE AU LPS DANS LES FLS RHUMATOÏDES.

Les premiers résultats obtenus concernant miR-19a et miR-19b nous ont conduit à évaluer le rôle du cluster miR-17~92 qui comporte 4 autres miARNs dans la réponse inflammatoire au cours de la PR.

Deux cluster de miARNs codant pour miR-19 ont été décrits mais seul le cluster miR-17~92 est exprimé dans les FLS rhumatoïdes. Partant du postulat qu'un cluster de miARNs est souvent impliqué dans le contrôle des différents acteurs d'une même voie de régulation, ce qui a été décrit pour le cluster miR-17~92 dans le développement de certains organes ou dans la voie du TGF- β , nous avons cherché d'autres cibles potentielles du cluster miR-17~92. Le rôle régulateur de miR-19 sur la synthèse de TNF- α ou sur STAT3 pour miR-18a avaient déjà été démontrés. Les sites de prédiction en ligne nous ont permis de retenir 3 cibles Ask1, Tak1 et Irak4 pour la famille miR-17 comprenant miR-17 et miR-20a codés dans le cluster miR-17~92. Des examens préliminaires de tests rapporteurs luciférase nous ont permis de retenir ASK1, une MAP3K impliquée dans les voies TLR4 et TNFR1. L'objectif de ce travail a été de déterminer quelle était la régulation d'ASK1 dans le contexte inflammatoire de la PR et si miR-20a pouvait influencer son expression. Le site de fixation d'Ask1 étant également prédit conservé chez la souris, un autre aspect de cette étude a été de vérifier la faisabilité de l'étude du rôle régulateur de miR-20a sur Ask1 *in vivo*.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication en soumission dans EMBO :

Modulation of TLR-induced Inflammation by miRNA-Dependent Regulation of ASK1 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes

Lucas Philippe, Ghada Alsaleh, Angélique Pichot, Eleonore Ostermann, Guy Zuber, Benoit Frisch, Jean Sibia, Sébastien Pfeffer, Philippe Georgel and Dominique Wachsmann.

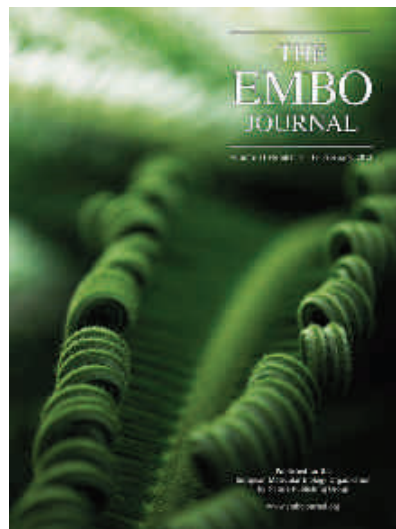


Modulation of TLR-induced Inflammation by miRNA- Dependent Regulation of ASK1 in Rheumatoid Fibroblast- like Synoviocytes

Lucas Philippe, Ghada Alsaleh, Angélique Pichot, Eleonore Ostermann, Guy Zuber, Benoit Frisch, Jean Sibia, Sébastien Pfeffer, Philippe Georgel and Dominique Wachsmann.

THE EMBO JOURNAL

Submitted 2012



Modulation of TLR-induced Inflammation by miRNA-Dependent Regulation of ASK1 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes

Lucas Philippe¹, Ghada Alsaleh², Angélique Pichot¹, Eleonore Ostermann², Guy Zuber³, Benoit Frisch³, Jean Sibilia², Sébastien Pfeffer⁴, Philippe Georgel^{2*} and Dominique Wachsmann¹.

1. Lucas Philippe, Ghada Alsaleh, Angélique Pichot, Jean Sibilia, Dominique Wachsmann, Université de Strasbourg, Laboratoire Physiopathologie des Arthrites, EA4438, UFR Sciences Pharmaceutiques, 74 route du Rhin, Illkirch France and Département de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg Hautepierre, France
2. Eleonore Ostermann, Philippe Georgel, Université de Strasbourg, Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire Humaine, EA4438, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, Faculté de Médecine 4 rue Kirschleger 67085 Strasbourg Cedex France
3. Guy Zuber, Benoit Frisch, Université de Strasbourg, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, CNRS - UMR 7199, Faculté de Pharmacie, 74, route du rhin, 67400 Illkirch, France
4. Sébastien Pfeffer, Université de Strasbourg, Architecture et Réactivité de l'ARN, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15 rue René Descartes, Strasbourg, France

* Corresponding author. Université de Strasbourg, Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire Humaine, EA4438, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, Faculté de Médecine 4 rue Kirschleger 67085 Strasbourg Cedex France
pgeorgel@unistra.fr

Running title : ASK1 expression is regulated by miR-20a

Keywords: miRNA/ASK1/rheumatoid arthritis/inflammation/TLR

Word count:

Abstract

Resident cells of the joint, such as fibroblast-like synoviocytes (FLS) are central to the development of rheumatoid arthritis (RA). Upon stimulation by Pathogen-Associated Molecular Patterns, they acquire an aggressive phenotype manifested by inflammatory cytokine and metalloprotease secretion and their proliferation leads to rheumatoid pannus formation, which ultimately, drives cartilage destruction and bone erosion. Toll-like Receptors 2 and 4 are well recognized Pattern Recognition Receptors involved in this process and recently, microRNAs appeared as important regulators of this signaling pathway. Here, we demonstrate that miR-20a, a member of the miR-17-92 cluster, is down modulated in LPS-activated FLS which is accompanied by augmented apoptosis signal-regulating kinase ASK1 protein expression, a critical component downstream of TLR4. Using transfection of Ask1 3'UTR reporters and miR-20a mimics or antagomiRs, we provide evidence of direct Ask1 mRNA targeting by miR-20a which profoundly modifies the inflammatory properties of FLS isolated from RA patients upon LPS stimulation. Furthermore, *in vivo* injection of miR-20a mimics into mice decreases lipopolysaccharide responsiveness of peritoneal macrophages.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease that predominantly affects multiple peripheral joints. It is characterized by synovial inflammation as well as bone and cartilage destruction. The development of RA is thought to result from interactions between genetic and environmental factors. There is now increasing evidence that Toll-like receptors (TLRs) play a key role in the development of RA in response to molecules of microbial origin found in the joint of RA patients. They trigger an inflammatory response, which damages host tissue thereby allowing the release of endogenous host molecules resulting in repeated cycles of inflammatory and destructive responses.

Resident cells of the joint such as fibroblast-like synoviocytes (FLS) play a crucial role in RA and express increased levels of TLRs such as TLR2, TLR3, TLR4 and TLR7 compared to osteoarthritis (OA) fibroblasts. TLR2 is significantly induced in FLS treated with cytokines such as TNF- α and IL-1 β or with TLR ligands such as poly I:C, bacterial lipoprotein (BLP), or lipopolysaccharide (LPS) (Ospelt et al, 2008). The control of TLR expression occurs at various levels including post-transcriptionally and recently, micro (mi)RNA have emerged as a new class of TLR regulators (O'Neill et al, 2011). For instance, Tlr4 mRNA regulation by members of the let-7 miRNA family such as let-7i and let-7e has been reported (Androulidaki et al, 2009; Chen et al, 2007). In a previous study we showed that stimulation of RA FLS with BLP and LPS induces a drop in expression of miR-19a and miR-19b, and that this decrease is associated with TLR2 up-regulation (Philippe et al, 2012).

TLR signaling pathways culminate with the activation of the transcription factor NF- κ B and the mitogen-activated protein kinases (MAPkinases), JNK and p38 (Carpenter & O'Neill, 2009). Recent studies have uncovered that RA patients exhibit a perturbed expression of miRNAs targeting the NF- κ B pathway. Thus, both the expression of miR-155 and TNF- α production are up-regulated in RA FLS compared to OA FLS. This miRNA targets SHIP-1, which is a negative regulator of NF- κ B signaling (O'Connell et al, 2009; Tili et al, 2007). TAB2, a molecule acting downstream of TRAF6, is also a direct target of miR-155, but in this case miR-155 exerts a negative feedback on inflammation. In a similar manner, miR-146, which is markedly up-regulated in RA synovial tissue, targets IRAK1 and IRAK4 and might therefore also restrain inflammation (Nakasa et al, 2008; Taganov et al, 2006).

MiR-19a and miR-19b belong to the mir-17-92 cluster, which is located within the non-protein-coding gene *C13orf25* at 13q31.3. Overexpression of this cluster, sometime referred to as oncomiR, is clearly implicated in multiple mechanisms of the tumorigenic program including proliferation and cell adhesion (Osada & Takahashi, 2011). This cluster, whose expression is down regulated in LPS-activated RA FLS (Philippe et al, 2012), contains 4 other miRNAs: miR-17, miR-18a, miR-20a and miR-92a. Using the target prediction algorithm TargetScan, we found that miR-20a is a potential regulator of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 protein expression. This protein is encoded by the *Map3k5* gene and activates the MAP kinase kinase 4 (MKK4), MKK7-Jnk, MKK3 and MKK6-p38 pathways, which converge on c-Jun N-terminal kinases and p38 MAPKs. ASK1 is activated by various stress signals including receptor-mediated inflammatory signals such as TNF- α and LPS (Matsuzawa et al, 2005; Nishitoh et al, 2002; Saitoh et al, 1998; Takeda et al, 2004). The production of LPS-induced inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β , is attenuated in ASK1-deficient splenocytes and dendritic cells and ASK1-deficient mice are resistant to LPS-induced septic shock (Hayakawa et al, 2006).

Recently Mnich et al. also showed that ASK1 is critical for the development of RA and is involved in the TNF- α -induced production of inflammatory mediators in the joint (Mnich et al, 2010). This raised the possibility that ASK1 might represent a novel therapeutic target. We therefore decided to evaluate the role of miR-20a on ASK1 expression in RA FLS. Here, we show that stimulation of RA FLS with LPS induces a drop in expression of miR-20a and that this decrease is associated with an up-regulation of ASK1. Furthermore, we demonstrate that ASK1 is a direct target of miR-20a and that the down-regulation of miR-20a in LPS-activated RA FLS and macrophages is associated with an increase of IL-6 and CXCL10 release. Lastly, we performed injection of vectorized miR-20a mimics to mice in order to provide the first *in vivo* insights of miR-20a-dependent modulation of inflammation. Altogether, our data suggest that targeted pharmacological modulation of essential components of the inflammatory reaction using miRNAs might be a realistic therapeutic opportunity.

Results

MiR-20a is down-regulated and ASK1 is up-regulated in LPS- and BLP-activated RA FLS

In a previous work we showed that expression of the mir-17-92 cluster was down regulated in LPS and BLP-activated RA FLS (Philippe et al, 2012). The mir-17-92 cluster contains several miRNAs and we used TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) to identify for these miRNAs putative targets with a known role in RA (data not shown). Among these predicted targets, we found that the Map3k5 mRNA (also called Ask1) contained a conserved binding site for miR-17 and miR-20a (which share the same seed sequence) in its 3' UTR. We first analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis the expression of miR-20a in LPS- and BLP-treated RA FLS. We found that, as expected, miR-20a was strongly down regulated in response to LPS and BLP in RA FLS (Figure 1A).

To get a first insight at the possible link between miR-20a and ASK1, we also measured the expression of ASK1, both at the mRNA and protein level. RA FLS were stimulated for 6h with LPS from *Salmonella abortus equi* (1 µg/ml) or with BLP (1 µg/ml) and RT-qPCR was performed on RNA isolated from both control and activated cells. We observed a 4- to 5-fold increase of Ask1 transcripts in response to LPS and a moderate, albeit non-significant, increase in response to BLP treatment (Figure 1B). To determine whether increased Ask1 mRNA expression correlated with enhanced ASK1 protein expression, we performed Western blotting experiments and quantified ASK1 expression by densitometry. As shown in figure 1C, stimulation of RA FLS with LPS led to an increased expression of ASK1 thereby confirming up-regulation in LPS- and to a lesser extent BLP-activated RA FLS.

MiR-20a directly regulates ASK1 expression

To validate the predicted binding site for miR-20a within Ask1 mRNA (Figure 2A), we generated several luciferase reporter constructs (pSI-CHECK2) that contain the firefly luciferase gene fused to the entire human or mouse Ask1 3' UTR sequence and the renilla luciferase for normalization. We also generated luciferase reporter constructs in which we inserted a mutant version of the human and mouse Ask1 3' UTR to disrupt the predicted seed-match for miR-20a. Before testing these constructs in HEK-293 cells, we measured the expression levels of miR-20a in these cells. HEK-293 cells express much higher levels of miR-17-92 cluster miRNAs than RA FLS (Philippe et al, 2012). We

therefore co-transfected the pSI-CHECK2 constructs with control or miR-20a specific antisense 2'-O-methylated oligoribonucleotides. In the presence of specific antisense oligonucleotides, we observed an upregulation of both the human and the mouse Ask1 3' UTR-controlled luciferase sensors, but not of the luciferase sensors fused to the mutated Ask1 3' UTR (Figure 2B,C). Altogether, these data suggest that Ask1 mRNA is a conserved direct target for post-transcriptional regulation by miR-20a.

MiR-20a modulates ASK1 expression in LPS-activated RA FLS

MiRNAs mediate post-transcriptional regulation *via* either mRNA destabilization or translation inhibition. To assess the effect of miR-20a overexpression on endogenous ASK1 expression, we measured the expression of Ask1 mRNA by RT-qPCR in RA FLS transfected with miR-20a oligonucleotides mimics. A plasmid encoding GFP was co-transfected to evaluate transfection efficiency. 48 h after transfection, cells were stimulated with LPS and BLP for 6 h (for mRNA expression studies) and 24 h (for protein expression studies). No significant difference in Ask1 mRNA expression was found in cells transfected with the miR-20a mimics compared with cells transfected with the control mimics (Figure 3A). In addition, the up-regulation of Ask1 mRNA after LPS or BLP treatment was not affected by the overexpression of miR-20a (Figure 3A).

We next tested whether overexpression of miR-20a affected ASK1 protein levels in RA FLS. We transfected control or miR-20a mimics in RA FLS, activated them with BLP or LPS, and visualized ASK1 protein expression by western blotting. As can be seen in Figure 3B, we found that overexpression of miR-20a led to a global decrease in ASK1 protein in protein extracts from BLP- and LPS-activated cells. These results indicate that miR-20a regulates the expression of ASK1 at the translational level.

MiR-20a regulates p38 MAP kinase phosphorylation in response to LPS

ASK1 is selectively required for p38 activation but not for JNK and NF- κ B stimulation. We therefore tested whether its overexpression could affect p38 phosphorylation in LPS-activated RA FLS. Compared to the control, we observed that stimulation of human RA FLS with LPS resulted in an increased p38 phosphorylation, which was detectable within 5 min and decreased at 30 min. Transfection of miR-20a mimics significantly decreased phosphorylation of p38 at 5 and 15 min (Figure 4A). These results clearly

demonstrate that ASK1 regulation by miR-20a has an effect on LPS-induced p38 phosphorylation in RA FLS.

MiR-20a represses IL-6 and CXCL10 in LPS-activated RA FLS

To examine the most downstream effect of ASK1 regulation by miR-20a, we next tested whether its overexpression could affect IL-6 release in LPS- and BLP-activated RA FLS. IL-6 is a cytokine with widespread activities and is one of the central mediators of inflammation; it plays a major role in RA and is an important therapeutic target (Assier et al, 2010). We measured IL-6 release by RA FLS transfected with miR-20a mimics for 48 h and then activated with LPS for 24 h. Compared to the control, we observed that transfection of miR-20a mimics significantly repressed the release of IL-6 in response to LPS (Figure 4B). A similar experiment performed with BLP instead of LPS showed no alteration of IL-6 secretion in cells transfected with miR-20a mimics (Figure 4C). We also measured the secretion of CXCL10. The production of this chemokine is increased in invasive RA FLS and is associated with joint damage, pannus invasion and destruction (Laragione et al, 2011). We found that, similar to IL-6, CXCL10 secretion was downregulated in LPS-activated FLS transfected with miR-20a mimics (Figure 4D). Secretion of CXCL10 was not activated by BLP (Figure 4D). Altogether, these data demonstrate that the regulation of ASK1 expression by miR-20a strongly modulates IL-6 and CXCL10 release by LPS-activated RA FLS.

MiR-20a represses TNF- α and IL-1 β release by LPS-activated THP-1 cells

As RA FLS do not secrete either TNF- α or IL-1 β , we next determine whether miR-20a overexpression could affect the production of these two cytokines by macrophages, which also play an important role in rheumatoid inflammation. We thus treated the human macrophage cell line THP-1 with LPS or BLP and performed a RT-qPCR analysis of miR-20a. We found that in these cells as well, the level of this miRNA was strongly down-regulated upon BLP or LPS treatment (Figure 5A). Expression of the mir-17~92 cluster was also down regulated in stimulated THP-1 cells (Figure 5B). We confirmed that, as in RA FLS, LPS and BLP induced ASK1 expression at the protein level in THP-1 cells (Figure 5C). We next tested whether overexpression of miR-20a affected ASK1 protein levels in THP-1 cells. We transfected control or miR-20a mimics in THP-1 cells,

activated them with BLP or LPS, and measured ASK1 protein expression. As can be seen in Figure 5D, we found that overexpression of miR-20a led to a global decrease in ASK1 protein in extracts from BLP- and LPS-activated cells.

To examine the consequence of ASK1 downregulation by miR-20a in THP-1 cells, we measured the effect of its overexpression on TNF- α and IL-1 β release in response to LPS. We measured TNF- α and IL-1 β production by THP-1 cells transfected with miR-20a mimics for 48 h and then activated with LPS or BLP for 6 h and 24 h. Compared to the control and consistent with the observations made in RA FLS, we observed that transfection of miR-20a mimics significantly repressed the release of these cytokines in response to LPS (Figure 5E, G) but not in response to BLP (Figure 5F, H).

Overexpression of miR-20a in vivo impacts on IL-6 secretion

Lastly, we examined the role of miR-20a on macrophages inflammatory properties upon *in vivo* intraperitoneal (i.p) injections in mice. For optimal delivery of miR-20a, we used pyridylthiourea-grafted polyethylenimine (π PEI) self-assembling polymers as delivery system. 72 h following i.p injection of polyplexes-containing miR-20a, macrophages were harvested and stimulated with LPS for 24 h. We first tested whether overexpression of miR-20a *in vivo* affected ASK1 protein levels in macrophages. As can be seen in Figure 6A, we found that overexpression of miR-20a led to a global decrease in ASK1 protein expression in LPS-activated cells. IL-6 secretion in the supernatant was quantified by ELISA and miR-20a expression was measured by RT-qPCR. As shown in Figure 6B, we observed a significant ($p=0.0362$, *) inverse correlation between miR-20a expression and IL-6 secretion.

Discussion

Cancer cells and TLR ligand-stimulated synoviocytes exhibit differential regulation of the miR-17-92 cluster

The miR-17-92 cluster, which is highly conserved between mice and humans, consists of 6 individual miRNAs located in a polycistronic transcript on human chromosome 13. In contrast to hematopoietic malignancies and solid tumors where this cluster is frequently activated, we found that miR-17-92 global expression was down regulated in activated RA FLS. We also demonstrated in this study that miR-20a, a paralog of miR-17, is

decreased in response to TLR4 and TLR2 ligands. This result strongly suggests that the majority of miRNAs belonging to this cluster, miR-20a (this study), miR-19a, miR-19b (Philippe et al, 2012), and miR-18 (LP, GA and DW, unpublished) are not differentially expressed in response to TLR stimulation. Interestingly three of them regulate the expression of molecules (i.e TLR2 and ASK1) implicated in TLR-dependent signaling pathways. Acting on various components of the same pathway is a hallmark of this cluster as illustrated by recent data reporting that the miR-17-92 cluster is a potent inhibitor of TGF- β signaling: miR-17 and miR-20a directly target TGFBR2 3'UTR and miR-18a binds to the 3'UTR of SMAD2 and SMAD4 (Li et al, 2011; Mestdagh et al, 2010). However, whereas most of the miRNA in this cluster function in a cooperative and sometimes additive manner, miR-92 was shown to exert opposite biological functions in cancer cells where its expression is reduced. It was recently reported that miR-17-92 cluster adopts a compact globular tertiary structure where miR-92 is sequestered and hardly accessible to the microprocessor (Chaulk et al, 2011) and such structural features might account for miR-92 differential expression. Interestingly, miR-92 is predicted to target Nox4, a NADPH oxydase implicated in ROS production upon TLR4 activation. Moreover, the miR-17 family members are also predicted to regulate the expression of 3 of the four E2F family members (E2F1, E2F2 and E2F3) implicated in the transcription of ASK1. Altogether, our data and prediction analysis strongly suggest that the miR-17-92 cluster plays an important role in ASK1-dependent inflammatory responses.

miR-20a: A novel player in Ask1 regulation

Regulation of ASK1 expression is performed at different levels. At the transcriptional level *Ask1* is a target of the E2F family of transcription factors but there is currently no evidence that E2F-mediated transcriptional control of *Ask1* is involved in the injury-induced expression of *Ask1 in vivo* (Hershko et al, 2006). ASK1 expression is also regulated at the posttranslational level through either c-IAP1-mediated ubiquitination or upon a SOCS1-dependent degradation process (He et al, 2006; Zhao et al, 2007).

Importantly, our study indicates that the effect of miR-20a on ASK1 expression occurs at the translational level in RA FLS. Whereas transfection of miR-20a mimics had no significant impact on *Ask1* mRNA levels, it caused a decrease at the protein level (Figure 3). In addition, inhibition of miR-20a with antisense oligonucleotides significantly increased the activity of a luciferase reporter containing the 3'-UTR of ASK1 (Figure 2).

A mutation in the miRNA binding sequence completely abrogated the regulation of the luciferase reporter by miR-20a. These results indicate that in LPS-activated RA FLS, miR-20a controls ASK1 expression by regulating mRNA translation. Therefore our studies suggest a novel mechanism for the regulation of ASK1 expression at the translational level in response to inflammatory stimuli. Strikingly, this effect is specific to ASK1 as ASK2 the closest paralog of ASK1 has no putative binding site for any members of the cluster miR-17-92. This is consistent with the fact that ASK2 activates JNK only weakly and not ERK1/2 or p38 (Wang et al, 1998).

Therapeutic potential of miRNA-dependent inflammatory responses modulation

In this report we have identified a new specific role of miR-20a in controlling the synthesis of two cytokines IL-6 and CXCL10, which play a main role in the inflammatory response. First, we noticed that its down regulation in response to TLR4 stimulation is crucial for the development of an inflammatory response (Figure 1). Next, we showed that overexpression of miR-20a led to a strong reduction of IL-6 and CXCL10 synthesis in LPS-activated RA-FLS and macrophages (Fig. 4 and 5). In addition, our *ex vivo* data were supported by *in vivo* experiments (Fig. 6), which shed new light on the potential anti-inflammatory properties of miR-20a.

Here, we demonstrate that ASK1 regulation by miR-20a modulates p38 phosphorylation in LPS-activated RA FLS. In RA, p38 MAPK isoforms have been implicated in the regulation of many processes, such as production of pro-inflammatory mediators, migration, angiogenesis, osteoclast formation and differentiation and IL-17 signaling (Schieven, 2009). p38 involvement was demonstrated in several animal models of RA and this has led to the development of inhibitory molecules, which have recently been reported to be efficacious in several arthritis models, although their clinical application remains to be cautiously evaluated because of the significant side effects of these compounds (Bonilla-Hernan et al, 2011; Cohen & Fleischmann, 2011).

Interestingly, we noticed that transfection of miR-20a mimics in RA FLS significantly down regulated IL-6 and CXCL10 release in response to LPS but not in response to BLP. Similar observation was made in macrophages for TNF- α and IL-1 β secretion. These data support published findings showing that, despite numerous similarities between TLR2 and TLR4 pathways (Matsuzawa et al, 2005), ASK1 is only implicated in the TLR4 signaling pathway. Therefore, targeting upstream signaling mediators, such as ASK1

whose stimulation is only TLR4-dependent, might minimize undesirable off-target effects. Indeed, it was recently reported that ASK1^{-/-} mice are resistant to inflammatory arthritis induced by the K/BxN serum transfer model of RA. Ablation of ASK1 expression in RA FLS resulted in inhibition of TNF- α -induced IL-6 and PGE(2) production and suggests that ASK1 is critical for the development of RA and that ASK1 may be involved in the production of proinflammatory mediators in response to TNF- α stimulation in synovial cells of RA patients (Mnich et al, 2010). Furthermore, overexpression of ASK1 in rat synovial cells using a viral vector promoted experimental (Collagen-induced) arthritis (Terauchi et al, 2005).

Different miR-20a targets have been identified and each of these contributes to a specific and complex readout of miR-20a function. In follicular lymphoma, the expression of the cell cycle inhibitor, CDKN1A, is modulated by miR-20a (Wang et al, 2011) and it was demonstrated that miR-20a over-expression contributes to tumor cell proliferation and survival. The STAT3 transcription factor, which induces the expansion of myeloid-derived suppressor cells is another target of miR-20a. Zhang et al. demonstrated that miR-20a could block the suppressive function of tumor-associated myeloid-derived suppressor cell by lowering STAT3 expression (Zhang et al, 2011). Moreover miR-20a inhibits T cell activation genes that are under-expressed in multiple sclerosis transcriptome (Cox et al, 2010). In these cases, delivery of miR-20a modulators (either mimics or antagomiRs) appears a difficult task because access to the precise cellular target is highly challenging. In the case of RA, such pharmacological approach aiming at the modulation of miRNAs activity in the synovial compartment to affect inflammatory responses of FLS and macrophages may be more realistic. Our data indicating efficient miR-20a delivery in macrophages upon pPEI vectorization and following intraperitoneal injection is a first step toward this goal.

Materials and Methods

Reagents

Cell culture media (RPMI 1640, M199 and DMEM), fetal calf serum (FCS), L-glutamine, penicillin, streptomycin, amphotericin B, TRIzol reagent were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). LPS from *Salmonella abortus equi* was obtained from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Synthetic bacterial lipopeptide Pam₃CSK₄ (BLP) was obtained from EMC Microcollections GmbH (Tuebingen, Germany). The Lightcycler

Faststart DNA Master SYBR Green and the miScript System, miRNAs mimics and Allstars negative control siRNA were obtained from Qiagen (Courtabeuf, France). Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ kit and **Cell Line Nucleofector Kit V** were from Lonza (Cologne, Germany). The enzyme immunoassay kits for human IL-6, CXCL10, IL-1 β and TNF- α detection were from R&D (Lille, France). Throughout this study, buffers were prepared with apyrogenic water obtained from Braun Medical (Boulogne, France). Anti-ASK1 mouse IgG monoclonal antibodies were from Imgenex, anti-GAPDH mouse IgG monoclonal antibodies from Millipore (Molsheim, France) and anti-p-P38 antibodies from Promega (Promega Coporation, France).

Cell culture

Human FLS were isolated from synovial tissues from four different RA patients at the time of knee joint arthroscopic synovectomy as described previously after informed consent was obtained from patients (Dechanet et al, 1994). The diagnosis was conformed to the revised criteria of the American College of Rheumatology (Aletaha et al, 2010). FLS cultures were done as previously described (Neff et al, 2001). Experiments were performed between the 3rd and the 9th passage. During that time, cultures were constituted of a homogeneous population of fibroblastic cells, negative for CD16 as determined by FACS analysis. HEK293 cells were purchased from the American type culture collection (ATCC) and maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2mM of L-glutamine, 40 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin. Cell number and cell viability were checked by the MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.

THP-1 cells (no. 88081201, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were cultured as described previously (Chatenay-Rivauday et al, 1998).

Stimulation of cells for total RNA extraction

FLS (10^6 cells) were stimulated with 2 ml of medium alone or medium containing LPS (1 mg/ml), BLP (1 mg/ml). After a 6 h and 24 h incubation period, total RNA was extracted using TRIzol according to the manufacturer's instruction.

Luciferase reporter constructs

To generate luciferase-based reporters plasmids, psiCHECK-2 (Promega) was modified by inserting the Gateway cassette C.1 (Invitrogen) at the 3'-end of the firefly Luciferase gene (*f-luc*) into the *Xba I* site of psiCHECK-2. The 3'UTR sequence of Ask1, was amplified from HEK293 cells genomic DNA and after addition of attB1 and 2 sequences, the resulting PCR products were cloned into pDONR/Zeo and then recombined in the modified psiCHECK-2 vector using Gateway technology (Invitrogen). The primer sequences were (sense and antisense primers are indicated in this respective order and the anchor sequence used for the nested PCR is underlined):

Human Ask1 :5'- AAAAAGCAGGCTAAATTAATACAGAGCTGATCTTCTTGG-3'

5'-AGAAAGCTGGGTTTTTTGTGAGAGTCTCTTTAATTTTT-3'

Mice Ask1 :5'-AAAAAGCAGGCTCCACCAGGGTGACCTTGACT-3'

5'-AGAAAGCTGGGTTTTCTTTGTTTCTTTGCGACA-3'

attB1/2 : 5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'

5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

The target seed sequence was modified using the QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagen) using the following primers :

Human

5'GTGGGAAAATCGAAGGGAGAGGAGAAAGGCGCTCGTGAAAAAATCCAGTATTTGTTTACTC
ATGTTAAAAAAA-3'

5'TTTTTTTTAACATGAGTAAACAAATACTGGATTTTTTTCACGAGCGCCTTCTCCTCTCCCTTC
GATTTTCCCAC-3'

Mice

5'CCGACAGGAGGAGAGGGAGAAGCTGGTGAAAAAATCCAGTCTTTGTTTACTCGTGT-3'

5'ACACGAGTAAACAAAGACTGGATTTTTTTCACCAGCTTCTCCCTCTCCTCCTGTCCGG-3'

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA isolated from FLS was reverse transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Real-time quantitative RT-qPCR was performed in a total volume of 20 µl using SensiMix Plus SYBR kit (Quantace, Corbett Life Science) and gene-specific primers:

Ask1: 5'-CCTGAAGCTTAAGTCCCAACC-3' and 5'-GCATCCCTCCCCTTAGTCTC-3';

Gapdh: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3'

and 5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3'

IL-6: 5'-TCACTGGTCTTTTGGAGTTTGA-3' and 5'-AGAGCCCTCAGGCTGGACT-3'

After an initial denaturing at 96° C for 10 min, the temperatures used were 95° C for 10 s, 60° C for 15 s, 72° C for 25 s for *Gapdh* and *Ask1* using a Rotor-Gene™ 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science). Amplification products were detected as an increased fluorescent signal of SYBR®Green during the amplification cycles. Results were obtained using SDS Software (Perkin Elmer) and evaluated using Excel (Microsoft). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products.

Real-time quantitative PCR analyses for miRNAs were performed using the miScript System and the primers (Qiagen). RNA concentrations were determined with a NanoDrop instrument (NanoDrop Technologies). 500 ng of RNA per sample was used for the assays. Reverse transcriptase reactions and RT-qPCR were performed according to the manufacturer's protocols. Expression of endogenous U6snRNA was used for normalization. Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method.

Transfections and luciferase assay

Transient transfection of FLS or THP-1 with miR-20a mimics (20 pM/sample) or with the negative controls was performed using the Human Dermal Fibroblast Nucleofactor™ kit or and the **Cell Line Nucleofactor Kit V** from Lonza as previously described (Alsaleh et al, 2009). FLS were then plated in 24-well plates (2 x 10⁵ cells per well). All assays were performed 48 h post transfection. Transfection efficiency was evaluated with the PmaxGFP vector.

Transfection of HEK293 cells plated in 24-well plates (2 x 10⁵ cells per well) with reporter constructs and miR-20a mimics (200 nM) was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 48 h cells were washed and lysed with passive lysis buffer (Promega) and *Firefly* luciferase (*f-luc*) and *Renilla* luciferase (*r-luc*) activities were determined using the dual-luciferase reporter assay system (Promega) and a luminometer (Glomax, Promega). The relative reporter activity was obtained by normalization to *r-luc* activity.

IL-6, IL-1β and TNF-α release were measured in culture supernatants by a heterologous two-site sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions.

Western Blot

10⁶ cells (FLS or THP-1) were transfected with miR-20a mimics or with the negative controls and then incubated for 24 h with BLP (1 µg/ml) or LPS (1 µg/ml). Controls were performed with cells maintained in medium with 5% heat inactivated FCS. After stimulation, cells were centrifuged and the pellets were suspended 20 min on ice in 300 mL of ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 130 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors). Lysates were centrifuged for 10 min at 14,000g at 4°C and supernatants were subjected to SDS-PAGE and transferred electrophoretically to PVDF membranes. Membranes were blocked using 1% bovine serum albumin in TBS (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl) for 1 h at 25°C. The blots were incubated with anti-ASK1 rabbit IgG polyclonal antibodies (Imgenex, IMG-90455-2) or anti-p-P38 rabbit IgG polyclonal antibodies (Promega) for 2 h at 25°C followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG polyclonal antibodies (Jackson ImmunoResearch, 711-035-152) (1 h at 25°C) and detected by enhanced chemiluminescence (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Reagents) according to the manufacturer's instructions. To confirm the presence of equal amounts of proteins, bound antibodies were removed from the membrane by incubation in 0,2 M Glycine, pH 2,8 0,5 M NaCl for 10 min at room temperature and reprobed again with anti-GAPDH mouse monoclonal antibodies (Millipore, clone 6C5) followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG polyclonal antibodies (Mouse TrueBlot® ULTRA, eBioscience).

miRNA delivery experiments in vivo

Stables pyridylthiourea-grafted polyethylenimine (πPEI) were prepared as described (Creusat et al, 2012). Polyplexes were formed at room temperature by mixing a 20 mM miRNA solution (67.5 mL) with a 22.5% glucose solution (30 mL) and 14.5 mL of sterilized deionised water. This mixture was then rapidly added to 28 mL of a 150 mM (18.3 ng/mL) πPEI solution, pH 6.0. This mixture (140 mL containing 1.35 nmoles of miR-20a mimic) was injected intraperitoneally in C57BL/6 mice and macrophages were harvested 72h after by peritoneal lavage.

Adherent macrophages were plated and exposed to LPS stimulation (1 µg/ml) for 24 h. ASK1 expression was detected by western blotting above with anti-ASK1 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, H-300, sc-7931) in LPS-activated macrophages. IL-6 secretion was measured in the supernatant by ELISA and miR-20a expression was quantified by RT-qPCR. Experiments involving animals were performed in accordance with institutional guidelines and recommendations.

Statistical analysis

Student's t (two-tailed unpaired) test was used to compare two independent groups and Pearson correlation was performed to analyze the relation between miR-20a and IL-6 expression. In all cases, we used GraphPad software. A probability (p) value of <0.05 was considered to be significant. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Acknowledgements

Pr. Wachsmann acknowledges financial support from Bristol Myers Squibb, Roche, Pfizer and CAMPLP. Work in the laboratories of PG and SP is supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR- 08-MIEN-005-01 DICERPATHO). Work in the laboratory of SP is also supported by the European Research Council (ERC Starting Grant ncRNAVIR 260767).

Author Contribution

LP, GA, AP and EO performed the experiments and participated in data analysis. GZ and BF contributed reagents. JS, SP, PG and DW designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest

References

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat

E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* **62**(9): 2569-2581

Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, Juncker T, Frenzel L, Gottenberg JE, Sibilia J, Pfeffer S, Wachsmann D (2009) Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* **182**(8): 5088-5097

Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, Margioris AN, Tsihchlis PN, Tsatsanis C (2009) The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* **31**(2): 220-231

Assier E, Boissier MC, Dayer JM (2010) Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine* **77**(6): 532-536

Bonilla-Hernan MG, Miranda-Carus ME, Martin-Mola E (2011) New drugs beyond biologics in rheumatoid arthritis: the kinase inhibitors. *Rheumatology (Oxford)* **50**(9): 1542-1550

Carpenter S, O'Neill LA (2009) Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Biochem J* **422**(1): 1-10

Chatenay-Rivauday C, Yamodo I, Sciotti MA, Ogier JA, Klein JP (1998) The A and the extended V N-terminal regions of streptococcal protein I/IIf mediate the production of tumour necrosis factor alpha in the monocyte cell line THP-1. *Mol Microbiol* **29**(1): 39-48

Chaulk SG, Thede GL, Kent OA, Xu Z, Gesner E, Veldhoen RA, Khanna SK, Goping IS, Macmillan AM, Mendell JT, Young H, Fahlman RP, Glover JN (2011) Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol* **8**(6)

Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF (2007) A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem* **282**(39): 28929-28938

Cohen S, Fleischmann R (2011) Kinase inhibitors: a new approach to rheumatoid arthritis treatment. *Curr Opin Rheumatol* **22**(3): 330-335

Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ, Broadley S, Scott RJ, Booth DR, Lechner-Scott J, Consortium ANMSG (2010) MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One* **5**(8): e12132

Creusat G, Thomann JS, Maglott A, Pons B, Dontenwill M, Guerin E, Frisch B, Zuber G (2012) Pyridylthiourea-grafted polyethylenimine offers an effective assistance to siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *J Control Release* **157**(3): 418-426

Dechanet J, Taupin JL, Chomarot P, Rissoan MC, Moreau JF, Banchereau J, Miossec P (1994) Interleukin-4 but not interleukin-10 inhibits the production of leukemia inhibitory factor by rheumatoid synovium and synoviocytes. *Eur J Immunol* **24**(12): 3222-3228

Hayakawa T, Matsuzawa A, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H (2006) The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect* **8**(4): 1098-1107

He Y, Zhang W, Zhang R, Zhang H, Min W (2006) SOCS1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation. *J Biol Chem* **281**(9): 5559-5566

Hershko T, Korotayev K, Polager S, Ginsberg D (2006) E2F1 modulates p38 MAPK phosphorylation via transcriptional regulation of ASK1 and Wip1. *J Biol Chem* **281**(42): 31309-31316

Laragione T, Brenner M, Sherry B, Gulko PS (2011) CXCL10 and its receptor CXCR3 regulate synovial fibroblast invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **63**(11): 3274-3283

Li L, Shi JY, Zhu GQ, Shi B (2011) MiR-17-92 cluster regulates cell proliferation and collagen synthesis by targeting TGF β pathway in mouse palatal mesenchymal cells. *J Cell Biochem*

Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**(6): 587-592

Mestdagh P, Bostrom AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquiere B, Schulte S, Dews M, Thomas-Tikhonenko A, Schulte JH, Zollo M, Schramm A, Gevaert K, Axelson H, Speleman F, Vandesompele J (2010) The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- β pathway in neuroblastoma. *Mol Cell* **40**(5): 762-773

Mnich SJ, Blanner PM, Hu LG, Shaffer AF, Happa FA, O'Neil S, Ukairo O, Weiss D, Welsh E, Storer C, Mbalaviele G, Ichijo H, Monahan JB, Hardy MM, Eda H (2010) Critical role for apoptosis signal-regulating kinase 1 in the development of inflammatory K/BxN serum-induced arthritis. *Int Immunopharmacol* **10**(10): 1170-1176

Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H (2008) Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* **58**(5): 1284-1292

Neff L, Zeisel M, Sibia J, Scholler-Guinard M, Klein JP, Wachsmann D (2001) NF- κ B and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci. *Cell Microbiol* **3**(10): 703-712

Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**(11): 1345-1355

O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D (2009) Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(17): 7113-7118

O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **11**(3): 163-175

Osada H, Takahashi T (2011) let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci* **102**(1): 9-17

Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2008) Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum* **58**(12): 3684-3692

Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibia J, Wachsmann D, Pfeffer S (2012) TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. *J Immunol* **188**(1): 454-461

Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* **17**(9): 2596-2606

Schieven GL (2009) The p38alpha kinase plays a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem* **9**(11): 1038-1048

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(33): 12481-12486

Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H, Tobiume K, Kishida S, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Ichijo H (2004) Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation. *EMBO Rep* **5**(2): 161-166

Terauchi R, Arai Y, Takahashi KA, Inoue A, Tonomura H, Asada H, Kishida T, Imanishi J, Mazda O, Kitajima I, Kubo T (2005) The effect of apoptosis signal-regulating kinase 1 gene transfer on rat collagen induced arthritis. *J Rheumatol* **32**(12): 2373-2380

Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM (2007) Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* **179**(8): 5082-5089

Wang W, Corrigan-Cummins M, Hudson J, Maric I, Simakova O, Neelapu SS, Kwak LW, Janik JE, Gause B, Jaffe ES, Calvo KR (2011) MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response. *Haematologica*

Wang XS, Diener K, Tan TH, Yao Z (1998) MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochem Biophys Res Commun* **253**(1): 33-37

Zhang M, Liu Q, Mi S, Liang X, Zhang Z, Su X, Liu J, Chen Y, Wang M, Zhang Y, Guo F, Yang R (2011) Both miR-17-5p and miR-20a alleviate suppressive potential of myeloid-derived suppressor cells by modulating STAT3 expression. *J Immunol* **186**(8): 4716-4724

Zhao Y, Conze DB, Hanover JA, Ashwell JD (2007) Tumor necrosis factor receptor 2 signaling induces selective c-IAP1-dependent ASK1 ubiquitination and terminates mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **282**(11): 7777-7782

Figure Legends

Figure 1: MiR-20a is down-regulated and ASK1 is up-regulated in LPS- and BLP-activated RA FLS. **A, B.** miR-20a (**A**) and Ask1 mRNA (**B**) expression was determined by RT-qPCR in RA FLS stimulated with BLP (1 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 6 h. Results were normalized to U6snRNA or Gapdh and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium (**C**). **C.** ASK1 expression in RA FLS, 24 h after stimulation with LPS, BLP and medium (**C**) was determined by Western blotting with anti-ASK1 antibodies. For protein loading control, membranes were reprobed with anti-GAPDH antibodies. Numbers indicate relative ASK1/GAPDH values upon densitometry scanning of the gel. Data are expressed as the mean of triplicate samples +/- SD and are representative of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01. ns, non significant.

Figure 2: MiR-20a directly regulates ASK1 expression. **A.** Sequence alignment of miR-20a and their target sites in the 3'-UTR of Ask1 mRNA. **B, C.** miR-20a directly targets the 3'-UTR of human (**B**) and mouse (**C**) Ask1 mRNA. Luciferase reporter constructs with wild-type or mutated (for miR-20a binding sites) were generated. HEK293 cells were transiently co-transfected with reporter constructs and with miR-20a antisense molecules. Luciferase activities were measured 48 h after transfection and normalized to Luciferase expressed by the control psi-CHECK-2 vector devoid of 3'UTR sequences. Data are expressed as the mean of triplicate samples +/- SD and are representative of three independent experiments. **p<0.01

Figure 3: miR-20a transfection affects Ask1 mRNA translation in RA FLS. **A.** FLS were transfected with miR-20a mimics or with a AllStars negative control (control). 48 h after, cells were activated with BLP (1 µg/ml) or LPS (1 µg/ml) for 6 h. Control cells were incubated for 6 h with medium (**C**). Ask1 mRNA expression was determined by RT-qPCR. Results were normalized to Gapdh and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium. **B.** ASK1 expression was detected using Western blotting with anti-ASK1 antibodies in FLS transfected with miR-20a mimics or with a AllStars negative control siRNA (control). 48 h post-transfection, FLS were either incubated in medium (**C**) or activated with BLP (1 µg/ml) or LPS (1 µg/ml) for 24 h. For protein loading control, membranes were reprobed with anti-GAPDH antibodies. Values

represent ASK1 expression measured upon densitometry scanning of the gel and normalized to GAPDH. RT-qPCR data are expressed as the mean of triplicate samples +/- SD and are representative of three independent experiments.

Figure 4: MiR-20a represses IL-6 and CXCL-10 production and p38 phosphorylation in LPS-activated RA FLS. (A) p38 phosphorylation was detected using Western blotting with anti-P-p38 antibodies in FLS transfected with miR-20a mimics or with a AllStars negative control siRNA (Ctl). 48 h post-transfection, FLS were either incubated in medium (C) or activated with LPS (1 μ g/ml) for 5, 15 and 30 min. For protein loading control, membranes were reprobated with anti-GAPDH antibodies. Numbers indicate ASK1 relative expression which was obtained by densitometry scanning of the gel. (B) and (C) IL-6 release was determined by ELISA in culture supernatants after in RA FLS transfected with miR-20a mimics or with a AllStars negative control siRNA (control) and then activated (24 h) with LPS (1 μ g/ml) (B) or BLP (1 μ g/ml) (C) 48 h post-transfection. Control cells were incubated with medium (C). (D) CXCL-10 release was determined by ELISA in culture supernatants after stimulation of RA FLS in the same conditions as Panels A and B. Data are expressed as the mean of triplicate samples +/- SD and are representative of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01. ns, non significant.

Figure 5: MiR-20a represses TNF- α and IL-1 β production in LPS-activated THP-1. A, B. MiR-20a (A) and miR 17-92 cluster (B) expression was determined by RT-qPCR in THP-1 stimulated with BLP (1 μ g/ml) and LPS (1 μ g/ml) for 6 h. Results were normalized to U6snRNA and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium (C). C, D. ASK1 expression was detected using Western blotting with anti-ASK1 antibodies in non transfected THP-1 cells (C) and in THP-1 cells transfected with miR-20a mimics or with a AllStars negative control siRNA (control) (D). 48 h post-transfection, FLS were either incubated in medium (C) or activated with BLP (1 μ g/ml) or LPS (1 μ g/ml) for 24 h. For protein loading control, membranes were reprobated with anti-GAPDH antibodies. ASK1 relative expression is indicated. E, F. TNF- α release was determined by ELISA in culture supernatants of THP-1 cells transfected with miR-20a mimics or with a AllStars negative control siRNA (control) and then

activated (6 h) with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) **(E)** or BLP (1 $\mu\text{g/ml}$) **(F)** 48 h post-transfection. Control cells were incubated with medium (C). **G, H.** IL-1 β release was determined by ELISA in culture supernatants after stimulation of THP-1 cells in the same conditions as Panels E and F (activated for 24 h). Data are expressed as the mean of triplicate samples +/- SD and are representative of three independent experiments. ** $p < 0.01$. ns, non significant

Figure 6: Decreased LPS-induced IL-6 secretion in mouse peritoneal macrophages upon *in vivo* miR-20a injection.

Mice (n=8) received an i.p injection of approx. 1.35 nmoles of pPEI-vectorized miR-20a. 3 days after, macrophages were harvested and stimulated with LPS for 24 h. **A.** ASK1 expression was detected by Western blotting with anti-ASK1 antibodies in LPS-activated macrophages. For protein loading control, membranes were reprobbed with anti-GAPDH antibodies. Values represent ASK1 expression measured upon densitometry scanning of the gel and normalized to GAPDH. **B.** miR-20a expression was quantified by RT-qPCR and IL-6 secretion by ELISA. Pearson correlation analysis was performed using GraphPad. ($p = 0.0362$; $r = 0.6644$)

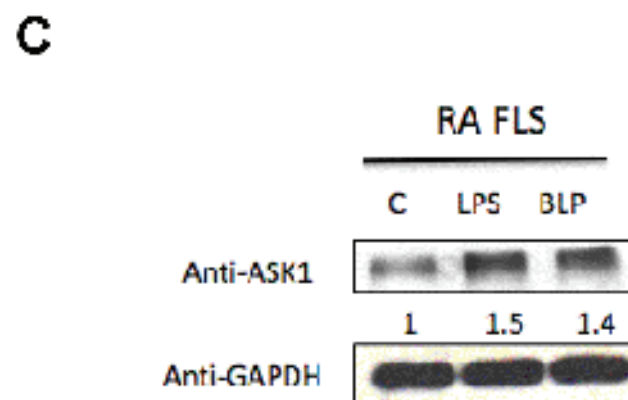
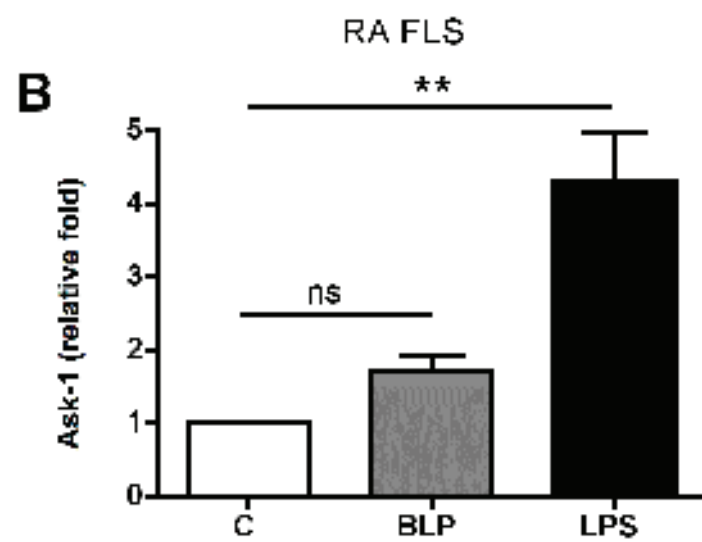
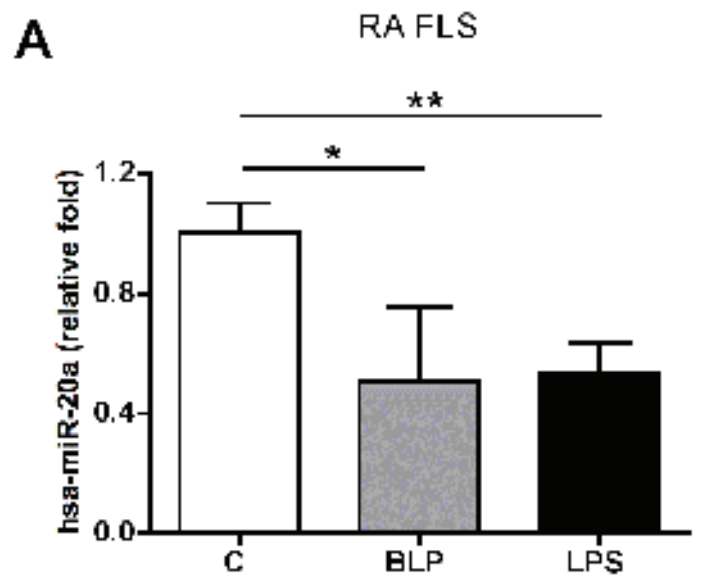


Figure 1

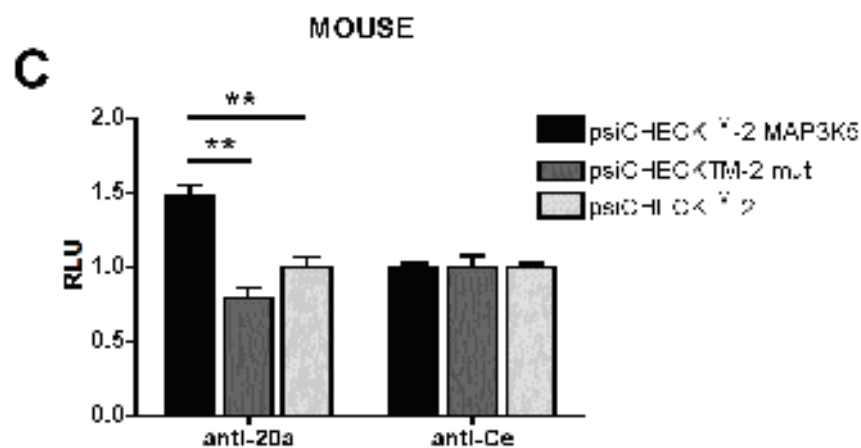
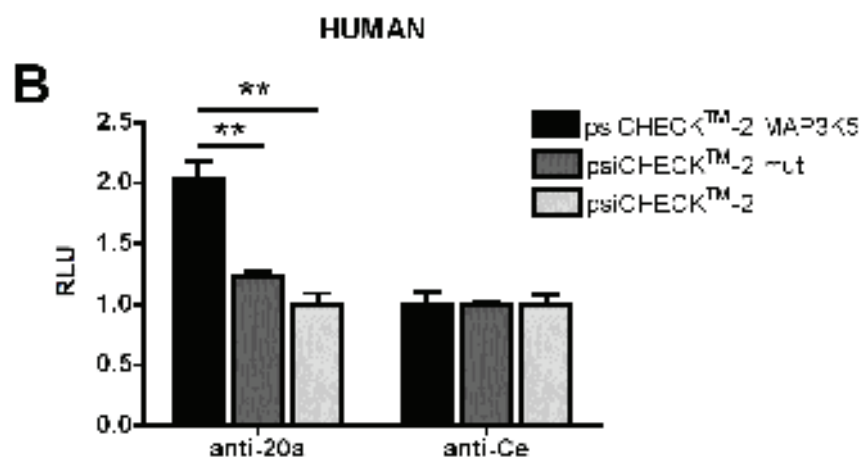
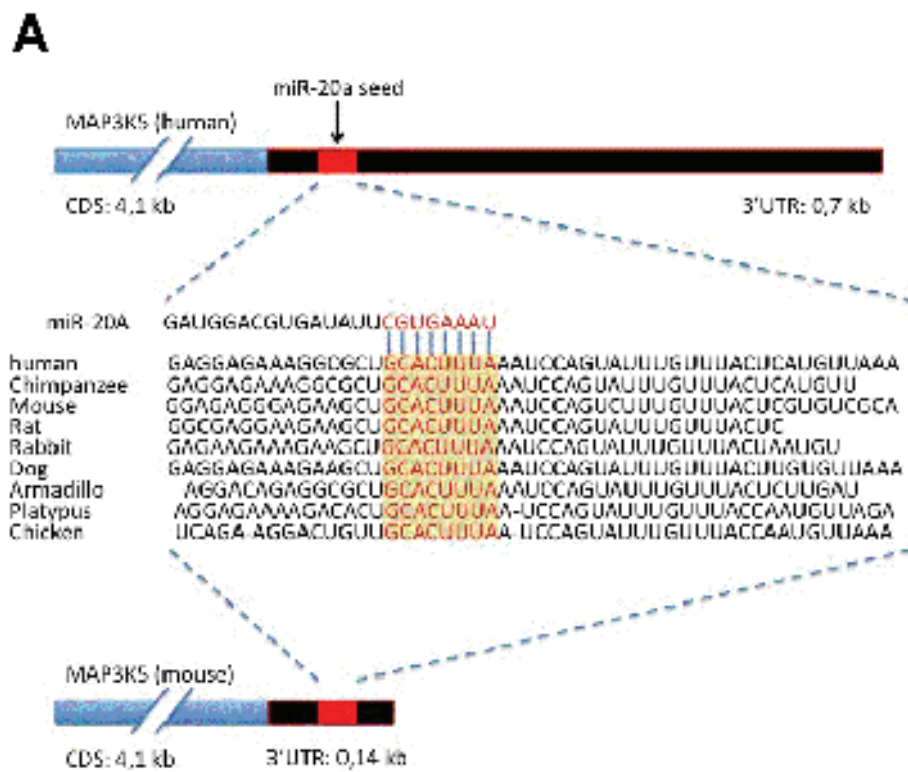


Figure 2

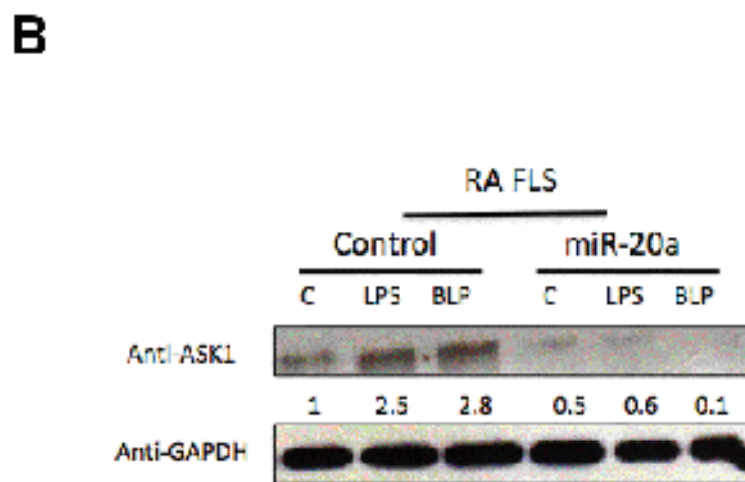
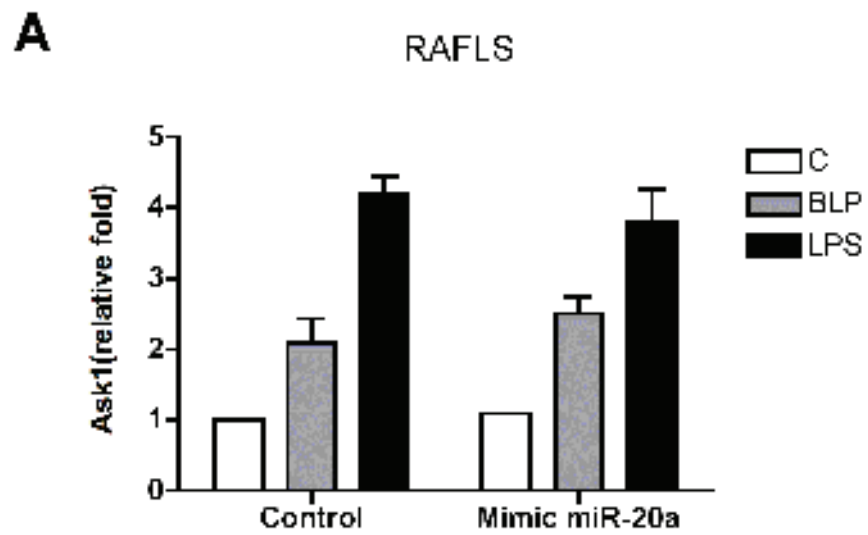


Figure 3

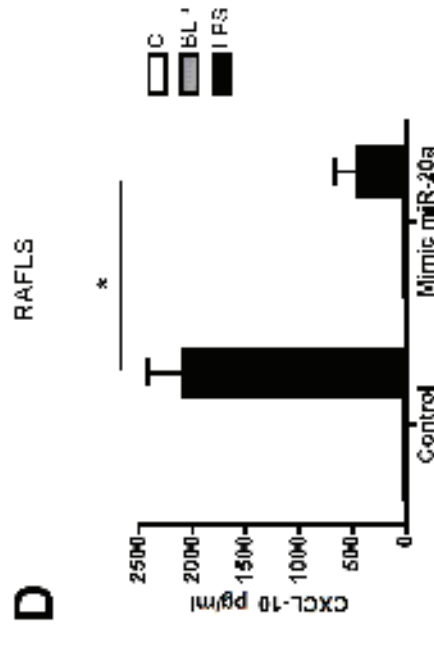
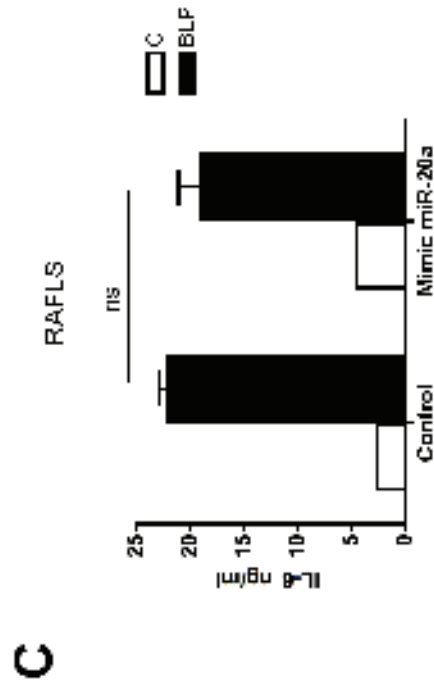
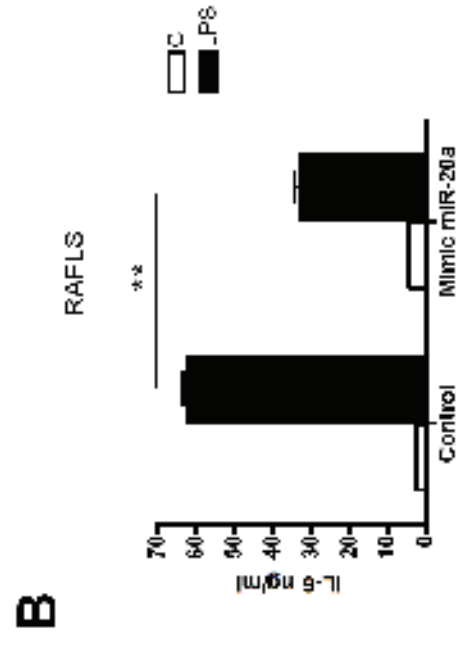
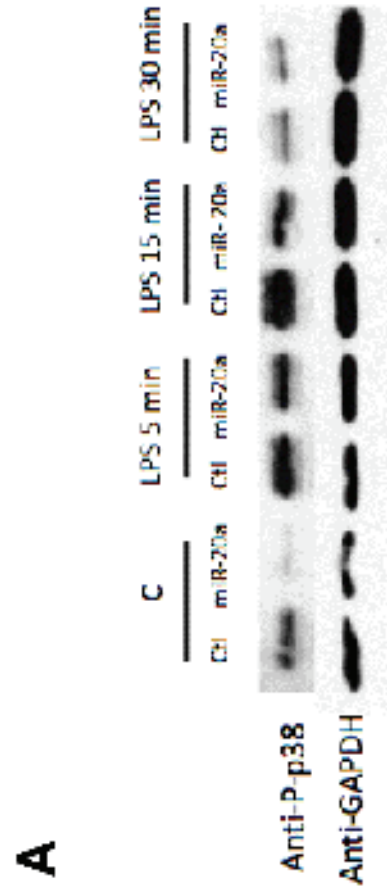


Figure 4

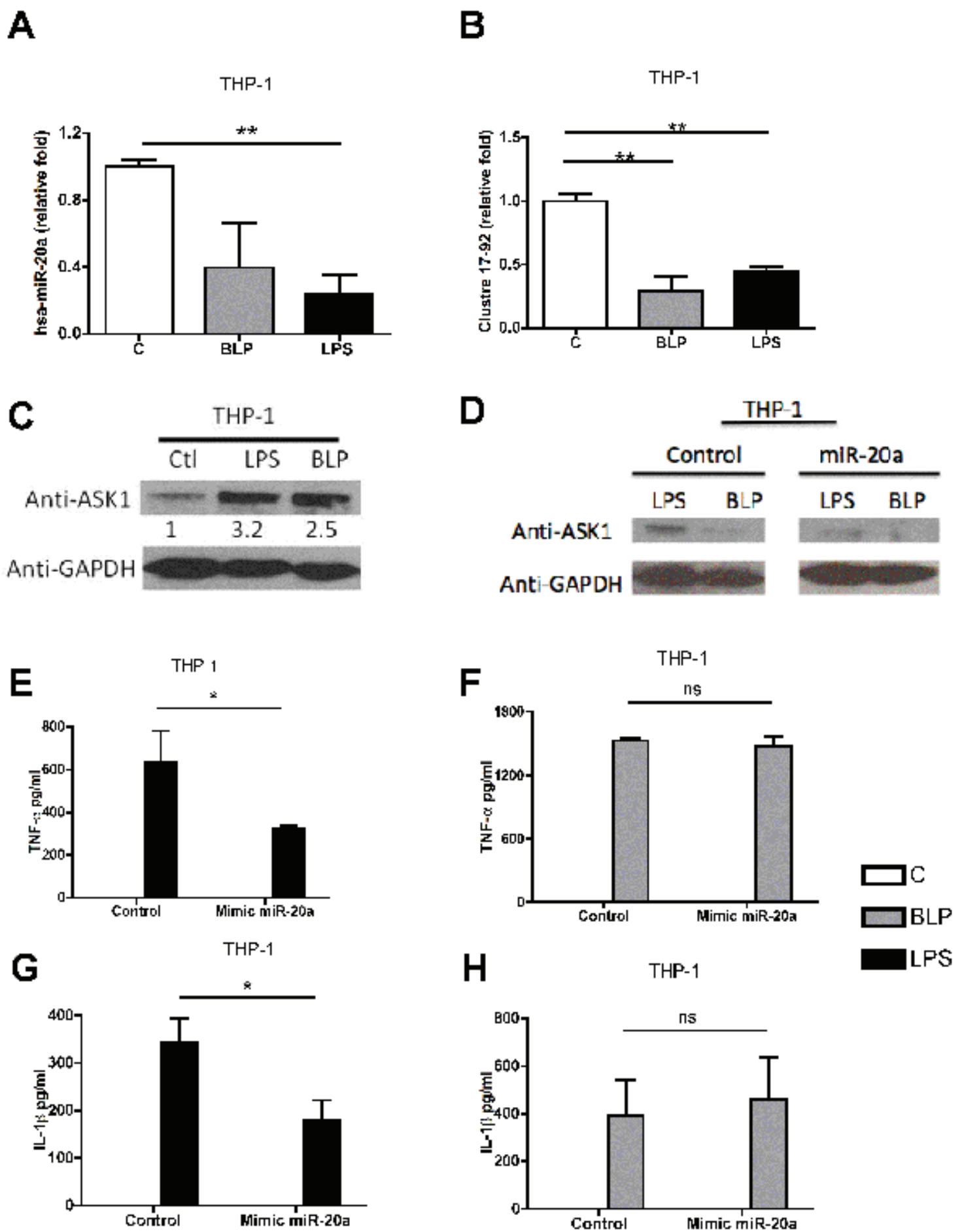
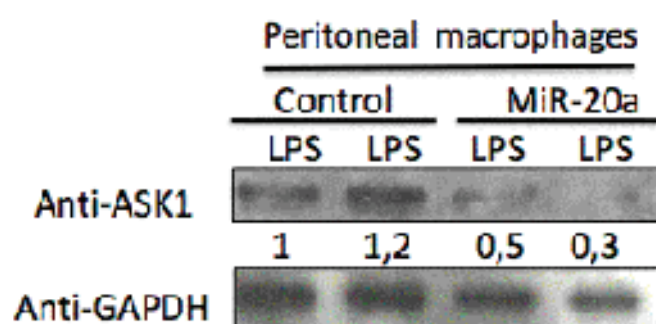


Figure 5

A



B

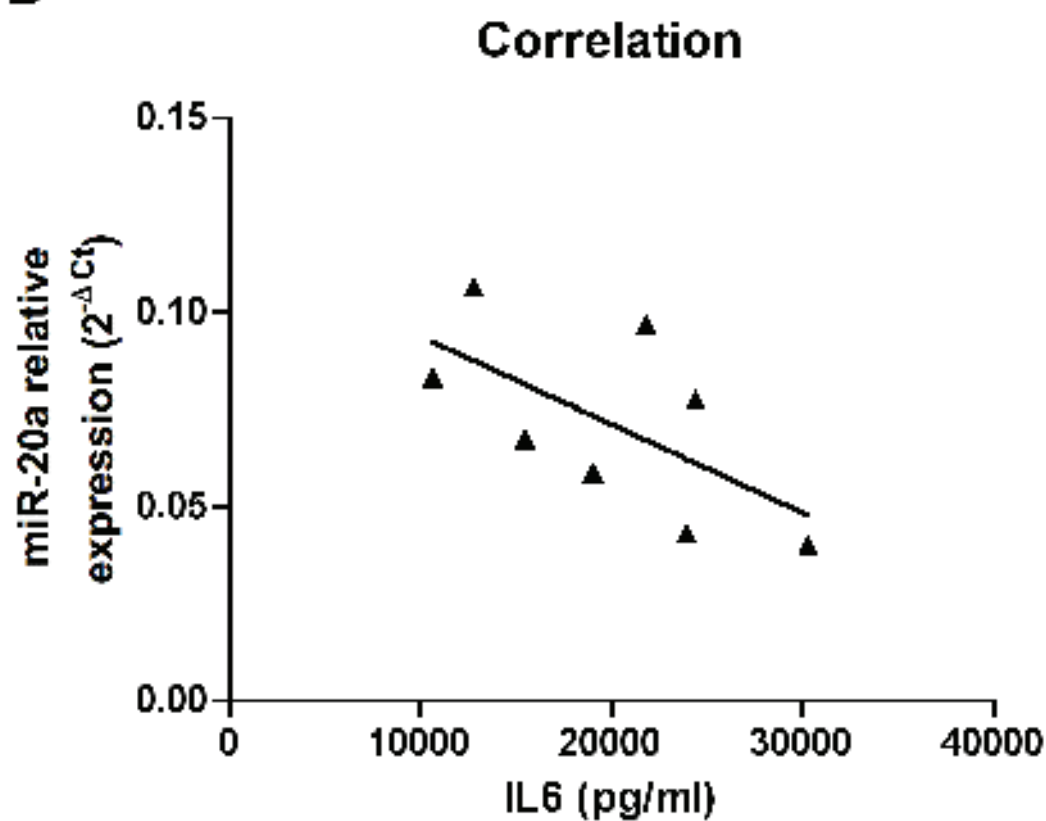


Figure 6

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 1...

...SUR LES DONNEES DES MIARNs MODULES PAR TLR4 DANS LES FLS RHUMATOÏDES

Notre étude concernant les mécanismes épigénétiques impliqués dans l'acquisition du phénotype agressif des synoviocytes rhumatoïdes avait été motivée par le fait que ces cellules présentaient un profil cytokinique particulier. En effet les FLS synthétisent l'ARNm du TNF- α et de l'IL-18 mais ne libèrent pas ces cytokines du fait de la grande instabilité de leur ARN messenger. Un microarray a été effectué sur ces cellules activées pendant 6 h par le LPS. Les résultats sont présentés ci-dessous. Nous avons pu identifier 12 miARNs dont l'expression était augmentée et parmi ceux-ci miR-346, miARN anti-inflammatoire qui inhibe l'expression du TNF- α et de l'IL-18 (Alsaleh et al., 2009; Semaan et al., 2011) et 15 miARNs dont l'expression était diminuée et parmi ceux-ci, miR-19 qui a fait l'objet de cette étude (**Tableau 5**).

Name	down-regulated	Name	up-regulated
hsa-let-7a	0,37375	miR-10a	6,618
hsa-let-7e	0,75975	miR-30b	2,53
miR-15a	0,68	miR-30c-2,miR-30c-1	2,949
miR-19b	0,67475	miR-30d	7,818
miR-21	0,6565	miR-100	2,9945
miR-22	0,6835	miR-346	5,054
miR-24	0,7135	miR-411	2,099
miR-29b	0,64525	miR-487b	3,2535
miR-99a	0,695	miR-508	2,637
miR-203	0,609	miR-563	2,1465
miR-222	0,68975	miR-585	2,6035
miR-299	0,719	miR-596	2,7935
miR-320	0,3245		
miR-335	0,5555		
miR-494	0,6785		
miR-633	0,4665		
miR-620	0,549		
miR-656	0,517		

Tableau 6: miARNs sélectionnées à la suite d'un microarray effectué sur des FLS activés par le LPS pendant 6h.

Des expériences de RT-qPCR nous ont permis de confirmer la baisse de certains miARNs (**Figure 17**).

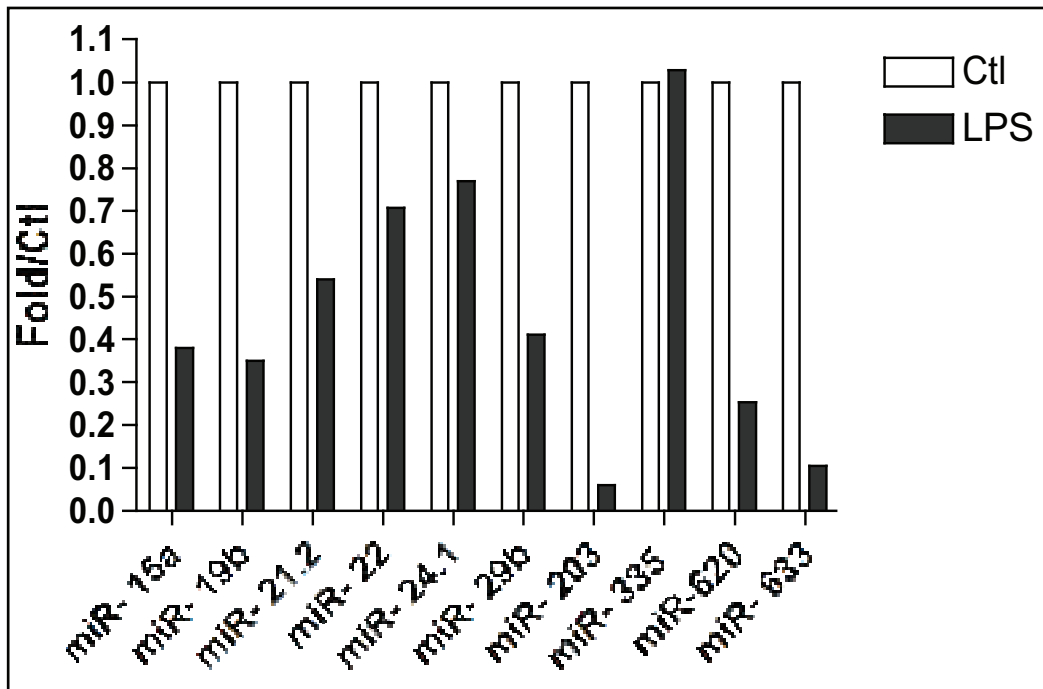


Figure 17. RT-qPCR préliminaire sur un groupe de miARNs abaissés au cours du microarray en réponse au LPS.

Nous avons alors sélectionné miR-19b, qui était un des seuls miARN prédit cibler Tlr2.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

2

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 2...

... SUR LE CLUSTER MIR-17~92.

1. Régulation de c-MYC dans les THP-1 et les FLS rhumatoïdes.

Le proto-oncogène *c-MYC* code un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, la croissance et l'apoptose. O'Donnell et al. ont montré que c-MYC régule directement la transcription du cluster miR-17~92 (O'Donnell et al., 2005). Plusieurs sites de fixation connus sous le nom de E-box, incluant la séquence canonique CACGTG et la séquence non canonique CATGTG, sont présents en amont du gène du cluster miR-17~92 et un en aval, quatre sites sont conservés chez la souris (Figure 18).

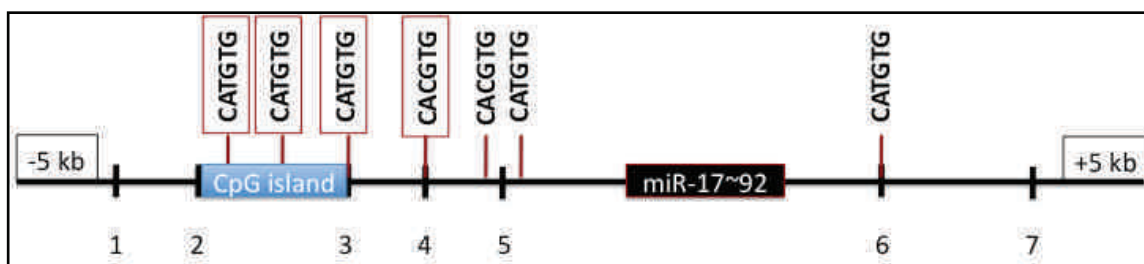


Figure 18. Sites de fixation de c-MYC en amont et en aval du cluster miR-17~92. Les séquences conservées chez la souris sont encadrées en rouge (O'Donnell et al., 2005).

Les premiers résultats obtenus par RT-qPCR ont montré une diminution de l'expression du transcrite de *c-Myc* à 6h et à 24h dans des FLS rhumatoïdes ainsi que dans les cellules THP-1, activés par le BLP ou le LPS (Figure 19). *C-MYC* régulant directement le cluster miR-17~92, la baisse d'expression de son transcrite dans les FLS et les cellules THP-1, est probablement à l'origine de la baisse du niveau d'expression de miR-19a et de miR-19b.

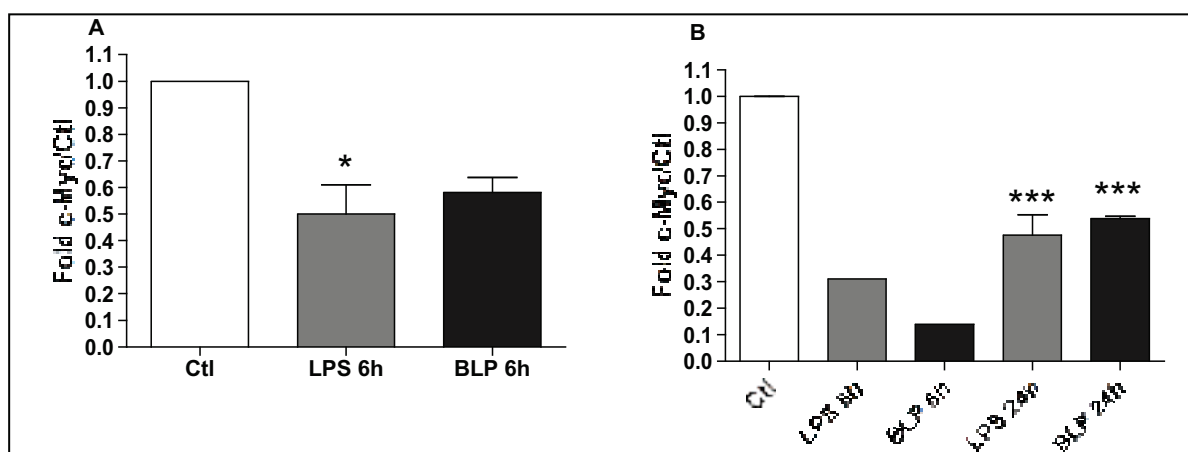


Figure 19. Expression de c-Myc évaluée par RT-qPCR. A. Expression de *c-Myc* dans les FLS rhumatoïdes en réponse au BLP et au LPS à 6h. B. Expression de *c-Myc* dans les cellules THP-1 en réponse au BLP et au LPS à 6h et à 24h.

Plusieurs études ont démontré que c-MYC joue un rôle important dans le développement du phénotype agressif des FLS rhumatoïdes (Pap et al., 2004; Yatsugi et al., 2000). Ces données sont en contradiction avec les résultats obtenus dans lesquels nous démontrons une baisse de c-MYC en réponse au BLP et au LPS.

Cependant en ce qui concerne les études de Pap et al et Yatsugi et al. la détermination de c-MYC a été faite en l'absence de toute stimulation, ce qui rend les résultats difficilement comparables. Il existe probablement une variation de c-Myc en fonction de l'activation et en fonction du temps au cours de la réponse inflammatoire dans la PR. L'étude de l'expression de c-Myc en réponse à l'activations de divers TLRs à des temps variés et à des stades variés de la maladie et sa corrélation avec l'expression du cluster miR-17~92 devrait aider à vérifier l'hypothèse de la régulation de c-MYC sur ces miARNs au cours de la réponse inflammatoire.

2. Baisse de l'expression d'autres membres du cluster miR-17~92 en réponse à TLR2 et TLR4

Nous avons également réalisé une expérience de RT-qPCR préliminaire visant à analyser l'expression des membres du cluster miR-17~92, miR-18a et miR-92, afin de vérifier s'ils pouvaient être également abaissés. Ces expériences ont été réalisées sur un patient, après activation par le LPS (6h) et le BLP (6h et 24h) (**Figure 20**).

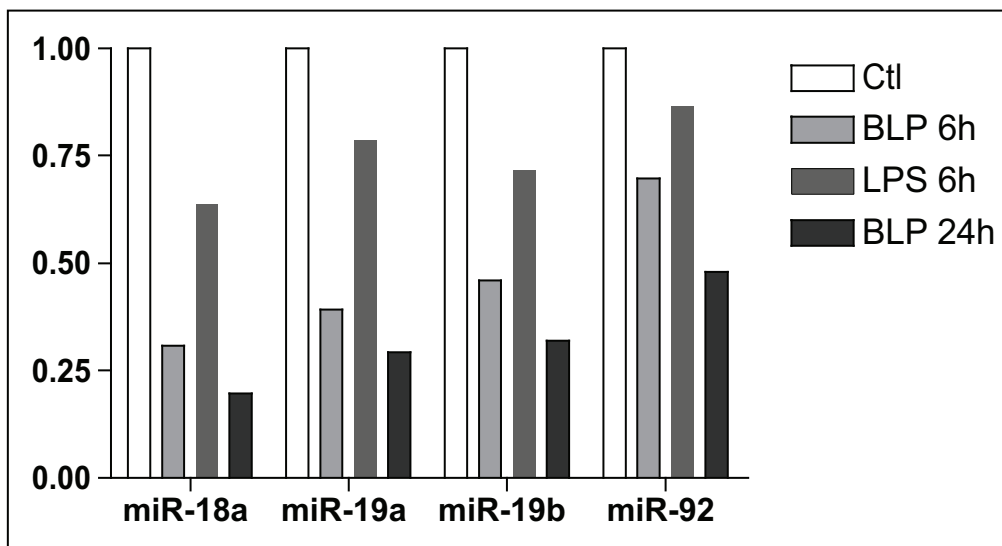


Figure 20 : Expression de miR-18a, miR-19a, miR-19b et miR-92 en réponse au BLP à 6h et 24h et au LPS à 6h.

L'examen de ces expériences tend à indiquer que tous les miARNs, incluant miR-20a sont abaissés en réponse aux ligands de TLR2 et de TLR4.

3. Autres cibles potentielles de miR-20a

Nous avons également cherché à identifier d'autres cibles de miR-20a, susceptibles de jouer un rôle dans la réponse immunitaire innée. En utilisant les sites de prédiction bioinformatiques TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) et MicroCosmTargets Version 5 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) nous avons pu observer qu'Irak4, et Tak1 (MAP3K7) étaient également des cibles possibles. Irak4 et Tak1 font parties des voies de signalisation classiques mises en jeu par la plupart des TLRs sauf TLR3.

Des vecteurs contenant la région 3'-UTR des ARNm de ces deux molécules, couplée au gène de la luciférase ont été construits. Des expériences de transfection dans les cellules HEKGrip nous ont permis de montrer qu'Ask1 est la seule cible directe de miR-20a (**Figure 21**).

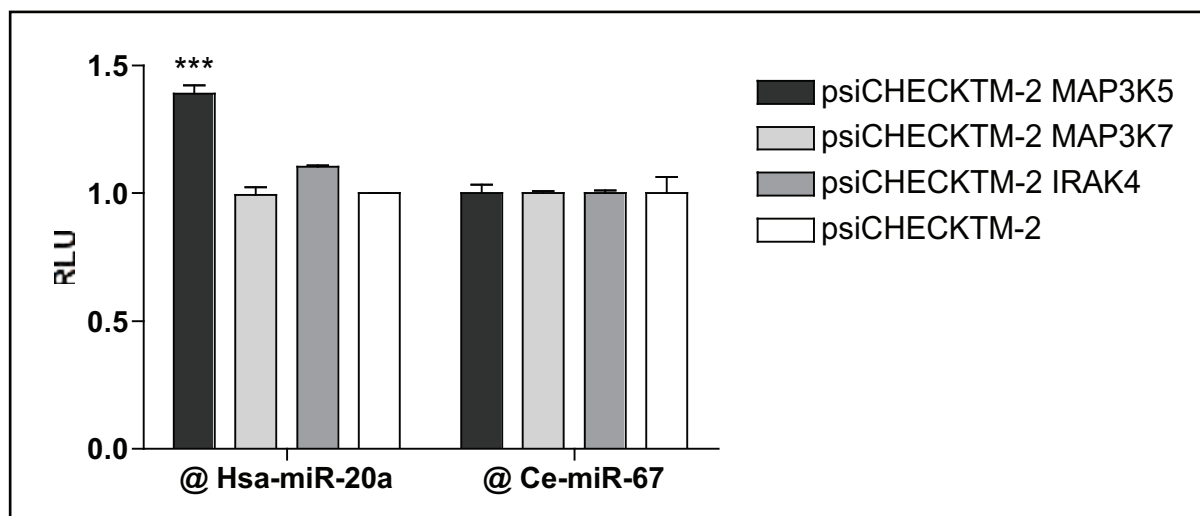


Figure 21. Effet de l'inhibition de miR-20a sur la régulation du gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle de la 3'-UTR d'Ask1 (MAP3K5), Tak1 (MAP3K7) et Irak4 dans des cellules HEKGrip.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

3

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 3...

...ETUDE DU ROLE POTENTIEL DE LA REGULATION DE DNMT1 PAR LES MIARNs DANS LES FLS RHUMATOÏDES

I. INTRODUCTION

1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'addition d'un groupement méthyl sur une cytosine (C) localisée en 5' d'une guanine (G) d'un dinucléotide CpG. On estime que 70 à 80% des dinucléotides CpG du génome sont méthylés. Les dinucléotides CpG non méthylés restants sont le plus souvent localisés à proximité des régions promotrices des gènes dans des clusters denses appelés îlots CpG. Le profil de méthylation d'un îlot CpG est tissu spécifique et permet de moduler l'expression des gènes (Law and Jacobsen, 2010).

L'activité transcriptionnelle d'un gène est inversement proportionnelle au degré de méthylation de son promoteur : les gènes associés aux sites non méthylés sont activement transcrits, la transcription est inhibée lorsque ces sites sont méthylés. Deux mécanismes expliquent cette inhibition : d'une part, la méthylation empêche l'interaction des facteurs de transcription avec leur séquence régulatrice de l'ADN, d'autre part, la reconnaissance des CpG méthylés par des protéines de la famille des MBD (Methyl Cytosine Binding Protein) réprime l'expression des gènes par le recrutement de complexes du remodelage de la chromatine (Jaenisch and Bird, 2003).

La méthylation de l'ADN est réalisée par les DNA méthyltransférases (DNMT), dont il existe 2 grandes classes : les méthylases de maintenance comme DNMT1, permettant le maintien du profil de méthylation au cours de la réplication de l'ADN et les méthylases *de novo* telles que DNMT3a et DNMT3b qui méthylent des sites CpG exempts de toute méthylation. Cependant, ces 2 groupes d'enzymes présentent chacun un certain niveau d'activité de méthylation *de novo* et de maintenance *in vitro* (Jones and Liang, 2009).

La fonction de DNMT1 est de maintenir le profil de méthylation de l'ADN au cours de la réplication de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire (**Figure 22**). En effet, la réplication de l'ADN étant semi-conservative, elle ne conserve pas le profil de méthylation du brin matrice; le brin néosynthétisé n'est donc pas méthylé. Le site hémi-méthylé est reconnu par le domaine SRA (SET or RING-associated domain) de la protéine UHRF1. DNMT1 est recrutée à la fourche de réplication, grâce à ses interactions avec UHRF1 et PCNA. Elle transfère alors un groupement méthyl d'une S-adosylméthionine à une cytosine située dans un dinucléotide CpG non méthylé.

La chromatine adopte alors une conformation fermée suite au recrutement de complexes répresseurs de la chromatine (Law et Jacobsen, 2010).

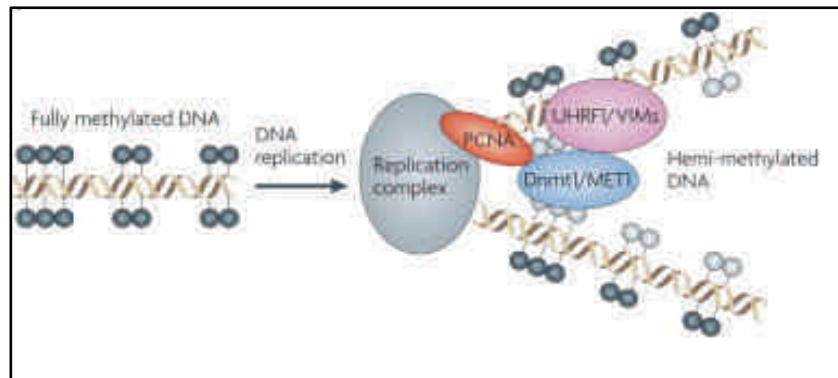


Figure 22 : Maintien de la méthylation de l'ADN au cours de la réplication de l'ADN

DNMT1 est recrutée à la fourche de réplication de PCNA (proliferating cell nuclear antigen) et UHRF1 (ubiquitin-like protein homeodomain and RING finger domain 1) dont le domaine SRA reconnaît spécifiquement l'ADN hémi-méthylé. DNMT1 ajoute alors un groupement méthyle au site spécifique sur le brin néoformé.

La méthylation de l'ADN est impliquée dans diverses fonctions biologiques, notamment dans la régulation de l'expression des gènes pendant le développement, l'établissement de l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X ou encore le silencing des transposons (Jones and Liang, 2009). Les altérations de la méthylation de l'ADN sont responsables d'un défaut d'empreinte génomique (syndrome de Wiedemann-Beckwith) et sont impliqués dans la pathogénie de certains cancers (Esteller, 2008) et de certaines maladies auto-immunes (Teitell and Richardson, 2003).

2. La dérégulation de la méthylation de l'ADN dans la PR

Des études de Karouzakis et al. ont montré que les FLS rhumatoïdes présentent un niveau globalement plus bas de méthylation de l'ADN par rapport aux FLS d'arthrose (Karouzakis et al., 2009b). Cette hypométhylation est associée à une diminution de l'expression de DNMT1. Le traitement de FLS normaux par la 5-azacytidine, inhibiteur des DNMTs, induit une hypométhylation globale et entraîne un profil de FLS rhumatoïdes, associé à la surexpression de nombreux gènes codant des cytokines, des MMPs, des kinases et des facteurs de transcription jouant un rôle majeur dans la PR.

D'autres études ont démontré également le rôle de l'hypométhylation de zones promotrices de certains gènes clés impliqués dans l'inflammation et la destruction de la synoviale. Ainsi Nile et al. ont observé que la présence d'un seul motif CpG non méthylé dans le promoteur du gène de l'IL-6 rend les monocytes rhumatoïdes plus aptes à produire de l'IL-6 en réponse au LPS (Nile et

al., 2008). Des régions promotrices du gène *Cxcl12* sont également hypométhylées dans des FLS de PR (Karouzakis et al., 2011), ce qui permet une augmentation de l'expression de CXCL12 dans les FLS de PR et conduit à l'expression de MMPs. A l'inverse la méthylation du promoteur du gène DR3 (death receptor 3) dans les synoviocytes entraîne une augmentation de la résistance à l'apoptose par la diminution de l'expression de la protéine DR3 (Takami et al., 2006).

L'expression des DNMTs peut-être contrôlée au niveau épigénétique par les miARNs. Dans les LT lupiques, l'ARNm de DNMT1 est ciblé directement par mir-148a et indirectement par mir-21, via RASGRP1, un intermédiaire de la voie Ras-MAPK (Pan et al., 2010). Il a été également montré que l'ARNm de DNMT1 est régulé par miR-126, mir-148a, miR-152 et miR-342 dans diverses lignées cancéreuses (Braconi et al., 2010; Wang et al., 2011a; Zhao et al., 2011). Mir-29b régule directement l'ARNm de DNMT3a et b dans certaines cellules néoplasiques et de façon indirecte DNMT1 par l'intermédiaire de SP1. MiR-143 et miR-148 ciblent également DNMT3a et DNMT3b (Duursma et al., 2008; Fabbri et al., 2007; Garzon et al., 2009; Ng et al., 2009).

Afin d'identifier des mécanismes impliqués dans «l'état d'hypométhylation globale» des FLS rhumatoïdes, nous avons étudié l'expression de l'ARNm des 3 DNMTs catalytiquement actives à l'état basal et après stimulation des cellules par des ligands de TLRs. Nous avons aussi abordé la régulation de leur expression, en recherchant l'existence d'un contrôle post-transcriptionnel des DNMTs par les miARNs.

II. RESULTATS

1. Expression de Dnmt1 dans les FLS

Nous avons étudié l'expression de l'ARNm de DNMT1 par RT-qPCR dans des FLS isolés de 3 patients atteints de PR et de 3 patients atteints d'arthrose (OA) (**Figure 23**). Cette expression de Dnmt1 a été d'abord déterminée dans les FLS rhumatoïdes et comparée à son expression dans des FLS de patients arthrosiques utilisés comme contrôle. Elle a été également déterminée dans les FLS rhumatoïdes ou isolés d'arthrose, après activation par le LPS pendant 6h et 24h. L'examen des résultats obtenus montre une diminution de l'expression de Dnmt1 de l'ordre de 30% dans les FLS rhumatoïdes par rapport aux FLS d'arthrose et ceci en l'absence de toute stimulation (**Figure 23a**).

L'activation par le LPS des FLS de PR pendant 6h et 24h induit une baisse significative de l'expression de Dnmt1 de 30% à 6h et 50% à 24h par rapport au contrôle non activé (**Figure 23b**). Ces résultats indiquent que DNMT1 est abaissée de façon constitutive dans les FLS de PR comparativement aux FLS de patients atteints d'arthrose, cette baisse est induite par la stimulation de TLR4.

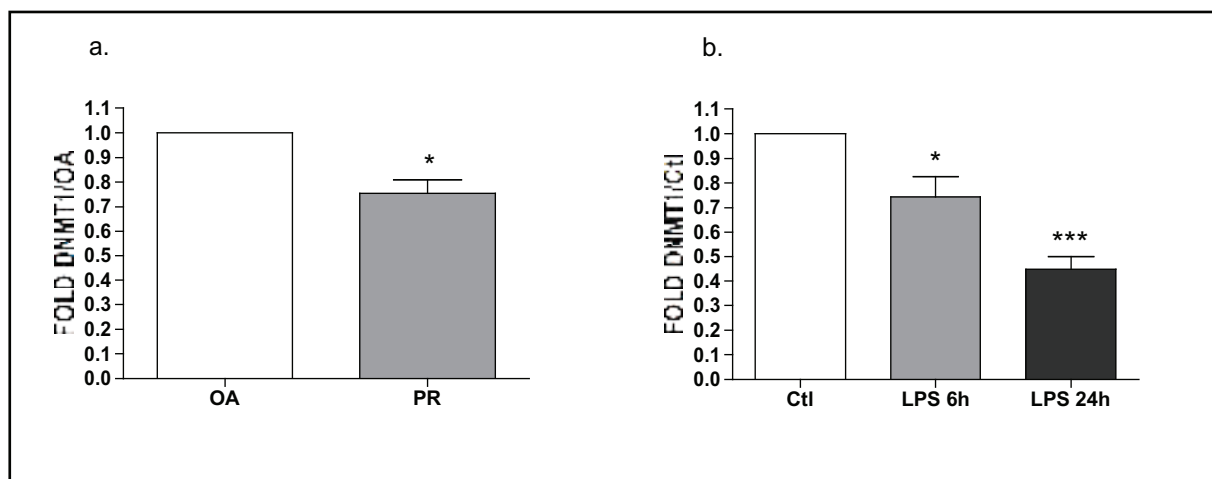


Figure 23 : Expression de l'ARNm de DNMT1 évaluée par RT-qPCR dans les FLS issus de membranes synoviales de patients atteints d'arthrose (OA) ou de PR. a : Expression de Dnmt1 dans les FLS de PR (n=3) comparée à son expression dans les FLS d'OA (n=3), en absence d'activation. **b.** Expression de Dnmt1 dans les FLS rhumatoïdes après activation par le LPS pendant 6h et 24h (n=3), comparativement à son expression dans le contrôle non activé. Les résultats correspondent à la moyenne +/- l'écart type de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$

2. Expression de Dnmt3a et Dnmt3b dans les FLS

DNMT3a et 3b ayant également une activité de méthyltransférases de maintenance, nous nous sommes intéressés à leur expression dans les FLS de PR à l'état basal et après activation (**Figure 24**). L'expression de l'ARNm de DNMT3a et b a été évaluée par RT-qPCR dans les FLS isolés des patients précédents. L'expression de l'ARNm de DNMT3a et b a d'abord été déterminée dans les FLS rhumatoïdes et comparée à leur expression dans les FLS d'arthrose. Elle a été également déterminée dans les FLS rhumatoïdes, après activation par le LPS pendant 6h et 24h et comparée à son expression en l'absence d'activation. Les résultats obtenus montrent que l'expression de Dnmt3a n'est pas modifiée de façon significative dans les FLS de PR, par comparaison aux FLS d'arthrose (**Figure 24a**). L'activation par le LPS pendant 6h et 24h ne modifie pas l'expression de Dnmt3a dans les FLS de PR par rapport au contrôle non activé (**Figure 24b**).

L'ARNm de DNMT3b n'a pas été retrouvée dans nos expériences, que ce soit dans les FLS isolés de PR ou d'arthrose, que les cellules soient activées ou non activées par le LPS.

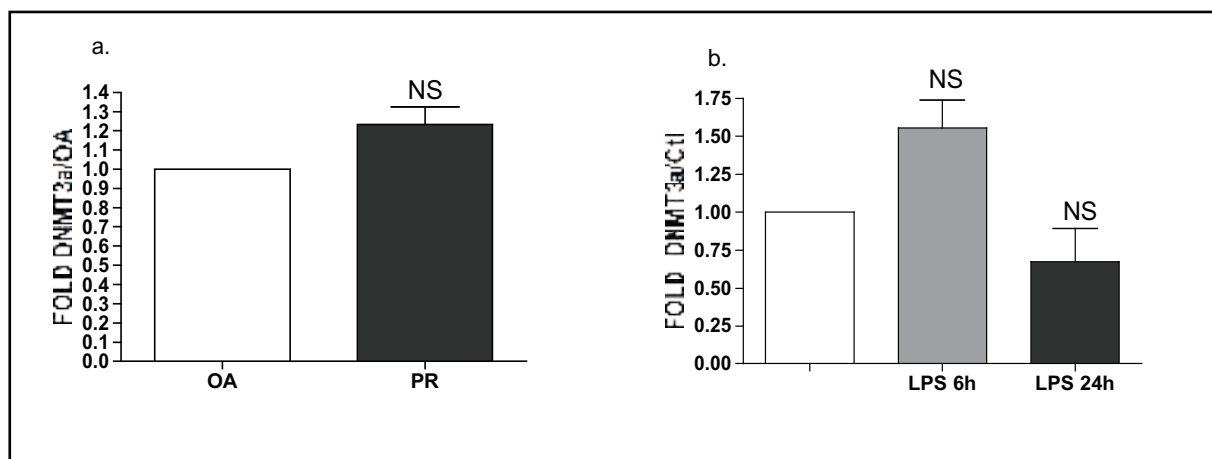


Figure 24 : Expression de l'ARNm de DNMT3A par RT-qPCR dans des FLS issus de PR et d'OA. a. Expression de dnmt3a dans les FLS rhumatoïdes (n=3) comparée à son expression dans les FLS arthrosiques (n=3), en absence d'activation. **b.** Expression de dnmt3a dans les FLS rhumatoïdes après 6h (n=2) et 24h (n=3) d'activation par le LPS, comparativement à son expression dans le contrôle non activé. Les résultats correspondent à la moyenne +/- l'écart type de 3 expériences indépendantes.

NS : non significatif.

3. Les miARNs contrôlent-ils l'expression de DNMT1 ?

DNMT1 est la seule DNA méthyltransférase dont l'expression varie de manière significative dans les FLS rhumatoïdes par rapport aux FLS d'arthrose, et dont la baisse est inducible par l'activation des FLS par le LPS. La régulation de l'expression de DNMT1 est inconnue dans les FLS. Un contrôle post-transcriptionnel direct de l'ARNm de DNMT1 par les miARNs a été démontré dans d'autres maladies auto-immunes, autorisant cette hypothèse dans la PR. DNMT1 étant abaissé dans les FLS, si un miARN cible directement l'ARNm de DNMT1, le miARN candidat doit être surexprimé dans les FLS, avec une surexpression inducible par l'activation de ces cellules. Nous avons sélectionné 5 miARNs : mir-142-5p, mir-148a et b, mir-152 et mir-563, qui étaient prédits cibler directement l'extrémité 3'-UTR de l'ARNm de DNMT1 dans différentes bases de données dont la Sanger database (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Mir-29b a été également étudié car il participe à la régulation de Dnmt1, par l'intermédiaire de Sp1, un facteur de transcription de Dnmt1 (Garzon et al., 2009). Cependant des études préliminaires réalisées par microarray avaient démontré sa baisse en réponse au LPS dans les synoviocytes rhumatoïdes.

L'expression des miARNs a été déterminée par RT-qPCR en l'absence d'activation, dans les FLS rhumatoïdes et comparée à leur expression dans FLS de patients arthrosiques utilisés comme contrôle. Elle a ensuite été déterminée dans les FLS rhumatoïdes activés par le LPS pendant 6h et comparée au contrôle non activé.

L'étude des résultats obtenus et présentés **Figure 25** a montré que:

- mir-142-5p et mir-563 ne sont pas exprimés dans les différents échantillons testés.
- mir-148a, mir-148b et mir-152 ne présentent pas d'expression différentielle quelque soit l'origine des FLS testés (**Figure 25a**) et qu'ils aient été activés ou non (**Figure 25b**).
- mir-29b est présent dans les FLS et son expression est diminuée de près de 40% après activation des cellules par le BLP et le poly I:C et de 50% après activation par LPS, comparativement à son expression dans les cellules non activées utilisées comme contrôle (**Figure 25c**).

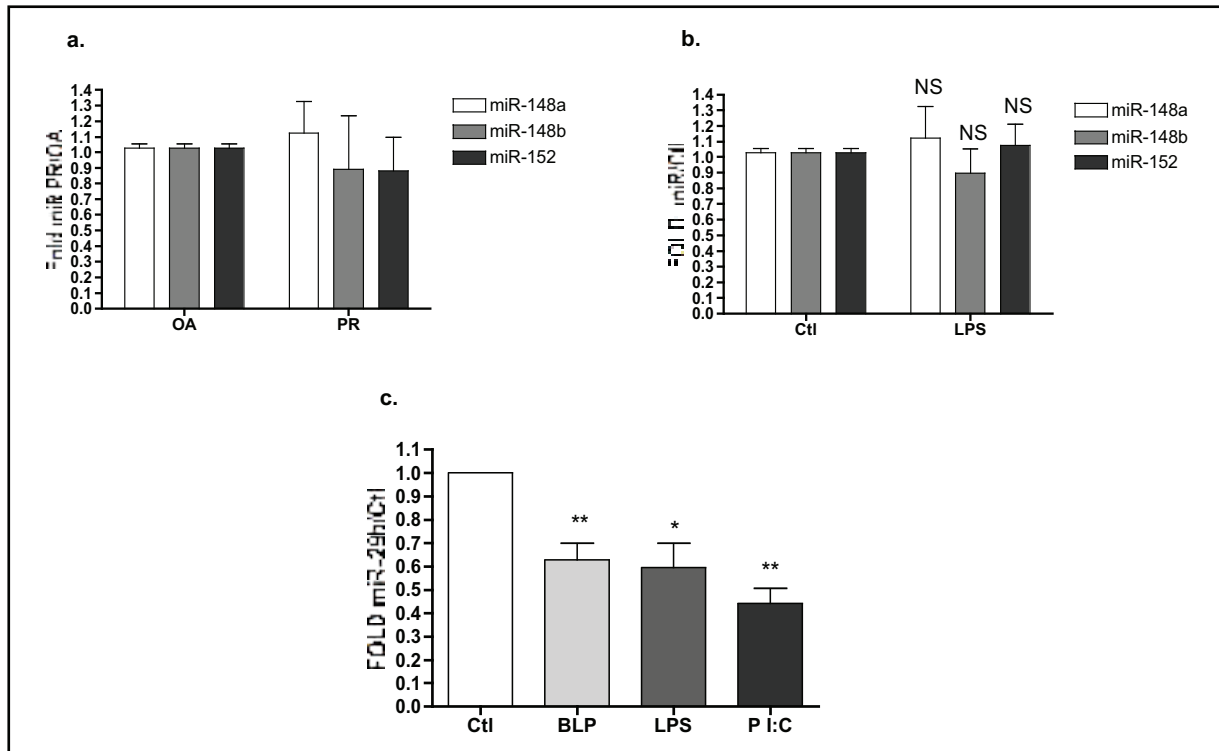


Figure 25 : Expression de mir-148a, mir-148b et mir-152 par qRT-PCR dans les FLS issus de 3 patients OA et PR. a. Expression de mir-148a, mir-148b et mir-152 dans les FLS rhumatoïdes, comparée à leur expression dans les FLS d'OA, en absence d'activation. **b.** Expression de mir-148a, mir-148b et mir-152 dans les FLS rhumatoïdes activés par le LPS pendant 6h, comparée à leur expression dans le contrôle non activé. **c. Expression de mir-29b dans les FLS rhumatoïdes par qRT-PCR dans les FLS rhumatoïdes (n=3)** après activation par le LPS, le poly I:C et le Blp pendant 6h, comparée à son expression dans le contrôle non activé. Les résultats correspondent à la moyenne +/- l'écart type de 3 expériences indépendantes. Les résultats correspondent à la moyenne +/- l'écart type de 3 expériences indépendantes. NS : non significatif * : p<0,05 ; ** : p<0,01, ***: p<0,001.

4. Expression de DNMT1 après inhibition de Dicer

Les résultats obtenus ne nous ayant pas permis de mettre en évidence une modification de l'expression des différents miARN sélectionnés, pouvant expliquer la baisse de Dnmt1 dans les FLS rhumatoïdes à l'état basal et après activation, nous avons utilisé une approche plus globale afin de vérifier l'hypothèse d'un contrôle de l'expression de Dnmt1 par les miARNs. DICER étant une enzyme impliquée dans la maturation des miARNs, nous avons recherché une modification de l'expression de Dnmt1 dans les FLS après inhibition de Dicer. Si Dnmt1 est régulé par un miARN, l'inhibition de Dicer devait augmenter l'expression de Dnmt1.

Les FLS rhumatoïdes ont été transfectés par un siRNA ciblant Dicer, puis activés 48h plus tard par du LPS pendant 24h. L'expression de l'ARNm de DNMT1 a été déterminée par RT-qPCR. L'inhibition de Dicer a été vérifiée dans les FLS (**Figure 26b**).

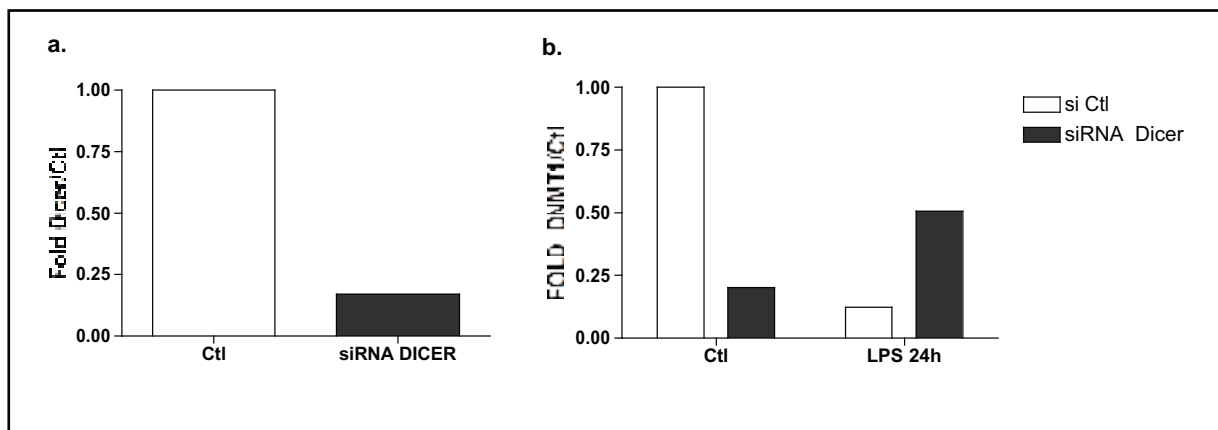


Figure 26 : Expression de Dnmt1 et Dicer par RT-qPCR dans les FLS rhumatoïdes après transfection d'un siRNA ciblant Dicer pendant 48h, puis activation par le LPS pendant 24h (n=1). a. Expression de Dicer dans les FLS après transfection d'un siRNA Dicer, comparée à son expression dans les cellules transfectées par un siRNA contrôle. **b. Expression de Dnmt1 par RT-qPCR dans les FLS rhumatoïdes après transfection d'un siRNA ciblant Dicer pendant 48h, puis activation par le LPS pendant 24h (n=1).**

Comme l'indique la **Figure 26b**, l'inhibition de l'expression de Dicer dans les FLS rhumatoïdes induit une diminution de l'expression de l'ARNm de DNMT1 de l'ordre de 70% dans les FLS transfectés par le siARN ciblant Dicer par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent qu'à l'état basal, les miARNs favorisent l'expression de Dnmt1 dans les FLS rhumatoïdes. Par contre, la stimulation des FLS rhumatoïdes transfectés par un siARN ciblant Dicer, par le LPS induit une augmentation de l'ARNm de DNMT1 par rapport au contrôle. Ceci suggère qu'en réponse au LPS, les miARNs diminuent l'expression de Dnmt1 dans les FLS rhumatoïdes. (**Figure 26b**).

Ces résultats démontrent le rôle potentiel des miARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression de DNMT1.

III. Discussion

La méthylation de l'ADN est un contrôle épigénétique important pouvant participer à la pathogénie de la PR (**Karouzakis et al., 2009a**). Cette étude avait pour objectif d'analyser l'expression et la régulation des 3 DNA méthyltransférases, dans les FLS rhumatoïdes.

Les résultats obtenus ont montré une diminution constitutive de l'expression de l'ARNm de DNMT1 dans les FLS rhumatoïdes comparativement aux FLS arthrosiques. Cette diminution est renforcée après activation par le LPS pendant 6h et 24h.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Karouzakis et al., qui ont étudié l'expression de DNMT1 et son cofacteur PCNA dans les FLS. Ils ont montré une baisse constitutive du ratio DNMT1/PCNA dans les FLS rhumatoïdes comparativement aux FLS issus de patients arthrosiques (Karouzakis et al., 2009b). Après activation par le TNF- α , l'IL-1 β et le PDGF pendant 24h, le ratio DNMT1/PCNA restait significativement abaissé dans les FLS de PR comparativement aux FLS issus de patients atteints d'arthrose.

L'expression de l'ARNm de DNMT3a dans les FLS issus de patients atteints de PR n'est pas modifiée par rapport aux FLS arthrosiques. Nous n'avons pas non plus observé de variation statistiquement significative de son expression après activation des cellules, quelle que soit leur origine. En ce qui concerne Dnmt3b, il n'est pas présent dans les FLS arthrosiques ou rhumatoïdes, à l'état basal ou après activation des cellules. Ces résultats qui tendent à démontrer que les DNMT3 ne jouent pas de rôle dans les FLS, sont cependant en contradiction avec les travaux de Nam et al, qui ont montré qu'un polymorphisme du promoteur du gène de DNMT3b, entraînant une diminution de sa transcription, est associé à une destruction ostéoarticulaire plus sévère et plus rapide au cours de la PR (Nam et al., 2010).

L'expression de Dnmt1 doit être régulée au cours du cycle cellulaire pour que la protéine soit présente au cours de la phase de réplication de l'ADN et réprimée par la suite. Il existe une régulation transcriptionnelle notamment par Sp1 (Liu et al., 2008), AP-1 et la voie Ras-MAPK (Rouleau et al., 1995)), post-transcriptionnelle (déstabilisation de l'ARNm) par AUF1 (Torrisoni et al., 2007), par les miARNs (Braconi et al., 2010; Pan et al., 2010)) et post-traductionnelle (dégradation par l'exosome suite à la méthylation de la protéine (Esteve et al., 2009)), de l'expression de DNMT1.

L'existence d'un contrôle de l'expression de DNMT1 par les miARNs n'est pas connue dans les FLS rhumatoïdes. Nous avons alors recherché une surexpression de plusieurs miARNs prédits cibler Dnmt1 : mir-29b, mir-142-5p, mir-148a et b, mir-152 et mir-563.

Les résultats obtenus n'ont pas montré de modification de l'expression de mir-148a et b et de mir-152 entre les FLS arthrosiques et rhumatoïdes, ni entre l'état activé et le contrôle non activé. Il est donc peu probable que ces 3 miARNs interviennent dans la régulation post-

transcriptionnelle de l'ARNm de DNMT1 dans les FLS rhumatoïdes. Nos résultats diffèrent de ceux de Pan et al. qui avaient retrouvé une surexpression mir-148a et de mir-21 dans les LT issus de patients atteints de lupus systémique, entraînant une diminution de l'expression de DNMT1 (Pan et al., 2010). Braconi et al., avaient également montré une baisse de mir-148a et mir 152, associée à une surexpression de DNMT1, dans une lignée de cellules de cholangiocarcinome (Braconi et al., 2010). La transfection de ces 2 miARNs entraînait une diminution de l'expression de DNMT1. Ces résultats démontrent que l'expression et l'effet des miARNs est souvent cellule spécifique.

Nous avons aussi confirmé que la stimulation des FLS rhumatoïdes pendant 6h par le LPS induit une baisse de mir-29b. L'ARNm de DNMT1 étant également abaissé dans les FLS, il n'est donc pas régulé directement par mir-29b. Garzon et al. ont démontré que la transfection de mir-29b dans des lignées de cellules de leucémie aigue myéloïde entraîne une diminution de l'expression de DNMT1, par l'intermédiaire de la régulation du facteur de transcription SP1 (Garzon et al., 2009). Il serait intéressant d'étudier l'expression de ce facteur dans les FLS.

MiR-142-5p n'est pas présent dans les FLS rhumatoïdes ni à l'état basal ni après activation par le LPS. Nos résultats sont là également en contradiction avec les travaux de Nakamachi et al. (Nakamachi et al., 2009) qui ont montré que ce miARN est surexprimé dans les FLS rhumatoïdes. Mir-563 était sous-exprimé dans le microarray réalisé au laboratoire, mais sa présence n'a pas pu être confirmée par RT-qPCR. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le microarray ait identifié non pas un miARN mature mais une forme prémature de miR-563 ou un de ses paralogues, comme par exemple, miR-380*, le brin passager de miR-380. Le fait que les miARNs* ne soit considérés que récemment comme actifs, pourrait être une raison pour laquelle miR-380* n'ait été retenu dans le microarray.

Afin de vérifier l'hypothèse d'un contrôle de l'expression de DNMT1 par les miARNs, nous avons réalisé une approche plus globale en inhibant Dicer. En effet, DICER est une enzyme cytoplasmique nécessaire à la maturation de la quasi-totalité des pré-miARNs en miARNs matures (Cheloufi et al., 2010; Winter et al., 2009).

Nous avons montré que l'activation des FLS par le LPS entraîne une diminution de l'expression de Dnmt1 en présence de Dicer, et donc en présence de miARNs. Le fait que l'activation par le LPS entraîne une surexpression de DNMT1 en l'absence de Dicer suggère que des miARNs ciblent directement Dnmt1, ou indirectement en inhibant les signaux transcriptionnels ou les contrôles post-transcriptionnels de Dnmt1. L'hypothèse d'un contrôle de DNMT1 par les miARNs semble confirmée, mais il reste à déterminer quels sont les miARNs impliqués dans ce contrôle, et quelles sont leurs cibles exactes.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

4

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 4...

...MIR-29B ET REGULATION DE L' APOPTOSE ET DE LA PROLIFERATION DES FLS DANS LA PR

I. INTRODUCTION

1. MCL1 et c-FOS, marqueurs du caractère prolifératifs des FLS

Les FLS rhumatoïdes expriment de façon constitutive des marqueurs de prolifération, tels c-FOS ou c-JUN (Dooley et al., 1996), c-MYC, le «proliferating cell nuclear antigen» (PCNA) ou le «nucleolar organizer regions» (Qu et al., 1994). En inhibant RAB-1 et c-MYC, Pap et coll. ont, en 2004, montré une réduction de l'invasion et de la prolifération des FLS chez des souris immunodéficientes (souris SCID) (Pap et al., 2004).

Les FLS présentent également une dérégulation de l'apoptose. Concernant la voie extrinsèque, même s'ils disposent de récepteurs spécifiques, les FLS rhumatoïdes semblent moins sensibles à l'apoptose induite par Fas-Ligand, le TNF- α ou le TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) (Korb et al., 2009).

La voie intrinsèque de l'apoptose est également altérée au cours de la PR. L'expression de BCL-2, facteur anti-apoptotique, est induite par le TNF- α et l'IL-1, limitant ainsi les capacités apoptotiques de la cellule en milieu inflammatoire. De plus, l'IL-15, cytokine impliquée dans l'immunité innée et acquise, induit une augmentation de la transcription de Bcl-2 et de Bcl-xL. En bloquant l'IL-15, on observe une diminution de l'expression de BCL-2 et une augmentation de l'apoptose. Enfin, l'IL-17 pourrait avoir un double rôle, induisant la prolifération en permettant l'hyperexpression de Cyr61 (Zhang et al., 2009) et inhibant l'apoptose en favorisant l'expression de BCL-2 (Miossec, 2011).

Mcl-1, gène appartenant à la famille de *Bcl-2*, est également exprimé par les FLS rhumatoïdes activés; son expression est corrélée au degré d'inflammation environnant. La diminution de MCL-1 dans ces fibroblastes induit l'apoptose de ces cellules (Liu et al., 2005a).

2. Le rôle de miR-29b dans l'apoptose

MiR-29b a été mis en évidence dans différentes pathologies tumorales. Il serait principalement impliqué dans les mécanismes de régulation de l'apoptose, en régulant l'expression de MCL-1. Une sous-expression de miR-29b conduirait à l'augmentation de MCL-1 et donc à un défaut d'apoptose, caractéristique des cellules cancéreuses.

Des travaux récents ont mis en évidence une sous-expression de miR-29b et miR-125 au cours du glioblastome, conduisant à une surexpression de *PDPN*, gène codant pour la podolamine, protéine impliquée dans la migration et l'invasion. La normalisation de l'expression de ces 2

miARNs a permis une diminution de l'invasion de la tumeur (Cortez et al., 2010). Une sous-expression de miR-29b a été également mise en évidence au cours des cancers du sein (Iorio et al., 2005), du poumon (Yanaihara et al., 2006), de la prostate (Porkka et al., 2007), du rhabdomyosarcome (Wang et al., 2008b), de la leucémie lymphoïde chronique (Calin et al., 2005; Zhu et al., 2011) et de la leucémie myéloïde chronique (Garzon et al., 2009).

Xiong et al. ont montré une baisse de miR-29b au cours du carcinome hépatocellulaire, associée à une moins bonne évolutivité de la maladie (Xiong et al., 2010). L'introduction de miR-29b a permis une diminution du potentiel tumoral des cellules carcinomateuses. MiR-29b favoriserait ainsi l'apoptose par son action inhibitrice sur Mcl-1 et Bcl-2 (Xiong et al., 2010).

De même, au cours du cholangiocarcinome, l'expression de miR-29b est diminuée dans les cellules tumorales et MCL-1 y est augmenté. Après transfection de miR-29b, on observe une régression de l'expression de MCL-1, ainsi qu'une sensibilisation des cellules tumorales à la cytotoxicité de TRAIL. La transfection d'un antagoniste de miR-29b dans des cellules non tumorales exprimant fortement miR-29b a permis de mettre en évidence une augmentation de MCL-1 et une diminution de la sensibilité de ces cellules à la cytotoxicité de TRAIL (Mott et al., 2010).

La famille du miR-29 permettrait également une augmentation de p53, favorisant l'apoptose par cette voie. Cette augmentation de l'apoptose est corrélée à une diminution de p85alpha (protéine régulant la sous-unité de la PI3Kinase) et CDC42 (GTPase de la famille Rho), molécules inhibant l'apoptose médiée par p53 (Park et al., 2009).

L'ensemble de ces données montre l'implication de miR-29b dans les voies de l'apoptose, sa sous-expression dans divers tissus tumoraux étant associée à une perte des capacités d'apoptose de la cellule.

Au cours de ce travail nous avons essayé d'évaluer le rôle de miR-29b dans l'acquisition du phénotype agressif des synoviocytes et plus particulièrement dans leur survie.

II. Résultats

1. Etude de l'expression de c-Fos et Mcl-1 dans les FLS rhumatoïdes

Selon les prédictions bio-informatiques, miR-29b ciblerait l'ARNm de Mcl-1, facteur anti-apoptotique et de c-Fos, facteur impliqué dans la prolifération cellulaire (**Figure 27**). Mott et coll. (2010) et Xiong et coll. (2010) ont confirmé que l'ARNm Mcl-1 était une cible directe de miR-29b (Mott et al., 2010; Xiong et al., 2010).

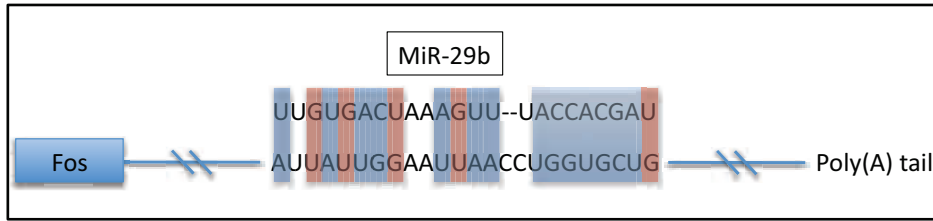


Figure 27 : Site de régulation de miR-29b sur le messager de c-Fos prédit par MicroCosmTargets Version 5.

Nous avons étudié l'expression de Mcl-1 dans les FLS rhumatoïdes issus de 4 patients après activation par le LPS ou le BLP, par RT-qPCR.

L'étude des résultats obtenus montre une augmentation de l'expression de Mcl-1 après activation par le LPS pendant 6h qui diminue après 24h d'activation par le LPS par rapport au contrôle (FLS non activés). L'activation par le BLP augmente l'expression de Mcl-1 après 6h et 24h d'activation (**Figure 28a et 28b**).

L'expression de l'ARNm c-Fos a été évaluée dans les FLS rhumatoïdes de ces 4 patients. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'expression de c-Fos après activation (6 h et 24 h) par le LPS et le BLP par rapport aux FLS non activés (**Figure 28c et 28d**).

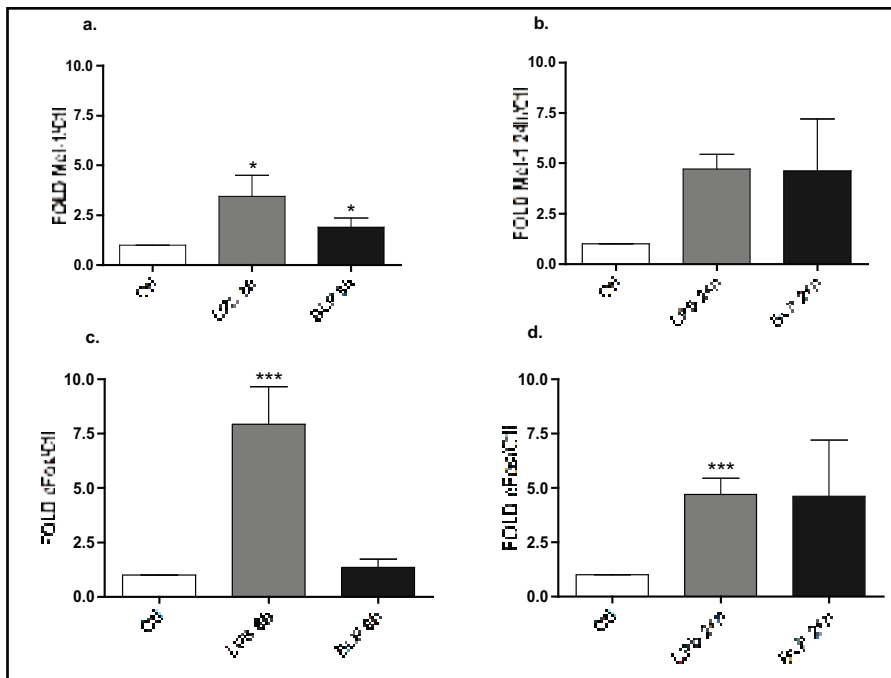


Figure 28 : Expression de l'ARNm, dans les FLS de PR, de Mcl-1 et c-Fos. a et b. Analyse par RT-qPCR de l'expression de Mcl-1 dans les FLS rhumatoïdes non activés et après activation 6h et 24h par le LPS et par le BLP. **c et d.** Analyse par RT-qPCR de l'expression de c-Fos dans les FLS rhumatoïdes non activés et après activation 6h et 24h par le LPS et par le BLP.

Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées à partir de 4 patients. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Ainsi, l'augmentation de l'expression de Mcl-1 et de c-Fos en réponse au LPS s'atténue après 24h d'activation, alors qu'elle augmente lorsque les cellules sont activées par le BLP.

2. Etude de l'apoptose après transfection de miR-29b

Nous avons ensuite voulu déterminer d'une part s'il existait une différence d'apoptose dans les FLS rhumatoïdes à l'état basal et après activation, et d'autre part quel était l'effet sur l'apoptose de la transfection de miR-29b dans ces cellules.

Nous avons comparé l'ADN mono- et oligo-nucléosomal présent dans les FLS rhumatoïdes d'un patient dans diverses conditions :

- FLS non transfectés, activés par du LPS, Fas-ligand ou non activés
- FLS transfectés par miR-29b, activés par du LPS ou non activés
- FLS transfectés par un miR contrôle (siRNA all star, Qiagen), activés par du LPS ou non activés.

Après 16h d'activation, nous avons déterminé par un test ELISA la présence d'ADN mono- et oligo-nucléosomal, témoin de l'apoptose, présent dans les cellules (CellDeath Détection ELISApus).

Comme le montre la **Figure 29a**, dans les FLS rhumatoïdes non transfectés, l'activation par le LPS n'induit pas d'apoptose, contrairement à l'activation par Fas-ligand, molécule stimulant l'apoptose par la voie extrinsèque, utilisée comme témoin positif. En effet, la quantité d'ADN mono- et oligo-nucléosomal double après 16h d'activation par ce ligand dans les cellules non transfectées par rapport au FLS non activés. L'activation par le LPS semble au contraire induire une baisse de l'ADN mono- et oligo-nucléosomal.

La **Figure 29b** représente la quantité d'ADN mono- et oligo-nucléosomal présente dans les FLS rhumatoïdes transfectés par miR-29b ou par le miR contrôle, suivant leur groupe d'activation. Elle montre une augmentation de 1,5 fois de l'ADN mono- et oligo-nucléosomal dans le groupe de FLS transfectés par miR-29b non activés, par rapport au contrôle (FLS transfectés par le miR contrôle et non activés). L'activation par le LPS ne met pas en évidence d'augmentation de l'ADN mono- et oligo-nucléosomal dans les FLS transfectés par miR-29b par rapport au contrôle. Les cellules transfectées par la contrôle présente également une légère baisse d'ADN mono- et oligo-nucléosomal lors de l'activation au LPS. Ainsi, ces premiers résultats indiquent que miR-29b peut induire l'apoptose chez les FLS, mais l'activation au LPS des cellules transfectées par miR-29b semble indiquer également que d'autres mécanismes sont impliqués par l'activation au LPS, étant donné qu'on observe une baisse de l'activité apoptotique dans la condition des cellules transfectées par miR-29b et activées par le LPS (**Figure 29b**).

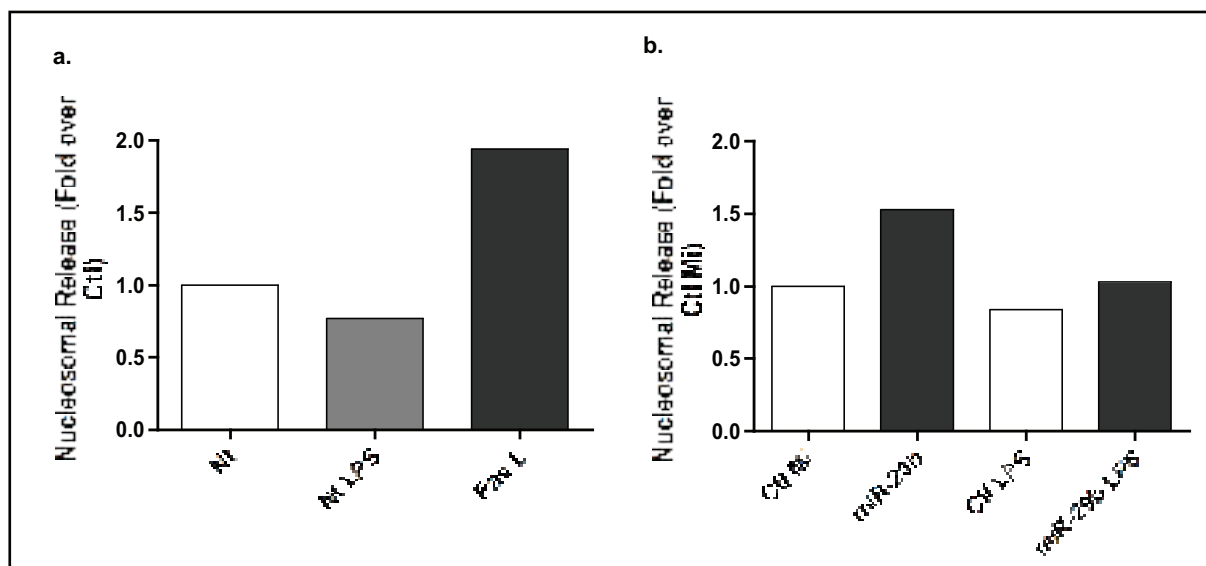


Figure 29 : Etude de l'ADN mono- et oligonucléosomal dans les FLS rhumatoïdes non transfectés ou transfectés par miR-29b. a. Analyse de l'apoptose par détermination de l'ADN mono- et oligo-nucléosomal dans les FLS rhumatoïdes non transfectés (Nt) d'1 patient, non activés ou activés par le LPS ou Fas-Ligand pendant 16h. **b.** Détermination de l'ADN mono- et oligo-nucléosomal par ELISA dans les FLS rhumatoïdes d'1 patient, non activés ou activés par le LPS, après transfection par un miR contrôle (siRNA all Star) ou par miR-29b.

III. Discussion

Au cours de la PR, les FLS rhumatoïdes présentent un phénotype agressif, caractérisé par une sécrétion de cytokines, de chémokines et de métalloprotéases, mais aussi par un défaut d'apoptose et un excès de prolifération, conduisant à une hypertrophie synoviale. Ce caractère presque pseudo-tumoral du FLS, nous a conduits à étudier l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose.

Nous avons dans un premier temps montré qu'il existait une augmentation de l'expression de l'ARNm de c-FOS, facteur de prolifération, et de MCL-1, facteur anti-apoptotique, dans les FLS rhumatoïdes après activation par le LPS et le BLP. Nos résultats sont en accord notamment, avec ceux de Kobayashi et al. montrant une surexpression de MCL-1 dans les cellules de cholangiocarcinome, cellules présentant un défaut d'apoptose (Kobayashi et al., 2005). Nous avons pu constater une augmentation précoce de Mcl-1 et de c-Fos après activation par le LPS, alors qu'elle est plus tardive en réponse au BLP. L'étude de l'expression protéique de c-FOS et de MCL-1 est actuellement en cours.

La perte des capacités d'apoptose des FLS rhumatoïdes est un élément essentiel à leur phénotype agressif. L'activation par Fas-Ligand, activateur de la voie extrinsèque de l'apoptose,

permet l'augmentation d'un facteur 2 de l'ADN mono- et oligo-nucléosomal, caractéristique des cellules entrant en apoptose (Darzynkiewicz and Huang, 2004). Ce résultat est comparable à ceux obtenus par Garcia et al. qui ont étudié la réponse des FLS rhumatoïdes après activation par Fas-Ligand, en utilisant le même kit de détection (Garcia et al., 2010).

Après transfection par miR-29b, l'ADN mono- et oligo-nucléosomal libéré augmente d'1,5 fois dans les FLS rhumatoïdes. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par Xiong et al. après transfection de miR-29b dans des cellules d'hépatocarcinome (Xiong et al., 2010).

Dans cette étude, le LPS n'induit pas d'augmentation de l'apoptose au niveau des FLS rhumatoïdes non transfectés, ce qui confirmerait la résistance à l'apoptose des FLS en milieu inflammatoire. L'activation au LPS semble même conduire à une baisse de l'activité anti-apoptotique. Nous avons observé une baisse miR-29b lors de l'activation des FLS par différents activateurs des TLR. miR-29b ayant été décrit comme un miR-29b pro-apoptotique par son rôle régulateur sur Mcl-1, la baisse de l'expression de ce miARN pourrait expliquer en partie les effets observés sur les cellules non transfectées activées au LPS.

Nous avons constaté une variation opposée de l'expression de miR-29b et de l'ARNm de c-FOS et MCL-1. Les prédictions bio-informatiques (miRBase, Microcosm, TargetScan) fondées, entre autre, sur le degré de complémentarité et l'énergie de liaison entre la « seed sequence » du miARN et la séquence 3'UTR de l'ARNm, ont prédit Mcl-1 et c-Fos comme cibles de miR-29b. Mott et al. ont montré par un rapporteur luciférase que miR-29b ciblait directement la 3'UTR de Mcl-1 (Mott et al., 2010). Les premiers tests luciférase réalisés (**Figure 30**) confirment une possible régulation directe de miR-29b sur la région 3'UTR de c-Fos. Cependant, ces expériences doivent être confirmées et la mutation de la seed séquence doit être réalisée afin de vérifier la spécificité de cette régulation.

c-Fos est une cible très intéressante à étudier car c-Fos/AP-1 contrôle l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de MMPs très importantes dans la pathogénèse de la PR. Parmi les cytokines inflammatoires, l'IL-1 β est un des inducteurs les plus importants des MMPs, responsables de la destruction ostéo-articulaire, le TNF- α ayant également un effet synergique sur ce processus. L'inhibition sélective de c-FOS/AP-1 serait une stratégie prometteuse pour traiter la maladie en plus de l'utilisation maintenant courante d'anti-TNF- α .

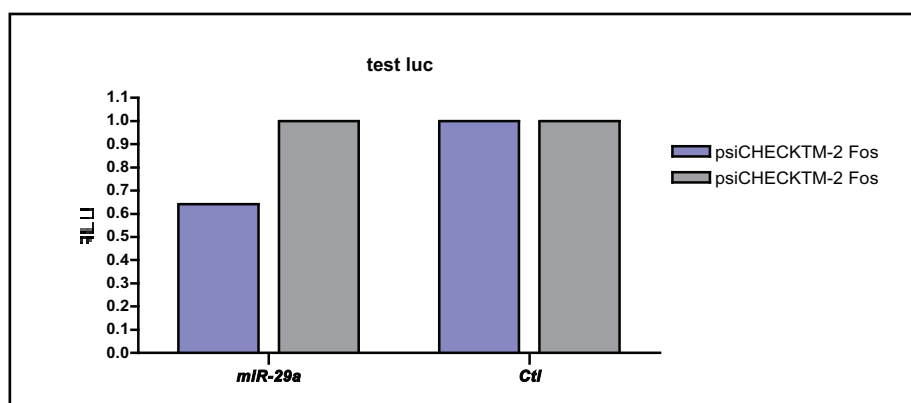


Figure 30. Effet de la transfection de miR-29b sur la régulation du gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle de la 3'UTR de c-Fos dans des cellules HEKGrip.

IV. Matériels et méthodes complémentaires

Etude de l'apoptose

Pour déterminer le degré d'apoptose est utilisé le Cell Death detection ELISApplus (Roche). Les FLS sont activées 48h après transfection, par le LPS ou le BLP. Un groupe de cellule non activées sert de contrôle. Après 16h d'activation, les surnageants sont retirés et conservés à -20°C et les cellules sont lysées par un tampon de lyse fourni par le kit. Après centrifugation (200g, 10 min, température ambiante), 20µL de surnageant sont prélevés pour chaque échantillon et déposés dans un puits pré-recouvert de streptavidine. Une solution contenant, par échantillon, 4µL d'anti-histone biotinyllée, 4µl d'anti-DNA POD et 72 µL de tampon d'incubation est déposé dans chaque puit, et incubé à température ambiante pendant 2h sous agitation douce (300 rpm)

Après lavage, 100µL de 2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonate) (ABTS), utilisé comme substrat, est ajouté. L'incubation est réalisée sous agitation (250 rpm), à l'abri de la lumière, la durée d'incubation étant évaluée selon la coloration du témoin positif (environ 10min). Une fois la réaction arrêtée, la densité optique de chaque échantillon est mesurée par une lecture à 505nm (et 490nm, correspondant à l'absorbance imputable à la plaque). Elle reflète la quantité d'ADN mono- et oligo-nucléosomal présent dans chaque échantillon, témoin de l'apoptose (Darzynkiewicz and Huang, 2004).

Un contrôle positif composé de complexes ADN-histones est fourni dans le kit, un sous-groupe de cellules non transfectées et activées par le Fas-L (100µg/ml), inducteur d'apoptose, sert de contrôle positif. Les contrôles négatifs sont le tampon d'incubation ainsi que les échantillons de cellules non transfectées non activées.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Les premiers travaux réalisés au laboratoire avaient permis de souligner l'importance du rôle joué par la cellule résidente, le synoviocyte dans l'étiopathogénie de la PR et les résultats obtenus avaient également permis de démontrer le rôle des facteurs extrinsèques, cytokines, composants de microorganismes dans l'acquisition du phénotype agressif de ces cellules.

Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'influence que pourraient avoir des facteurs intrinsèques, épigénétiques sur la régulation du phénotype rhumatoïde de la cellule résidente au cours de la PR.

Confirmant des données observées par d'autres auteurs, nous avons montré que les synoviocytes rhumatoïdes surexpriment un PRR de la famille des TLRs, TLR2, qui joue un rôle important dans la réponse inflammatoire synoviale (Ospelt et al., 2008). Il existe plusieurs approches permettant de contrôler l'activation d'un récepteur par son ligand mais l'une des plus efficace reste probablement le contrôle de son expression (O'Neill et al.).

Dans ce cadre, nous avons recherché et identifié 2 miARNs pouvant réguler l'expression de Tlr2 dans les synoviocytes activés par le BLP ou le LPS: miR-19a et miR-19b.

Bien que miR-19a et miR-19b n'induisent pas la déstabilisation de l'ARNm de TLR2, nous avons montré par des tests rapporteurs luciférase que miR-19a et b ciblent directement la séquence 3'UTR de Tlr2. Cette régulation directe a été confirmée au niveau protéique par une diminution de l'expression de TLR2 dans les synoviocytes transfectés par miR19a et miR-19b. Il n'existe que peu de données concernant un ciblage direct des TLRs par des miRNAs. C'est le cas de miR-let-7i et let-7e qui cible Tlr4 et miR-105, Tlr2 (Benakanakere et al., 2009; Chen et al., 2007). Nous n'avons pas pu détecter miR-105 dans les FLS, qui est présent dans de nombreux types cellulaires sous forme de précurseur mais dans peu de cellules sous forme mature (Lee et al., 2008).

De façon intéressante, miR-105 et miR-19 présentent des sites de régulation très proches suggérant que cette région est accessible et conservée *in vivo*. Ces deux sites de régulation ne sont cependant pas conservés chez la souris. Le site de prédiction TargetScan, qui utilise dans ses critères de sélection, la conservation inter-espèce, ne propose que très peu de sites de régulation conservés pour les ARNm de TLR2, 3 et 4. Il est possible que les pressions de sélection concernant la régulation des 3'UTR de ces 3 TLRs par les miARNs aient suivi des voies différentes (O'Neill et al., 2011). En comparant les séquences 3'UTR de Tlr2 humaines et de grands singes disponibles, nous avons cependant pu observer que les 3'UTR de *Pongo abelii* et *Homo sapiens* possédaient 96,58 % de similarité d'après le programme SerialCloner. La séquence « seed » semble même « améliorée » chez *Pongo abelii* car sans « wobble pairing », suite à une insertion de deux nucléotides chez *Pongo abelii* ou une délétion de deux nucléotides chez *Homo sapiens* (Figure 31).

Cet appariement parfait pourrait aboutir à une régulation plus efficace de miR-19 sur Tlr2.

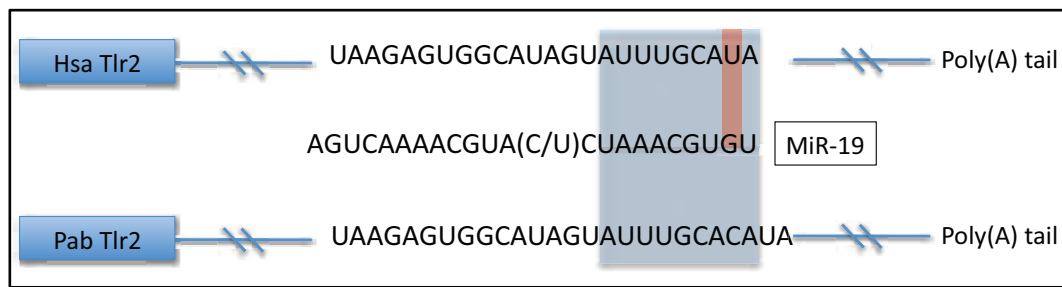


Figure 31. Site de fixation de miR-19 sur la 3'UTR de Tlr2 de l'homme (Hsa) et de l'orang outan (Pab). Le site humain est conservé chez le chimpanzé. Bleu : appariement canonique, rouge : "appariement wobble pairing".

La séquence de régulation de miR-105 est complètement conservée chez ces deux espèces. La séquence 3'UTR de *Pan troglodytes* n'était pas disponible, mais des analyses par "blast" sur le génome du chimpanzé montre que les sites de fixation de miR-19 et miR-105 sont totalement conservés en comparaison avec l'homme.

La différence entre miR-19a et miR-19b réside en un nucléotide en position 11. La plupart des miARNs présentent un mésappariement de 1 à 3 nucléotides des positions 10 à 12. La complémentarité de ces nucléotides ayant été décrite comme nécessaire à l'induction du clivage par AGO2, ce bulge devrait donc plutôt permettre une inhibition de la traduction ou favoriser la dégradation plutôt qu'un clivage direct des ARNm cibles (Carthew and Sontheimer, 2009).

La différence de séquence de miR-19a et miR-19b ne devrait pas jouer au niveau de l'appariement mais pourrait modifier l'énergie de liaison à la cible. La mutation qui a conduit à la génération de miR-19a et de miR-19b n'aurait donc pour conséquence qu'une multiplication de l'expression de miR-19.

Utilisant des amorces spécifiques de chacun des 2 miARNs, nous n'avons pas observé de différences significatives d'expression de miR-19a ou de miR-19b. Nous n'avons pas non plus observé de courbes de fusion aberrantes ni pu différencier leurs effets sur l'expression de l'IL-6 lors des transfections des mimétiques miR-19a et miR-19b dans les FLS rhumatoïdes. Dans les expériences de validation de cible par test de luciférase, il est probable que les nucléotides anti-sens aient hybridé les deux paralogues de miR-19 si l'on considère la position du nucléotide différenciant en milieu de séquence et que l'effet observé résulte de l'inhibition simultanée des 2 miRNAs.

miR-19a est localisé sur un seul locus, miR-19b est présent sur deux loci, le cluster miR-17~92 code pour miR-19b-1, et le cluster miR-106a~363 code pour miR-19b-2. Ni les amorces permettant l'amplification du cluster miR-106a~363 ni les amorces spécifiques du pre-miARN

de miR-19b-2 n'ont permis d'obtenir un amplicon. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs montrant que le cluster miR-106a~363, n'est présent qu'à l'état de trace ou indétectable et ne serait exprimé que lors du développement embryonnaire ou pour palier l'absence du cluster miR-17~92 (Tong et al., 2011; Ventura et al., 2008).

La stimulation des TLRs induit l'expression de nombreux miARNs tels miR-146, miR-155, miR-147 et miR-9 dont certains tels miR-146 et miR-155 ont été clairement impliqués dans l'inflammation. Cependant leurs effets peuvent varier en fonction des modèles étudiés. Ainsi dans le modèle de la souris KB/xN, la surexpression de miR-146 conduit à une prévention de la destruction ostéoarticulaire sans agir sur l'inflammation, alors que la perte de fonction de miR-155 limite la différenciation des ostéoclastes et joue sur l'immunité adaptative. Ces deux miARNs importants dans la réponse inflammatoire semblent pouvoir avoir des propriétés différentes, ce qui rend plus complexe l'étude de leurs effets fonctionnels (Bluml et al., 2011; Nakasa et al., 2008).

Au cours de ce travail, nous avons également pu montrer que miR-19a et miR-19b avaient un rôle anti-inflammatoire dans la mesure où leur transfection inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-6. Mais dans ces conditions leur effet ne va pas dépendre uniquement de leur cible mais également de leur expression. Dans les FLS rhumatoïdes miR-19a et miR-19b présentent une expression diminuée en réponse à la stimulation de TLR2 et TLR4 ce qui permet alors le développement d'une réponse inflammatoire. Des travaux précédents réalisés au laboratoire avaient permis d'identifier un autre miRNA, miR-346, qui présentait également une activité anti-inflammatoire. L'augmentation de son expression dans les FLS rhumatoïdes stimulés par le LPS conduisait dans ce cas à une inhibition de la synthèse de TNF- α et d'IL-18.

Le cluster miR-17~92 dans la PR

Le cluster miR-17~92 est très conservé entre l'homme et la souris et est composé de 6 miARNs dans un transcrite polycistronique codé dans le chromosome 13. Son rôle en ce qui concerne le développement cardio-respiratoire, la spermatogenèse et la différenciation des LB est actuellement très étudié.

Le cluster miR-17~92 est fortement exprimé dans diverses lignées tumorales et dans des cellules telles les cellules HEKGrip utilisées lors des validations de cibles par test luciférase et qui ont un fort caractère prolifératif. Cependant les FLS qui présentent un caractère prolifératif comparé à des FLS d'arthrose ne surexpriment pas ce cluster. Ces données tendent à montrer que dans les FLS rhumatoïdes, ce cluster jouerait un rôle différent et plus particulièrement dans la régulation de la réponse inflammatoire. Nous avons montré que le cluster miR-17~92 présente une diminution de son expression en réponse à l'activation de TLR2 et TLR4 et régule négativement l'expression de Tlr2 et d'Ask1.

Il a été également montré que miR-19 cible Tnf- α , mais ce dernier n'est pas secrété par les FLS. STAT3, qui est impliqué dans la voie de signalisation du récepteur de l'IL-6, est également régulé par miR-17, régulation qui intervient également dans le développement de l'appareil cardio-respiratoire. Le messager de PIAS3 qui est un régulateur négatif de STAT3 est la cible de miR-18. STAT3 est capable de fixer les zones promotrices du cluster miR-17-92, ce qui indique une importante boucle de rétrocontrôle négatif entre STAT3 et le cluster miR-17~92. Enfin, des études menées dans les LT CD4 isolés de la synoviale et du sang périphérique de patients atteints de PR ont montré que miR-363 était sous-exprimé dans ces cellules. Partant du fait que miR-363 est codé par le cluster miR-106a~363 décrit comme très peu exprimé, il est possible que ce soit son paralogue miR-92 qui ait été identifié, compte tenu de leurs similarité en 5' et également en 3' (**Figure 32**).

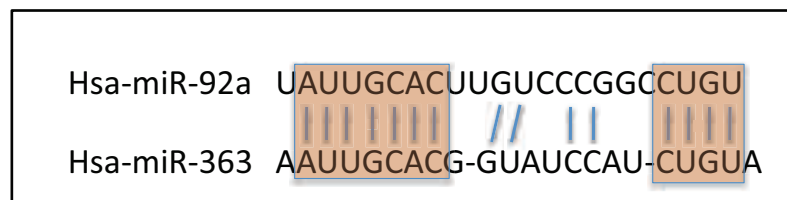


Figure 32. Comparaison entre les paralogues miR-92a et miR-363.

Des études concernant la structure tridimensionnelle du pri-miARN du cluster miR-17~92 ont montré que le cluster forme une structure compacte globulaire dans laquelle est insérée miR-92. Ce qui le rend peu accessible. Ceci expliquerait l'expression différentielle de miR-92 dans les cellules où le cluster miR-17~92 est surexprimé et miR-92 peu exprimé (Chaulk et al., 2011). Au cours de nos études concernant le cluster nous n'avons pas mis en évidence de différence d'expression de miR-92 comparé à celle des autres membres du cluster situés en 5' sur le pri-miARN tels miR-18a, miR-19a ou miR-19b (**Figure 20**).

Régulation de l'expression du cluster miR-17~92 dans la polyarthrite rhumatoïde

Au cours de ce travail, nous n'avons pas étudié les mécanismes impliqués dans la baisse transcriptionnelle du cluster miR-17~92. Les facteurs de transcription STAT3 et c-MYC pourraient intervenir dans cette régulation. Une étude préliminaire réalisée par RT-qPCR, a montré une baisse de c-MYC après 6 h d'activation en réponse au LPS et au BLP dans les FLS et les cellules THP-1. Il serait alors intéressant d'inhiber l'expression de c-MYC et de vérifier son rôle sur l'expression du cluster miR-17~92 et sur la réponse inflammatoire. STAT3 permet également une activation transcriptionnelle du cluster miR-17~92 et STAT3 est également activé en réponse à l'activation du récepteur de l'IL-6. Nous n'avons pas étudié l'expression de Stat3 en réponse au BLP et au LPS dans les FLS et les cellules THP-1. Si effectivement STAT3 permet l'activation de la transcription du cluster miR-17~92, la baisse d'expression de miR-

17~92 devrait être associée à une surexpression de Stat3 du fait de la baisse de l'activité régulatrice de la famille miR-17 sur la traduction de la protéine et permettre alors un rétablissement de l'expression du cluster miR-17~92. Des études plus approfondies sur l'expression de c-MYC et STAT3 devraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la baisse d'expression de miR-19 et miR-20 au cours de la réponse inflammatoire. p53 pourrait également être impliqué dans la régulation de l'expression du cluster miR-17~92 car il inhibe la transcription de ce cluster en se fixant en trans sur les zones promotrices du pri-miARN (Yan et al., 2009). p53 est surexprimé dans les couches bordantes des membranes synoviales rhumatoïdes et dans les FLS rhumatoïdes invasifs (Firestein et al., 1996; Seemayer et al., 2003). Au cours de cette étude nous n'avons pas évalué l'expression de p53 au niveau transcriptomique et protéique en réponse à des ligands de TLRs, une perspective intéressante serait de voir si l'expression de p53 est corrélée à une baisse du cluster miR-17~92 et de ce fait à une hausse de la réponse inflammatoire.

TLR4, une autre cible potentielle des miARNs dans la PR

Ospelt et al. avaient montré que les FLS rhumatoïdes présentent une expression augmentée de TLR4 qui n'est cependant pas modifiée après activation par le LPS (Ospelt et al., 2008). La famille let-7 régule l'expression de TLR4. Les résultats obtenus au laboratoire par microarray avaient montré une diminution de l'expression de let-7a et de let-7e en réponse au LPS alors que le messager de TLR4 n'était pas modulé en réponse au LPS. Il sera intéressant de vérifier si la baisse de let-7a et let-7e suffit à permettre la surexpression de TLR4 dans le contexte inflammatoire de la PR.

Le cluster miR-17~92 et le signalosome ASK1

Afin de vérifier si comme dans la voie du TGF- β , le cluster miR-17~92 pouvait cibler plusieurs gènes d'une même voie, nous avons cherché d'autres cibles potentielles et sélectionné 3 composants des voies TLRs, Irak4, Tak1 et Ask1, prédits ciblés par la famille miR-17. L'utilisation de vecteurs rapporteurs nous ont permis de valider l'ARNm d'*Ask1* comme cible directe de miR-20a. ASK1 est une MAPK impliquée dans les voies de signalisation activées en aval de TLR4 et TNFR1 et permettant la phosphorylation de p38 pour TLR4 et p38 et JNK pour TNFR1. L'activation d'ASK1 nécessite sa dissociation de la thiorédoxine réalisée par des ROS. La production de ROS est dépendante de NOX4, qui est ciblée par miR-92. E2F1 est également une cible validée pour la famille miR-17. Les facteurs E2F1, E2F2, E2F3 et E2F4 sont capables de fixer les régions promotrices du gène d'*Ask1*. Trenkmann et al. ont montré que l'activation des FLS par le TNF- α activait le facteur de transcription E2F, ce qui laisse supposer que l'activation *a minima* de la voie TNF- α pourrait stimuler l'expression d'ASK1 via les facteurs de transcription

E2Fc (Trenkmann et al., 2011). Ainsi, si les cibles E2F2, 3 et 4 ainsi que NOX4 étaient validées, une nouvelle régulation de la voie du signalosome ASK1 par la famille miR-17 pourrait être mise en évidence (**Figure 33**).

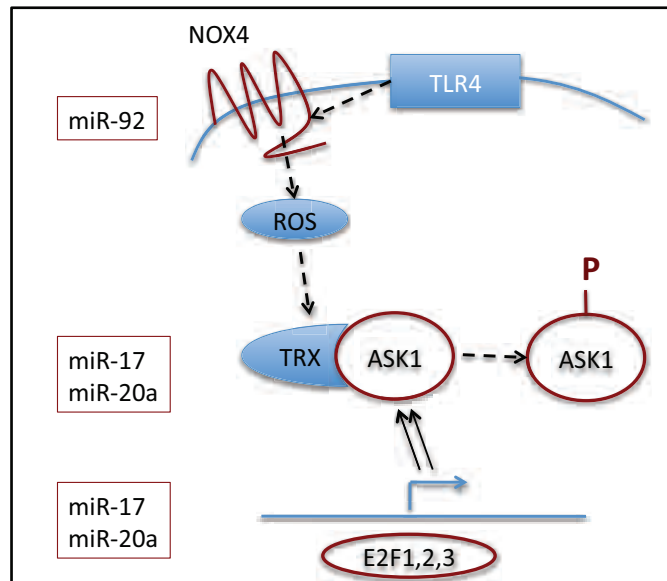


Figure 33 : Schéma de régulation potentielle de la signalisation et l'expression d'ASK1 au niveau post-transcriptionnel.

Le signalosome ASK1 est d'autant plus important qu'il est conservé chez *C. elegans*, et la souris. Le site de fixation de miR-20a est aussi prédit conservé. Si les orthologues d'ASK1 étaient validés pour les autres espèces indiquées par le site TargetScan, nous pourrions alors vérifier un mécanisme important conservé à travers les espèces (**Figure 34**). Dans le cas contraire, il serait intéressant de déterminer les raisons de la conservation de ce site consensus au travers les espèces.

Les perspectives de ces études seront aussi de vérifier l'impact du cluster miR-17~92 sur le signalosome ASK1. La régulation de Nox4 par miR-92 doit être étudiée, ainsi que celle de miR-20a sur les facteurs de transcription E2F1, 2, et 3. Il sera aussi intéressant de vérifier l'expression des facteurs E2F1, 2 et 3 ainsi que NOX4 en réponse au LPS.

Hsa	GAGGAGA-AAGGC-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCAUGUUAA
Mml	GAGGAGA-AAGGC-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCAUGUU---A
Ptr	GAGGAGA-AAGGA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCACGUUAAA
Oga	GAGGAGA-AAGGA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCAUGUU---A
Tbe	GAGGAGGAAAAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCAUGUU----
Mmu	GGAGAGG-GAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUCUUUGUUUACUCGUGUCGCA
Rno	GGCGAGG-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUC-----AACG
Cpo	AAGAAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCUUGUUU----
Ocu	GAGAAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUAAUGUUAAA-
Eeu	GAGGAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAUCCAGUAUUUGUUUACUUGUGUUAAA-
Cfa	GAGGAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUUGUGUUAAA
Fca	--GGAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCGUGUUAAA
Eca	GAGGAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAACCAGUAUUUGUUUACUCAUGUUAAA
Bta	CAGGAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCGUGUUAAA
Dno	AGG-ACA-GAGGC-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCUUGUAUAC
Laf	UGGGAGA-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUAAUGCUGAA
Ete	GAGGAGG-AAGAA-GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUGAUGUUAGG
Mdo	GAGAAGA-AAAAC-CCUGCACUUUAAUCCAGUAUUUGUUUACCAGUGCUGUAAA
Oan	AGGAGAA-AAGAC-ACUGCACUUUAAUCCAGUAUUUGUUUACCAUGUUAGA
Aca	UGUCAAGAAUGCUGUUUACUCUUUAAUCCAGUAUUUGUUUACCA---UAAAG
Gga	UGUCAGA-AGGACUGUUUACUCUUUAAUCCAGUAUUUGUUUACCAUGUUAAA
Xtr	AGAGACA-UG----GCUGGACAUUAAUCCCA----UUGUUUACUAAUGUGAA-
CONSENSUS	GAGGAGA.AAGAA.GCUGCACUUUAAAUCCAGUAUUUGUUUACUCAUGUUAAA

Figure 34. Conservation du site de fixation de la “seed-sequence” de miR-20a, d’après le site de prédiction TargetScan.

Les voies TLR4 et TNFR1 sont à ce jour les seules voies de l’immunité innée à utiliser le signalosome ASK1. Dans cette étude, nous avons montré que miR-20a permet l’inhibition de la traduction d’ASK1 sans influencer la stabilité de son messenger et ce, par fixation directe par sur une séquence consensus de la 3’UTR d’ASK1 qui est très conservée. De façon intéressante, ASK2, un paralogue d’ASK1 proche dans sa structure et sa fonction mais divergeant en ce qui concerne les voies de signalisation induites n’est pas régulé par les membres du cluster miR-17~92.

L’inhibition d’ASK1 par miR-20a entraîne une inhibition de la sécrétion de cytokines telles l’IL-6 ou CXCL10, cytokines pro-inflammatoires qui jouent un rôle important dans l’inflammation au cours de la PR. Ce rôle anti-inflammatoire de miR-20a a été également observé *in vivo* dans un modèle de stimulation par le LPS. Les résultats obtenus en utilisant des polymères de pyridylthiourée-polyéthylènimine (π PEI) comme système de délivrance du miR-20a *in vivo* ont montré que l’injection intra-péritonéale d’un mimique de miR-20a, permettait une forte expression de miR-20a et bloquait la synthèse d’IL-6 par les macrophages péritoneaux de souris traités par le LPS. Ces expériences constituent une étape préliminaire dans l’étude de l’effet *in vivo* de miR-20a dans un modèle d’arthrite expérimentale (arthrite induite par le collagène, arthrite induite par l’injection de sérum de souris K/BxN). Ces expériences sont possibles dans la mesure où le site de fixation de miR-20a est conservé chez la souris.

La suite de ces travaux *in vivo* reposera également sur l'étude de souris KO conditionnelles pour le cluster miR-17~92 ou pour la famille miR-17 pour l'étude du signalosome ASK1. La souris KO conditionnelle pour le cluster miR-17~92 est disponible mais la souris KO conditionnelle pour la famille miR-17 devra être produite. L'induction de la délétion du cluster miR-17~92 ou de miR-17 et miR-20a se fera par recombinaison Cre-Lox après injection de tamoxifène dans les articulations de souris. Nous vérifierons les effets sur l'induction de l'arthrite. Ces études seront comparées à celles réalisées chez des souris surexprimant miR-20a. Il serait aussi intéressant de vérifier si l'absence du cluster miR-17~92 est compensée par l'expression du cluster miR-106a-363, comme l'ont montré Tong et al. dans la spermatogénèse (Tong et al., 2011).

L'étude de l'impact de miR-19 *in vivo* est plus complexe à évaluer dans la mesure où la régulation de miR-19 sur Tlr2 n'est pas présente chez la souris. Elle sera réalisée dans le modèle de la souris HuRA-SCID et seront étudiés le comportement inflammatoire des FLS ainsi que la destruction de cartilages articulaire humains. Ces études permettraient de vérifier l'effet anti-inflammatoire de miR-19a et miR-19b.

Le ciblage d'ASK1 en stratégie thérapeutique

ASK1 est une MAPK impliquée dans le cycle cellulaire et l'immunité innée et est associée à un nombre important de pathologies (Takeda et al., 2008). L'identification d'un nouveau mode de régulation post-transcriptionnelle de miR-20a sur Ask1 pourrait ainsi fournir une nouvelle approche dans le contrôle des réponses inflammatoires dépendantes d'ASK1. Dans des modèles expérimentaux d'arthrites, l'inhibition d'ASK1 est associée à une diminution de l'arthrite induite par le sérum de souris K/BxN ou par le collagène chez le rat (Mnich et al., 2010; Terauchi et al., 2005).

Nous avons montré que miR-20 inhibe la phosphorylation de p38 dans des FLS rhumatoïdes activés au LPS. p38 joue un rôle important dans le développement des arthrites et constitue une cible thérapeutique intéressante. Cependant, son application en clinique est limitée par de nombreux effets secondaires indésirables.

Le fait que la transfection de miR-20a inhibe dans les FLS la sécrétion d'IL-6 et de CXCL-10 et dans les macrophages la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α uniquement en réponse au LPS et non au BLP constitue en effet une opportunité pour limiter les effets secondaires liés à l'inhibition de p38.

miR-20a intervient dans la régulation du cycle cellulaire dans les tumeurs, en inhibant l'inhibiteur d'induction d'entrée en phase G1 en réprimant Cdkn1a (Wang et al., 2011b). De plus, il inhibe également l'expression de STAT3 et par ce biais contre les effets cellulaires myéloïdes suppressives lors de la croissance tumorale par un faible niveau de STAT3 (Zhang et al., 2011). Enfin, miR-20a inhibe les gènes d'activation des lymphocytes T sous-exprimés dans le

transcriptome de patients souffrant de la sclérose multiple. miR-20a peut donc jouer des rôles positifs sur l'inhibition de l'activation des cellules T ou l'inhibition de l'immunité innée dans le cadre de la pathogénèse de la PR, mais également des effets néfastes par exemple sur le caractère prolifératif des FLS, par l'inhibition de Cdkn1a. Le ciblage thérapeutique des cellules actrices de la PR est donc un challenge pour l'administration des miARNs, qui pourrait être envisagé par injection localisée des complexes π PEI. Des études de l'impact sur la prolifération cellulaire peuvent également être menées sur des FLS de PR surexprimant le cluster miR-17~92 sur divers passages.

Autre cible potentielle de la régulation des voies MAPKs dans la pathogénèse de la PR

La voie des MAPKs dans l'immunité innée pourrait être une bonne cible thérapeutique dans la mesure où elle permet d'atténuer le déclenchement de l'immunité innée sans la supprimer de manière drastique. Nous avons montré que miR-29b était abaissé en réponse au BLP, au LPS et au poly (I :C) dans des FLS de PR. Les prévisions informatiques montrent un site conservé pour Dusp2, une MAPK phosphatase qui semble être très importante dans la polyarthrite rhumatoïde. A l'inverse des autres MAPK phosphatases, dont la déficience rend les souris plus sensibles à l'induction d'arthrite, les souris KO pour DUSP2 présente une plus grande résistance à l'induction d'arthrite (Jeffrey et al., 2006). La baisse de miR-29b, à l'instar de miR-19 pour Tlr2 et miR-20a pour Ask1, pourrait accompagner la réponse inflammatoire par une levée de l'inhibition de Dusp2. Nous pourrions ainsi voir si une surexpression de miR-29b peut exercer un effet protecteur dans modèle murin d'arthrite.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A., Koenders, M.I., Devesa, I., Roelofs, M.F., Radstake, T.R., Heuvelmans-Jacobs, M., Akira, S., Nicklin, M.J., Ribeiro-Dias, F., *et al.* (2008). Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* 118, 205-216.

Abraham, S.M., Lawrence, T., Kleiman, A., Warden, P., Medghalchi, M., Tuckermann, J., Saklatvala, J., and Clark, A.R. (2006). Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J Exp Med* 203, 1883-1889.

Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z.J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26, 3214-3226.

Agarwal, S., Misra, R., and Aggarwal, A. (2010). Induction of metalloproteinases expression by TLR ligands in human fibroblast like synoviocytes from juvenile idiopathic arthritis patients. *Indian J Med Res* 131, 771-779.

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., and White, M.F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275, 9047-9054.

Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2008). TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20, 420-425.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Aleman, L.M., Doench, J., and Sharp, P.A. (2007). Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA* 13, 385-395.

Alsaleh, G., Messer, L., Semaan, N., Boulanger, N., Gottenberg, J.E., Sibia, J., and Wachsmann, D. (2007). BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. *Arthritis Rheum* 56, 3202-3214.

Alsaleh, G., Suffert, G., Semaan, N., Juncker, T., Frenzel, L., Gottenberg, J.E., Sibia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2009). Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* *182*, 5088-5097.

An, H., Hou, J., Zhou, J., Zhao, W., Xu, H., Zheng, Y., Yu, Y., Liu, S., and Cao, X. (2008). Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat Immunol* *9*, 542-550.

An, H., Xu, H., Zhang, M., Zhou, J., Feng, T., Qian, C., Qi, R., and Cao, X. (2005). Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism. *Blood* *105*, 4685-4692.

Ananieva, O., Darragh, J., Johansen, C., Carr, J.M., McIlrath, J., Park, J.M., Wingate, A., Monk, C.E., Toth, R., Santos, S.G., *et al.* (2008). The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* *9*, 1028-1036.

Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., Margioris, A.N., Tsihchlis, P.N., and Tsatsanis, C. (2009). The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* *31*, 220-231.

Ashwell, J.D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* *6*, 532-540.

B

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* *122*, 553-563.

Baltimore, D., Boldin, M.P., O'Connell, R.M., Rao, D.S., and Taganov, K.D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* *9*, 839-845.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.

Barton, G.M., Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 7, 49-56.

Baumberger, N., and Baulcombe, D.C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11928-11933.

Bazzoni, F., Rossato, M., Fabbri, M., Gaudiosi, D., Mirolo, M., Mori, L., Tamassia, N., Mantovani, A., Cassatella, M.A., and Locati, M. (2009). Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5282-5287.

Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313.

Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., and Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77, 817-827.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., and Izaurralde, E. (2006). MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 523-530.

Benakanakere, M.R., Li, Q., Eskan, M.A., Singh, A.V., Zhao, J., Galicia, J.C., Stathopoulou, P., Knudsen, T.B., and Kinane, D.F. (2009). Modulation of TLR2 protein expression by miR-105 in human oral keratinocytes. *J Biol Chem* 284, 23107-23115.

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., *et al.* (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37, 766-770.

Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H., and Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120, 21-24.

Bhoj, V.G., and Chen, Z.J. (2009). Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458, 430-437.

Blank, J.L., Gerwins, P., Elliott, E.M., Sather, S., and Johnson, G.L. (1996). Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *J Biol Chem* 271, 5361-5368.

Blumli, S., Bonelli, M., Niederreiter, B., Puchner, A., Mayr, G., Hayer, S., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., Smolen, J., and Redlich, K. (2011). Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 63, 1281-1288.

Braconi, C., Huang, N., and Patel, T. (2010). MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology* 51, 881-890.

Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* 44, 120-133.

Brint, E.K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A.N., O'Neill, L.A., and Liew, F.Y. (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 5, 373-379.

Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R.E., Gay, S., Speich, R., and Huber, L.C. (2011). MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes. *J Biol Chem* 286, 40142-40150.

Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S., Fischler, M., Ulrich, S., Speich, R., and Huber, L.C. (2009). Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res* 104, 1184-1191.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190.

Brondello, J.M., Pouyssegur, J., and McKenzie, F.R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286, 2514-2517.

Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., and Arditi, M. (2001). Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* 167, 987-994.

Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Muller, S., Sobott, F., Parker, S.A., Zhang, H., Min, W., Turk, B.E., *et al.* (2007). Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1. *Structure* 15, 1215-1226.

Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J., and Volpe, F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2, 346-351.

Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., and Tschopp, J. (2003). Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 197, 263-268.

C

Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., *et al.* (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353, 1793-1801.

Cao, W., Bao, C., Padalko, E., and Lowenstein, C.J. (2008). Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *J Exp Med* 205, 1491-1503.

Carraro, G., El-Hashash, A., Guidolin, D., Tiozzo, C., Turcatel, G., Young, B.M., De Langhe, S.P., Bellusci, S., Shi, W., Parnigotto, P.P., *et al.* (2009). miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial branching morphogenesis through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution. *Dev Biol* 333, 238-250.

Carrick, D.M., Lai, W.S., and Blakeshear, P.J. (2004). The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 6, 248-264.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.

Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P.N., and Bowie, A.G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 7, 1074-1081.

Ceppi, M., Pereira, P.M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M.A., and Pierre, P. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2735-2740.

Cha, G.H., Kim, S., Park, J., Lee, E., Kim, M., Lee, S.B., Kim, J.M., Chung, J., and Cho, K.S. (2005). Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10345-10350.

Chang, M., Jin, W., and Sun, S.C. (2009). Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol* 10, 1089-1095.

Chatzikyriakidou, A., Voulgari, P.V., Georgiou, I., and Drosos, A.A. (2010). A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine* 77, 411-413.

Chaulk, S.G., Thede, G.L., Kent, O.A., Xu, Z., Gesner, E.M., Veldhoen, R.A., Khanna, S.K., Goping, I.S., MacMillan, A.M., Mendell, J.T., *et al.* (2011). Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol* 8, 1105-1114.

Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584-589.

Chen, P., Li, J., Barnes, J., Kokkonen, G.C., Lee, J.C., and Liu, Y. (2002). Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* 169, 6408-6416.

Chen, X.M., Splinter, P.L., O'Hara, S.P., and LaRusso, N.F. (2007). A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem* 282, 28929-28938.

Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K., and Tsuruo, T. (1999). ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* *18*, 173-180.

Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* *447*, 823-828.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.

Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., and Flavell, R.A. (2006). Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2274-2279.

Chi, H., and Flavell, R.A. (2008). Acetylation of MKP-1 and the control of inflammation. *Sci Signal* *1*, pe44.

Chiang, E., Dang, O., Anderson, K., Matsuzawa, A., Ichijo, H., and David, M. (2006). Cutting edge: apoptosis-regulating signal kinase 1 is required for reactive oxygen species-mediated activation of IFN regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *J Immunol* *176*, 5720-5724.

Chibon, F., Mariani, O., Derre, J., Mairal, A., Coindre, J.M., Guillou, L., Sastre, X., Pedeutour, F., and Aurias, A. (2004). ASK1 (MAP3K5) as a potential therapeutic target in malignant fibrous histiocytomas with 12q14-q15 and 6q23 amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* *40*, 32-37.

Choe, J.Y., Crain, B., Wu, S.R., and Corr, M. (2003). Interleukin 1 receptor dependence of serum transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. *J Exp Med* *197*, 537-542.

Chuang, T.H., and Ulevitch, R.J. (2004). Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* *5*, 495-502.

Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., *et al.* (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694-1698.

Cloonan, N., Brown, M.K., Steptoe, A.L., Wani, S., Chan, W.L., Forrest, A.R., Kolle, G., Gabrielli, B., and Grimmond, S.M. (2008). The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol* 9, R127.

Coban, C., Igari, Y., Yagi, M., Reimer, T., Koyama, S., Aoshi, T., Ohata, K., Tsukui, T., Takeshita, F., Sakurai, K., *et al.* (2010). Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* 7, 50-61.

Coornaert, B., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2009). A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem* 284, 8217-8221.

Cortez, M.A., Nicoloso, M.S., Shimizu, M., Rossi, S., Gopisetty, G., Molina, J.R., Carlotti, C., Jr., Tirapelli, D., Neder, L., Brassesco, M.S., *et al.* (2010). miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 981-990.

Costinean, S., Sandhu, S.K., Pedersen, I.M., Tili, E., Trotta, R., Perrotti, D., Ciarlariello, D., Neviani, P., Harb, J., Kauffman, L.R., *et al.* (2009). Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood* 114, 1374-1382.

Cremer, T.J., Ravneberg, D.H., Clay, C.D., Piper-Hunter, M.G., Marsh, C.B., Elton, T.S., Gunn, J.S., Amer, A., Kanneganti, T.D., Schlesinger, L.S., *et al.* (2009). MiR-155 induction by *F. novicida* but not the virulent *F. tularensis* results in SHIP down-regulation and enhanced pro-inflammatory cytokine response. *PLoS One* 4, e8508.

Cromartie, W.J., Craddock, J.G., Schwab, J.H., Anderle, S.K., and Yang, C.H. (1977). Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med* 146, 1585-1602.

Curtale, G., Citarella, F., Carissimi, C., Goldoni, M., Carucci, N., Fulci, V., Franceschini, D., Meloni, F., Barnaba, V., and Macino, G. (2010). An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood* 115, 265-273.

Czech, B., and Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 12, 19-31.

D

Dahiya, Y., Pandey, R.K., and Sodhi, A. (2011). Nod2 downregulates TLR2/1 mediated IL1beta gene expression in mouse peritoneal macrophages. *PLoS One* 6, e27828.

Dai, R., and Ahmed, S.A. (2011). MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 157, 163-179.

Daniels, S.M., Melendez-Pena, C.E., Scarborough, R.J., Daher, A., Christensen, H.S., El Far, M., Purcell, D.F., Laine, S., and Gatignol, A. (2009). Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Mol Biol* 10, 38.

Darzynkiewicz, Z., and Huang, X. (2004). Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al] Chapter 5, Unit 5 7.*

Deng, G.M., Nilsson, I.M., Verdrengh, M., Collins, L.V., and Tarkowski, A. (1999). Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 5, 702-705.

Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

Dews, M., Fox, J.L., Hultine, S., Sundaram, P., Wang, W., Liu, Y.Y., Furth, E., Enders, G.H., El-Deiry, W., Schelter, J.M., *et al.* (2010). The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res* 70, 8233-8246.

Dickinson, R.J., and Keyse, S.M. (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci* 119, 4607-4615.

Diehl, G.E., Yue, H.H., Hsieh, K., Kuang, A.A., Ho, M., Morici, L.A., Lenz, L.L., Cado, D., Riley, L.W., and Winoto, A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* 21, 877-889.

Ding, X.C., and Grosshans, H. (2009). Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* 28, 213-222.

Dooley, S., Herlitzka, I., Hanselmann, R., Ermis, A., Henn, W., Remberger, K., Hopf, T., and Welter, C. (1996). Constitutive expression of c-fos and c-jun, overexpression of ets-2, and reduced expression of metastasis suppressor gene nm23-H1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 55, 298-304.

Dunne, A., and O'Neill, L.A. (2003). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003, re3.

Duursma, A.M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C., and Agami, R. (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* 14, 872-877.

E

Eacker, S.M., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2009). Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 10, 837-841.

Engels, B.M., and Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25, 6163-6169.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358, 1148-1159.

Esteve, P.O., Chin, H.G., Benner, J., Feehery, G.R., Samaranayake, M., Horwitz, G.A., Jacobsen, S.E., and Pradhan, S. (2009). Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5076-5081.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.

F

Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., *et al.* (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung

cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15805-15810.

Firestein, G.S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.

Firestein, G.S., Nguyen, K., Aupperle, K.R., Yeo, M., Boyle, D.L., and Zvaifler, N.J. (1996). Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 149, 2143-2151.

Firestein, G.S., and Zvaifler, N.J. (2002). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 46, 298-308.

Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., and Roth, J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 81, 28-37.

Fontana, L., Fiori, M.E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., *et al.* (2008). Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One* 3, e2236.

Franklin, C.C., Srikanth, S., and Kraft, A.S. (1998). Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3014-3019.

Frasnelli, M.E., Tarussio, D., Chobaz-Peclat, V., Busso, N., and So, A. (2005). TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* 7, R370-379.

Fujii, K., Goldman, E.H., Park, H.R., Zhang, L., Chen, J., and Fu, H. (2004). Negative control of apoptosis signal-regulating kinase 1 through phosphorylation of Ser-1034. *Oncogene* 23, 5099-5104.

Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T., and Koyasu, S. (2002). PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol* 3, 875-881.

Fulci, V., Scappucci, G., Sebastiani, G.D., Giannitti, C., Franceschini, D., Meloni, F., Colombo, T., Citarella, F., Barnaba, V., Minisola, G., *et al.* (2010). miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 71, 206-211.

G

Gabhann, J.N., Higgs, R., Brennan, K., Thomas, W., Damen, J.E., Ben Larbi, N., Krystal, G., and Jefferies, C.A. (2010). Absence of SHIP-1 results in constitutive phosphorylation of tank-binding kinase 1 and enhanced TLR3-dependent IFN-beta production. *J Immunol* 184, 2314-2320.

Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F.J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 206, 1983-1994.

Gantier, M.P., Sadler, A.J., and Williams, B.R. (2007). Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol* 85, 458-462.

Garcia, S., Liz, M., Gomez-Reino, J.J., and Conde, C. (2010). Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage. *Arthritis Res Ther* 12, R33.

Garlanda, C., Riva, F., Polentarutti, N., Buracchi, C., Sironi, M., De Bortoli, M., Muzio, M., Bergottini, R., Scanziani, E., Vecchi, A., *et al.* (2004). Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3522-3526.

Garzon, R., Heaphy, C.E., Havelange, V., Fabbri, M., Volinia, S., Tsao, T., Zanesi, N., Kornblau, S.M., Marcucci, G., Calin, G.A., *et al.* (2009). MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 114, 5331-5341.

Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-79.

Goh, F.G., Piccinini, A.M., Krausgruber, T., Udalova, I.A., and Midwood, K.S. (2010). Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J Immunol* 184, 2655-2662.

Goldman, E.H., Chen, L., and Fu, H. (2004). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation. *J Biol Chem* 279, 10442-10449.

Goodridge, H.S., and Underhill, D.M. (2008). Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb Exp Pharmacol*, 87-109.

Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., and Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8115-8119.

Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32, D109-111.

Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6, 961-967.

H

Hacker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006, re13.

Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., *et al.* (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204-207.

Hammer, M., Mages, J., Dietrich, H., Servatius, A., Howells, N., Cato, A.C., and Lang, R. (2006). Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med* 203, 15-20.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.

Harada, C., Nakamura, K., Namekata, K., Okumura, A., Mitamura, Y., Iizuka, Y., Kashiwagi, K., Yoshida, K., Ohno, S., Matsuzawa, A., *et al.* (2006). Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress-induced neural cell apoptosis in vivo. *Am J Pathol* 168, 261-269.

Hasegawa, M., Fujimoto, Y., Lucas, P.C., Nakano, H., Fukase, K., Nunez, G., and Inohara, N. (2008). A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J* 27, 373-383.

Hashimoto, Y., Niikura, T., Chiba, T., Tsukamoto, E., Kadowaki, H., Nishitoh, H., Yamagishi, Y., Ishizaka, M., Yamada, M., Nawa, M., *et al.* (2003). The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2-terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 889-902.

Hatai, T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H., and Takeda, K. (2000). Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem* 275, 26576-26581.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.

Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P., Lao, K., O'Carroll, D., Das, P.P., Tarakhovskiy, A., Miska, E.A., *et al.* (2008). MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 3, e1738.

Hayashi, T., Gray, C.S., Chan, M., Tawatao, R.I., Ronacher, L., McGargill, M.A., Datta, S.K., Carson, D.A., and Corr, M. (2009). Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2764-2769.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65, 9628-9632.

He, Y., Zhang, W., Zhang, R., Zhang, H., and Min, W. (2006). SOCS1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation. *J Biol Chem* 281, 5559-5566.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J.F., Floyd, R.A., and Butterfield, D.A. (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3270-3274.

Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* 32, 276-284.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.

Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., *et al.* (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433, 523-527.

Hossain, A., Kuo, M.T., and Saunders, G.F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* 26, 8191-8201.

Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., An, H., Wang, Z., and Cao, X. (2009). MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol* 183, 2150-2158.

Hu, J.H., Chen, T., Zhuang, Z.H., Kong, L., Yu, M.C., Liu, Y., Zang, J.W., and Ge, B.X. (2007). Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cell Signal* 19, 393-400.

Huang, G., Shi, L.Z., and Chi, H. (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 48, 161-169.

Huang, Q., Yang, J., Lin, Y., Walker, C., Cheng, J., Liu, Z.G., and Su, B. (2004a). Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 5, 98-103.

Huang, S., Shu, L., Easton, J., Harwood, F.C., Germain, G.S., Ichijo, H., and Houghton, P.J. (2004b). Inhibition of mammalian target of rapamycin activates apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling by suppressing protein phosphatase 5 activity. *J Biol Chem* 279, 36490-36496.

Huber, L.C., Brock, M., Hemmatazad, H., Giger, O.T., Moritz, F., Trenkmann, M., Distler, J.H., Gay, R.E., Kolling, C., Moch, H., *et al.* (2007). Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56, 1087-1093.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.L., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16961-16966.

Hwang, J.R., Zhang, C., and Patterson, C. (2005). C-terminus of heat shock protein 70-interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 10, 147-156.

1

Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.

Iliopoulos, D., Malizos, K.N., Oikonomou, P., and Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* 3, e3740.

Imoto, K., Kukidome, D., Nishikawa, T., Matsuhisa, T., Sonoda, K., Fujisawa, K., Yano, M., Motoshima, H., Taguchi, T., Tsuruzoe, K., *et al.* (2006). Impact of mitochondrial reactive oxygen species and apoptosis signal-regulating kinase 1 on insulin signaling. *Diabetes* 55, 1197-1204.

Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., *et al.* (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65, 7065-7070.

Irvine, D.V., Zaratiegui, M., Tolia, N.H., Goto, D.B., Chitwood, D.H., Vaughn, M.W., Joshua-Tor, L., and Martienssen, R.A. (2006). Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Science* 313, 1134-1137.

Iwami, K.I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikacharoen, T., and Yoshikai, Y. (2000). Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 165, 6682-6686.

Izumi, Y., Kim, S., Yoshiyama, M., Izumiya, Y., Yoshida, K., Matsuzawa, A., Koyama, H., Nishizawa, Y., Ichijo, H., Yoshikawa, J., *et al.* (2003). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in injured artery and its critical role in neointimal hyperplasia. *Circulation* 108, 2812-2818.

Izumi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Yoshiyama, M., Omura, T., Shiota, M., Matsuzawa, A., Yukimura, T., Murohara, T., Takeya, M., Ichijo, H., *et al.* (2005). Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1877-1883.

Izumiya, Y., Kim, S., Izumi, Y., Yoshida, K., Yoshiyama, M., Matsuzawa, A., Ichijo, H., and Iwao, H. (2003). Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res* 93, 874-883.

J

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 245-254.

Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-1274.

Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., and Beyaert, R. (2002). Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 12, 467-471.

Jazdzewski, K., Murray, E.L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D.R., and de la Chapelle, A. (2008). Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7269-7274.

Jeffrey, K.L., Brummer, T., Rolph, M.S., Liu, S.M., Callejas, N.A., Grumont, R.J., Gillieron, C., Mackay, F., Grey, S., Camps, M., *et al.* (2006). Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol* 7, 274-283.

Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., and Mackay, C.R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 6, 391-403.

Jiang, S., Li, C., Olive, V., Lykken, E., Feng, F., Sevilla, J., Wan, Y., He, L., and Li, Q.J. (2011). Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood* 118, 5487-5497.

Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., and Lee, J.O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071-1082.

Jin, W., Chang, M., Paul, E.M., Babu, G., Lee, A.J., Reiley, W., Wright, A., Zhang, M., You, J., and Sun, S.C. (2008). Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest* 118, 1858-1866.

Johnston, M., and Hutvagner, G. (2011). Posttranslational modification of Argonautes and their role in small RNA-mediated gene regulation. *Silence* 2, 5.

Jones, P.A., and Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10, 805-811.

Jones, S.W., Watkins, G., Le Good, N., Roberts, S., Murphy, C.L., Brockbank, S.M., Needham, M.R., Read, S.J., and Newham, P. (2009). The identification of differentially expressed microRNA in

osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 464-472.

Joosten, L.A., Koenders, M.I., Smeets, R.L., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M.M., Takeda, K., Akira, S., Lubberts, E., van de Loo, F.A., and van den Berg, W.B. (2003). Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 171, 6145-6153.

Jopling, C.L., Schutz, S., and Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 4, 77-85.

K

Kadowaki, H., Nishitoh, H., Urano, F., Sadamitsu, C., Matsuzawa, A., Takeda, K., Masutani, H., Yodoi, J., Urano, Y., Nagano, T., *et al.* (2005). Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ* 12, 19-24.

Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125, 943-955.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9, 361-368.

Kajava, A.V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol* 277, 519-527.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649-661.

Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H., and Bazenet, C.E. (2000). Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol Cell Biol* 20, 196-204.

Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.G., and Lee, J.O. (2009). Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31, 873-884.

Kanzler, H., Barrat, F.J., Hessel, E.M., and Coffman, R.L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13, 552-559.

Kariya, S., Hirano, M., Nagai, Y., Furiya, Y., Fujikake, N., Toda, T., and Ueno, S. (2005). Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches. *J Mol Neurosci* 25, 165-169.

Karouzakis, E., Gay, R.E., Gay, S., and Neidhart, M. (2009a). Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Nat Rev Rheumatol* 5, 266-272.

Karouzakis, E., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S., and Neidhart, M. (2009b). DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 60, 3613-3622.

Karouzakis, E., Rengel, Y., Jungel, A., Kolling, C., Gay, R.E., Michel, B.A., Tak, P.P., Gay, S., Neidhart, M., and Ospelt, C. (2011). DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Genes Immun* 12, 643-652.

Kawagoe, T., Takeuchi, O., Takabatake, Y., Kato, H., Isaka, Y., Tsujimura, T., and Akira, S. (2009). TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nat Immunol* 10, 965-972.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7, 131-137.

Kawai, T., and Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 1-20.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.

Kherrouche, Z., Blais, A., Ferreira, E., De Launoit, Y., and Monte, D. (2006). ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) is a direct E2F target gene. *Biochem J* 396, 547-556.

Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J., *et al.* (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130, 906-917.

Kim, J.Y., Omori, E., Matsumoto, K., Nunez, G., and Ninomiya-Tsuji, J. (2008). TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J Biol Chem* 283, 137-144.

Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 376-385.

Kinjo, I., Hanada, T., Inagaki-Ohara, K., Mori, H., Aki, D., Ohishi, M., Yoshida, H., Kubo, M., and Yoshimura, A. (2002). SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* 17, 583-591.

Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.

Kobayashi, S., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2005). Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 128, 2054-2065.

Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725-732.

Koenders, M.I., Devesa, I., Marijnissen, R.J., Abdollahi-Roodsaz, S., Boots, A.M., Walgreen, B., di Padova, F.E., Nicklin, M.J., Joosten, L.A., and van den Berg, W.B. (2008). Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum* 58, 3461-3470.

Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., *et al.* (2008). Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 132, 860-874.

Korb, A., Pavenstadt, H., and Pap, T. (2009). Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 14, 447-454.

Krutzfeldt, J., and Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab* 4, 9-12.

Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2, 717-726.

Kutuzov, M.A., Andreeva, A.V., and Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2005). Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by polyamine levels via protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 280, 25388-25395.

Kyburz, D., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Gay, R.E., Carson, D.A., and Gay, S. (2003). Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum* 48, 642-650.

Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.

ℒ

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., Cao, W., Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., *et al.* (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564-569.

Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11, 204-220.

Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005). IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138-1143.

LeBouder, E., Rey-Nores, J.E., Rushmere, N.K., Grigorov, M., Lawn, S.D., Affolter, M., Griffin, G.E., Ferrara, P., Schiffrin, E.J., Morgan, B.P., *et al.* (2003). Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 171, 6680-6689.

Lee, E.J., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D.J., Nuovo, G.J., and Schmittgen, T.D. (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 14, 35-42.

Lee, E.K., Kang, S.M., Paik, D.J., Kim, J.M., and Youn, J. (2005). Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS. *Int Immunol* 17, 325-333.

Lee, I., Ajay, S.S., Yook, J.I., Kim, H.S., Hong, S.H., Kim, N.H., Dhanasekaran, S.M., Chinnaiyan, A.M., and Athey, B.D. (2009). New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 19, 1175-1183.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.

Li, X., and Carthew, R.W. (2005). A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 123, 1267-1277.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.

Lin, Y., Choksi, S., Shen, H.M., Yang, Q.F., Hur, G.M., Kim, Y.S., Tran, J.H., Nedospasov, S.A., and Liu, Z.G. (2004). Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 279, 10822-10828.

Lin, Y.W., Chuang, S.M., and Yang, J.L. (2003). ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 278, 21534-21541.

Lin, Y.W., and Yang, J.L. (2006). Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *J Biol Chem* 281, 915-926.

Lindenblatt, C., Schulze-Osthoff, K., and Totzke, G. (2009). IkappaBzeta expression is regulated by miR-124a. *Cell Cycle* 8, 2019-2023.

Liu, B., Yang, Y., Chernishof, V., Loo, R.R., Jang, H., Tahk, S., Yang, R., Mink, S., Shultz, D., Bellone, C.J., *et al.* (2007a). Proinflammatory stimuli induce IKK α -mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell* 129, 903-914.

Liu, H., Eksarko, P., Temkin, V., Haines, G.K., 3rd, Perlman, H., Koch, A.E., Thimmapaya, B., and Pope, R.M. (2005a). Mcl-1 is essential for the survival of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 175, 8337-8345.

Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., and Kyriakis, J.M. (2000). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol* 20, 2198-2208.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.

Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, Parker, R., and Hannon, G.J. (2005b). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7, 1261-1266.

Liu, M., Wang, Z., Yang, S., Zhang, W., He, S., Hu, C., Zhu, H., Quan, L., Bai, J., and Xu, N. (2011). TNF- α is a novel target of miR-19a. *Int J Oncol* 38, 1013-1022.

Liu, Q., Wilkins, B.J., Lee, Y.J., Ichijo, H., and Molkentin, J.D. (2006). Direct interaction and reciprocal regulation between ASK1 and calcineurin-NFAT control cardiomyocyte death and growth. *Mol Cell Biol* 26, 3785-3797.

Liu, S., Liu, Z., Xie, Z., Pang, J., Yu, J., Lehmann, E., Huynh, L., Vukosavljevic, T., Takeki, M., Klisovic, R.B., *et al.* (2008). Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by interfering with Sp1/NF- κ B-dependent DNA methyltransferase activity in acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 2364-2373.

Liu, Y., and Min, W. (2002). Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res* 90, 1259-1266.

Liu, Y., Shepherd, E.G., and Nelin, L.D. (2007b). MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* 7, 202-212.

Lodish, H.F., Zhou, B., Liu, G., and Chen, C.Z. (2008). Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol* 8, 120-130.

Loiarro, M., Ruggiero, V., and Sette, C. (2010). Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. *Mediators Inflamm* 2010, 674363.

Lu, Y., Thomson, J.M., Wong, H.Y., Hammond, S.M., and Hogan, B.L. (2007). Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Dev Biol* 310, 442-453.

Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9667-9672.

M

Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G., and Beninati, C. (2009). Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 587-594.

Manning, A.M., and Davis, R.J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2, 554-565.

Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., *et al.* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764-1767.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.

Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., and Kuroki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 8, 124.

Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D.M., Kumagai, Y., Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H., *et al.* (2009). Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* 458, 1185-1190.

Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K., and Ichijo, H. (2005). ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 6, 587-592.

McCoy, C.E., Sheedy, F.J., Qualls, J.E., Doyle, S.L., Quinn, S.R., Murray, P.J., and O'Neill, L.A. (2010). IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J Biol Chem* 285, 20492-20498.

McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J., and Lefkowitz, R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-1577.

McInnes, I.B., and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365, 2205-2219.

Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 115, 407-417.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.

Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.

Mendell, J.T. (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 133, 217-222.

Meng, L., Zhu, W., Jiang, C., He, X., Hou, W., Zheng, F., Holmdahl, R., and Lu, S. (2010). Toll-like receptor 3 upregulation in macrophages participates in the initiation and maintenance of pristane-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 12, R103.

Mestas, J., and Hughes, C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* *172*, 2731-2738.

Mestdagh, P., Bostrom, A.K., Impens, F., Fredlund, E., Van Peer, G., De Antonellis, P., von Stedingk, K., Ghesquiere, B., Schulte, S., Dews, M., *et al.* (2010). The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell* *40*, 762-773.

Midwood, K., Sacre, S., Piccinini, A.M., Inglis, J., Trebault, A., Chan, E., Drexler, S., Sofat, N., Kashiwagi, M., Orend, G., *et al.* (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* *15*, 774-780.

Miossec, P. (2011). Interleukin-17 and Th17 cells: from adult to juvenile arthritis--now it is serious! *Arthritis Rheum* *63*, 2168-2171.

Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2006). A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* *126*, 1203-1217.

Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2005). Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* *19*, 2837-2848.

Mnich, S.J., Blanner, P.M., Hu, L.G., Shaffer, A.F., Happa, F.A., O'Neil, S., Ukairo, O., Weiss, D., Welsh, E., Storer, C., *et al.* (2010). Critical role for apoptosis signal-regulating kinase 1 in the development of inflammatory K/BxN serum-induced arthritis. *Int Immunopharmacol* *10*, 1170-1176.

Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H., and Ichijo, H. (2001). Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J* *20*, 6028-6036.

Mott, J.L., Kurita, S., Cazanave, S.C., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Fernandez-Zapico, M.E. (2010). Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *J Cell Biochem* *110*, 1155-1164.

Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Muller-Ladner, U., Ospelt, C., Gay, S., Distler, O., and Pap, T. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 9, 223.

Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., and Nakamura, T. (2010). Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R86.

N

Nagata, Y., Kiefer, F., Watanabe, T., and Todokoro, K. (1999). Activation of hematopoietic progenitor kinase-1 by erythropoietin. *Blood* 93, 3347-3354.

Nagata, Y., Nakasa, T., Mochizuki, Y., Ishikawa, M., Miyaki, S., Shibuya, H., Yamasaki, K., Adachi, N., Asahara, H., and Ochi, M. (2009). Induction of apoptosis in the synovium of mice with autoantibody-mediated arthritis by the intraarticular injection of double-stranded MicroRNA-15a. *Arthritis Rheum* 60, 2677-2683.

Nahid, M.A., Pauley, K.M., Satoh, M., and Chan, E.K. (2009). miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem* 284, 34590-34599.

Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. (2003). 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.

Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., Seki, E., Sato, S., Takeuchi, O., Takeda, K., *et al.* (2002). SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 17, 677-687.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Nakamachi, Y., Kawano, S., Takenokuchi, M., Nishimura, K., Sakai, Y., Chin, T., Saura, R., Kurosaka, M., and Kumagai, S. (2009). MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 1294-1304.

Nakamura, C., Matsushita, I., Kosaka, E., Kondo, T., and Kimura, T. (2008). Anti-arthritic effects of combined treatment with histone deacetylase inhibitor and low-intensity ultrasound in the presence of microbubbles in human rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)* 47, 418-424.

Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., and Asahara, H. (2008). Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 58, 1284-1292.

Nam, E.J., Kim, K.H., Han, S.W., Cho, C.M., Lee, J., Park, J.Y., and Kang, Y.M. (2010). The -283C/T polymorphism of the DNMT3B gene influences the progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 30, 1299-1303.

Newman, M.A., Thomson, J.M., and Hammond, S.M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* 14, 1539-1549.

Ng, E.K., Tsang, W.P., Ng, S.S., Jin, H.C., Yu, J., Li, J.J., Rocken, C., Ebert, M.P., Kwok, T.T., and Sung, J.J. (2009). MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer* 101, 699-706.

Niimoto, T., Nakasa, T., Ishikawa, M., Okuhara, A., Izumi, B., Deie, M., Suzuki, O., Adachi, N., and Ochi, M. (2010). MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord* 11, 209.

Nile, C.J., Read, R.C., Akil, M., Duff, G.W., and Wilson, A.G. (2008). Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 2686-2693.

Nishida, K., Komiyama, T., Miyazawa, S., Shen, Z.N., Furumatsu, T., Doi, H., Yoshida, A., Yamana, J., Yamamura, M., Ninomiya, Y., *et al.* (2004). Histone deacetylase inhibitor suppression of

autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum* 50, 3365-3376.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by O'Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7113-7118.

O

O'Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7113-7118.

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.

O'Neill, L.A., Sheedy, F.J., and McCoy, C.E. (2011). MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 11, 163-175.

Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., and Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208-211.

Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130, 89-100.

Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.J., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and He, L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev* 23, 2839-2849.

Orom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30, 460-471.

Osada, H., and Takahashi, T. (2011). let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci* 102, 9-17.

Osaka, N., Takahashi, T., Murakami, S., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Fujiwara, T., Aburatani, H., Moriyama, K., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. *J Cell Biol* 176, 903-909.

Ospelt, C., Brentano, F., Rengel, Y., Stanczyk, J., Kolling, C., Tak, P.P., Gay, R.E., Gay, S., and Kyburz, D. (2008). Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 3684-3692.

Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64, 3087-3095.

Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26, 3203-3213.

P

Palsson-McDermott, E.M., Doyle, S.L., McGettrick, A.F., Hardy, M., Husebye, H., Banahan, K., Gong, M., Golenbock, D., Espevik, T., and O'Neill, L.A. (2009). TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol* 10, 579-586.

Pan, W., Zhu, S., Yuan, M., Cui, H., Wang, L., Luo, X., Li, J., Zhou, H., Tang, Y., and Shen, N. (2010). MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 184, 6773-6781.

Panayi, G.S., Lanchbury, J.S., and Kingsley, G.H. (1992). The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35, 729-735.

Pap, T., Nawrath, M., Heinrich, J., Bosse, M., Baier, A., Hummel, K.M., Petrow, P., Kuchen, S., Michel, B.A., Gay, R.E., *et al.* (2004). Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 2794-2802.

Park, H.S., Jung, H.Y., Park, E.Y., Kim, J., Lee, W.J., and Bae, Y.S. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* *173*, 3589-3593.

Park, S.Y., Lee, J.H., Ha, M., Nam, J.W., and Kim, V.N. (2009). miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 23-29.

Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J* *23*, 4727-4737.

Pauley, K.M., Cha, S., and Chan, E.K. (2009). MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* *32*, 189-194.

Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* *10*, R101.

Peng, J., Yuan, Q., Lin, B., Panneerselvam, P., Wang, X., Luan, X.L., Lim, S.K., Leung, B.P., Ho, B., and Ding, J.L. (2010). SARM inhibits both TRIF- and MyD88-mediated AP-1 activation. *Eur J Immunol* *40*, 1738-1747.

Perlman, H., Georganas, C., Pagliari, L.J., Koch, A.E., Haines, K., 3rd, and Pope, R.M. (2000). Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol* *164*, 5227-5235.

Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* *21*, 533-542.

Pichiorri, F., Suh, S.S., Ladetto, M., Kuehl, M., Palumbo, T., Drandi, D., Taccioli, C., Zanesi, N., Alder, H., Hagan, J.P., *et al.* (2008). MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 12885-12890.

Pillai, R.S., Artus, C.G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* *10*, 1518-1525.

Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 9, 738-748.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.

Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., Vessella, R.L., Tammela, T.L., and Visakorpi, T. (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 67, 6130-6135.

Q

Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J. (2005). Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol Cell* 19, 421-428.

Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J., and Hannon, G.J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443, 1008-1012.

Qin, J., Yao, J., Cui, G., Xiao, H., Kim, T.W., Fraczek, J., Wightman, P., Sato, S., Akira, S., Puel, A., *et al.* (2006). TLR8-mediated NF-kappaB and JNK activation are TAK1-independent and MEKK3-dependent. *J Biol Chem* 281, 21013-21021.

Qu, Z., Garcia, C.H., O'Rourke, L.M., Planck, S.R., Kohli, M., and Rosenbaum, J.T. (1994). Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* 37, 212-220.

R

Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.

Roelofs, M.F., Joosten, L.A., Abdollahi-Roodsaz, S., van Lieshout, A.W., Sprong, T., van den Hoogen, F.H., van den Berg, W.B., and Radstake, T.R. (2005). The expression of toll-like receptors 3 and 7

in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 52, 2313-2322.

Roelofs, M.F., Wenink, M.H., Brentano, F., Abdollahi-Roodsaz, S., Oppers-Walgreen, B., Barrera, P., van Riel, P.L., Joosten, L.A., Kyburz, D., van den Berg, W.B., *et al.* (2009). Type I interferons might form the link between Toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). *Ann Rheum Dis* 68, 1486-1493.

Rouleau, J., MacLeod, A.R., and Szyf, M. (1995). Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 270, 1595-1601.

Rowe, D.C., McGettrick, A.F., Latz, E., Monks, B.G., Gay, N.J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A., and Golenbock, D.T. (2006). The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6299-6304.

Rubiolo, C., Piazzolla, D., Meissl, K., Beug, H., Huber, J.C., Kolbus, A., and Baccarini, M. (2006). A balance between Raf-1 and Fas expression sets the pace of erythroid differentiation. *Blood* 108, 152-159.

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83-86.

Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* 10, 987-993.

S

Sacre, S.M., Lo, A., Gregory, B., Simmonds, R.E., Williams, L., Feldmann, M., Brennan, F.M., and Foxwell, B.M. (2008). Inhibitors of TLR8 reduce TNF production from human rheumatoid synovial membrane cultures. *J Immunol* 181, 8002-8009.

Saito, K., Nishida, K.M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2006). Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev* 20, 2214-2222.

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 17, 2596-2606.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., *et al.* (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456, 264-268.

Salojin, K.V., Owusu, I.B., Millerchip, K.A., Potter, M., Platt, K.A., and Oravec, T. (2006). Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *J Immunol* 176, 1899-1907.

Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82, 323-330.

Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 1087-1095.

Sayama, K., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Yamasaki, K., Sawada, Y., Sun, L., Yamanishi, K., Ichijo, H., and Hashimoto, K. (2001). Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 276, 999-1004.

Sayama, K., Komatsuzawa, H., Yamasaki, K., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Ouhara, K., Tokumaru, S., Dai, X., Tohyama, M., Ten Dijke, P., *et al.* (2005). New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immunol* 35, 1886-1895.

Scherr, M., Venturini, L., Battmer, K., Schaller-Schoenitz, M., Schaefer, D., Dallmann, I., Ganser, A., and Eder, M. (2007). Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res* 35, e149.

Schirmer, M., Vallejo, A.N., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (1998). Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 161, 1018-1025.

Seemayer, C.A., Kuchen, S., Neidhart, M., Kuenzler, P., Rihoskova, V., Neumann, E., Pruschy, M., Aicher, W.K., Muller-Ladner, U., Gay, R.E., *et al.* (2003). p53 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts at sites of invasion. *Ann Rheum Dis* 62, 1139-1144.

Seggeron, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 243, 215-225.

Seibl, R., Birchler, T., Loeliger, S., Hossle, J.P., Gay, R.E., Saurenmann, T., Michel, B.A., Seger, R.A., Gay, S., and Lauener, R.P. (2003). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 162, 1221-1227.

Sekine, Y., Takeda, K., and Ichijo, H. (2006). The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Curr Mol Med* 6, 87-97.

Semaan, N., Frenzel, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Gottenberg, J.E., Sibilia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2011). miR-346 controls release of TNF-alpha protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization. *PLoS One* 6, e19827.

Shaked, I., Meerson, A., Wolf, Y., Avni, R., Greenberg, D., Gilboa-Geffen, A., and Soreq, H. (2009). MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity* 31, 965-973.

Shen, Y.H., Godlewski, J., Zhu, J., Sathyanarayana, P., Leaner, V., Birrer, M.J., Rana, A., and Tzivion, G. (2003). Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *J Biol Chem* 278, 26715-26721.

Shim, J.H., Xiao, C., Paschal, A.E., Bailey, S.T., Rao, P., Hayden, M.S., Lee, K.Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., *et al.* (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 19, 2668-2681.

Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B., Kobayashi, K.S., Glimcher, L.H., and Cantor, H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 7, 498-506.

Sly, L.M., Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Buchse, T., and Krystal, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* 31, 1170-1181.

Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G.R., Rampersaud, N., Dyson, M.H., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., and Arthur, J.S. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J* 22, 2788-2797.

Song, H.Y., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6721-6725.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.

Song, S., Kim, S.Y., Hong, Y.M., Jo, D.G., Lee, J.Y., Shim, S.M., Chung, C.W., Seo, S.J., Yoo, Y.J., Koh, J.Y., *et al.* (2003). Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity. *Mol Cell* 12, 553-563.

Sonkoly, E., Stahle, M., and Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18, 131-140.

Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P.C., Saaf, A., Lundeberg, L., Tengvall-Linder, M., Norstedt, G., Alenius, H., Homey, B., Scheynius, A., *et al.* (2007). MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One* 2, e610.

Spierings, D.C., McGoldrick, D., Hamilton-Easton, A.M., Neale, G., Murchison, E.P., Hannon, G.J., Green, D.R., and Withoff, S. (2011). Ordered progression of stage-specific miRNA profiles in the mouse B2 B-cell lineage. *Blood* 117, 5340-5349.

Stanczyk, J., Ospelt, C., Karouzakis, E., Filer, A., Raza, K., Kolling, C., Gay, R., Buckley, C.D., Tak, P.P., Gay, S., *et al.* (2011). Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum* 63, 373-381.

Stanczyk, J., Pedrioli, D.M., Brentano, F., Sanchez-Pernaute, O., Kolling, C., Gay, R.E., Detmar, M., Gay, S., and Kyburz, D. (2008). Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 1001-1009.

Starczynowski, D.T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., Sung, S., Morin, R., Muranyi, A., Hirst, M., Hogge, D., Marra, M., Wells, R.A., *et al.* (2010). Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med* 16, 49-58.

Stefani, G., and Slack, F.J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 219-230.

Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., *et al.* (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 11, 155-161.

Subramanian, R.R., Zhang, H., Wang, H., Ichijo, H., Miyashita, T., and Fu, H. (2004). Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp Cell Res* 294, 581-591.

Sun, S.C. (2010). CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ* 17, 25-34.

Sweeney, S.E., and Firestein, G.S. (2006). Mitogen activated protein kinase inhibitors: where are we now and where are we going? *Ann Rheum Dis* 65 *Suppl* 3, iii83-88.

Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U.K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G., and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem* 282, 2135-2143.

Symons, A., Beinke, S., and Ley, S.C. (2006). MAP kinase kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol* 27, 40-48.

T

Taganov, K.D., Boldin, M.P., and Baltimore, D. (2007). MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26, 133-137.

Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12481-12486.

Tagawa, H., Karube, K., Tsuzuki, S., Ohshima, K., and Seto, M. (2007). Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci* 98, 1482-1490.

Takakura, S., Mitsutake, N., Nakashima, M., Namba, H., Saenko, V.A., Rogounovitch, T.I., Nakazawa, Y., Hayashi, T., Ohtsuru, A., and Yamashita, S. (2008). Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci* 99, 1147-1154.

Takami, N., Osawa, K., Miura, Y., Komai, K., Taniguchi, M., Shiraishi, M., Sato, K., Iguchi, T., Shiozawa, K., Hashiramoto, A., *et al.* (2006). Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum* 54, 779-787.

Takeda, K., Hatai, T., Hamazaki, T.S., Nishitoh, H., Saitoh, M., and Ichijo, H. (2000). Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J Biol Chem* 275, 9805-9813.

Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., and Ichijo, H. (2008). Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 199-225.

Takeda, K., Shimozono, R., Noguchi, T., Umeda, T., Morimoto, Y., Naguro, I., Tobiume, K., Saitoh, M., Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2007). Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 2 functions as a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in a heteromeric complex with ASK1. *J Biol Chem* 282, 7522-7531.

Takekawa, M., Tatebayashi, K., and Saito, H. (2005). Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* 18, 295-306.

Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P.J., Cofield, R.H., O'Fallon, W.M., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2001). Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 167, 1072-1080.

Tamiya, G., Shinya, M., Imanishi, T., Ikuta, T., Makino, S., Okamoto, K., Furugaki, K., Matsumoto, T., Mano, S., Ando, S., *et al.* (2005). Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet* 14, 2305-2321.

Tang, B., Xiao, B., Liu, Z., Li, N., Zhu, E.D., Li, B.S., Xie, Q.H., Zhuang, Y., Zou, Q.M., and Mao, X.H. (2010). Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *FEBS Lett* 584, 1481-1486.

Tang, Y., Luo, X., Cui, H., Ni, X., Yuan, M., Guo, Y., Huang, X., Zhou, H., de Vries, N., Tak, P.P., *et al.* (2009). MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 60, 1065-1075.

Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2008). Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 94-99.

Teitell, M., and Richardson, B. (2003). DNA methylation in the immune system. *Clin Immunol* 109, 2-5.

Terauchi, R., Arai, Y., Takahashi, K.A., Inoue, A., Tonomura, H., Asada, H., Kishida, T., Imanishi, J., Mazda, O., Kitajima, I., *et al.* (2005). The effect of apoptosis signal-regulating kinase 1 gene transfer on rat collagen induced arthritis. *J Rheumatol* 32, 2373-2380.

Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., *et al.* (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8, 487-496.

Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M.W., and Ladurner, A.G. (2007). A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* 14, 897-903.

Tobiame, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., and Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2, 222-228.

Tobiame, K., Saitoh, M., and Ichijo, H. (2002). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol* 191, 95-104.

Todoerti, K., Barbui, V., Pedrini, O., Lionetti, M., Fossati, G., Mascagni, P., Rambaldi, A., Neri, A., Introna, M., Lombardi, L., *et al.* (2010). Pleiotropic anti-myeloma activity of ITF2357: inhibition of interleukin-6 receptor signaling and repression of miR-19a and miR-19b. *Haematologica* 95, 260-269.

Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19, 517-529.

Tong, M.H., Mitchell, D.A., McGowan, S.D., Evanoff, R., and Griswold, M.D. (2011). Two miRNAs Clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), Are Involved in the Regulation of Spermatogonial Differentiation in Mice. *Biol Reprod.*

Torrisani, J., Unterberger, A., Tendulkar, S.R., Shikimi, K., and Szyf, M. (2007). AUF1 cell cycle variations define genomic DNA methylation by regulation of DNMT1 mRNA stability. *Mol Cell Biol* 27, 395-410.

Trenkmann, M., Brock, M., Gay, R.E., Kolling, C., Speich, R., Michel, B.A., Gay, S., and Huber, L.C. (2011). Expression and function of EZH2 in synovial fibroblasts: epigenetic repression of the Wnt inhibitor SFRP1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 1482-1488.

Tsitsikov, E.N., Laouini, D., Dunn, I.F., Sannikova, T.Y., Davidson, L., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2001). TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. *Immunity* 15, 647-657.

U

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.

V

Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128, 1105-1118.

Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.

Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., *et al.* (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* *132*, 875-886.

Venturini, L., Battmer, K., Castoldi, M., Schultheis, B., Hochhaus, A., Muckenthaler, M.U., Ganser, A., Eder, M., and Scherr, M. (2007). Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* *109*, 4399-4405.

Vermeulen, A., Behlen, L., Reynolds, A., Wolfson, A., Marshall, W.S., Karpilow, J., and Khvorova, A. (2005). The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA* *11*, 674-682.

Verstrepen, L., Carpentier, I., Verhelst, K., and Beyaert, R. (2009). ABINs: A20 binding inhibitors of NF-kappa B and apoptosis signaling. *Biochem Pharmacol* *78*, 105-114.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* *320*, 97-100.

Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M.A., Nacken, W., Foell, D., van der Poll, T., Sorg, C., *et al.* (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* *13*, 1042-1049.

Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S., *et al.* (2005). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* *202*, 1575-1585.

W

Wachsmann, D., and Sibia, J. (2011). Survival in the rheumatoid synovium. *Joint Bone Spine* *78*, 435-437.

Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* *21*, 1857-1862.

Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J.E., Stark, G.R., and Li, X. (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4, 920-927.

Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008a). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5343-5348.

Wang, H., Garzon, R., Sun, H., Ladner, K.J., Singh, R., Dahlman, J., Cheng, A., Hall, B.M., Qualman, S.J., Chandler, D.S., *et al.* (2008b). NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer cell* 14, 369-381.

Wang, H., Wu, J., Meng, X., Ying, X., Zuo, Y., Liu, R., Pan, Z., Kang, T., and Huang, W. (2011a). MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis* 32, 1033-1042.

Wang, W., Corrigan-Cummins, M., Hudson, J., Maric, I., Simakova, O., Neelapu, S.S., Kwak, L.W., Janik, J.E., Gause, B., Jaffe, E.S., *et al.* (2011b). MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response. *Haematologica*.

Wang, X.S., Diener, K., Tan, T.H., and Yao, Z. (1998). MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 33-37.

Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., Wakatsuki, Y., Fuss, I.J., and Strober, W. (2006). Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* 25, 473-485.

Watanabe, T., Otsu, K., Takeda, T., Yamaguchi, O., Hikoso, S., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Taniike, M., Nakai, A., Matsumura, Y., *et al.* (2005). Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 562-567.

Weinmann, L., Hock, J., Ivacevic, T., Ohrt, T., Mutze, J., Schwille, P., Kremmer, E., Benes, V., Urlaub, H., and Meister, G. (2009). Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* 136, 496-507.

Wiggin, G.R., Soloaga, A., Foster, J.M., Murray-Tait, V., Cohen, P., and Arthur, J.S. (2002). MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 22, 2871-2881.

Williams, R.O., Inglis, J.J., Simelyte, E., Criado, G., and Sumariwalla, P.F. (2005). Analysing the effect of novel therapies on cytokine expression in experimental arthritis. *Int J Exp Pathol* 86, 267-278.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228-234.

Winter-Vann, A.M., and Johnson, G.L. (2007). Integrated activation of MAP3Ks balances cell fate in response to stress. *J Cell Biochem* 102, 848-858.

Woods, K., Thomson, J.M., and Hammond, S.M. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem* 282, 2130-2134.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-4039.

X

Xiao, C., and Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136, 26-36.

Xiong, Y., Fang, J.H., Yun, J.P., Yang, J., Zhang, Y., Jia, W.H., and Zhuang, S.M. (2010). Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 51, 836-845.

Y

Yamaguchi, O., Higuchi, Y., Hirotani, S., Kashiwase, K., Nakayama, H., Hikoso, S., Takeda, T., Watanabe, T., Asahi, M., Taniike, M., *et al.* (2003). Targeted deletion of apoptosis signal-

regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15883-15888.

Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotsu, S., Asahi, M., Taniike, M., *et al.* (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* *114*, 937-943.

Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J., *et al.* (2006). Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* *7*, 962-970.

Yan, H.L., Xue, G., Mei, Q., Wang, Y.Z., Ding, F.X., Liu, M.F., Lu, M.H., Tang, Y., Yu, H.Y., and Sun, S.H. (2009). Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J* *28*, 2719-2732.

Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., *et al.* (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell* *9*, 189-198.

Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* *2*, 620-624.

Yatsugi, N., Tsukazaki, T., Osaki, M., Koji, T., Yamashita, S., and Shindo, H. (2000). Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci* *5*, 150-156.

Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.C., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J., and Mello, C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* *127*, 747-757.

Yokoi, T., Fukuo, K., Yasuda, O., Hotta, M., Miyazaki, J., Takemura, Y., Kawamoto, H., Ichijo, H., and Ogihara, T. (2006). Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells. *Diabetes* *55*, 1660-1665.

Yuan, Z.Q., Feldman, R.I., Sussman, G.E., Coppola, D., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2003). AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem* 278, 23432-23440.

Z

Zaru, R., Ronkina, N., Gaestel, M., Arthur, J.S., and Watts, C. (2007). The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nat Immunol* 8, 1227-1235.

Zhang, B., and Farwell, M.A. (2008). microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med* 12, 3-21.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302, 1-12.

Zhang, G., and Ghosh, S. (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 277, 7059-7065.

Zhang, H., Shi, X., Hampong, M., Blanis, L., and Pelech, S. (2001). Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 276, 6905-6908.

Zhang, L., Chen, J., and Fu, H. (1999). Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8511-8515.

Zhang, M., Liu, Q., Mi, S., Liang, X., Zhang, Z., Su, X., Liu, J., Chen, Y., Wang, M., Zhang, Y., *et al.* (2011). Both miR-17-5p and miR-20a alleviate suppressive potential of myeloid-derived suppressor cells by modulating STAT3 expression. *J Immunol* 186, 4716-4724.

Zhang, Q., Wu, J., Cao, Q., Xiao, L., Wang, L., He, D., Ouyang, G., Lin, J., Shen, B., Shi, Y., *et al.* (2009). A critical role of Cyr61 in interleukin-17-dependent proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 3602-3612.

Zhang, R., Al-Lamki, R., Bai, L., Streb, J.W., Miano, J.M., Bradley, J., and Min, W. (2004a). Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ Res* 94, 1483-1491.



Lucas PHILIPPE

LE CLUSTER MIR-1792, ROLE DANS LA REGULATION DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE AU COURS DE LA POLYARTHRITITE RHUMATOÏDE



La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la maladie auto-immune la plus fréquente avec une prévalence de 1%. Les cellules résidentes de la cavité synoviale, les fibroblast-like synoviocytes (FLS), sont des acteurs majeurs de la PR. Leur activation par des récepteurs de l'immunité innée participe à l'acquisition d'un phénotype agressif menant à la destruction ostéo-articulaire. Dans cette étude, nous avons évalué le rôle régulateur de miARN sur les voies de signalisation des TLR. L'activation de TLR2 et de TLR4 dans les FLS induit la diminution de plusieurs miARN, dont miR-19a et b (miR-19), alors que TLR2 est surexprimé. Nous avons pu ainsi montrer que miR-19 régule Tlr2 et que la transfection de mir-19 dans les FLS activés induit une diminution de l'expression de TLR2 et de la synthèse d'IL-6 et de MMP-3. Mir-19 appartient au cluster miR-17~92, abaissée après activation des FLS. Il code pour 6 miARN dont miR-20a. miR-20a est également sous-régulé après activation de TLR2 et TLR4 dans les FLS et les THP-1. Nous avons montré que miR-20a régule l'expression d'Ask1, impliquée dans la voie de TLR4. La transfection de miR-20a *in vitro* nous a permis de montrer que miR-20a contrôle l'expression d'ASK1 et induit une inhibition de la synthèse de cytokines majeures de la PR dans les FLS et les THP-1. Des résultats équivalents ont été obtenus *ex vivo* chez la souris. Ces travaux ont permis d'identifier dans les FLS rhumatoïdes des miARN anti-inflammatoires dont la baisse d'expression permet une augmentation de l'expression de TLR2 et d'ASK1. Ces miARN pourraient donc constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

miARN, Fibroblast-like synoviocyte, Toll-like receptor, polyarthrite rhumatoïde, immunité innée, maladie auto-immune.

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequently autoimmune disease with a prevalence of 1%. Resident cells of joints, the fibroblast-like synoviocytes (FLS), act as key players in RA. Their activation through Pattern-recognition receptors leads to an aggressive phenotype, leading in the osteo-articular destruction of the joints. In this study, we aimed to discuss the link between Toll-like receptors (TLR) and miRNA pathway. We established the down-regulation of a few miRNA when FLS were activated through TLR2 and TLR4, including miR-19a and miR-19b (miR-19). We showed that miR-19 regulates directly Tlr2 and that transfection of miR-19 mimics leads to a decrease of IL-6 and MMP-3 synthesis in FLS. miR-19 belongs to the cluster miR-17~92, which is also down-regulated in activated FLS. This primary transcript encodes for 6 miRNA, including miR-20a, which is also down regulated upon TLR2 and TLR4 activation in FLS and further in THP-1, a monocyte cell-line. Then, we validated the predicted regulation of miR-20a on Ask1, an important kinase involved in TLR4 pathway. The transfection of miR-20a mimics *in vitro* represses ASK1 expression and inhibits several major cytokines in RA both in FLS and THP-1. Further, we confirmed these results on *ex vivo* experiments on peritoneal macrophages. These works allowed us to identify new anti-inflammatory miRNA that are downregulated and allow overexpression of TLR2 and ASK1 in RA FLS. These results open new experiments on *in vivo* models. All together, these data give new insights for identify new therapeutics in RA.

miRNA, Fibroblast-like synoviocyte, Toll-like receptor, Rheumatoid arthritis, innate immunity, auto-immune disease.