

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR\_S 1109

**THÈSE** présentée par :

**Aurore DE CAUWER**

soutenue le : **03 Juillet 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Implication du gène *Dicer1* dans le  
vieillessement et ses pathologies chez la  
souris.**

**THÈSE dirigée par :**

**M. GEORGEL Philippe**

Professeur, Université de Strasbourg, UMR\_S 1109

**RAPPORTEURS :**

**M. GODINHO-FERREIRA Miguel**

Directeur de recherche, Université Côte d'Azur, U1081

**Mme. EL HADRI-ZEGOUAH Khadija**

Professeur, Sorbonne Université, UMR 8256

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. KEYES Bill**

Directeur de recherche, IGBMC



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR\_S 1109

**THÈSE** présentée par :

**Aurore DE CAUWER**

soutenue le : **03 Juillet 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Implication du gène *Dicer1* dans le  
vieillessement et ses pathologies chez la  
souris.**

**THÈSE dirigée par :**

**M. GEORGEL Philippe**

Professeur, Université de Strasbourg, UMR\_S 1109

**RAPPORTEURS :**

**M. GODINHO-FERREIRA Miguel**

Directeur de recherche, Université Côte d'Azur, U1081

**Mme. EL HADRI-ZEGOUAH Khadija**

Professeur, Sorbonne Université, UMR 8256

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. KEYES Bill**

Directeur de recherche, IGBMC



*“Si ton labeur est dur et si tes résultats sont minces,  
Rappelle-toi qu'un jour le grand chêne a été un gland comme toi.”*

[Inconnu]

## **Remerciements**

Je remercie vivement les Drs Miguel Godinho-Ferreira, Khadija El Hadri-Zegouagh et Bill Keyes d'avoir accepté de juger ce travail et d'honorer le jury de leur présence. Je remercie également Olivier Lefebvre pour avoir participé à mon suivi tout au long de cette thèse.

Je remercie le Pr Siamak Bahram de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour les moyens mis en œuvre pour que mes travaux avancent avec facilité.

À mon directeur de thèse, Philippe Georgel, pour avoir fait avec moi le pari de cette thèse, pour son encadrement et son soutien et pour avoir organisé au mieux l'idée de ce que sera « l'après ».

À Alexandre et Romain, les premiers à m'avoir accueillie à Strasbourg et à m'avoir ouvert leur porte en grand. Pour les soirées passées ensemble, l'initiation au ski de fond, votre humour douteux, votre cuisine, ... bref, si je suis arrivée seule ici il y a presque 6 ans, je suis aujourd'hui heureuse et fière de vous compter parmi mes amis.

À tous mes collègues de travail, anciens et récents, que je remercie pour leur soutien et leur patience... Pour m'avoir formée et m'avoir aidée dans mes travaux, je remercie ainsi Ghada, Ramzi, Wassila, Irina, Aurore, Angélique, Cécile Véronique et Anne.

Aux petites mains qui travaillent dans l'ombre, Gregory, Camille, Laetitia, Laure, Fanny et Linda pour avoir fait que mon passage se passe dans les meilleures conditions et m'avoir aidée à « dédramatiser » cette épreuve !

À mes parents pour, et ce depuis toujours, leur soutien et leur présence inconditionnels ; qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection et mes remerciements les plus sincères. À ma grande sœur et mon grand frère, pour me faire grandir à vos côtés et pour tous ces bons moments passés ensemble et que j'attends à chaque fois avec impatience.

À mes deux amies d'enfance, Lucile et Clémence, dont j'ai « lâchement » abandonné les sorties plages en Vendée pour aller taquiner seule les sommets Vosgiens. Merci de ne pas avoir tenu rigueur de cet éloignement volontaire et d'être toujours présentes à mes épisodiques retours dans l'Ouest.

Aux copains et copines, qui m'ont permis d'oublier les moments difficiles autour d'une bière (ou d'un café) ! Perrine, Alice, Alev, Chérine, Thomas, William, Ben... votre arrivée a rajeuni et redynamisé le laboratoire, merci.

Enfin, à toi qui partages ma vie, en qui j'ai puisé une grande partie de mon énergie et qui malgré les aléas de mon travail est resté présent et patient.



# Table des matières

LISTE DES ILLUSTRATIONS	II
LISTE DES ANNEXES	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	V
<b>INTRODUCTION</b>	<b>2</b>
<b>PREAMBULE</b>	<b>1</b>
<b>I. LE VIEILLISSEMENT, UNE CONDITION COMPLEXE.</b>	<b>3</b>
A) THEORIES DU VIEILLISSEMENT	3
1. Théories du vieillissement programmé	3
2. Théories de l'erreur/dommage.	4
B) MARQUEURS DU VIEILLISSEMENT	5
1. Marqueurs « primaires » : sources de dommages	6
2. Marqueurs antagonistes	10
3. Marqueurs intégrés	12
C) PATHOLOGIES LIEES A L'AGE	13
<b>II. DICER1 : UNE ENZYME AUX MULTIPLES FACETTES.</b>	<b>16</b>
A) GENERALITES SUR DICER	16
1. Famille des enzymes ribonuclases III (RNase III)	16
2. La protéine DICER : structure et domaines	16
3. Évolution des homologues <i>Dicer</i>	17
B) LE GENE <i>DICER1</i> ET SA REGULATION CHEZ LA SOURIS	18
1. Transcription du gène <i>Dicer1</i>	18
2. Régulation transcriptionnelle de <i>Dicer1</i>	18
3. Régulation post-transcriptionnelle de <i>Dicer1</i>	19
4. Régulation de la protéine DICER	20
C) LES FONCTIONS DE DICER	21
1. Fonction classique : maturation des miRs	21
2. Autres fonctions impliquées dans l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes	23
3. Régulation transcriptionnelle des gènes	25
4. Maintien de l'intégrité du génome	25
5. Détoxification des ARN double-brin	26
<b>IV. LES RETROTRANSPOSONS : DE « L'ADN POUHELLE » AUX ELEMENTS BIOLOGIQUEMENT ACTIFS.</b>	<b>28</b>
A) GENERALITES	28
1. Structure et rétro-transposition des LINE et SINE.	28
2. Distribution des rétrotransposons	29
B) REGULATION DE L'EXPRESSION DES RETROTRANSPOSONS NON-LTR.	29

1. Régulation transcriptionnelle	30
2. Régulation post-transcriptionnelle	30
C) FONCTIONS ASSOCIEES AU RETROTRANSPOSONS	31
1. Transcrits « libres »	31
2. Transcrits SINEs insérés dans les régions transcrites.	32
<b>V. DICER ET RETROTRANSPOSONS DANS LE VIEILLISSEMENT</b>	<b>34</b>
1. Dérégulation de l'expression de <i>Dicer1</i> et des rétrotransposons	34
2. Contribution de <i>Dicer1</i> dans les marqueurs du vieillissement	34
<b>VI. OBJECTIF DE LA THESE ET MODELE D'ETUDE.</b>	<b>37</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>39</b>
<hr/>	
<b>I. MODELE <i>DICER1</i>-DEFICIENT : CONFIRMATION DES DONNEES ANTERIEURES.</b>	<b>41</b>
<b>II. SURVIE ET ESPERANCE DE VIE EN BONNE SANTE REDUITE CHEZ LES SOURIS <i>DICER1</i>-DEFICIENTES.</b>	<b>42</b>
A) SURVIE	42
B) ESPERANCE DE VIE EN BONNE SANTE : DESORDRES/PATHOLOGIES LIES A L'AGE.	43
1. Dégradation de l'état de santé : Suivi du poids des animaux	43
2. Déclin fonctionnel et pathologies liées à l'âge	44
<b>III. LA DEFICIENCE EN <i>DICER1</i> PROVOQUE DES ALTERATIONS DU METABOLISME</b>	<b>52</b>
A) LES ANIMAUX <i>DICER1</i> -DEFICIENTS PRESENTENT UNE ALTERATION DE LA GLYCEMIE BASALE ET UNE MEILLEURE TOLERANCE AU GLUCOSE.	52
B) LA SECRETION D'INSULINE ET LA SENSIBILITE A L'INSULINE SONT GLOBALEMENT INCHANGEES CHEZ LES INDIVIDUS <i>DICER1</i> -DEFICIENTS.	54
C) L'EXPRESSION DES REGULATEURS DU METABOLISME ENERGETIQUE <i>SIRT1</i> ET <i>UCP1</i> EST ALTEREE DANS LE TISSU ADIPEUX BLANC DES ANIMAUX <i>DICER1</i> -DEFICIENTS ET CORRELE AVEC L'ACCUMULATION DE TRANSCRITS SINES.	55
D) LA DEFICIENCE EN <i>DICER1</i> PROTEGE DES ALTERATIONS METABOLIQUES MAIS NON DE L'INFLAMMATION PROVOQUEES PAR UN REGIME GRAS.	57
<b>IV. LA DEFICIENCE CHRONIQUE EN <i>DICER1</i> MODIFIE PROFONDEMENT LE TRANSCRIPTOME DU TISSU ADIPEUX AVEC L'AGE.</b>	<b>61</b>
A) EFFET DE L'AGE SUR LE TRANSCRIPTOME DU TA VISCERAL	62
B) EFFET DE LA DEFICIENCE EN <i>DICER1</i> SUR LE TRANSCRIPTOME DU TA VISCERAL.	65
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>71</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>77</b>
<hr/>	
<b>ANNEXES</b>	<b>91</b>



<b>ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES</b>	<b>93</b>
A) ANIMAUX :	93
1. Génération des animaux et stratégie de génotypage	93
2. Condition d'hébergements/procédures.	93
B) SUIVI DE LA SURVIE ET DES PARAMETRES METABOLIQUES	94
1. Analyse de la survie.	94
2. Mesure de la force	94
3. Test de tolérance au glucose.	94
4. Test de tolérance à l'insuline	95
5. Prélèvement sanguin	95
C) ANALYSE BIOMOLECULAIRE : EXPRESSION DES GENES	95
1. Préparation des échantillons (lyse)	95
2. Extraction d'ARN	95
3. Retrotranscription	96
4. PCR quantitative (qPCR)	97
5. Séquençage ARN	98
D) HISTOLOGIE	98
1. Préparation des échantillons en paraffine	98
2. Coloration Hématoxyline & Eosine	98
E) LOGICIELS UTILISES	99
<b>ANNEXE 2: ARTICLE PROPOSÉ</b>	<b>101</b>
<b>ANNEXE 3: OPINION</b>	
<b>ANNEXE 4: REVUE</b>	
<b>ANNEXE 5: ARTICLE</b>	
<b>ANNEXE 6: ARTICLE</b>	



# Liste des Illustrations

## Figures

<i>Figure 1 : Continuum entre vieillissement et pathologies liés à l'âge</i>	15
<i>Figure 2 : Domaines et structure de la protéine DICER</i>	17
<i>Figure 3 : Biogenèse des miRs</i>	22
<i>Figure 4 : Retrotranscription des LINEs et SINEs par un mécanisme de « Copier-Coller »</i>	29
<i>Figure 5 : Contrôle des éléments LINE/SINEs</i>	31
<i>Figure R6 : Les souris Dicer1-déficientes présentent une surmortalité embryonnaire, notamment chez les femelles</i>	41
<i>Figure R7 : La déficience en Dicer1 est associée à une survie médiane réduite et une diminution du poids moyen avec l'âge</i>	44
<i>Figure R8 : La diminution de l'expression de Dicer1 provoque le développement accéléré de la sarcopénie et de la cyphose</i>	46
<i>Figure R9 : La déficience en Dicer1 pourrait s'accompagner d'une perte prématurée de force</i>	47
<i>Figure R10 : La diminution de l'expression de Dicer1 entraîne le développement d'atteintes inflammatoires de l'œil avec l'âge</i>	49
<i>Figure R11 : La déficience chronique en Dicer1 n'entraîne pas d'alopécie avec l'âge mais augmente la susceptibilité à la dermatite ulcéreuse</i>	50
<i>Figure R12 : Les animaux Dicer1-déficients développent une hypertension précoce et sévère avec l'âge</i>	51
<i>Figure R13 : Les souris mâles Dicer1-déficientes présentent une diminution de la glycémie basale et une meilleure tolérance au glucose</i>	53
<i>Figure R14 : La déficience en Dicer1 s'accompagne d'une légère insulïnémie et d'une modeste insuline-résistance avec l'âge</i>	54
<i>Figure R15 : Les animaux Dicer1-déficients présentent une altération de l'expression des régulateurs du métabolisme Sirt1 et Ucp1 ainsi qu'une accumulation de transcrits SINE dans le tissu adipeux</i>	56
<i>Figure R16 : Les animaux Dicer1-déficients sont protégés de la prise de poids liée à un régime gras</i>	58
<i>Figure R17 : Les altérations métaboliques liées à un régime gras sont réduites chez les animaux Dicer1-déficients</i>	59
<i>Figure R18 : Sous un régime gras, la déficience en Dicer1 s'accompagne d'une augmentation de l'expression de gènes inflammatoires et de transcrits SINEs dans le tissu adipeux blanc viscéral</i>	60
<i>Figure R19 : Figure R14 : La déficience en Dicer1 augmente le nombre de gènes différentiellement exprimés dans le TA viscéral avec l'âge</i>	62
<i>Figure R20 : La déficience en Dicer1 altère le transcriptome du TA viscéral avec l'âge</i>	64
<i>Figure R21 : La déficience en Dicer1 a un impact très limité sur le transcriptome des animaux jeunes</i>	65
<i>Figure R22 : Avec l'âge, le transcriptome du TA viscéral est modifiée par la déficience en Dicer1</i>	66
<i>Figure R23 : L'analyse GSEA de la voie de signalisation « Reactome » associe la déficience en Dicer1 à une altération de l'homéostasie des composants de la matrice extra-cellulaire</i>	68

## **Tableaux**

<i>Tableau R1 : Manifestations cliniques chez les souris mâles adultes vivantes ou après nécropsie.....</i>	<i>45</i>
<i>Tableau R2 : Top cinq des fonctions cellulaire et moléculaire enrichies par les GDE dans les différentes conditions testées.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau R3 : Le vieillissement s'accompagne d'une altération de l'expression d'adipokines chez les souris Dicer1<sup>d/d</sup>.....</i>	<i>69</i>

## Liste des Annexes

<i>Annexe 1 : Matériel et Méthodes</i>	93
<i>Annexe 2 : Dicer1 deficient mice exhibit premature ageing and metabolic perturbation of adipocytes (Proposed Article)</i>	101
<i>Annexe 3 : Therapeutic Perspectives for Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells in Rheumatoid Arthritis (Opinion)</i>	
<i>Annexe 4 : DICER1: A key player in rheumatoid arthritis, at the crossroads of cellular Stress, innate immunity and chronic inflammation in Aging (Revue)</i>	
<i>Annexe 5 : A mouse model of MSU-induced acute inflammation in vivo suggests imiquimod-dependent targeting of Il-1<math>\beta</math> as relevant therapy for gout patients. (Article)</i>	
<i>Annexe 6 : Temporomandibular joint damage in K/BxN arthritic mice (Article)</i>	

## Liste des abréviations

ADAR : Adenosine Deaminase Acting on RNA

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGO : Argonaute (Protéine)

AMP/ADP/ATP : Adénosine MonoPhosphate / DiPhosphate / Triphosphate

AMPK : AMP-Activated Protein Kinase

APOBEC3 : Apolipoprotein B editing Complex 3

ARN(m) : Acide Ribonucléique (messager)

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein

AUF1 : AU binding factor 1 ou AU-rich element RNA-binding protein 1

BAM : Binary Alignment Map

BUB1 : Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1

CHIP : Carboxyl terminus of Hsp70-Interacting Protein

ChIPSeq : Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing

DCL : Dicer-Like protein

DDR : DNA-Damage Response

DDRNA (t-) : (telomeric-) DNA-damage RNAs

DGCR8 : DiGeorge syndrome Chromosomal Region 8 (Protéine)

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'âge

dsRBP : double-strand RNA Binding Protein

DUF283 : Domain of Unknown Function

EEFE1E1 : Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Epsilon 1

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

Ercc5 : Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 5

EXP5 : Exportine 5 (Protéine)

GDE : Gène Différentiellement Exprimé

GSEA : Gene Set Enrichment Analysis

HDAC : Histone désacétylase

HFD : High-Fat Diet

HIF : Hypoxia-Induced Factor

IFN : Interferon

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

IIS : Insulin/IGF-1 Signaling (voie)

IL-n : Interleukine-(n)

IMC : Indice de Masse Corporelle

IPA : Ingenuity Pathway Analysis

IRAlu : Inverted-Repeated Alu elements

LINE : Long Interspersed Nuclear Element

LTR : Long-Terminal Repeat

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MEFs : Mouse Embryonic fibroblast

miR (pri- pre-) : micro-RNA (primaire, précurseur)

MITF : microphthalmia-associated transcription factor

mTOR : mammalian ou mechanistic Target of Rapamycin

MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NDP52 : Nuclear Dot Protein 52Kd

NER : Nucleotide Excision Repair

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor- $\kappa$ B (Protéine)

NLRP3 : NOD-like Receptor family, Pyrin domain containing 3

PACT : Protein Activator of PKR

PAR-3 : Protease Activated Receptor 3

PARP1 : Poly(ADP-Ribose) Polymérase 1

PAZ : Piwi Argonaut and Zwiille (Domaine)

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PCBP2 : Poly(C)-Binding Protein 2

PMA : Phorbol Myristate Acetate

RBP : RNA-Binding Protein

RdRP : RNA-dependant RNA polymerases

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

RITS : RNA-induced Transcriptional Silencing

RNAi : interférence ARN

RNase III : Ribonucléase III

RNAseL : Ribonuclease L

RNP : RiboNucloprotein (complexe)

ROS : Reactive Oxygen Species

SAHF : Senescence-Associated Heterochromatin Foci

SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype

SA- $\beta$ GAL : Senescence-Associated beta-Galactosidase

sdrRNA : sno-derived RNA

SINE : Short Interspersed Nuclear Element

siRNA (v-) : short interferent ou silencing RNA (viral-)

SIRT1, 6 : Sirtuine 1, 6 (Protéines)

snoRNA : small nucleolar RNA

SOD2 : SuperOxyde Dismutase 2

SOX-4 : SRY- related high-mobility group box4

SRA : stéroïd Receptor Activator

STAU1 : Staufen 1

TA : Tissu Adipeux

Terc : Telomerase RNA Component

Tert : Telomerase Reverse Transcriptase

TGS : Transcriptional Gene Silencing

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha  
TRBP : TAR-RNA binding Protein  
tRF : tRNA Related Fragment  
TSA : deacetylase inhibitor trichostatin A  
TTG : test de Tolérance au Glucose  
UCP : Uncoupling Protein  
UTR : Untranslated Region  
Xrcc5,6 : X-ray repair cross-complementing protein 5, 6





# INTRODUCTION



## Préambule

Atteindre un âge très avancé (>100 ans) ne sera pas le privilège de quelques individus des générations futures ; en fait la plupart des personnes vivant actuellement dans les pays développés vont très probablement accéder à cette (très) longue vie.

En effet, l'espérance de vie augmente de façon quasi linéaire dans la plupart des pays développés et a atteint un gain de 30 ans au cours du siècle dernier (Christensen *et al.*, 2009; Vaupel, 2010). Les progrès dans l'espérance de vie au début du XXème siècle reposent sur l'amélioration notable de la survie des enfants via l'éradication des maladies infectieuses. L'augmentation actuelle de l'espérance de vie dépend de la baisse sans précédent de la mortalité des personnes âgées (>80 ans). La probabilité de survivre de 80 à 90 ans est ainsi passée de 16% chez les femmes et 12% chez les hommes en 1950 à 37% (voire 50% au Japon) et 25% aujourd'hui, chez les femmes et les hommes respectivement (Rau *et al.*, 2008).

La question de savoir si l'espérance de vie peut continuer à augmenter de manière linéaire ou si elle s'approche de sa limite reste controversée (Vijg and Le Bourg, 2017; Barbi *et al.*, 2018). Néanmoins, il est certain que la nouvelle démographie qui s'inscrit dans les pays développés, faible natalité et faible mortalité, conduit au développement d'une population vieillissante à l'effectif déclinant comme cela est déjà observé au Japon.

Nous vivons donc plus longtemps, mais vivons-nous plus longtemps en *bonne santé* ? A ce sujet, différentes études s'accordent pour montrer que la prévalence des maladies augmente chez les individus âgés (>65ans). Le vieillissement corrèle ainsi avec un état morbide, avec notamment le développement de pathologies, principalement à caractère chronique, comme le diabète, les maladies pulmonaires, l'arthrose ou les pathologies cardiovasculaires. Des symptômes plus généraux comme la douleur, la détresse psychologique ou la fatigue généralisée émergent également. Paradoxalement, de plus en plus d'études montrent que le déclin fonctionnel (ou l'invalidité), caractérisé par la perte d'autonomie et le besoin d'assistance dans les activités de la vie quotidienne, sont retardés similairement à l'espérance de vie. Pour les personnes de plus de 65 ans, malgré le développement de pathologies chroniques qui sont néanmoins de mieux en mieux diagnostiquées et prises en charge, le gain d'espérance de vie s'accompagne donc d'une meilleure santé par rapport aux cohortes du début du siècle.

Pour les personnes très âgées (>85 ans), la situation est moins claire et les études beaucoup plus restreintes. Certaines cohortes, comme au Japon, s'inscrivent dans l'hypothèse de « l'échec de la réussite » où les individus, s'ils réussissent effectivement à atteindre 100 ans, développent de nombreuses pathologies et invalidités. Au contraire, des études au Danemark soutiennent l'hypothèse du « succès de la réussite » avec des centenaires en bonne santé, susceptibles de vivre encore longtemps (Christensen *et al.*, 2009). Le fait de savoir si l'augmentation de l'espérance de vie favorise « l'échec » ou le « succès » de la santé des populations très âgées reste encore à découvrir ;

il dépendra probablement de nombreux facteurs comme la génétique, le régime alimentaire, le système de santé et les stratégies politiques et gouvernementales en place comme la prévention des pathologies/mortalités liées au tabagisme, alcoolisme, suralimentation, sédentarité, *etc...*

Pour les sociétés des pays développés à la population déclinante et vieillissante, le défi est donc double : comment adapter le système de santé à la proportion grandissante d'une population porteuse de maladies chroniques, voire de perte d'autonomie ? Comment modifier le système économique et social face à la diminution du nombre d'actifs et l'augmentation des retraités ? La réponse à ce dernier défi pourrait reposer sur l'augmentation de l'âge du départ à la retraite et la redistribution du temps de travail ([Vaupel and Loichinger, 2006](#)). Répondre au premier défi nécessite d'acquérir de nouvelles connaissances, d'identifier et de caractériser les mécanismes impliqués dans les pathologies liées à l'âge afin d'en freiner au maximum le développement et/ou d'en minimiser l'impact sur la qualité de vie.

# I. Le vieillissement, une condition complexe.

Il n'existe pas à ce jour de définition universelle, acceptée du vieillissement. Il serait néanmoins défini par les quatre postulats suivants : (i) le vieillissement est universel, il touche tous les individus ; (ii) il est intrinsèque, résulte de causes endogènes ; (iii) il est progressif avec des changements se déclenchant tout au long de la vie et enfin (iv) il est délétère, *i.e.* les processus qui le dirigent sont mauvais pour l'organisme.

Si, à mon avis, certains de ces postulats sont à nuancer et sont discutés au cours de cette section, une définition évidente découlant de ces postulats et des connaissances actuelles peut toutefois être proposée : Le vieillissement est le déclin inévitable, dépendant du temps, des fonctions physiologiques conduisant à l'augmentation de la susceptibilité aux maladies et à la mort.

Afin d'expliquer et comprendre le phénomène de vieillissement et les processus qui le dirigent, de nombreuses théories sont proposées, des marqueurs caractérisés et les liens entre vieillesse et pathologies liée à l'âge analysés. L'ensemble de ces avancées est détaillé dans cette section et constitue une description –sommaire- des connaissances actuelles sur le processus compliqué qu'est le vieillissement.

## A) Théories du vieillissement

Comment et pourquoi vieillissons-nous ? Quand sommes-nous considérés « vieux » ? Peut-on vieillir indéfiniment ? De nombreuses théories existent pour tenter de répondre à ces questions et comprendre les mécanismes du vieillissement. Ces théories se regroupent selon deux grands types d'hypothèses (Jin, 2010) : le vieillissement est soit (i) un événement programmé, ordonné, résultant de la différenciation, croissance et maturation de l'organisme soit (ii) un événement stochastique résultant de l'accumulation d'erreurs et de dommages au cours du temps (théories des erreurs/dommages).

### 1. Théories du vieillissement programmé

Cette catégorie regroupe trois théories. La première est la théorie de la longévité programmée selon laquelle le processus de vieillissement résulte de l'activation/répression de certains gènes. Les exemples les plus emblématiques appuyant cette théorie sont les syndromes progéroïdes, un groupe de maladies génétiques associées à un vieillissement accéléré. Les gènes touchés sont principalement impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Ainsi, pour ne citer que quelques exemples chez la souris, une mutation hypomorphe dans le gène *Atr* (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related, codant pour la kinase ATR impliquée dans la résolution de cassures simple brin de l'ADN)(Murga *et al.*, 2009), une délétion des gènes *Xrcc5* ou *Xrcc6* (X-ray Repair Complementing

defective repair in Chinese hamster cells 5 ou 6, codants pour les protéines Ku80 et Ku70 respectivement, impliquées dans la réparation des cassures double-brin par jonction des extrémités non homologues )(Li *et al.*, 2007) ou encore du gène *Ercc5* (Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 5, codant pour une protéine impliquée dans la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue)(Barnhoorn *et al.*, 2014) sont associés au développement de symptômes de vieillissement accéléré et à une longévité réduite.

La seconde théorie est la théorie endocrine du vieillissement où des changements réguliers dans l'expression des hormones contrôlent le processus du vieillissement. Un acteur principal de cette théorie est l'axe insuline/IGF-1. Cet axe somatotrope repose sur l'expression de l'hormone de croissance, ou somatotropine, et son messenger secondaire l'Insuline-like Growth Factor 1 (IGF-1). La voie de signalisation activée par l'IGF-1 est identique à celle de l'Insuline et est l'une des voies de signalisation les plus conservées phylogénétiquement. Différentes modulations de cette voie de signalisation, par des approches génétiques ou l'utilisation de « drogues » augmentent la longévité et diminuent le développement de maladies liées à l'âge et ce, dans différents modèles biologiques (Fontana, Partridge and Longo, 2010). Ces effets sont intimement liés à l'apport alimentaire mais les mécanismes sous-jacents, s'ils sont parfaitement décrits chez le nématode et la drosophile, restent encore à clarifier chez les mammifères.

Enfin, la dernière théorie dans cette catégorie est la théorie immunologique dans laquelle le déclin du système immunitaire (souvent nommé immunosénescence dans la littérature) conduit à l'augmentation de la susceptibilité de l'organisme aux infections/maladies et donc au vieillissement et à la mort. En effet, le vieillissement s'accompagne, chez l'Homme comme chez la souris, d'un déclin dans le nombre et/ou dans la fonction des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (Kovacs *et al.*, 2009; Frasca and Blomberg, 2016). Cette immunosénescence se caractérise par une diminution de la capacité à répondre aux antigènes, notamment lors des vaccinations (Ciabattini *et al.*, 2018), ainsi que par un niveau persistant d'inflammation de bas-grade.

## **2. Théories de l'erreur/dommage.**

Cette catégorie regroupe cinq théories majeures, initialement décrites distinctement les unes des autres mais que la littérature relie à ce jour par des interactions complexes.

Par exemple, la théorie de l'usure (Wear and Tear theory, en anglais) est l'idée que les cellules et les tissus s'abiment, par leur fonctionnement, au cours du temps, provoquant le déclin fonctionnel observé avec l'âge. Cette théorie coïncide avec celle du « taux de vie » (Rate of living theory) décrite initialement au début du XX<sup>ème</sup> siècle dans laquelle le métabolisme de base, notamment l'utilisation de l'oxygène, corrèle avec la longévité ; plus l'organisme présente un métabolisme de base élevé, plus sa longévité sera courte. Cette théorie, bien que toujours valide à nos jours (Speakman, 2005), est quasiment effacée dans les années 50 par la théorie des radicaux libres. Cette dernière propose que le vieillissement soit causé par l'accumulation de radicaux libres, notamment des espèces

réactives de l'oxygène (ROS) qui sont produites lors des réactions métaboliques ou lors de la respiration cellulaire, capables de provoquer des dommages aux protéines, lipides et à l'ADN cellulaire. Cette théorie bénéficie d'une attention considérable dans la communauté scientifique et les radicaux libres sont aujourd'hui impliqués dans la pathogenèse d'une vaste majorité des maladies liées au vieillissement : pathologies cardiovasculaires, diabète, atteinte rénale chronique, déficience cognitive, sarcopénie et cancer (Liguori *et al.*, 2018). Si l'implication des radicaux libres dans ces pathologies est parfaitement établie, les traitements visant à les contrôler restent aujourd'hui peu caractérisés et les nombreux essais cliniques réalisés pour évaluer l'efficacité de différents antioxydants sont restés majoritairement inefficaces (Steinhubl, 2008). Une explication possible de ces échecs est une mauvaise conception du traitement (dosage, molécule et mode d'administration choisis) mais cela peut également refléter la contribution d'autres sources de dommages dans les pathologies liées à l'âge ; ce dont rendent compte les deux dernières théories. Une de ces sources potentielles serait l'accumulation au cours du temps de macromolécules, principalement de protéines, agrégées (cross-linking theory). L'agrégation des protéines par un phénomène de glycosylation (réaction de Maillard) est aujourd'hui associée au diabète, à l'athérosclérose, aux néphropathies, à la cataracte ainsi qu'à l'inflammation chronique (Nagaraj, Shipanova and Faust, 1996). La dernière théorie, celle des dommages à l'ADN somatique, propose que l'accumulation des dommages à l'ADN (nucléaire et mitochondrial) soit à l'origine de la dysfonction cellulaire et la perte de fonction des tissus observée au cours du vieillissement.

Toutes ces théories ne peuvent expliquer à elles seules le processus de vieillissement, aucune n'exclut une autre et elles sont toutes, très probablement, interconnectées ; hormones et infections peuvent par exemple modifier le métabolisme de base des cellules, conditionnant la production de radicaux libres, associés à la glycosylation des protéines ou encore à des dommages à l'ADN.

## **B) Marqueurs du vieillissement**

L'étude des différentes théories décrites dans la section précédente a permis de définir que le processus de vieillissement résulte d'une accumulation, dépendante du temps, de dommages cellulaires. López-Otín *et al.* (2013) ont identifié différents marqueurs cellulaires et moléculaires de ces dommages. Ces neuf marqueurs du vieillissement sont hiérarchisés selon leur contribution potentielle au processus de vieillissement ainsi qu'au phénotype âgé : les marqueurs dits « primaires » sont les sources des dommages cellulaires, les marqueurs « antagonistes » ne contribuent au processus de vieillissement que s'ils sont fortement dérégulés et enfin les marqueurs « intégrés » sont considérés comme responsables du phénotype.

## 1. Marqueurs « primaires » : sources de dommages

Le point commun caractérisant ces marqueurs dits primaires est que leur présence et leur accumulation est catégoriquement négative. Il s'agit de l'instabilité génomique, de l'usure des télomères, des altérations épigénétiques et de la perte de l'homéostasie des protéines.

### *Instabilité génomique*

Un point-clé du vieillissement est l'accumulation de dommages génomiques (nucléaire et mitochondrial). Ces dommages sont très divers et regroupent les coupures simple- et double-brin, les mutations ponctuelles, les translocations et l'intégration de virus ou de rétrotransposons (Moskalev *et al.*, 2013). En plus de ces atteintes directes, la déstructuration de l'enveloppe nucléaire (=laminopathie) est également liée à des dommages à l'ADN et à un vieillissement accéléré (López-otín *et al.*, 2013).

Les différents dommages à l'ADN sont pris en charge par un système complexe de réparation comprenant différents senseurs, transducteurs et effecteurs capables de réparer la quasi-totalité des atteintes représentées au cours du vieillissement. Or, l'expression et l'efficacité de ces différents acteurs est diminuée au cours du vieillissement, pouvant expliquer l'accumulation des dommages observée (Gorbunova *et al.*, 2007). L'importance de ces systèmes de réparation est en effet validée par de nombreux modèles cellulaires et animaux où la délétion/mutation d'un ou plusieurs des acteurs est associée à une accumulation de dommages à l'ADN et à des syndromes progeroïdes (Folgueras *et al.*, 2018). Cependant, la relation inverse, une surexpression de facteurs impliqués dans la réparation protégeant de l'accumulation des dommages à l'ADN et du vieillissement est (i) peu étudiée et (ii) révèle des résultats disparates (Moskalev *et al.*, 2013). Par exemple, la surexpression du facteur de réparation EEF1E1 (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Epsilon 1) ou celle de PARP1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1) chez la souris sont associées à une diminution de la survie et au développement précoce de pathologies liées à l'âge. Au contraire, la surexpression de la protéine BUB1 (Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1), kinase indispensable à la bonne ségrégation des chromosomes est associée à longévité accrue ainsi qu'à un développement retardé des désordres liés à l'âge (Folgueras *et al.*, 2018).

Les stratégies visant à améliorer la longévité et à réduire le développement de pathologies liées à l'âge sont majoritairement obtenues, non en manipulant les voies de réparation de l'ADN mais principalement en régulant le métabolisme; l'exemple le plus emblématique étant la restriction calorique. L'effet bénéfique sur la stabilité génomique reste encore partiellement à élucider mais agirait potentiellement via la réduction du stress oxydatif. Par ailleurs, si la longévité repose non seulement sur un contrôle des agents endommageant l'ADN, elle est aussi associée à une réparation de l'ADN plus efficace en condition de restriction calorique (Heydari *et al.*, 2007).



### *L'usure des télomères*

Les télomères sont des structures complexes situées à l'extrémité des chromosomes, composées de la répétition d'un hexanucléotide [(TTAGGG)*n*] d'environ 5 à 15 kb chez l'homme et associées à un complexe protéique nommé « shelterin ».

Les études cellulaires sont les premières à montrer que la diminution de la longueur des télomères active une réponse des dommages à l'ADN résultant en un arrêt spécifique du cycle cellulaire : la sénescence répliquative, ou limite de Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961). Cet arrêt de la prolifération peut être inversé par l'expression ectopique de la télomérase, la polymérase impliquée dans le maintien et la réplication des télomères. La télomérase est exprimée et active dans les cellules germinales et les cellules souches adultes ; au contraire, elle n'est pas exprimée dans la plupart des cellules somatiques différenciées et les télomères se raccourcissent donc lors des divisions cellulaires et au cours du vieillissement. Il est à noter que la longueur des télomères peut également être modifiée par le stress oxydatif et certaines endonucléases.

Le rôle des télomères dans le processus de vieillissement est établi notamment grâce aux études génétiques, montrant que des mutations/délétion touchant le système de maintenance des télomères sont associées au développement de pathologies dégénératives et à un vieillissement accéléré. Un exemple d'une de ces téloméropathies est la dyskératose congénitale (Hoareau-aveilla, Henry and Leblanc, 2008). Les patients atteints de cette maladie présentent le plus souvent des mutations dans les gènes *Tert* (Telomerase Reverse Transcriptase) et *Terc* (Telomerase RNA Component) codant pour les différents composants de la télomérase. Ces patients présentent des télomères raccourcis, une mortalité prématurée et le développement de désordres liés à l'âge. Des arguments supplémentaires en faveur de l'implication des télomères dans le vieillissement sont retrouvés dans les modèles animaux. Par exemple chez la souris, la réactivation de la télomérase par transduction virale chez des animaux *Tert*<sup>-/-</sup> réverse les phénotypes de vieillissement. De même, le traitement de souris âgées (1,5 à 2 ans) par un adénovirus exprimant la télomérase améliore leur qualité de vie et allonge leur durée de vie (Folgueras *et al.*, 2018).

La relation entre longueur des télomères, télomérase et vieillissement est donc parfaitement établie. Il est néanmoins important de noter que de des phénotypes de vieillissement peuvent émerger de manière indépendante à la longueur des télomères. En effet, des mutations dans les protéines du complexe shelterin, ou une accumulation de dommages oxydatifs (Anderson *et al.*, 2019) peuvent activer une réponse persistante aux dommages à l'ADN au niveau des télomères et résulter dans un phénotype de vieillissement accéléré. Il serait donc plus exact de parler de *dysfonction des télomères* plutôt que de l'usure des télomères comme marqueur primaire du vieillissement.

### *Altérations épigénétiques*

Les modifications épigénétiques rassemblent les modifications des motifs de méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le remodelage de la chromatine et les altérations transcriptionnelles (*via* les micro-ARNs). Ces différentes altérations retrouvées au cours du vieillissement sont

principalement caractérisées chez les organismes moins « complexes » comme le nématode et la drosophile et les stratégies visant à moduler ces interactions ont permis dans certains cas de modifier la longévité dans ces organismes (López-otín *et al.*, 2013). Chez les mammifères, même si les altérations sont clairement observées au cours du vieillissement, peu d'études sont aujourd'hui capables de déterminer la contribution de ces altérations dans le processus de vieillissement ou encore de réussir à moduler la longévité en modifiant ces différentes altérations. Je citerai néanmoins l'exemple le plus prometteur : la modification des histones H3 par la déacétylase SIRT6 (Sirtuine 6). Les souris *Sirt6*<sup>-/-</sup> présentent un vieillissement accéléré (Mostoslavsky *et al.*, 2006; Peshti *et al.*, 2017) et la surexpression de la protéine inverse le phénotype, avec une qualité et « quantité » de vie supérieure aux contrôles, un effet cependant limitée uniquement aux individus mâles (Kanfi *et al.*, 2012; Roichman *et al.*, 2017).

#### *Perte de l'homéostasie des protéines*

Le maintien de l'homéostasie des protéines est assuré d'une part par l'action des protéines chaperonnes assurant le repliement et la localisation correctes des protéines et d'autre part par les différents mécanismes de dégradation, le protéasome et l'autophagie. Tous ces systèmes sont réduits chez les animaux âgés, notamment *via* la réduction globale de l'expression des différents acteurs (chaperonnes, composants du protéasome/autophagosome) supposant que la dérégulation globale des protéines est un élément clé du vieillissement (Vilchez, Saez and Dillin, 2014). Un argument dans ce sens est que la majorité des pathologies neurodégénératives retrouvées lors du vieillissement, comme la maladie de Parkinson, d'Alzheimer ou d'Huntington, résultent de l'accumulation de protéines endommagées et/ou mal repliées.

Comme pour les *altérations épigénétiques*, les études visant à caractériser l'effet d'une perte de l'homéostasie des protéines dans le processus du vieillissement sont peu nombreuses chez les vertébrés et sont principalement caractérisées, avec succès, chez les nématodes et les insectes. Concernant les protéines chaperonnes, seule la déplétion de la chaperonne CHIP (Carboxyl terminus of Hsp70-Interacting Protein) est documentée chez la souris et est associée à un vieillissement accéléré et une réduction de la longévité (Min *et al.*, 2008). L'effet des protéasomes est étudié par la surexpression d'une sous unité du complexe modifiée pour avoir une activité fortement réduite (souris Tg-β5t)(Tomaru *et al.*, 2012); ces animaux présentent une accumulation de protéines polyubiquitinilées et/ou oxydées associée à une réduction de la qualité de vie et de la longévité.

La contribution de l'autophagie dans le vieillissement est caractérisée chez des souris surexprimant certains composants de l'autophagosome (Lamp2, Atg5) permettant non seulement de restaurer l'autophagie typiquement réduite lors du vieillissement mais également d'améliorer la qualité de vie et la survie des animaux (Folgueras *et al.*, 2018). L'intérêt et l'importance de l'autophagie explose surtout avec la découverte qu'un traitement par la rapamycine, un inhibiteur de mTOR (mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin) contrôlant l'autophagie, permet d'améliorer considérablement la survie des animaux (Wilkinson *et al.*, 2012). L'effet de la rapamycine sur le

vieillessement est strictement et uniquement dépendant de son effet sur l'autophagie chez les organismes moins complexes (levures, nématodes et drosophile). En revanche, chez les mammifères l'effet est moins « clair » et la rapamycine agirait également sur d'autres marqueurs du vieillissement comme l'altération épigénétique et la dérégulation de la réponse au nutriment)(López-otín *et al.*, 2013). Dans ce sens, l'utilisation du Resvératrol, un autre inhibiteur de mTOR, n'a pas d'effet sur la longévité de souris saines (vieillessement physiologique) mais améliore par contre la survie d'animaux soumis à un challenge métabolique ; cette molécule potentialise la survie des souris sous restriction calorique et améliore la longévité des souris sous régime gras (High Fat Diet, HFD)(Bhullar and Hubbard, 2015). Ces différentes études montrent une relation forte entre autophagie et métabolisme dans le vieillissement des mammifères.

#### *Dérégulation de la réponse aux nutriments*

La capacité à déterminer et répondre aux variations environnementales en nutriments, composants de base de la production d'énergie et des structures biologiques, est un prérequis à la survie des organismes. Différentes voies de signalisation sont capables de détecter ces nutriments et vont enclencher les réponses adaptées en se coordonnant entre elles, notamment via la production d'hormones. L'abondance des nutriments entraîne des processus anaboliques (construction de nouvelles molécules/tissus) et de stockage et au contraire la pauvreté en nutriments active les processus cataboliques (destruction/réutilisation des molécules).

La voie Insuline-IGF-1 (IIS) répond au niveau de glucose, l'activité de mTOR dépend, elle, du niveau d'acides aminés. Ces deux voies sont activées en présence d'un environnement riche en nutriments et favorisent les activités cataboliques. L'expression et l'activation des sirtuines et de l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase) dépendent du NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide Adénine Dinucleotide) et de l'AMP/ADP (Adénosine monophosphate / Adénosine diphosphate) respectivement, dont les niveaux sont élevés en contexte pauvre en ressources ; le métabolisme activé en réponse est catabolique.

Dans ce sens, de multiples modèles génétiques (Folgueras *et al.*, 2018) ou pharmacologiques (Rapamycine, Resvératrol (Wilkinson *et al.*, 2012; Bhullar and Hubbard, 2015)) visant à réduire l'activité des voies IIS et mTOR permettent d'améliorer considérablement la longévité des individus et démontrent que les bénéfices liés à la restriction calorique sont, partiellement chez les mammifères, médiés par ces voies (López-Otín *et al.*, 2013). A l'inverse, c'est l'activation des voies Sirtuines et AMPK qui va favoriser la survie. Ces études mettent également en évidence de nombreuses boucles de régulation interconnectant les différentes voies.

Pour ajouter à la complexité de ces régulations, un paradoxe émerge des études caractérisant l'expression et l'activité de la voie IIS : le niveau d'expression de la Somatotropine et d'IGF-1 diminue au cours du vieillissement physiologique et chez les modèles d'animaux progéroïdes. Cette diminution est donc caractéristique du vieillissement alors qu'une diminution constitutive, provoquée améliore la longévité ! Une explication à ce paradoxe serait que l'inactivation de la voie IIS représente une réponse de survie/défense visant à réduire la croissance et le métabolisme afin de

limiter les dommages cellulaires, notamment à l'ADN ([Garinis et al., 2008](#)). Ainsi, les animaux présentant une activation constitutive de la voie IIS survivent plus longtemps car ils présentent une croissance et un métabolisme ralentis et donc, potentiellement moins de dommages cellulaires. Toutefois, cette réponse de survie, si elle est chroniquement activée peut devenir délétère et participer au processus de vieillissement. Cette balance fragile est notamment démontrée dans le cas d'un modèle souris progéroïde, les souris déficientes en *Zmpste24* entraînant la déstructuration du noyau. Ces animaux présentent une forte diminution des niveaux d'hormone de croissance et d'IGF-1 et une supplémentation en IGF-1 permet de rétablir l'activité de la voie IIS, retarde le développement des pathologies liées à l'âge et allonge la survie des individus ([Mariño et al., 2010](#)).

## 2. Marqueurs antagonistes

Les marqueurs antagonistes sont les marqueurs dont l'activation est initialement bénéfique et nécessaire à la survie de l'individu. C'est leur activation chronique ou non contrôlée qui va participer au processus de vieillissement

### *Dysfonction mitochondriale*

De nombreuses données et modèles génétiques montrent un effet néfaste des ROS produits par les mitochondries (voir théorie des radicaux libres I.B.2). Cependant, des études plus récentes accordent un effet protecteur des ROS mitochondriaux dans des conditions de stress. Les ROS mitochondriaux sont ainsi indispensables à l'activation de mécanismes permettant la survie des cellules (i) en hypoxie, via l'activation des facteurs HIF (Hypoxia-induced Factors), (ii) carencées, en activant l'autophagie et le catabolisme, (iii) lors d'infection, nécessaire à la production de cytokines inflammatoires et enfin (iv) lors de la réplication, en conditionnant la différenciation ([Sena and Chandel, 2012](#)).

Ces différentes études aux résultats *a priori* opposés poussent [Hekimi, Lapointe et Wen \(2011\)](#) à réévaluer la contribution des ROS mitochondriaux dans le processus de vieillissement et harmoniser les différentes études. Les auteurs proposent ainsi que les ROS soient un signal de survie en réponse au stress, permettant la mise en place des réponses compensatrices appropriées. Avec l'âge, le stress et les dommages s'accumulent, le niveau de ROS augmente en parallèle pour tenter de maintenir la survie ; à partir d'un certain seuil, les ROS sont néfastes et deviennent contributeurs, plutôt que protecteurs, au processus du vieillissement.

Indépendamment des ROS, les dysfonctions mitochondriales peuvent également être impliquées dans le processus de vieillissement. Ces dysfonctions regroupent les mutations de l'ADN mitochondrial, l'oxydation des protéines, la déstabilisation de la chaîne respiratoire ou l'altération de la composition lipidique des membranes. Ce sont aussi la diminution de la biogenèse, inhibée lors des dommages à l'ADN ou d'une dysfonction des télomères, ainsi que le défaut d'élimination qui est contrôlé par l'autophagie et indirectement les Sirtuines ([López-Otín et al., 2013](#)). Toutes ces données

démontrent un lien fort entre dysfonction mitochondriale, ROS et l'ensemble des marqueurs primaires du vieillissement.

### *Sénescence cellulaire*

La sénescence cellulaire est aujourd'hui communément caractérisée par l'arrêt permanent du cycle cellulaire en réponse à divers stress (dommages à l'ADN, dysfonction des télomères, stress oxydant, surexpression d'oncogènes) et est associée à des changements phénotypiques caractéristiques. Ces caractéristiques incluent un arrêt de croissance irréversible, une forte activité de la SA- $\beta$ GAL (Senescence-Associated  $\beta$ -Galactosidase), l'expression de suppresseurs de tumeurs et d'inhibiteurs du cycle cellulaire (p16<sup>INK4a</sup>, p19<sup>ARF</sup>, p21, p53, pRB) avec, parfois, l'apparition de foyers nucléaires d'hétérochromatine (SAHF). Les cellules sénescents sécrètent également de nombreux facteurs à activité autocrine et paracrine, tels que des facteurs de croissance, des cytokines ou des protéases, regroupés sous le nom de SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Si aucun de ces marqueurs n'est exclusivement spécifique ou universel au phénotype, il est largement admis que les cellules sénescents en expriment la plupart.

La sénescence cellulaire n'est pas une simple « pause » mais permet de limiter activement la progression tumorale ; elle est aussi impliquée dans le développement embryonnaire (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013), la résolution des blessures (Demaria *et al.*, 2014) et l'atténuation de la fibrose hépatique (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Concernant le vieillissement, il est clairement admis que les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus ; Krishnamurthy *et al.* (2004) montrent ainsi une corrélation robuste entre expression de p16<sup>INK4a</sup> et âge chronologique chez la souris. Une implication de la sénescence dans le processus de vieillissement est suggérée par une méta-analyse d'études GWAS qui associe le locus INK4a/ARF (codant pour p16<sup>INK4a</sup> et p19<sup>ARF</sup>) à de nombreuses pathologies liées à l'âge. Cette relation est démontrée par l'élimination des cellules sénescence (cellules positives pour p16<sup>INK4a</sup>) chez des souris progéroïdes (Baker *et al.*, 2011) ou wild-type âgées (Baker *et al.*, 2016) ; dans les deux cas, l'établissement des pathologies liées à l'âge est retardé et la longévité est allongée !

Comme décrit pour la *dysfonction mitochondriale*, l'induction de la sénescence cellulaire et de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est un mécanisme d'abord physiologique, une défense à la propagation de cellules endommagées et une aide à la résolution d'atteintes (blessures, fibrose). Mais avec le vieillissement, comme les dommages sont chroniques et augmentent, les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus, *via* une génération accélérée et/ou une élimination insuffisante médiée par système immunitaire inefficace et participent ainsi au processus de vieillissement et à l'établissement de pathologies.

### 3. Marqueurs intégrés

Ce sont les marqueurs qui apparaissent lorsque les dommages accumulés *via* les marqueurs primaires et antagonistes ne peuvent plus être compensés par les mécanismes de réparation/réponse au stress. Ce sont les principaux acteurs du déclin fonctionnel observé avec l'âge.

#### *« Épuisement » des cellules souches*

La perte de capacité de régénération des tissus est l'une des caractéristiques les plus évidentes du vieillissement. Le déclin fonctionnel des cellules souches, résultant d'une perte de capacité à se renouveler, proliférer, s'activer et se différencier, va toucher virtuellement tous les tissus : le sang (cellules hématopoïétiques), l'intestin, la peau, les muscles ou encore le cerveau (Keyes and Fuchs, 2018). Les modèles génétiques et les traitements pharmaceutiques démontrent que l'ensemble des marqueurs du vieillissement décrits jusqu'ici participent à l'établissement de cette perte de fonction des cellules souches (Folgueras *et al.*, 2018).

L'épuisement des cellules souches se présente alors comme la conséquence de l'accumulation de multiples dommages liés au vieillissement et constitue l'un des principaux coupables du phénotype observé avec l'âge. Ce marqueur n'est néanmoins pas seulement la conséquence de changements intrinsèques aux cellules mais peut également être influencé par le milieu extérieur ; c'est le dernier des marqueurs de vieillissement.

#### *Altération des communications inter-cellulaires*

Le processus de vieillissement est un phénomène global touchant tous les tissus suggérant que des facteurs extrinsèques, présents dans l'environnement cellulaire, sont impliqués dans ce déclin systémique. En effet, avec l'âge les cellules modifient la quantité et les types de facteurs sécrétés qui vont pouvoir moduler les cellules voisines et/ou distantes. Ces cellules peuvent à leur tour modifier leur sécrétome, créant un cercle vicieux et néfaste.

Les exemples les plus évidents de l'importance de facteurs sécrétés dans le processus de vieillissement sont les études de parabioses hétérochronique où deux souris d'âge différents partageant leur système circulatoire (Conboy *et al.*, 2005; Villeda *et al.*, 2011). L'exposition à un sang « jeune » permet de rétablir le potentiel de régénération du muscle âgé, notamment en « rajeunissant » les cellules souches. A l'inverse, les cellules souches neuronales exposées à un sang âgé perdent leur capacité de régénération impliquant que le déclin fonctionnel observé provient, en partie, de changements avec l'âge dans les facteurs sécrétés et véhiculés de manière systémique (sang).

Une autre altération de la communication intercellulaire caractéristique du vieillissement est l'inflammation, présente de manière chronique, persistante et systémique chez les mammifères âgés (on parle d'« Inflammaging »). Cette inflammation résulterait de l'accumulation de molécules (Acides nucléiques, protéines, lipides) endommagées ou mal localisées provenant de cellules ou d'organelles abimées ou mortes. Dans ce contexte particulier, ces signaux endogènes peuvent être

reconnus et activer le système immunitaire à l'origine de l'inflammation chronique observée (Franceschi *et al.*, 2017). Le déclin du système immunitaire, caractérisé par des réactions inflammatoires mal contrôlées, ainsi que l'accumulation de cellules sénescentes pourrait également participer au phénotype inflammatoire.

L'inflammageing se caractérise par la forte activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like Receptor family, Pyrin domain containing 3), de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) et la sécrétion de cytokines proinflammatoires comme l'Interleukine-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor Alpha) et les interférons (IFN). Cette inflammation chronique est impliquée dans la pathogenèse de la plupart des pathologies liées à l'âge. Elle contribue notamment à la dégénérescence des tissus en inhibant la fonction des cellules souche ou en provoquant l'apoptose des cellules ; elle participe également à l'accumulation des cellules sénescentes en diminuant l'activité du système immunitaire (López-Otín *et al.*, 2013; Frasca and Blomberg, 2016).

L'identification et la caractérisation des différents marqueurs liés au vieillissement permettent d'établir des pistes thérapeutiques potentielles visant à ralentir l'accumulation des différentes altérations, décrites tout au long de cette section, qui dirigent le processus de vieillissement. Le contrôle de ces altérations est crucial car il conditionne non seulement la longévité mais principalement l'établissement des pathologies liées à l'âge et le succès des traitements envisagés (s'ils existent).

### **C) Pathologies liées à l'âge**

L'âge est le principal facteur de risque du développement de la plupart des pathologies chroniques et/ou dégénératives et conditionne la longévité et la qualité de vie. Dans ce sens, les interventions visant à allonger la survie des modèles animaux diminuent ou freinent le développement de ces pathologies.

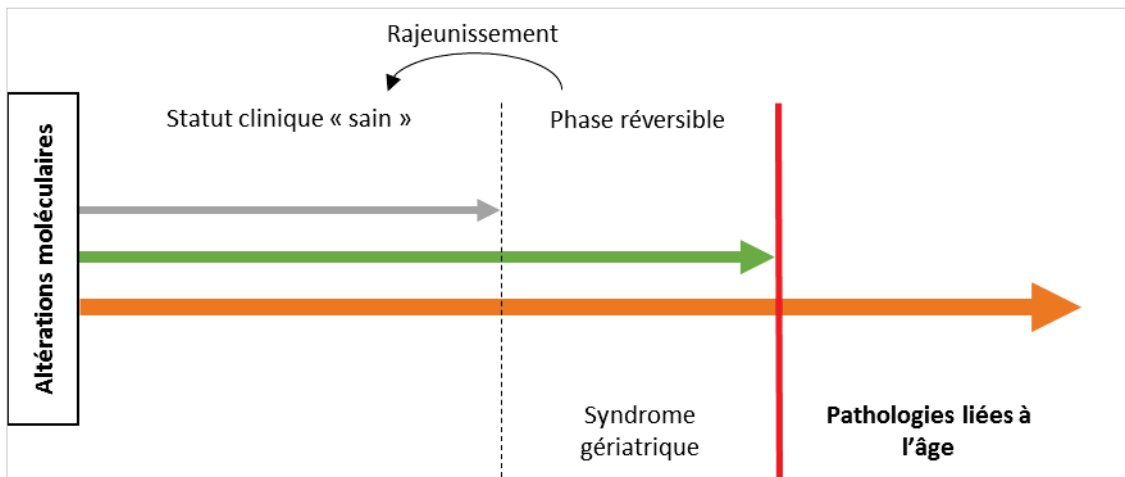
Quelle est la relation entre vieillissement et pathologies liées à l'âge ? Les deux partageraient les mêmes mécanismes de base : l'accumulation des altérations moléculaires et cellulaires décrits dans la section précédente. Dans cette hypothèse, le vieillissement et les pathologies liées à l'âge sont à considérer comme différentes trajectoires d'un même processus mais avec des vitesses différentes (Franceschi *et al.*, 2018). Le développement des pathologies liées à l'âge serait donc un phénomène de vieillissement « accéléré » alors que les centenaires, ce petit groupe de personnes capables d'atteindre un grand âge en ne développant peu ou pas de pathologies, présenteraient un vieillissement ralenti.

Cette hypothèse est appuyée par le fait que les maladies liées à l'âge présentent une longue période asymptomatique, où la pathologie n'est pas diagnostiquée mais les altérations moléculaires et cellulaires sont déjà présentes dans les tissus. Je citerai ici l'exemple de deux pathologies neurodégénératives : la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Ces deux pathologies résultent de l'accumulation de protéines mal repliées, les protéines  $\beta$ -amyloïdes et Tau dans le cas d'Alzheimer et l' $\alpha$ -synucléine pour la maladie de Parkinson. Dans les deux cas, ces altérations sont retrouvées chez des patients âgés sans signes cliniques de la maladie, suggérant un continuum entre le vieillissement physiologique et la maladie neurodégénérative liée à l'âge (Buchman *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2012). Les deux pathologies présentent également de nombreux marqueurs du vieillissement décrits précédemment : dommages à l'ADN, dysfonction mitochondriale, perte de l'homéostasie des protéines, épuisement des cellules souches, sénescence cellulaire et enfin, inflammation. Il est important de noter que ces altérations ne sont pas limitées aux neurones mais affectent l'ensemble de l'organisme avec notamment dans le cas de ces pathologies, le système immunitaire et l'épithélium intestinal qui sont deux régulateurs-clés du microbiote, fortement dérégulé chez les patients (Roy Sarkar and Banerjee, 2019).

Comment des mécanismes similaires peuvent-ils conduire à un vieillissement sain d'un côté et au développement de pathologies de l'autre ? Pour Franceschi *et al.* (2018) les altérations moléculaires et cellulaires liant vieillissement et pathologies s'inscrivent dans le concept « d'hormèse » selon lequel un signal de stress peut être à la fois bénéfique et néfaste selon son intensité (Zimmermann *et al.*, 2014). Si l'intensité des altérations ne dépasse par le seuil au-delà duquel les mécanismes adaptatifs de réponse au stress ne sont plus protecteurs, le vieillissement sera « réussi ». Au contraire, des stress trop importants vont accélérer ce vieillissement et le développement des pathologies. Avec cette théorie, même les centenaires « sains » (super-agers, en anglais) n'échappent pas au déclin physiologique et à l'accumulation d'altérations dans les tissus mais le développement de ce processus est suffisamment lent pour leur permettre de rester sous le seuil du développement de pathologies (Figure 1).

Suivant cette théorie, il devient crucial d'identifier des biomarqueurs d'âge biologique, c'est à dire capables d'identifier des individus « plus jeunes » ou « plus âgés » que leur âge chronologique, afin d'anticiper le développement de symptômes cliniques. Malheureusement à ce jour, les marqueurs proposés (méthylation de l'ADN, N-glycosylation des protéines ou encore composition du microbiote intestinal) s'ils permettent effectivement d'établir un niveau d'altération lié au vieillissement (= âge biologique), ils ne peuvent prédire quelle(s) maladie(s) la personne sera prédisposée à développer (Franceschi *et al.*, 2018).





**Figure 1 : Continuum entre vieillissement et pathologies liées à l'âge.** La progression et l'accumulation des altérations moléculaires définiront le développement de pathologies chez les individus. Certains, comme les centenaires, présentent un processus d'accumulation d'altérations moléculaires suffisamment lent pour rester sous le seuil de développement de pathologies manifestes (flèche grise). Une accumulation plus rapide des altérations conduit chez certains au développement d'un syndrome gériatrique (flèche verte), une condition regroupant des atteintes polyfactorielles telles que l'anorexie, la fragilité, la dépression, la confusion mentale ou les douleurs chroniques. Ce statut est considéré comme réversible et des stratégies de rajeunissement devraient rétablir un statut clinique sain. Enfin, tous les autres individus vont présenter un vieillissement « accéléré » avec l'accumulation rapide et non contrôlée d'altérations à l'origine du développement de pathologies liées à l'âge (flèche orange).

Une implication au continuum vieillissement-pathologies liées à l'âge est qu'une médecine efficace serait de lutter contre le vieillissement pour combattre les différentes pathologies, et non de les traiter une par une. Deux perspectives sont ainsi possibles : (i) ralentir au maximum la progression du vieillissement avec des traitements/style de vie contrôlant l'établissement des différents marqueurs ou (ii) plus radicalement, essayer de rajeunir les tissus/organes. Ces stratégies de rajeunissement reposent actuellement sur l'élimination des cellules sénescents avec l'utilisation de sénolytiques, la régulation du métabolisme, l'administration de facteurs sanguins ou la reprogrammation cellulaire (Mahmoudi, Xu et Brunet, 2019). Principalement caractérisées chez la souris ou dans un système de culture cellulaire humaine, ces stratégies devraient néanmoins se transposer dans un futur très proche chez l'Homme et contribueraient très probablement à l'augmentation de la limite d'espérance de vie.

Malgré ces avancées, il reste encore aujourd'hui extrêmement important de caractériser de nouveaux acteurs des altérations moléculaires liées à l'âge et leur contribution dans les différentes pathologies associées afin d'identifier de nouveaux moyens de freiner le processus de vieillissement, voire de l'inverser, pour aider les organismes à rester « sain » et actif le plus longtemps possible.

## II. DICER1 : Une enzyme aux multiples facettes.

La protéine DICER, découverte chez la drosophile au début des années 2000 (Bernstein *et al.*, 2001) est initialement décrite et caractérisée pour son rôle majeur dans la maturation des micro-ARN (miR). Le chapitre suivant va montrer comment les études réalisées jusqu'à aujourd'hui révèlent non seulement une protéine hautement conservée au cours de l'évolution, mais également une enzyme capable d'assurer une grande variété de fonctions grâce à ses multiples domaines qui vont définir les substrats, les cofacteurs et les différents produits de ces interactions. La brève description des fonctions de DICER permettra j'espère de montrer comment la protéine pourrait être un élément relevant dans les études du vieillissement.

### A) Généralités sur DICER

#### 1. Famille des enzymes ribonucléases III (RNase III)

DICER est une enzyme appartenant à la famille des ribonucléases III (RNase III). Ces molécules se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs domaine(s) RNase III capables, sous forme d'un dimère, de cliver l'ARN double-brin. Les RNases III sont présentes chez la quasi-totalité des bactéries et des Eucaryotes et se divisent en 3 classes selon le niveau de complexité de la molécule.

Les RNases III de classe 1 regroupent les enzymes les plus simples représentées chez les bactéries et les Eucaryotes « simples ». Dans ces organismes, l'activité catabolique nécessite la dimérisation de 2 molécules. L'évolution des enzymes chez les Eucaryotes supérieurs complexifie les molécules en ajoutant des domaines supplémentaires, définissant les classes 2 et 3 (cette dernière classe étant représentée majoritairement par DICER). Ces nouveaux domaines permettent d'acquérir une activité catabolique *via* l'intradimérisation des modules RNase III ainsi que l'apparition de fonctions complémentaires.

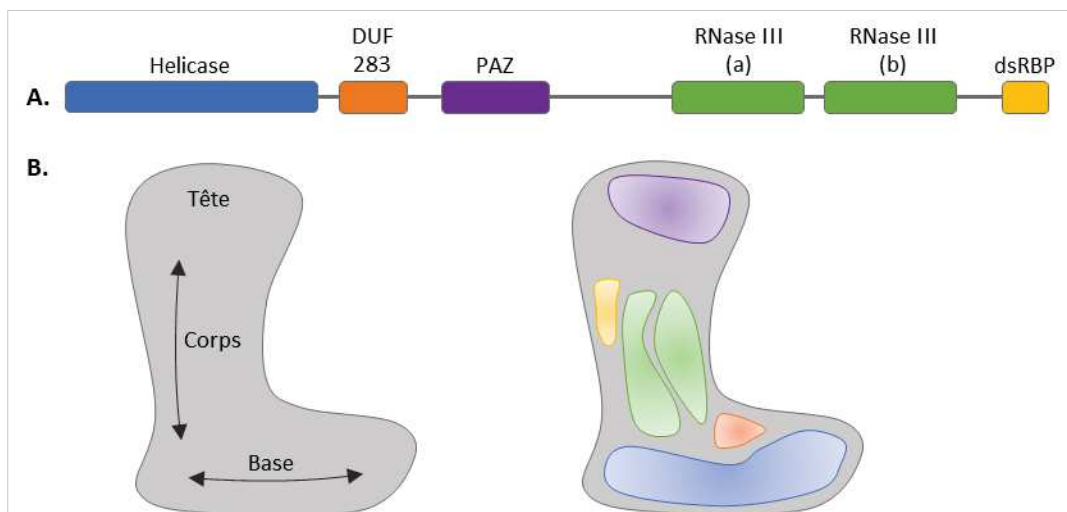
#### 2. La protéine DICER : structure et domaines

Bien que la protéine DICER n'ait à ce jour encore jamais pu être cristallisée entièrement, de nombreuses études ont pu établir la structure et la position des différents domaines composant l'enzyme. Les principaux domaines d'une protéine DICER « type » sont les suivants (de l'extrémité N terminale à C-terminale – **Figure 2A**) :

- Domaine hélicase ARN : la fixation de l'ARN à ce domaine permettrait de discriminer différents types de substrats et d'améliorer le clivage par un changement de conformation substrat-dépendant de l'enzyme (Taylor *et al.*, 2013). La présence de ce domaine n'est cependant pas nécessaire à l'activité endonucléase de la protéine (Ye, Paroo and Liu, 2007).

- Domaine DUF283 (Domaine of Unknow Function 283) : la fonction de ce domaine n'est à ce jour pas connue. Il est néanmoins nécessaire pour la bonne conformation de la protéine et son activité endonucléase. Une étude montre également que ce module est capable de lier l'acide nucléique sous forme simple-brin (Kurzynska-Kokorniak *et al.*, 2016), sans pouvoir déterminer de fonction à cette interaction.
- Domaine PAZ (Piwi/Argonaut/Zwille) : ce domaine est indispensable à la reconnaissance et la fixation du substrat, son affinité à l'enzyme, ainsi qu'à l'activité catalytique de l'enzyme.
- Domaines RNase III (a et b) : Ces deux modules composent le cœur catalytique de l'enzyme et sont responsables du clivage des différents substrats.
- Domaine RBP (RNA-Binding Protein) : domaine de liaison à l'ARN double-brin

La structure tertiaire de DICER forme un « L » avec à sa base, les domaines hélicase et DUF283, au niveau du corps, les domaines RNase III et RBP et à la tête, le domaine PAZ (Figure 2B).



**Figure 2 : Domaines et structure de la protéine DICER** A| Représentation graphique des différents domaines de la protéine DICER non repliée. B| Représentation de la structure tertiaire de la protéine, avec un repliement en forme de « L » et de l'organisation spatiale des domaines dans la protéine (domaine de la même couleur qu'en A.)

### 3. Évolution des homologues *Dicer*

Différentes protéines DICER peuvent être retrouvées selon les organismes. En effet, la famille de gènes *Dicer* se serait diversifiée de manière indépendante chez les animaux et les plantes à partir d'un Eucaryote ancestral, coïncidant avec l'apparition de la multicellularité (Mukherjee, Campos and Kolaczowski, 2013). Cette diversification répondrait alors à un besoin de complexification dans la régulation d'expression des gènes chez les organismes pluricellulaires. La diversification a donné naissance à deux groupes chez les animaux (*Dicer-1* et *Dicer-2*) et à 4 groupes chez les plantes (protéines *Dicer-like* (DCL), DCL-1 à DCL-4). Chacun de ces groupes reconnaît des substrats et génère des produits différents.

L'exemple le plus emblématique et le mieux caractérisé à ce jour est retrouvé chez la drosophile. DICER-1 reconnaît spécifiquement les micro-ARNs précurseurs, provenant de la transcription de l'ADN cellulaire. Ces précurseurs, simple-brin mais formant une structure tige-boucle, sont clivés en micro-ARN mature ensuite impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes (décrit dans la partie II.C.1). DICER-2 reconnaît des ARNs double-brin endogènes et exogènes, notamment les ARNs issus de particules virales. Ces ARNs sont clivés en siRNA (silencing RNA ou short-interferent RNA) qui vont participer au processus de RNA interférence (RNAi) en conduisant à la dégradation des ARN cibles (Lee *et al.*, 2004). DICER-2 a donc essentiellement une activité antivirale qui est reconnue comme indispensable à la protection des organismes contre les virus (Deddouche *et al.*, 2008).

De manière intéressante, DICER-2 est perdu chez les animaux ayant développé une stratégie antivirale alternative : il s'agit du système « Interféron » présent exclusivement chez les vertébrés. Mon modèle d'intérêt, la souris, ne possède alors plus qu'une seule copie dans son génome, notée *Dicer1*.

## B) Le gène *Dicer1* et sa régulation chez la souris

### 1. Transcription du gène *Dicer1*

La localisation chromosomique du gène *Dicer1*, ainsi que le nombre d'exons dont il est composé varient selon les espèces. Chez la souris, *Dicer1* est localisé sur le chromosome 12 et comporte 31 exons.

Le gène produit six transcrits par épissage alternatif ; quatre d'entre eux ne sont pas codants. Un des transcrits codants donne la protéine complète ; l'autre est responsable de la production d'une forme tronquée de DICER dans sa partie N-terminale, avec notamment la perte du domaine hélicase. Cette isoforme, nommée *Dicer*<sup>0</sup>, est spécifique de la famille des *Muridae* (rat et souris) et son expression est restreinte aux oocytes (voir partie III.B.n) (Flemer *et al.*, 2013).

### 2. Régulation transcriptionnelle de *Dicer1*

Si la structure du gène et ses transcrits chez l'homme et la souris sont aujourd'hui bien décrits, les processus régulant sa transcription sont en revanche bien moins connus. Je cite ici les quelques exemples décrits dans la littérature.

En 2010, Levy *et al.* (2010), montrent que le gène *Dicer1*, chez l'homme comme chez la souris, est sous contrôle du facteur de transcription MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) dans les mélanocytes. La fixation du facteur de transcription en amont du gène *Dicer1* active sa transcription lors de la différenciation de la cellule.

Identifié par un ChIPSeq (chromatin immunoprecipitation and sequencing) réalisé à partir de kératinocytes humains, le facteur de transcription TA-p63, un membre de la famille de la protéine P53, est également capable d'activer la transcription de *Dicer1*. Cette observation, ensuite validée dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) implique l'axe TA-p63/DICER dans la régulation de la tumorigenèse et de la sénescence cellulaire (Su *et al.*, 2010).

Le ChipSeq permet d'identifier dans les années suivantes les facteurs de transcription SOX-4 (SRY-related high-mobility group box4) et  $\beta$ -Caténine capables de réguler l'expression du gène *Dicer1* dans les mélanomes (Jafarnejad *et al.*, 2013) et les neurones des noyaux accumbens respectivement (Dias *et al.*, 2014).

Ces différentes données, bien que relativement éparses, révèlent néanmoins un contrôle strict de l'expression de *Dicer1* dans le temps (e.g lors d'une différenciation cellulaire) et dans l'espace (spécifiquement à un type cellulaire). Pour ajouter à cette complexité, les travaux de Wiesen et Tomasi (2009) montrent clairement que dans différentes lignées cellulaires humaines, le niveau d'expression de l'ARNm de *Dicer1* ne corrèle pas toujours avec l'expression de la protéine, impliquant des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

### 3. Régulation post-transcriptionnelle de *Dicer1*

De même que pour la régulation transcriptionnelle, les données montrant une régulation post-transcriptionnelle de *Dicer1* sont encore très limitées.

En étudiant différentes lignées cellulaires humaines, Wiesen et Tomasi (2009) montrent que l'expression de la protéine DICER est diminuée par un traitement à la TSA (deacetylase inhibitor trichostatin A) et différents stress cellulaires comme une accumulation de ROS, un traitement au *phorbol*-12-myristate-13-acetate (PMA) ou encore une sur-activation de l'oncogène RAS. Ils montrent également que l'ARN double-brin et les interférons de type I (IFN-I) diminuent l'expression de DICER alors que l'IFN $\gamma$  l'augmente. Ces changements sont observés majoritairement au niveau de l'expression de la protéine et non de l'ARN messenger, impliquant des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle qui ne sont néanmoins pas proposés ou décrits par les auteurs.

Certains mécanismes de régulation ont pu néanmoins être davantage décrits et caractérisés. Ainsi, identifiée initialement dans un système *in vitro* (cellules humaines HeLa), la protéine AUF1 (AU binding factor 1) est capable de lier l'ARNm de *Dicer1*, provoquant son instabilité (Abdelmohsen *et al.*, 2012). Cette interaction est également confirmée dans les cellules mononuclées du sang (PBMC) aussi bien chez l'homme que chez la souris (Noren Hooten *et al.*, 2016). Dans cette dernière étude, il est montré que la Metformine, un agent antidiabétique, régule indirectement DICER en provoquant le détachement et la relocalisation d'AUF1 dans le noyau et donc la stabilisation de l'ARNm de *Dicer1*. De manière très intéressante, les travaux antérieurs de l'équipe associent un traitement

chronique de Metformine et augmentation de la qualité et durée de vie chez la souris ([Martin-Montalvo et al., 2013](#)) ; ceci suggère indirectement une implication de DICER dans le vieillissement !

Dans une étude visant à localiser les séquences capables d'être liées par l'enzyme DICER, [Rybak-Wolf et al. \(2014\)](#) découvrent que le transcrit de *Dicer1* lui-même contient plusieurs sites de fixation de la protéine. Un mécanisme d'auto-régulation de l'expression est alors proposé, avec la fixation de la protéine DICER sur son propre ARN messager inhibant sa traduction.

Les derniers éléments décrits dans la régulation post-transcriptionnelle de *Dicer1* sont les miRs. En effet, l'ARNm issu de *Dicer1* possède des sites de fixation pour les miR let-7, miR 103/107 et miR 130a ([Ha and Kim, 2014](#)). Tous ces miRs, une fois fixés à l'ARNm, inhibent la traduction de l'ARNm de *Dicer1* et diminuent donc son expression.

#### 4. Régulation de la protéine DICER

Une fois la protéine traduite, différents mécanismes de régulation peuvent encore intervenir.

DICER, chez la souris comme chez l'homme, peut être phosphorylée sur différents résidus. La phosphorylation va définir la localisation de la protéine ; dans son état basal non phosphorylée, elle est majoritairement cytoplasmique. Sa phosphorylation la délocalise dans le noyau. La capacité de se transloquer d'un compartiment à l'autre en fonction son état de phosphorylation est un processus conservé ([Drake et al., 2014](#)) et nécessaire au bon fonctionnement de la cellule et au développement de l'organisme. En effet, l'expression d'une protéine constitutivement phosphorylée chez la souris provoque un phénotype sévère, avec une mortalité périnatale élevée ainsi qu'une infertilité et un vieillissement accéléré chez les animaux survivants ([Aryal et al., 2019](#)).

DICER peut également être modifiée par l'ajout de peptides SUMO. Ce phénomène est décrit notamment dans les macrophages humains exposés à la fumée de cigarette. Les mécanismes sous-jacents restent à élucider, mais la SUMOylation de la protéine diminue son activité de clivage et à terme, son expression dans les cellules ([Gross et al., 2014](#)).

Le niveau d'expression de la protéine est également régulé par son niveau de dégradation. Ainsi, le Panoblinostat, inhibiteur non sélectif des histones désacétylases (HDAC 1 à 9, 11), agit sur le niveau d'expression de DICER non pas au niveau de sa transcription comme attendu, mais plutôt en dirigeant sa dégradation par le protéasome *via* un mécanisme qui reste encore à élucider ([Hoffend, Magner and Tomasi, 2017](#)). DICER est aussi la cible d'une autophagie sélective dépendante du récepteur NDP52 (Nuclear Dot Protein 52 Kd) ([Gibbings et al., 2012](#)).

Enfin, il est important de mentionner que même si la protéine seule est capable de cliver l'ARN double-brin *in vitro*, il est aujourd'hui bien établi que DICER fonctionne majoritairement dans des complexes multiprotéiques dont l'activité va dépendre des différents cofacteurs. Un exemple peut être donné avec la régulation de l'activité de clivage de DICER par le fer cytosolique. En condition

normal, le chélateur de fer nommé PCBP2 (Poly(C)-binding protein 2) se multimérise et fixe la protéine DICER, améliorant son activité catabolique. Un excès de fer inhibe cette activité, d'une part en empêchant la multimérisation de PCBP2 et d'autre part en empêchant sa liaison à DICER (Li *et al.*, 2012).

Les régulations post-traductionnelles ainsi que les cofacteurs de DICER vont ainsi non seulement réguler l'activité catabolique de l'enzyme mais également conditionner sa localisation et ses substrats, définissant un ensemble de fonctions bien distinctes.

## C) Les fonctions de DICER

### 1. Fonction classique : maturation des miRs

#### *Les miRs, acteurs de l'interférence ARN (RNAi)*

Le premier microARN a été identifié il y a presque 40 ans chez le nématode *Caenorhabditis elegans* : il s'agit de Lin-4, impliqué dans le développement (Horvitz and Sulston, 1980). Lin-4 est initialement décrit comme un gène codant, et ce n'est que 10 ans plus tard que les travaux de Wightman, Ha and Ruvkun (1993) vont le caractériser comme un petit ARN non codant de 22 nucléotides, capable de fixer un autre ARN impliqué dans le développement, l'ARN messager lin-14 et d'en réduire l'expression de la protéine résultante LIN-14. Ces travaux restent peu significatifs jusqu'à l'identification d'un autre micro-ARN : Let-7. Ce miR est retrouvé conservé dans de nombreux organismes suggérant que cette classe d'ARN régulateur a un rôle biologique bien plus étendu que le simple développement du nématode (Pasquinelli *et al.*, 2000). Ces travaux précipitent la caractérisation de l'interférence ARN (RNAi), *i.e* l'inhibition post transcriptionnelle des gènes par la fixation de micro-ARN, la découverte de plusieurs milliers de miRs ainsi que l'identification des différents acteurs de leur biogenèse.

#### *Biogenèse des miRs*

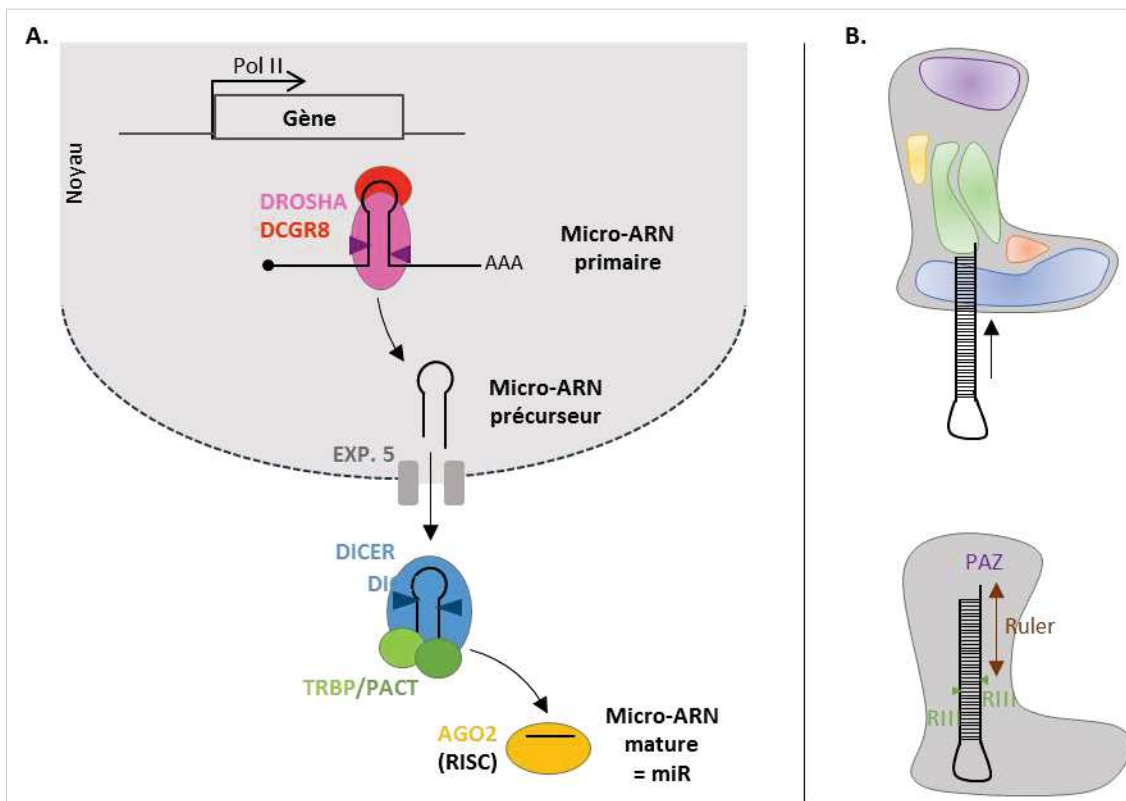
Plusieurs étapes sont nécessaires avant l'obtention d'un miR mature (Figure 3A). La première étape est l'obtention d'un micro-ARN primaire (pri-miR). Ce pri-miR peut être le seul transcrit d'un gène ou bien être transcrit à partir de séquences introniques ou non traduites (UTR : Untranslated Transcribed Region) d'un gène codant. De manière similaire aux ARN messagers, le pri-miR est généralement épissé, possède une coiffe et une queue poly-A. À cette étape, il s'agit d'un ARN long (~1000 nucléotides) possédant une structure en tige-boucle interne et ses extrémités 3' et 5' sous forme simple-brin.

Un fois transcrit, le pri-miR va être pris en charge par le complexe « microprocesseur » composé de DROSHA et de DGCR8 (DiGeorge syndrome Chromosomal Region 8). Le complexe reconnaît et fixe la

structure en tige-boucle de l'ARN et DROSHA clive les extrémités 3' et 5' libérant un petit ARN (~65 nucléotides) en forme d'épingle : il s'agit d'un micro-ARN précurseur (pre-miR).

Le précurseur est ensuite exporté dans le cytoplasme grâce à l'exportine 5 (EXP5) où il va être reconnu par un complexe protéique contenant DICER. Cette dernière va fixer et cliver l'ARN au niveau de la boucle pour former un duplex ARN. La fixation et le site de clivage sont aujourd'hui bien caractérisés grâce à l'étude des différents domaines de la protéine décrits en II.A.2. Le domaine hélicase permet de fixer le précurseur et de le positionner au sein de la protéine. Deux poches au sein du domaine PAZ vont ainsi pouvoir fixer l'ARN, préférentiellement au niveau de son extrémité 3'. Le site de clivage par les domaines RNase III est situé à une distance fixe de l'extrémité 3' (3' counting rule), typiquement entre 21 et 25 nucléotides (**Figure 3B**).

DICER agit au sein d'un complexe multiprotéique, notamment avec la fixation de la protéine TRBP (TAR RNA Binding Protein) et son co-facteur PACT (Protein Activator of PKR). Si ces deux protéines ont été identifiées très tôt dans la voie de biogenèse des miRs, leur rôle reste incertain chez les mammifères. Certaines données suggèrent qu'elles peuvent influencer la localisation du site de clivage et l'efficacité de ce dernier.



**Figure 3 : Biogenèse des miRs. A** | L'obtention d'un miR est le résultat de plusieurs étapes : Le micro-ARN primaire issu de la transcription subit un premier clivage dans le noyau par le complexe micro-processeur (DROSHA + DGCR8). Le micro-ARN précurseur formé est exporté dans le cytoplasme *via* l'EXP5 et clivé par le complexe comprenant DICER. Un des brins du duplex formé est pris en charge par le complexe RISC composé de protéine AGO et forme le miR, fonctionnel. **B** | Le micro-ARN précurseur est positionné dans le site catalytique de DICER *via* sa base, avec l'aide du domaine hélicase. Une fois positionné, la distance entre les domaines PAZ et RNase III détermine la position au niveau de laquelle est clivé le micro-RNA (ruler).



La dernière étape consiste à l'intégration du duplex ARN formé par DICER au sein du complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex) formé par les protéines argonautes (AGO). Un des brins du duplex, nommé brin guide, est sélectionné grâce à ses propriétés de stabilité thermodynamique et donne le microARN mature. Le second brin, nommé brin passager et noté microARN\*, va être rapidement dégradé dans le cytoplasme après s'être détaché du duplex.

#### *DROSHA et DICER, des protéines aux fonctions polyvalentes éclipsées par l'étude des miRs ?*

Les miRs et l'interférence ARN suscitent depuis leur découverte un intérêt considérable de la part de la communauté scientifique avec près de 10 000 articles publiés sur le sujet par an ces 10 dernières années (Source PubMed, Recherche (microRNA or miR or RNAi [MeSH Major Topic])). Les miRs ont été ainsi impliqués dans virtuellement tous les processus physiologiques ou pathologiques du vivant, y compris mon sujet d'intérêt : le vieillissement (Thalyana and Slack, 2012; Harries, 2014). Dans la majorité de ces études, l'implication d'une dérégulation de *Dicer1* dans le vieillissement se résume à son effet sur l'expression de différents miRs.

Pourtant, de nombreuses données suggèrent que la protéine possède des fonctions indépendantes de la maturation des miRs. Les premières données viennent des différents phénotypes observés entre cellules délétées en DROSHA ou délétées en DICER. Si le rôle de ces enzymes se limitait à la production des miRs, la déplétion de l'une ou l'autre des protéines devrait engendrer des phénotypes identiques. Si c'est le cas dans certaines cellules, de nombreux exemples prouvent le contraire. Une déplétion de DROSHA et non de DICER dans les cellules souches neuronales entraîne une différenciation précoce (Knuckles *et al.*, 2012). Une déplétion de DICER et non de DROSHA entraîne la mort cellulaire dans les cellules de la rétine (plus précisément décrit en II.C.2. (Kaneko *et al.*, 2011)). Ces observations suggèrent que les mécanismes impliqués dans les différents phénotypes ne résultent pas seulement d'une modification de l'expression des miRs.

Par ailleurs, en étudiant les sites potentiels de fixation de DICER dans un système de culture cellulaire humaine et chez *C. elegans*, Rybak-Wolf *et al.* (2014) identifient une grande variété de substrats, conservés phylogénétiquement. DICER fixe non seulement les pre-miRs mais également une pléthore d'ARN différents : ARN messagers, structuraux, non-codants, mitochondriaux. Certains sites sont également dits « passifs » : ils fixent la protéine mais n'entraînent pas de clivage. Tous ces éléments suggèrent également des fonctions DICER indépendantes des miRs.

## **2. Autres fonctions impliquées dans l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes**

### *RNAi indépendante des miRs*

L'activité endonucléase de DICER n'est pas limitée aux précurseurs miRs. L'enzyme est ainsi capable de lier et cliver certain ARN de transfert (tRNA) pour former de courts fragments ARN nommés tRFs (tRNA-related fragments). De la même manière, l'ARN nucléolaire (snoRNA – small nucleolar RNA) peut être la cible de DICER, générant de petits ARNs plus stables appelés sdRNAs (SnoRNA-derived

RNAs). Ces différents produits – tRFs et sRNAs – possèdent une activité très proche des miRs par leur capacité à lier un ARNm cible et à en réguler la traduction/dégradation (Song and Rossi, 2017).

#### *Endo-siRNA : Isoforme spécifique DicerO*

La production d'endo-siRNA semble négligeable dans les cellules somatiques de mammifères, probablement par l'absence des protéines RdRPs (RNA-dépendant RNA polymerases), un élément clé de l'amplification des siRNA précurseurs. En revanche les siRNA sont retrouvés en forte abondance dans les oocytes et les embryons au stade de pré-implantation de la souris. Ces endo-siRNA dérivent de transcrits de rétrotransposons et de pseudogènes et sont nécessaires à la survie de la cellule. Cette activité RNAi médiée par les endo-siRNA est en contraste avec les études montrant une protéine DICER peu efficace à générer les siRNA - comparé au miRs - chez les mammifères. Une explication se trouve avec les travaux de [Flemer et al. \(2013\)](#) démontrant l'existence d'une isoforme spécifique de DICER, nommée Dicer<sup>O</sup> dans les oocytes. Cette isoforme est générée à partir d'un promoteur alternatif résultant de l'intégration d'un rétrotransposon et est tronquée de son domaine hélicase en sa partie N-terminale. Dicer<sup>O</sup> possède une affinité plus élevée pour les longs ARNs double-brin que pour les précurseurs miRNA et présente une activité catabolique plus importante.

#### *DICER et défense antivirale*

Si le mécanisme est parfaitement décrit dans les plantes, nématodes et insectes, la production DICER-dépendante de siRNA à partir d'ARN viral comme mécanisme de défense antivirale chez les mammifères fait encore l'objet de nombreux débats. La production de vsiRNA (viral siRNA) a en effet été observée mais toujours associée à des contextes très particuliers. Par exemple, la protéine DICER humaine exprimée dans un système de cellules de drosophile est capable de produire des vsiRNAs lors d'une infection par le virus Sindbis (SINV) ; ces vsiRNAs ne protègent toutefois pas les cellules de l'infection virale ([Girardi et al., 2015](#)). Une autre étude montre que l'infection de cellules de hamster et de jeunes souris non sevrés par le virus Nodamura (NoV) entraîne la production de vsiRNAs responsables de la clairance du virus. Ces résultats sont toutefois obtenus uniquement si le virus est modifié pour ne plus exprimer la protéine VSR, un inhibiteur de la RNAi. Aucune production de vsiRNAs n'est observée avec le virus wild-type ([Li et al., 2013](#)). La défense antivirale par RNAi est également présente dans les cellules souches, et de manière intéressante, perdue lors de la différenciation ([Maillard et al., 2013](#)). Les cellules souches ne possédant pas de réponse IFN efficace, une hypothèse de la communauté scientifique propose que réponse IFN et RNAi soient mutuellement exclusives. En l'absence d'une réponse IFN efficace, DICER lie l'ARN viral et initie la production de RNAi comme mécanisme antiviral. En revanche dans les cellules différenciées possédant la réponse IFN fonctionnelle, les senseurs à ARN (RIG-1, MDA5) entrent en compétition avec DICER pour la fixation de l'ARN viral et initient la puissante réponse IFN, masquant l'interférence à l'ARN.

Outre sa capacité à générer les vsiRNA, DICER est également impliquée dans la réponse aux infections *via* la production classique des miRs. Son action peut être bénéfique, avec la production de

miRs endogènes dirigés contre des transcrits codants des protéines virales impliquées dans la réplication ; c'est le cas des miR24 et miR93 dirigés contre l'ARN du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Otsuka *et al.*, 2007). Les miRs sont également indispensables à l'établissement d'une réponse IFN rapide et efficace (Ostermann *et al.*, 2012). Un rôle « proviral » de DICER est également décrit pour certains virus à ADN. Dans ce cas, la voie de biogenèse des miRs peut être détournée par le virus qui code ses propres miRs. Une fois maturés par la protéine DICER de l'hôte, ces miR viraux ciblent des gènes de l'hôte ainsi que des gènes viraux impliqués dans la survie (Cullen, 2009) .

### 3. Régulation transcriptionnelle des gènes

Outre son activité endonucléase, DICER est également capable de lier l'ADN et d'interagir avec l'ARN polymérase II lors de la transcription des gènes. Cette fixation se fait préférentiellement au niveau des promoteurs et des sites de terminaison de la transcription et est spécifique à certains gènes. Ces interactions permettent la régulation de la transcription des gènes et notamment leur inhibition en favorisant le recrutement de protéines modifiant les histones et l'ADN et l'établissement de marques répressives – Il s'agit ici d'un mécanisme de « TGS » (Transcriptional Gene Silencing) (White *et al.*, 2014). Dans certains cas, l'inhibition de la transcription va dépendre de la production de petits ARNs non codants par DICER qui vont agir au sein d'un complexe RITS (RNA-Induced Transcriptional Silencing) contenant les protéines AGO, probablement en servant de guide à la fixation du complexe, favorisant ensuite le recrutement des protéines régulatrices de la transcription.

DICER est également impliquée dans la régulation de l'expression des gènes hormono-sensibles. En effet, l'enzyme est capable de lier le transcrit du gène steroid Receptor Activator (SRA), un co-activateur des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes. Cette interaction provoque la liaison du complexe au promoteur de gènes hormono-sensibles et en active la transcription (Burger and Gullerova, 2015).

Il semble aussi que la fixation passive de DICER sur différents ARN en contrôle la stabilité et la localisation subcellulaire. Cette fixation passive pourrait également être un mécanisme de séquestration de l'enzyme DICER (Rybak-Wolf *et al.*, 2014).

### 4. Maintien de l'intégrité du génome

Des données très récentes suggèrent l'implication de DICER (ainsi que DROSHA) dans la réponse aux dommages à l'ADN, plus spécifiquement lors de cassures double-brin (on parle de DDR – Double-strand DNA Damage Repair). Ainsi, DROSHA et DICER sont recrutées sur les sites de cassures double-brin et sont impliquées dans la production de petits ARNs issus des transcrits du site de dommage. Ces petits ARN non-codants, nommés DDRNAs (DNA-damage RNAs), sont nécessaires à une DDR fonctionnelle (Wei *et al.*, 2012). Les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider mais les

DDRNAS pourraient fonctionner comme ARN guides favorisant le recrutement et la fixation des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.

Ce phénomène est également nécessaire à la maintenance des télomères. En effet, il est montré qu'une dysfonction au niveau des télomères active la DDR et la production dépendante de DICER de petits ARN non-codants spécifique au site (tDDRNA – telomeric DDRNAs). De la même manière que pour les cassures double-brins, les tDDRNAS sont nécessaires à une réparation fonctionnelle des télomères (Rossiello *et al.*, 2017).

Chitale and Richly (2017) démontrent que DICER, indépendamment de son activité catalytique, est aussi nécessaire au mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotide ou NER (Nucleotid excision Repair). Dans ce contexte, DICER se fixe à l'ADN à proximité des dommages et participe à la décondensation de la chromatine, essentielle au recrutement et à la fixation des facteurs de réparation.

## 5. Détoxification des ARN double-brin

Les ARN double-brin peuvent avoir différentes origines et leur accumulation/dérégulation est majoritairement associée à un phénotype délétère, impliquant le besoin d'une stricte régulation de ces éléments pour le maintien d'une bonne homéostasie.

### *Maladie à triplets et gènes chevauchants*

DICER est impliquée dans le contrôle des transcrits de gènes mutés responsables des maladies à triplets répétés. Ces maladies, comme la maladie de Huntington, la dystrophie myotonique de Steinert, l'ataxie spinocérébelleuse de type I ou encore le syndrome de l'X fragile, sont causées par l'expansion progressive de triplets de nucléotide dans un gène (Huntingtin, ATXN1, DMPK et FMR1 respectivement) résultant dans l'expression et l'accumulation de protéines malformées à l'origine de la maladie. La répétition de ces triplets de nucléotides forme une structure en tige-boucle au niveau de l'ARNm qui est reconnu et clivé par la protéine DICER. La synthèse de protéines aberrantes est alors limitée, d'une part par le clivage direct de l'ARNm et d'autre part par l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes *via* les endo-siRNA résultant de ce clivage (Johanson, Lew and Chong, 2013; Burger and Gullerova, 2015)

L'activité endonucléase de DICER est également indispensable au contrôle des ARN double-brin issus de la transcription de gènes non codants chevauchants (White *et al.*, 2014). En l'absence de l'enzyme, ces ARN double-brin s'accumulent dans le noyau et dans le cytoplasme et activent une forte réponse IFN à l'origine de l'apoptose des cellules.

### *Contrôle des rétrotransposons*

Les rétrotransposons sont des éléments transposables du génome capables de se répliquer dans le génome *via* un intermédiaire ARN. Ces séquences se divisent en 3 grandes familles, les

rétrotransposons à LTR (long-terminal repeat), les LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) et les SINEs (Short interspersed Nuclear Elements) et représentent jusqu'à 40% des séquences du génome. La littérature suggère que DICER est essentielle au contrôle de l'expression des familles LINE et SINE.

Dans des cellules souches embryonnaire de souris, les LINEs, représentés majoritairement par LINE-1 (L1) sont régulés par deux mécanismes dépendants de DICER: (i) une régulation post-transcriptionnelle avec la maturation d'un miR contenu dans l'ARNm de L1 et (ii) une répression transcriptionnelle avec la méthylation du promoteur (Claudio *et al.*, 2013) par un mécanisme qui reste à élucider.

Les transcrits SINE, représentés par les ARNs Alu chez l'homme et les ARNs B1 et B2 chez la souris sont également contrôlés par DICER. Ce phénomène a été particulièrement bien décrit dans une maladie emblématique du vieillissement : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Chez les patients atteints de DMLA, une diminution de l'expression de DICER est observée dans les cellules de la rétine pigmentaire, résultant dans l'accumulation d'ARNs Alu. Cette accumulation est toxique pour les cellules et provoque l'apoptose *via* l'activation de l'inflammasome NLRP3 et une voie dépendante de MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) et de la Caspase 8 (Kaneko *et al.*, 2011; Tarallo *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014). L'expression et l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans ce contexte dépend de la production de ROS, de l'activation du récepteur P2X7 et de l'activation du récepteur cytosolique cGAS par de l'ADN mitochondrial provoqués par l'accumulation des ARN Alu (Kerur *et al.*, 2013a, 2018).

Dans les cellules de la rétine pigmentaire, la détoxification médiée par DICER des transcrits SINEs semble être le mécanisme clé de la survie ; les produits du clivage, de taille variant entre 25 et 70 nucléotides ne semblent pas avoir de rôle fonctionnel. En revanche, dans les cellules souches neurales où une augmentation de l'expression des ARN Alu est observée en réponse à l'acide rétinoïque, les produits du clivage par DICER ont un rôle proche des miRs avec une fixation AGO-dépendante à un groupe d'ARNm impliqués dans la prolifération et la différenciation de la cellule (Hu *et al.*, 2012).

Bien que le contrôle des rétrotransposons par DICER n'ait fait l'objet à ce jour que de peu d'observations et semble restreint à certains types cellulaires, l'abondance des éléments transposables et leur implication dans de nombreuses fonctions cellulaires laissent à penser que l'importance de DICER dans leur régulation pourrait être aujourd'hui sous-estimée.

## IV. Les rétrotransposons : de « l'ADN poubelle » aux éléments biologiquement actifs.

Les rétrotransposons ont longtemps été considérés comme de l'ADN « poubelle » non codant et sans fonctions biologiques associées, mais toutefois dangereux par leur capacité à s'intégrer aléatoirement dans le génome lors de leur réplication. De nos jours, de plus en plus de données suggèrent (i) que les transcrits de ces rétrotransposons ont des rôles biologiques et (ii) qu'une régulation stricte de leur expression est essentielle au bon fonctionnement des cellules et des organismes.

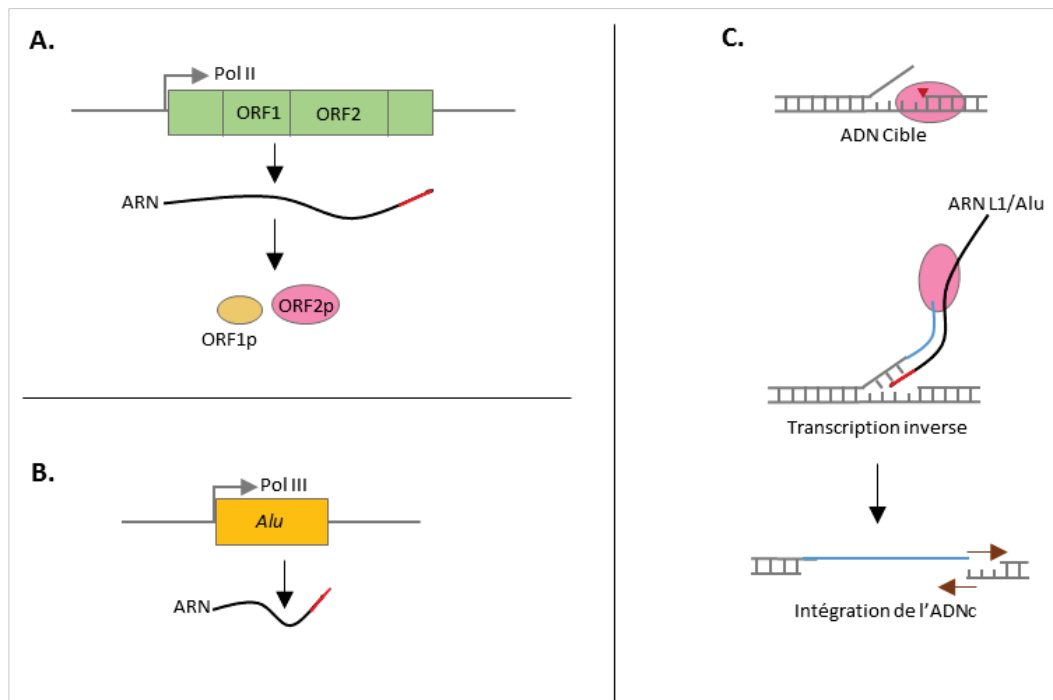
Cette partie vise à décrire sommairement les rétrotransposons LINEs et SINEs, les deux familles régulées par DICER, et leurs fonctions dans l'homéostasie de la cellule.

### A) Généralités

#### 1. Structure et rétro-transposition des LINE et SINE.

Les LINEs sont les seuls rétrotransposons (non-LTR) capables de se répliquer de manière autonome. Ce sont de longues séquences (~6000 paires de bases) transcrites par l'ARN polymérase II à partir d'un promoteur interne. Le transcrit L1 possède une structure proche des ARNm avec une coiffe et une queue polyadénylée et contient deux cadres de lecture non chevauchants codant pour les protéines ORF1p (activité chaperonne) et ORF2p (activité endonucléase et rétrotranscriptase) indispensables à l'étape de rétrotransposition (**Figure 4A**). Lors de la traduction dans le cytoplasme, les protéines ORF1p et ORF2p vont lier leur ARN codant pour former un complexe ribonucléoprotéique (RNP) qui est ensuite exporté vers le noyau. Le complexe RNP va cliver un brin de l'ADN au niveau d'une séquence conservée qui sert d'amorce à la rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire qui est simultanément incorporé dans le génome (**Figure 4C**).

Les SINEs sont de courtes séquences (200-300 paires de bases) transcrites par l'ARN polymérase III à partir d'un promoteur interne. Le transcrit ne code pour aucune protéine et sa rétrotransposition dans le génome se fait donc en détournant la machinerie (ORF1p-ORF2p) de L1 (**Figure 4B-C**). Il existe différents SINEs en fonction de l'ARN dont il dériverait originellement. L'homme possède uniquement des SINE dérivant de l'ARN 7SL (séquences Alu) ; les souris possèdent des SINE homologues au Alu, dérivant aussi de l'ARN 7SL (éléments B1) mais également des SINEs dérivant d'ARN de transfert (éléments B2).



**Figure 4 : Rétrotranscription des LINEs et SINEs par un mécanisme de « Copier-Coller ».** **A|** L'étape de «Copie» se fait lors de la transcription par l'ARN polymérase II des LINEs et la traduction subséquente de l'ARN ou **B|** lors de la transcription par l'ARN polymérase III pour les SINEs. **C|** Les transcrits LINEs et/ou SINEs sont ensuite «collés» et intégrés dans le génome grâce à l'activité endonucléase et transcriptase inverse de la protéine ORFp2

## 2. Distribution des rétrotransposons

Avec leur capacité à se rétrotransposer, les LINEs (~500 000 copies) et les SINEs (Alu/B1 :  $1.10^6$  copies ; B2 :  $1.10^5$  copies) peuvent représenter jusqu'à 30% des séquences génomiques. Si la rétrotransposition n'est pas dirigée, la distribution des rétrotransposons n'est pas aléatoire et reflète différents processus de sélection.

Les LINEs sont principalement localisés dans les régions intergéniques, reflétant très probablement une sélection négative contre l'insertion de larges fragments dans les régions codantes. Au contraire, Les SINEs sont majoritairement localisés dans les régions riches en gènes. De manière surprenante, cette distribution serait le résultat d'une sélection positive des SINEs dans les régions introniques et 3'UTR de certains gènes, des gènes notamment impliqués dans le maintien et le métabolisme des acides nucléiques. Cette distribution non aléatoire, conservées indépendamment chez l'homme et la souris, suggère que l'insertion de ces rétrotransposons dans les régions riches en gènes assurerait une fonction de régulation de la transcription.

### **B) Régulation de l'expression des rétrotransposons non-LTR.**

La plupart des LINE/SINEs ont perdu une partie de leur promoteur lors des évènements de rétrotransposition ou ont fait l'objet de mutations les rendant « inactifs » car incapables d'être

transcrits et/ou de se rétrotransposer. Certaines copies sont néanmoins actives et sont strictement contrôlées afin d'en limiter la transcription et les événements de rétrotransposition (**Figure 5**).

### **1. Régulation transcriptionnelle**

La régulation transcriptionnelle de L1 est majoritairement retrouvée dans les cellules somatiques de l'adulte ; dans ce cas, la transcription est inhibée par la méthylation du promoteur. Dans les cellules où le niveau de méthylation de l'ADN est faible, voire nul (gamètes, cellules du blastocyste), la régulation de l'expression des L1s est principalement post-transcriptionnelle (**Ciudo et al., 2013**).

Si la méthylation de l'ADN était initialement proposée comme mécanisme de régulation de l'expression des SINEs, il semble qu'elle soit en fait régulée par la méthylation des histones (marque H3K9me3) au site de transcription (**Dunker et al., 2017**).

### **2. Régulation post-transcriptionnelle**

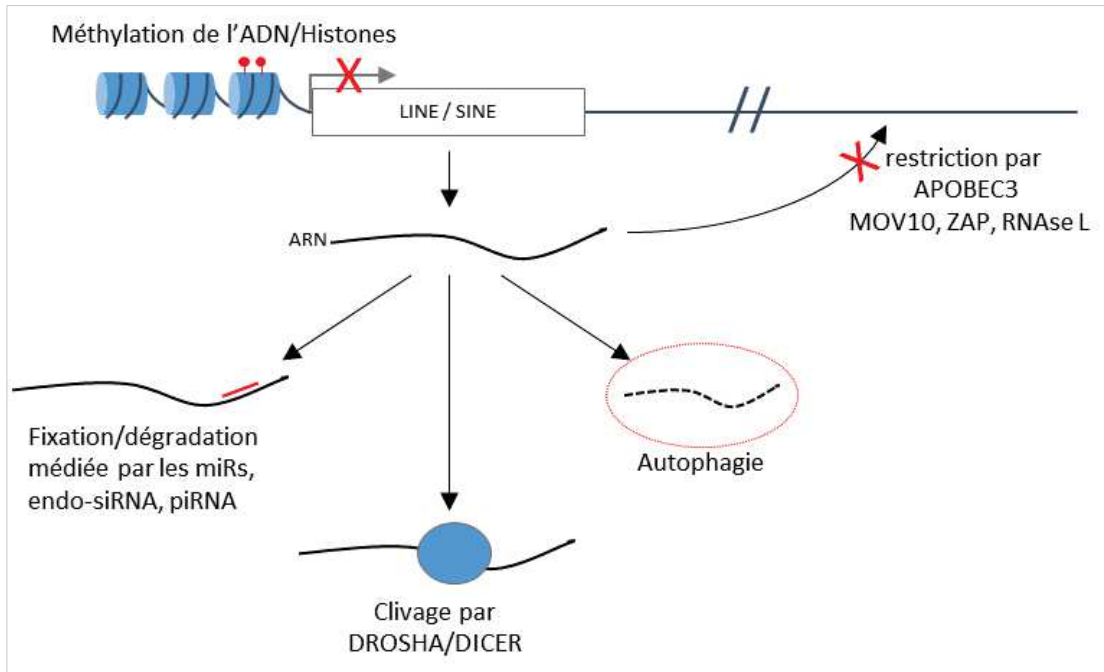
La plupart des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle sont communs aux LINEs et aux SINEs.

La régulation se fait principalement par l'interférence ARN : les transcrits LINE/SINE sont en effet la cible de miRs et d'endo-siRNA générés par DICER, ainsi que des piRNA (PIWI-interacting micro-ARN) spécifiquement dans les gamètes. La production de ces derniers ne dépend pas de DICER et semble également impliquée dans la mise en place des marques de répression de la transcription (méthylation de l'ADN) même si le mécanisme reste à élucider (**Malone and Hannon, 2009**). L1 et SINEs sont aussi directement clivés par DROSHA et DICER respectivement.

Le niveau d'expression des LINEs/SINEs est également régulé *via* une autophagie sélective dépendante de NDP52/p62 (**Guo et al., 2014**).

Le phénomène de rétrotransposition des LINEs/SINEs est restreint par les protéines APOBEC3 (Apolipoprotein B m-RNA-editing Enzyme 3) mais les mécanismes impliqués restent encore à éclaircir. D'autres facteurs de restriction virale, notamment produits/activés lors de la réponse IFN, comme MOV10 (hélicase ARN), ZAP (Zinc-finger Antiviral Protein) ou la RNase L (ribonucléase L) sont capables d'interagir avec l'ARN L1 et d'en restreindre la rétrotranscription notamment en régulant la stabilité de l'ARN (**Pizarro and Cristofari, 2016**). Ces mécanismes ne sont aujourd'hui décrits que dans le contrôle de la rétrotransposition de L1 et non des SINEs.





**Figure 5 : Contrôle des éléments LINE/SINES.** La transcription des éléments LINES/SINES est régulée par des modifications épigénétiques répressives; l'accumulation des transcrits est régulée post-transcriptionnellement par la fixation de petits ARN non codants, par clivage ou par autophagie; la rétrotransposition est restreinte par différents facteurs anti-viraux.

## C) Fonctions associées au rétrotransposons

Les séquences des rétrotransposons, ainsi que les transcrits, qu'ils soient sous forme libre ou insérés dans un transcrit ARN, sont associés à différentes fonctions.

### 1. Transcrits « libres »

Dans les cellules embryonnaires (Homme et souris), les transcrits L1 et SINES sont une source d'endo-siRNAs indispensables à une bonne régulation des gènes (Ohnishi *et al.*, 2012).

Dans les cellules somatiques, les transcrits de rétrotransposons sont fortement réprimés mais leur expression, notamment celles des SINES, peut être activée en condition de stress, comme lors d'un choc thermique (Allen *et al.*, 2004), de dommages à l'ADN (Rudin and Thompson, 2001), d'infections virales (Dunker *et al.*, 2017), de stress oxydant (Hwang *et al.*, 2019) ou encore lors d'un excès de nutriments (Wang *et al.*, 2016).

Cette réponse au stress est conservée phylogénétiquement et est spécifique aux SINES ; en effet aucun des autres transcrits de l'ARN polymérase III n'est augmenté dans ces conditions. Le rôle de ces transcrits SINES n'est pas encore totalement élucidé mais leur capacité à réguler l'expression des gènes suggère une implication dans la réponse au stress et aux infections virales.

Par exemple, après un choc thermique, les transcrits SINES provoquent une inhibition globale de la transcription des gènes, excepté ceux impliqués dans la réponse à la chaleur, en fixant l'ARN

polymérase II et en empêchant son activité (Allen *et al.*, 2004). Cette inhibition de la transcription permettrait aux cellules d'entrer en « pause » le temps du stress thermique et d'y survivre.

Les transcrits Alu/B1 ont également été impliqués dans la régulation de la traduction, d'une part en modulant le pool de ribosomes actifs disponibles (Ivanova *et al.*, 2015) et d'autre part en fixant la protéine PKR, impliquée dans l'initiation de la traduction (Chu *et al.*, 1998). L'effet de la fixation des ARN Alu/B1 sur PKR semble être dépendant de la quantité de transcrits et pourra être soit activateur soit inhibiteur.

L'infection virale, notamment par des virus à ADN, corrèle avec l'activation de la transcription des rétrotransposons SINEs ; toutefois un rôle de ces ARN dans la réponse antivirale reste encore à éclaircir (Dunker *et al.*, 2017).

Si les transcrits SINEs pourraient jouer un rôle dans la résolution de différents stress, leur accumulation peut devenir néfaste. C'est le cas dans les cellules de la rétine pigmentaire lors du vieillissement (voir section II.C.5 détoxification) et la cause de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Une accumulation délétère est également décrite dans un système cellulaire humain (cellules endothéliales HUVEC) soumis à un milieu additionné de glucose, mimant l'hyperglycémie. Cette condition provoque l'accumulation des ARN Alu, résultant dans l'augmentation des ROS et l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B entraînant un fort dysfonctionnement cellulaire *via* la production anormale d'IL-1 $\beta$  et la diminution de la sécrétion d'eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) et de SOD2 (SuperOxide Dismutase 2)(Wang *et al.*, 2016).

## **2. Transcrits SINEs insérés dans les régions transcrites.**

Les transcrits SINEs « libres » ne représentent qu'une minorité de la transcription de ces séquences ; la plupart des transcrits sont retrouvés insérés dans de long ARN non-codants ou encore dans certains ARNm (régions UTR ou introns). Ces SINEs insérés peuvent agir sur la régulation de l'expression des gènes (Elbarbary, Lucas and Maquat, 2016; Chen and Yang, 2017).

Certaines des séquences Alu et éléments B ne sont pas transcrites mais possèdent des sites de fixation à des facteurs ou amplificateurs de transcription qui pourraient moduler l'activité transcriptionnelle. Il reste cependant à déterminer si ces sites de fixation agissent directement sur la transcription ou s'ils agissent simplement comme une « éponge » retenant les différents facteurs à distance de leur site de fixation classique.

Les séquences Alu insérées dans les transcrits codants ou non codants peuvent représenter des sites alternatifs d'initiation de la transcription, d'épissage ou encore de polyadénylation et expliqueraient 5% des variants ARN (régions 5' et/ou 3' UTR différentes) retrouvés chez l'homme. Les transcrits insérés dans les régions 3'UTR conditionnent également la stabilité de l'ARNm, sa traduction ou même sa dégradation médiée par STAU1 (Staufen 1), dans le cas particulier d'une dimérisation d'ARNm *via* une complémentarité des insertions Alu.

Certains transcrits ARN présentent deux séquences Alu insérées en direction opposée, pouvant former un duplex intramoléculaire nommé IRAlus (Inverted-repeat Alus). Cette structure en épingle peut agir comme site de fixation de protéines dsRBP (double-strand RNA Binding Protein) et moduler la localisation et la traduction de l'ARNm. Les IRAlus peuvent aussi être liés par les protéines ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) responsables de l'édition des Adénosine en Inosine dans l'ARN. La grande majorité (90%) de ces événements d'édition chez l'Homme est retrouvée au sein des IRAlus et pourrait être à l'origine de nouveaux sites d'épissage alternatif, d'une modulation du métabolisme de l'ARN en modifiant le répertoire de dsRBP capable de se fixer ou encore de mutations dans la protéine. La fonction biologique de l'édition des IRAlus reste à découvrir mais il est proposé que ces éléments fassent office d'éponge fixant les ADAR, protégeant le cadre de lecture d'évènements d'édition susceptibles de modifier le codage des acides aminés et provoquer des mutations dans la protéine.

L'ensemble des fonctions associées aux transcrits SINEs insérés est principalement caractérisée pour les séquences Alu chez l'Homme. La présence de telles régulations chez la souris reste très peu documentée mais certaines observations commencent à émerger, impliquant des fonctions similaires et conservées. La présence d'éléments B insérés est ainsi associée à la régulation de la dégradation de l'ARN médié par STAU ([Wang, Gong and Maquat, 2013](#)), la modulation de la localisation de l'ARN *via* la fixation de dsRBP ([Fasolo et al., 2019](#)), ou encore la régulation de la traduction ([Carriero et al., 2012](#) ; [Bon et al., 2019](#)).

La contribution de ces fonctions dans le vieillissement peut sembler minime car il n'y a, *a priori*, pas de raisons que les SINEs insérés, présents dès la naissance, se comportent différemment avec l'âge. Certaines évidences laissent néanmoins à penser que ces inserts ne sont pas si « passifs ». Chez la souris par exemple, les éléments B insérés au sein d'un long ARN non-codant peuvent réguler la traduction ou la dégradation d'ARNm par un mécanisme antisens ([Carriero et al., 2012](#)). De manière intéressante, l'expression de cet ARN long non-codant antisens est régulée et augmente en condition de stress, une caractéristique du vieillissement. D'autre part, les phénomènes de rétrotransposition, bien que longtemps considérés restreints aux cellules germinales, existent et s'accumulent au cours du temps dans les cellules somatiques, principalement dans le cerveau, et sont à l'origine d'un mosaïcisme somatique, *i.e* différentes population de cellules génétiquement distinctes au sein d'un même organisme ([García-pérez and Moran, 2015](#)). Ces rétrotranspositions peuvent entraîner une modification de l'expression, de la localisation ou de la composition de protéines et contribuer au déclin physiologique/vieillesse.

## V. DICER et rétrotransposons dans le vieillissement

Des signes d'association entre vieillissement, expression de DICER et/ou rétrotransposons émergent ces dernières années, notamment avec des observations corrélant dérégulation de l'expression de l'enzyme ou des transcrits SINEs avec la vieillesse. Les études *in vitro* et les modèles animaux impliquent également la protéine et les rétrotransposons dans l'établissement des différents marqueurs de vieillissement.

### 1. Dérégulation de l'expression de *Dicer1* et des rétrotransposons

Plusieurs études montrent une diminution globale et/ou une dérégulation de l'expression de *Dicer1* avec l'âge. Chez les rongeurs, c'est le cas dans les cellules endothéliales du cerveau (Ungvari *et al.*, 2013) et le tissu adipeux, un phénomène conservé du nématode à l'Homme (Mori *et al.*, 2012). L'expression de l'enzyme est également globalement réduite et ses oscillations d'expression circadiennes perturbées dans les centres de contrôle de l'horloge biologique interne, *i.e.* le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, la rétine, le foie et la moelle osseuse (Yan *et al.*, 2013). Chez l'Homme, en plus du tissu gras, une diminution de l'expression de *Dicer1* dans les cellules mononuclées du sang (Serna *et al.*, 2012; Borrás *et al.*, 2017) est observée au cours du vieillissement ; cette baisse de l'expression de *Dicer1* est également retrouvée lors du diabète, une pathologie classiquement associée au vieillissement humain (Yan *et al.*, 2013). Dans cette dernière étude, la diminution de l'expression de *Dicer1* est aussi associée à une accumulation d'ARNs Alu dans le plasma.

Avec l'âge, l'expression et la rétrotransposition des transcrits LINEs et SINEs augmentent, phénomène décrit dans différents tissus chez la souris (cerveau, muscle squelettique, foie et cœur) et dans les fibroblastes humains (Cecco *et al.*, 2013; De Cecco *et al.*, 2013; Van Meter *et al.*, 2014). L'augmentation de l'activité et la mobilité des rétrotransposons résulteraient du déclin global des mécanismes régulant leur expression (remodelage de la chromatine) et leur dégradation (DICER, autophagie).

Les relations entre expression de DICER et vieillissement demeurent peu étudiées et restent principalement de simples observations. Toutefois, de plus en plus d'évidences pointent vers une implication de la protéine et une dérégulation de son expression dans l'établissement des différents marqueurs de vieillissement.

### 2. Contribution de *Dicer1* dans les marqueurs du vieillissement

L'implication de DICER dans le vieillissement est principalement caractérisée à travers son effet sur l'expression des miRs. D'autre part, les fonctions non-canoniques décrites dans la section II.C.2 émergent également comme acteurs probables de l'établissement de différents marqueurs liés à l'âge.

### *miRs et vieillissement*

En comparant l'expression des miRs dans les cellules mononuclées du sang d'octogénaires à celle de centenaires, ou « super-agers », il est mis en évidence que l'expression globale des miRs et des acteurs de leur voie de biogenèse sont essentiels à un vieillissement « réussi ». En effet, si les centenaires maintiennent le niveau d'expression normal, les octogénaires présentent une réduction de l'expression de *DROSHA*, *EXP5* et *DICER1* ainsi que des miRs, impliquant un rôle essentiel de ceux-ci dans le processus de vieillissement (Serna *et al.*, 2012; Borrás *et al.*, 2017).

L'identification de miRs impliqués dans le vieillissement, ou géromiRs, est principalement mise en évidence chez les invertébrés. Dans ces organismes, la modification d'expression de certains miRs peut influencer directement la longévité et le développement de pathologies chez l'animal. C'est par exemple le cas de Lin-4 chez le nématode (Boehm and Slack, 2005) et de miR-34 chez la drosophile (Liu *et al.*, 2012). Au contraire, aucune étude à ce jour n'a pu démontrer la capacité d'un miR unique à réguler la longévité chez les vertébrés, suggérant que ces molécules ne sont pas seules à contribuer au processus vieillissement, plus complexe chez ces organismes. Toutefois, de nombreuses études mettent en évidence que la dérégulation de l'expression de certains miRs participe à l'établissement des neuf marqueurs de vieillissement (Caravia and López-Otín, 2015).

### *Fonctions non-canoniques de DICER*

L'émergence de données caractérisant des fonctions indépendantes des miRs suggère différents niveaux d'implication de la protéine DICER dans le vieillissement et dans l'établissement de ses marqueurs.

Comme décrit précédemment, DICER est essentielle, *via* sa fixation à l'ADN ou la production de petits ARN non-codants, à la résolution de différents dommages à l'ADN ainsi qu'aux télomères (Wei *et al.*, 2012; Chitale and Richly, 2017; Rossiello *et al.*, 2017) suggérant que la dérégulation de l'expression de l'enzyme peut potentiellement participer à l'établissement de l'*instabilité génomique* et à la *dysfonction des télomères*. DICER est également nécessaire à l'établissement de marques épigénétiques répressives (Ciaudo *et al.*, 2013; White *et al.*, 2014) et la diminution de son expression pourrait ainsi contribuer aux *altérations épigénétiques* globales, typiques du vieillissement. La délétion conditionnelle de *Dicer1* dans les adipocytes de souris est associée, en condition de restriction calorique, non seulement à une *dysfonction mitochondriale* avec l'altération de la structure et du nombre des mitochondries ainsi qu'une accumulation de ROS mais également à une *dérégulation de la réponse au nutriment* avec l'hyper-activation de la voie de signalisation mTOR (Reis *et al.*, 2016). Les auteurs suggèrent dans ce papier que les phénotypes observés ne peuvent être expliqués seulement par la dérégulation des miRs et proposent que d'autres ARN non-codants régulés par DICER pourraient être impliqués, sans proposer de candidats. La délétion de *Dicer1* dans les adipocytes (Mori *et al.*, 2012) et les fibroblastes embryonnaires murins (Mudhasani *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2010) est associée à l'établissement de la *sénescence cellulaire*. Cette association est également décrite dans les cellules mésenchymateuses stromales humaines, combinée à un

*épuiement des cellules souches* (Zhao *et al.*, 2015). Ces différentes études attribuent les phénotypes à la dérégulation de l'expression des miRs mais la contribution de fonctions non-canoniques n'y est pas du tout explorée. *Sénescence et épuiement des cellules souche* étant des marqueurs intégratifs, il paraît fort probable que les altérations indépendantes des miRs citées jusque-là participent également à l'établissement ces deux marqueur. Enfin, l'implication de fonctions non-canoniques de DICER dans les *altérations des communications intercellulaires* est parfaitement illustrée par le contrôle des transcrits SINEs dans la rétine. L'accumulation de ces transcrits médiée par la déficience en DICER provoque l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, l'expression et l'activation de l'inflammasome NLRP3 résultant en une forte réponse inflammatoire (Tarallo *et al.*, 2012; Kerur *et al.*, 2013b). Le contrôle de l'expression/activation de l'inflammasome NLRP3 par les fonctions canoniques (Ojcius *et al.*, 2019) et non-canoniques de DICER pourrait s'avérer être un élément clé du processus de vieillissement. En effet, la déplétion de *Nlrp3* chez la souris augmente son espérance de vie et protège les individus du développement de pathologies liées à l'âge en réduisant certains marqueurs de vieillissement comme l'usure des télomères, l'altération des réponses aux nutriments et l'inflammation (Youm *et al.*, 2013; Marín-Aguilar *et al.*, 2019).

L'ensemble de ces données suggère une relation forte entre dérégulation de l'expression de DICER et processus du vieillissement, sans pour autant pouvoir définir si la diminution l'expression de *Dicer1* est une cause ou une conséquence du vieillissement. Il est important de considérer que l'analyse de la dérégulation de DICER dans les processus de vieillissement est entravée par le fait que (i) la délétion de *Dicer1* est létale au stade embryonnaire (Bernstein *et al.*, 2003) et que (ii) les mutants conditionnels développent généralement des pathologies sévères associées au tissu/cellules considérés.

L'implication d'une diminution globale de l'expression de *Dicer1* dans le vieillissement et l'établissement de pathologies liées à l'âge reste donc encore à éclaircir.

## VI. Objectif de la thèse et modèle d'étude.

L'objectif de ma thèse est donc de caractériser le vieillissement et le développement de pathologies liées à l'âge dans un modèle murin *Dicer1*-déficient.

Les souris DICER-déficientes ont été générées par le passé par la technologie du « trap-gene » avec l'insertion en amont de l'exon 25 du gène *Dicer1* d'un gène de fusion beta-galactosidase- résistance à la néomycine (Otsuka *et al.*, 2007). Cette insertion conduit à l'expression d'une molécule de fusion *Dicer1*- $\beta$ -galactosidase-neomycinR ne possédant plus le deuxième domaine catalytique RNAse III, ni le domaine de liaison à l'ARN double brin, inactivant ainsi l'activité endonucléase de DICER.

De manière surprenante, les animaux homozygotes pour le variant *Dicer1* modifié (noté *Dicer1*<sup>d/d</sup>) échappent à la létalité embryonnaire, très probablement grâce à des événements rares d'épissage alternatifs qui résultent en l'expression résiduelle d'un transcrit normal, nécessaire à la survie des mutants. Ces mutants sont alors caractérisés par une diminution globale de l'expression de la protéine DICER retrouvée à l'échelle de l'organisme, tous tissus confondus.

Ce modèle présente une susceptibilité aux infections virales (Otsuka *et al.*, 2007; Ostermann *et al.*, 2012, 2015), une exacerbation des symptômes arthritiques dans un modèle expérimental de polyarthrite rhumatoïde (Alsaleh *et al.*, 2016) ainsi qu'une infertilité chez les femelles (Otsuka *et al.*, 2008). L'effet de « l'âge » sur ce mutant n'a encore cependant jamais été caractérisé.





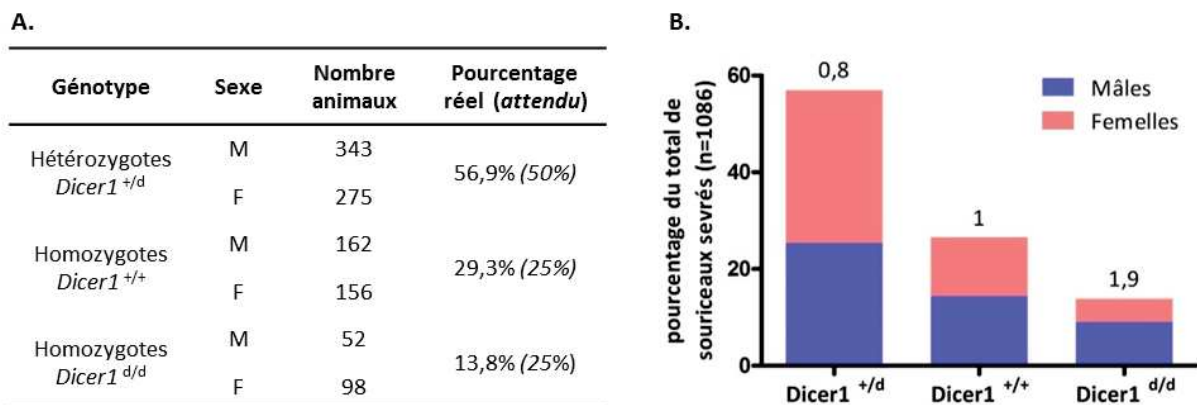
# Résultats et Discussion



## I. Modèle *Dicer1*-déficient : confirmation des données antérieures.

Le maintien et la génération des animaux utilisés dans le cadre de ma thèse a permis de valider l'importance de l'expression de DICER dans le développement embryonnaire. En effet, la répartition des génotypes de souriceaux issus de croisement hétérozygotes ne suit pas les proportions attendues par les lois de Mendel (disjonction des allèles). Les souriceaux *Dicer1*-déficients sont beaucoup moins nombreux (13,8% des naissances contre 25% attendus – **Figure R6A**) résultant de la mortalité embryonnaire due à la diminution de l'expression de DICER. Néanmoins, l'obtention de souriceaux *Dicer1*-déficients viables confirme qu'un niveau d'expression « seuil » de *Dicer1*, bien que fortement réduit, permet de surmonter la létalité embryonnaire et d'obtenir des souris adultes ([Otsuka et al., 2007](#)).

De manière surprenante et non décrite jusque-là, les souriceaux *Dicer1*-déficients présentent un sex-ratio fortement biaisé en faveur des mâles à la naissance, ce qui n'est pas observé dans les autres génotypes (**Figure R6B**). Ce résultat implique une surmortalité des embryons femelles *Dicer1*-déficients.



**Figure R6** : Les souris *Dicer1*-déficientes présentent une surmortalité embryonnaire, notamment chez les femelles. Distribution de la descendance (n=1086) issue de croisements de parents hétérozygotes (*Dicer1*<sup>+/-</sup>) selon le génotype (A) et le sexe (B). Le sex-ratio est indiqué au sommet des barres pour chacun des génotypes.

Bien que je ne sois pas en mesure d'expliquer ce résultat, certaines hypothèses peuvent être proposées. Parmi les gènes présentant une expression significativement différente entre les embryons (blastocystes) mâle et femelles de la souris se trouvent *Rho5/Pem* et *Xist* ([Kobayashi et al., 2006](#)). Ces gènes sont présents sur le chromosome X et sont exprimés majoritairement chez l'embryon femelle. *Xist* code pour un long ARN double-brin non codant, impliqué dans le phénomène de compensation du dosage des chromosomes X. Si DICER ne semble pas impliqué dans le contrôle direct du transcrit *Xist*, soit par un clivage direct soit par une dégradation médiée par des miRs, la protéine est néanmoins indispensable à la régulation d'autres gènes impliqués dans la compensation de dosage. La régulation de ces gènes se fait par une fonction non-canonique, notamment en favorisant la répression transcriptionnelle (TGS) ([Kota et al., 2014](#)). D'après les travaux de [Sakata et](#)

al. (2017), un défaut dans la compensation de dosage des X est associé non seulement à un déséquilibre dans l'expression des gènes du chromosome sexuel, mais également à un impact sur la régulation globale des gènes. Une mauvaise compensation de dosage des X médiée par la déficience en DICER pourrait peut-être expliquer, du moins en partie, la surmortalité embryonnaire observée chez les embryons femelles.

Du fait de la difficulté à obtenir des cohortes d'animaux femelle en nombre suffisant pour réaliser des analyses statistiques, l'ensemble des résultats présentés ci-après portent sur des individus mâles.

## **II. Survie et espérance de vie en bonne santé réduite chez les souris *Dicer1*-déficientes.**

Afin d'évaluer l'impact d'une déficience en *Dicer1* dans les processus de vieillissement, j'ai laissé vieillir et suivi les animaux au sein de l'institut afin de mesurer et caractériser la « quantité » (survie) et la « qualité » (déclin fonctionnel, pathologies liées à l'âge) de leur vie.

Les animaux des deux génotypes, *Dicer1*<sup>+/+</sup> et *Dicer1*<sup>d/d</sup>, sont maintenus dans la même pièce et partagent les mêmes cages afin de s'affranchir au mieux des effets environnementaux et du microbiote.

### **A) Survie**

Le suivi des animaux au cours de ma thèse et l'analyse des registres de sortie des animaux permettent d'établir clairement que les animaux *Dicer1*-déficients ont une espérance de vie significativement réduite comparée à leurs contrôles. Leur survie médiane est de 80 semaines (19 mois) alors que celle des contrôles dépasse les 2 ans (**Fig R7A**). La survie médiane des souris *Dicer1*<sup>+/+</sup> n'a pas pu être établie au sein de notre institut par manque de temps et de place mais les données du fournisseur Charles River sur la souris C57Bl/6J, le fond génétique de mes animaux, mentionne une survie médiane de 120 semaines en animalerie conventionnelle, soit 40 semaines (ou 9 mois) de plus que mes animaux *Dicer1*-déficients. Ainsi, si l'on devait corrélérer ces données à un âge équivalent humain, selon les formules proposées par [Dutta et Sengupta \(2016\)](#), seule la moitié des animaux mutants atteindrait 62 ans, pour 92 ans chez les souris contrôles.

L'étude est incomplète et la longévité maximale n'est pas établie pour mes animaux et semble dépasser, pour les deux groupes, les 100 semaines (2 ans). Toutefois, la diminution drastique de la survie médiane des mutants suggère que leur survie maximale sera bien inférieure à celle des contrôles.

Une diminution de l'expression du gène *Dicer1* semble donc être impliquée dans le vieillissement et non juste une conséquence de celui-ci. Si la plupart (90%) des souris *Dicer1*-déficiences présentent une survie supérieure à un an, ce qui pourrait faire penser à une implication limitée de DICER avec un phénotype modéré ou peu pénétrant, il est important de noter que les animaux mutés développent davantage et plus précocement que les contrôles (i) un état morbide, défini comme proche de la fin de vie en l'absence de signes de pathologie et (ii) un ensemble de désordres/pathologie liées à l'âge. En effet, les causes de la mort chez les animaux mutés ne sont pas associées à des facteurs externes (ex : infections) ou au développement de masses tumorales palpables ou visibles à la nécropsie ; les décès prématurés des animaux mutants semblent associés à déclin progressif de l'état de santé de l'animal avec l'apparition de pathologies évocatrices du vieillissement.

## **B) Espérance de vie en bonne santé : désordres/pathologies liés à l'âge.**

L'ensemble des individus présents à l'animalerie ont fait l'objet d'un suivi hebdomadaire afin de détecter l'apparition d'un état morbide ou de signes pathologiques. De plus, le sacrifice de cohortes à âge donné (35-40 semaines ou 75-80 semaines) pour le prélèvement et l'étude de tissus permet de compléter les données avec la réalisation d'une nécropsie sommaire.

### **1. Dégradation de l'état de santé : Suivi du poids des animaux**

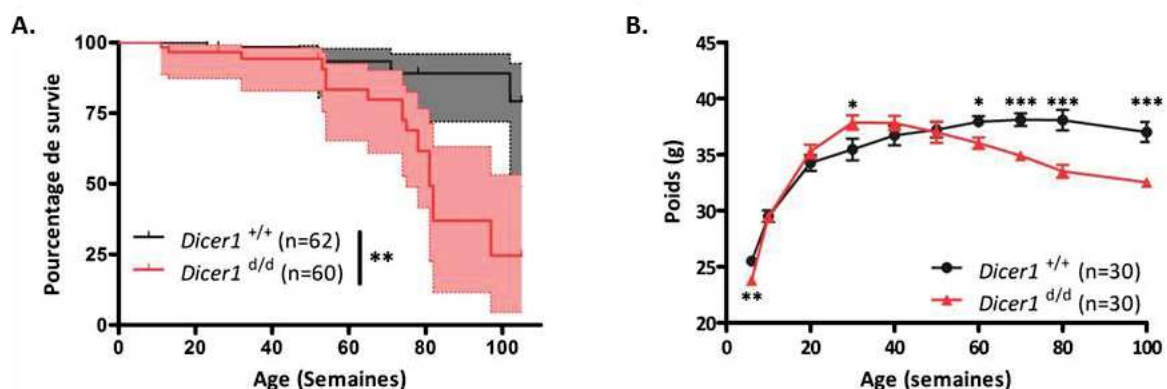
Le premier marqueur reflétant l'état de santé des souris est leur poids. Cette donnée est en effet considérée comme un des marqueurs clé de l'âge biologique et de la « fragilité », cet état de vulnérabilité aux pathologies et à la mort retrouvé chez les personnes et les animaux âgés ([Dutta et Sengupta, 2016](#)).

Les animaux *Dicer1*-déficients présentent un retard de croissance au sevrage qui s'efface rapidement autour de 10 semaines et puis semblent prendre davantage de poids que les contrôles jusqu'à 40 semaines (~9 mois). À partir de cet âge, les animaux mutés montrent une perte de poids progressive et significative à partir de 60 semaines et ce jusqu'à la fin du suivi (100 semaines, ~2 ans) ([Figure R7B](#)). Les animaux contrôles, eux, ont une prise de poids progressive jusqu'à 50 semaines, une phase de plateau d'environ 20 semaines où le poids est constant, suivi d'une perte limitée de poids entre 80 et 100 semaines.

Le poids moyen maximum atteint par les deux groupes de souris est quasiment identique (*Dicer1*<sup>+/+</sup> = 38,1g ; *Dicer1*<sup>d/d</sup> = 37,9g) mais l'âge auquel est atteint ce maximum est radicalement différent avec, de manière similaire à la longévité, 40 semaines de différence (*Dicer1*<sup>+/+</sup> = 70 semaines contre *Dicer1*<sup>d/d</sup> = 30 semaines). De manière intéressante, ceci concorde avec les observations faites par le groupe de [Wagener, Müller and Brockmann \(2013\)](#) montrant que l'âge auquel est atteint le maximum du poids, plutôt que la valeur de celui-ci, corrèle avec la longévité de l'animal. L'hypothèse avancée par les auteurs est qu'une rapide prise de poids à un âge précoce, suivi d'une perte de poids

accélérée affecte d'avantage la durée de vie que le poids corporel lui-même. Ces résultats, établis sur un modèle de souris génétiquement obèses (Lignée consanguine 860, Berlin Fat Mouse) et un nombre limité d'animaux, semblent néanmoins reproductibles et s'adaptent à mon modèle, où la prise de poids lente et progressive à un âge adulte/avancé assurent une longue vie chez les contrôles alors que la prise brusque et précoce de poids chez les animaux mutés s'associe à une diminution de la longévité.

De manière intéressante, une méta-analyse de données chez l'Homme, âgé de plus de 65 ans et en bonne santé, associe le risque de mortalité le plus faible à un Indice de Masse Corporelle (IMC) compris entre 26 et 28, juste au-dessus de la norme « corpulence normale » (IMC entre 18,5 et 25). En revanche, un IMC réduit mais néanmoins dans la norme, est associé à une augmentation du risque de mortalité de 12% pour un  $IMC < 23$ , et 28% pour un  $IMC \leq 20$  (Winter *et al.*, 2014). Chez l'homme, un vieillissement « réussi » repose donc sur un IMC dans les tranches hautes de la norme alors qu'un poids réduit s'associe à une augmentation du risque de mortalité. Cela suggère que la diminution avec l'âge du poids moyen de mes animaux mutés pourrait, en partie, contribuer à la diminution de leur survie.



**Figure R7** : La déficience en *Dicer1* est associée à une survie médiane réduite et une diminution du poids moyen avec l'âge. **(A)** Courbe de survie de Kaplan-Meier des souris mâles *Dicer1*-déficients (n=60) et contrôles (n=62). La comparaison des distributions se fait par le test du logrank. **(B)** Distribution du poids moyen en fonction de l'âge chez les mâles *Dicer1*<sup>d/d</sup> et *Dicer1*<sup>+/+</sup> (n=30 par groupe). Pour chaque âge, la p-value est calculée par un test non paramétrique de Mann-Whitney.

## 2. Déclin fonctionnel et pathologies liées à l'âge

Certaines pathologies se développant typiquement avec l'âge chez le modèle souris sont décrits dans les travaux Pettan-Brewer et M. Treuting (2011) ; j'ai ainsi pu observer dans notre colonie le développement significatif chez les mutants (i) d'atteintes musculosquelettiques ; (ii) d'atteinte oculaires comme la conjonctivite/blépharite ; (iii) et de la dermatite ulcérate (tableau R1).

**Tableau R1 : (a)** Manifestations cliniques chez les souris mâles adultes vivantes ou **(b)** après nécropsie. Le nombre d'animaux et le pourcentage correspondant (%) sont indiqués. NO : Non observé; vés. séminales. : Vésicules séminales. Les p-values sont calculées en utilisant le test exact de Fisher.

Age :	35-40 semaines			75-80 semaines		
Pathologies	<i>Dicer1</i> <sup>+/+</sup> (N=107)	<i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup> (N=98)	p value	<i>Dicer1</i> <sup>+/+</sup> (N=65)	<i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup> (N=60)	p value
Alopecie (a)	24 (22%)	25 (25%)	0.623	16 (24%)	14 (23%)	1
Prolapsus rectal (a)	2 (2%)	4 (4%)	0.428	3 (4%)	3 (5%)	1
Cyphose (a)	NO	NO	1	NO	19 (32%)	1.514e-7
Dermatite ulcérate (a)	NO	2 (2%)	0.227	3 (4%)	14 (23%)	0.00321
Conjonctivite (a)	NO	5 (5%)	0.02364	2 (3%)	11 (19%)	0.00696
	<i>Dicer1</i> <sup>+/+</sup> (N=33)	<i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup> (N=31)		<i>Dicer1</i> <sup>+/+</sup> (N=21)	<i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup> (N=18)	
Splénomégalie (b)	NO	2 (6%)	0.2307	2 (10%)	5 (28%)	0.2155
Cardiomégalie (b)	NO	1 (3%)	0.4844	NO	1 (6%)	0.4615
Hypertrophie vés. séminales.(b)	1 (3%)	4 (13%)	0.1896	4 (19%)	4 (22%)	1

### Atteintes musculaires et osseuses

Le vieillissement s'accompagne d'une perte progressive de la densité et de la solidité osseuse (=ostéoporose) ainsi que d'une réduction de la masse (=sarcopénie) et de la force musculaire (=dynapénie). Taille et force des os et des muscles sont fortement associés, d'une part mécaniquement avec la force exercée par le muscle conditionnant la taille/solidité de l'os auquel il est rattaché et d'autre part via des stimuli paracrines et endocriniens. Cette relation os-muscle s'altère avec l'âge et les atteintes observées sont généralement interdépendantes. Ces différentes atteintes musculaires et osseuses peuvent être évaluées visuellement sur l'animal ou mesurées par des tests fonctionnels.

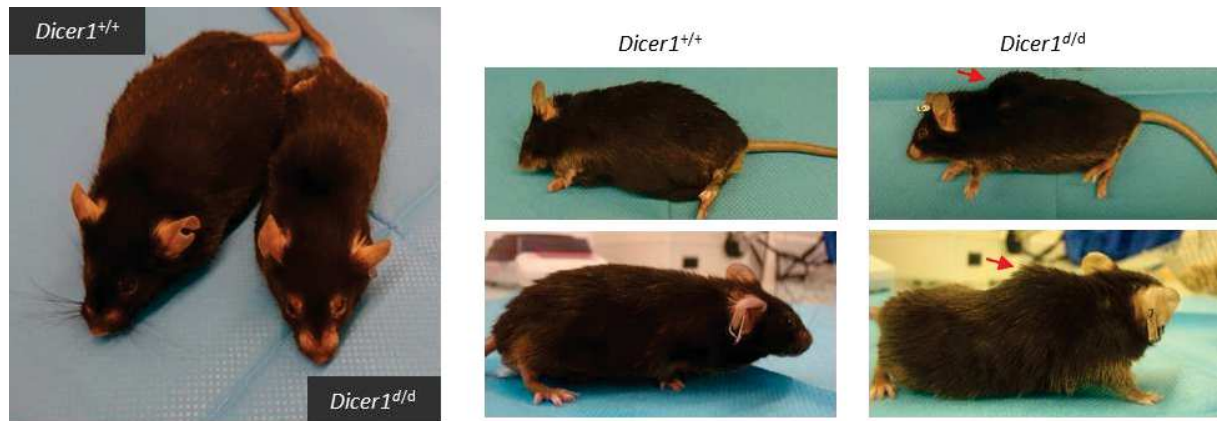
- **Observations macroscopiques :** Plusieurs observations pourraient être associées, directement ou indirectement, à une sarcopénie et/ou une ostéoporose chez mes animaux.

**(I) Perte de poids :** la diminution significative du poids observée chez les mutants reflète une perte de la masse musculaire, en plus du tissu adipeux (TA), qui s'observe d'ailleurs facilement sur l'animal (**Figure R8A**).

**(III) Cyphose :** le développement de la cyphose, une courbure exagérée de la colonne vertébrale, s'explique par une combinaison de facteurs regroupant les atteintes osseuses (ostéoporose, dégénérescence des disques intervertébraux), un affaiblissement des ligaments ainsi qu'une atrophie musculaire. Les études cherchant à caractériser ce phénotype étant souvent incomplètes, *i.e* ne prenant pas en compte tous les facteurs possiblement impliqués, la contribution de chacun de ces acteurs (os-muscle) reste encore à définir chez la souris.

La cyphose se développe de manière très évocatrice chez mes animaux *Dicer1*-déficients pour toucher jusqu'à 30% des animaux âgés de 80 semaines (**Tableau R1, figure R8B**). L'atteinte n'est pas

observée chez les animaux wild-type mais pourrait se développer bien plus tard, autour de 24 mois. Le développement précoce et limité aux animaux mutés suggère une implication non négligeable de *Dicer1* dans l'établissement de la cyphose. Des analyses histologiques et moléculaires des os, disques intervertébraux et des muscles permettraient de caractériser cette implication à l'avenir.



**Figure R8** : La diminution de l'expression de *Dicer1* provoque le développement accéléré de la sarcopénie et de la cyphose. (A) Comparaison de l'état général d'une souris mâle *Dicer1<sup>d/d</sup>* avec son contrôle, âgés de 80 semaines. Notez la perte de tissu adipeux et de masse musculaire chez le mutant; (B) Photographies de souris mâles âgés de 80 semaines mettant en évidence le développement d'une cyphose (flèche rouge) chez les individus *Dicer1<sup>d/d</sup>*. Les photographies sont représentatives des animaux de la colonie et trois couples différents sont représentés ici.

**(III) Prolapsus rectal** : Dans les travaux de [Pettan-Brewer and M. Treuting \(2011\)](#), le prolapsus rectal est l'une des manifestations cliniques couramment observées au cours du vieillissement, touchant jusqu'à 20% des individus de plus de 16 mois (68 semaines). La cause sous-jacente proposée par les auteurs est qu'une détérioration des muscles de la région pelvienne favoriserait l'établissement du prolapsus. Chez mes animaux, le développement du prolapsus reste très limité (maximum 5%) et n'évolue pas avec l'âge ([Tableau R1](#)). Par ailleurs, le prolapsus rectal ne représente pas une observation clinique fréquente, ni au sein de ma colonie, ni au sein de notre animalerie. Le développement de ce phénomène semble d'avantage être un indicateur d'infection(s) qu'un marqueur de vieillissement. En effet, il est communément admis que certaines infections par des parasites et bactéries intestinaux (*Oxyures*, *Helicobacter spp*, *Citrobacter spp*) prédisposent les animaux au développement du prolapsus rectal ([Mahesh Kumar et al., 2004](#); [Pettan-Brewer et M. Treuting, 2011a](#); [Miller et al., 2014](#)).

Quelques soient les causes du prolapsus rectal, l'absence de différences entre les deux génotypes semble indiquer que DICER ne participe pas à l'établissement du phénotype. D'autre part, le statut sanitaire de notre institut fait état de la présence de différents pathogènes intestinaux bactériens (*Helicobacter spp*) et parasitaires (*Trichomonas sp*, *Spironucleus muris*). L'absence d'un développement significatif de prolapsus chez mes animaux suggère que la déficience en *Dicer1* n'est pas liée à une hypersusceptibilité à ces pathogènes et que la protéine DICER aurait une responsabilité limitée dans le contrôle de ces bactéries/endoparasites. Cette suggestion reste bien sûr à explorer,

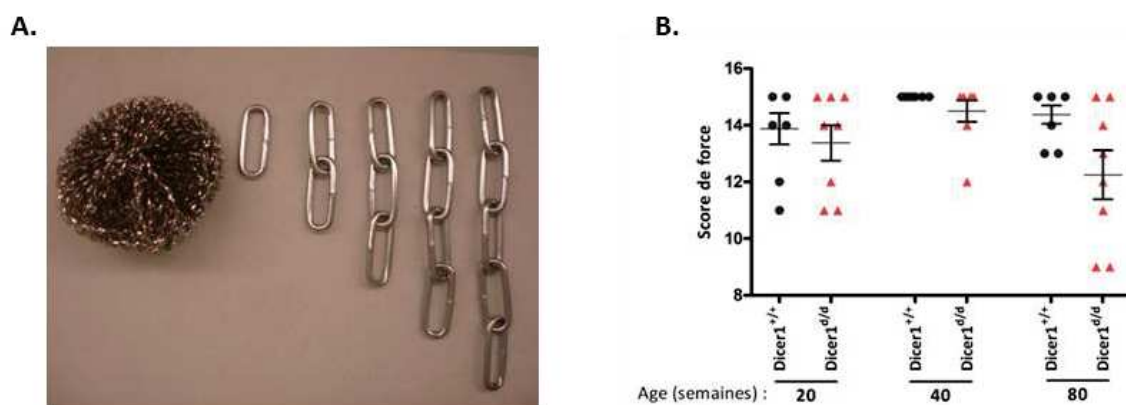


avec par exemple, une comparaison du microbiote (incluant les germes pathogènes et non-pathogènes) des souris *Dicer1*<sup>+/+</sup> et *Dicer1*<sup>d/d</sup>. L'utilisation de knock-out (KO) conditionnels de *Dicer1* dans les cellules intestinales (*Villin1-Cre*<sup>tg/-</sup>, *Dicer1*<sup>fl/fl</sup>) a déjà montré l'implication des miRs dans la composition du microbiote (Liu *et al.*, 2016) ainsi que dans l'intégrité et l'inflammation de l'épithélium intestinal (McKenna *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012) tous deux impliqués dans les dysbioses intestinales. Il serait intéressant de déterminer si mes animaux *Dicer1*-déficients présentent un phénotype de dysbiose similaire et si cette dernière pourrait être impliquée dans le vieillissement, comme suggéré dans la littérature (Kim and Jazwinski, 2018).

▪ Tests fonctionnels :

L'évolution fonctionnelle de la dégénérescence musculaire et osseuse peut être évaluée par le suivi de l'activité physique, la mesure de l'endurance (rotarod) ou encore une mesure de la force (grip test). De manière intéressante, cette dernière mesure est proposée comme un marqueur précoce du déclin lié au vieillissement chez la souris (Ge *et al.*, 2016). Le laboratoire ne disposant pas des moyens techniques pour évaluer le phénotype, j'ai réalisé un score de force en suivant les recommandations proposée par les travaux de Deacon (2013).

Le test des poids est réalisé en faisant porter à l'animal différents poids, de plus en plus important et permet d'établir un « score de force ». Les poids sont constitués d'une éponge métallique d'environ 20g que les animaux vont pouvoir attraper, à laquelle est fixée ou non une chaîne de maillons ; le nombre de maillons diffèrent de 1 à 5, et chaque maillon pèse environ 13g. Les poids testés sont donc : 20, 33, 46, 59, 72, 85g (Figure R9A). Le score est évalué à partir de la capacité de l'animal à soulever un poids pendant plus de 3 secondes.



**Figure R9** : La déficience en *Dicer1* pourrait s'accompagner d'une perte prématurée de force. (A) dispositif expérimental du test de force, les différents poids variant de 20g (éponge seule) à 85g; (B) Comparaison du score de force entre mâles mutés (*Dicer1*<sup>d/d</sup>) et contrôles (*Dicer1*<sup>+/+</sup>) à 20, 40 et 80 semaines (n=8 souris par groupe).

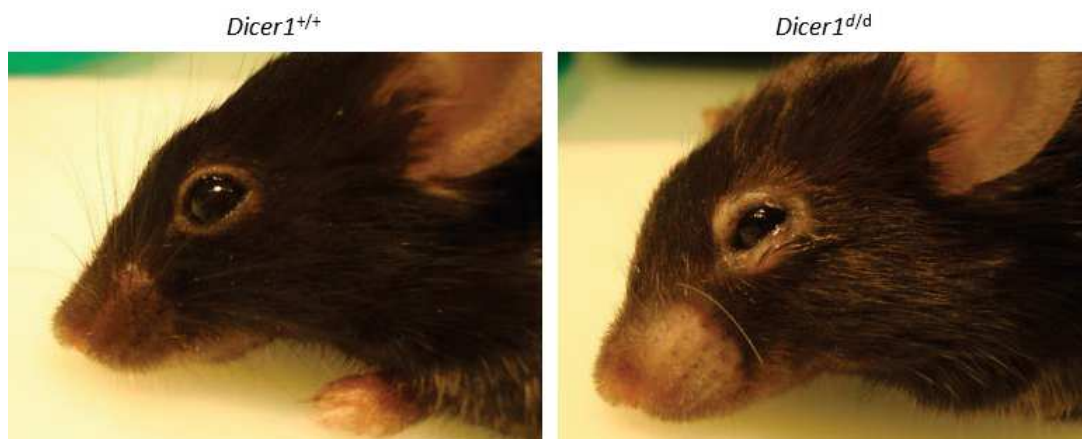
Chez les animaux jeunes (20 semaines), le score de force varie entre 11 et 15 (le maximum) pour les individus des deux génotypes, sans différence entre les groupes (**Figure R9B**). J'expliquerai la variabilité observée entre les individus par la difficulté que pourraient avoir de jeunes animaux encore en croissance à soulever une forte charge (jusqu'à 3 fois leur poids). Chez les adultes (40 semaines), le score de force est maximal pour les deux groupes avec la majorité des individus capables de soutenir la charge maximale de 85g pendant 3 secondes. Cette valeur est plus élevée que celle décrite pour les C57Bl/6J qui soulèvent en moyenne 70g (score = 12) dans les travaux de [Deacon \(2013\)](#). Les différences observées reflètent probablement les facteurs tels que le sexe (femelle dans l'article), l'âge (non spécifié), la manipulation des animaux ou encore des aspects techniques (épaisseur des mailles de l'éponge métallique). Enfin, chez les animaux âgés, il semblerait que les animaux mutés présentent une diminution (non-significative) de leur score de force suggérant une potentielle association entre déficience en DICER et dynapénie.

Le score de force est un test long à mesurer et difficile à reproduire sur les mêmes animaux (suivi longitudinal) par un manque flagrant de motivation, notamment chez les individus âgés qui, lors d'une répétition du test, « échappent » à l'exercice en n'attrapant pas le poids. Les données présentées ici sont donc très réduites et restent à confirmer, dans l'idéal grâce à un grip-test. Les atteintes, musculaires ou osseuses, à l'origine de ce phénotype sont également à identifier et caractériser.

#### *Atteintes oculaires*

Avec le vieillissement chez la souris s'établissent certaines lésions au niveau de l'œil : il s'agit de conjonctivites (inflammation de la conjonctive de l'œil), de blépharites (inflammation des paupières) et de kératite (atteintes de la cornée). Ces différents phénotypes s'expliquent par la dégénérescence et l'inflammation des glandes lacrymales, provoquant une diminution de la quantité et la qualité des larmes produites. D'autres pathologies emblématiques du vieillissement sont également présentes chez la souris : la cataracte et la DMLA.

Ce sont les atteintes inflammatoires, conjonctivite et blépharite, qui sont les plus observées chez mes souris, avec près de 20% des animaux mutés touchés à 80 semaines (**Tableau R1**). Les lésions atteignent un œil ou les deux et se caractérisent par un bord de l'œil gonflé et épaissi, douloureux, accompagné par des écoulements (**Figure R10**). L'observation est bien plus épisodique chez les animaux wild-type (3%) et les plus jeunes. La kératite, elle, se caractérise par un blanchiment de la cornée, normalement facilement visualisable sur les animaux noirs. Un tel phénotype n'a été observé qu'une fois sur un animal muté (1/98) de 40 semaines, très éloigné des 13% de kératites rapportées chez les C57Bl/6J de plus de 16 mois ([Pettan-Brewer and M. Treuting, 2011](#)). Cette différence entre les observations pourrait provenir (i) soit d'une implication différentielle de *Dicer1* dans les phénotypes, avec une expression suffisante nécessaire au contrôle de l'inflammation de la conjonctive et de la paupière mais dispensable au maintien de la cornée ; (ii) soit d'éléments exogènes (litières, enrichissement, hygrométrie, pathogènes, etc...) différents entre les animaleries.



**Figure R10** : La diminution de l'expression de *Dicer1* entraîne le développement d'atteintes inflammatoires de l'œil avec l'âge. Comparaison de l'aspect de l'œil d'un individu mâle âgé de 80 semaines entre animal contrôle et *Dicer1*-déficient.

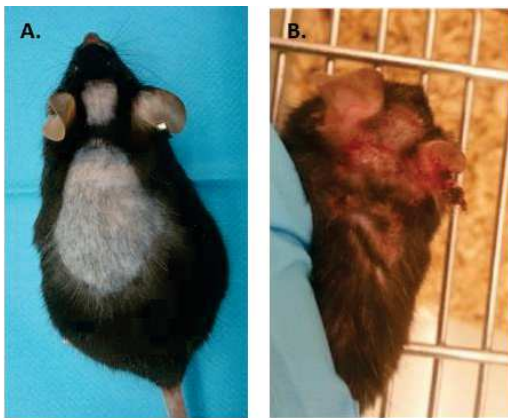
L'importance de l'expression de *Dicer1* dans l'établissement de la DMLA, médiée par l'accumulation des transcrits SINEs, est validée dans notre mutant par les travaux de [Wright et al. \(2020\)](#). Dans cette étude, les auteurs montrent que les souris *Dicer1*<sup>d/d</sup> présentent un développement accéléré de la dégénérescence de la rétine, ainsi que d'une néovascularisation rétinienne et choroïdienne, marqueurs d'une DMLA avancée. L'incidence et la sévérité des lésions sont significativement corrélées avec l'âge, avec 10% des mutants développant ces lésions à 1 mois, contre 60% à 10 mois. Aucune lésion n'est observée à ces âges chez les contrôles. Ces résultats sont par ailleurs validés dans l'étude avec un autre modèle hypomorphe, généré par l'insertion du vecteur « trap-gene » dans une région différente du gène *Dicer1* (exon 22), confirmant l'importance de *Dicer1* dans l'établissement de ce phénotype emblématique du vieillissement.

Une dernière atteinte oculaire emblématique du vieillissement est la cataracte. Cette maladie est provoquée par des changements de structure du cristallin, liés à la perte d'homéostasie des protéines, qui s'associent à une perte progressive de la transparence et conduit à la perte de vision. Malheureusement le diagnostic de cette atteinte oculaire reste compliqué et demande des moyens techniques et des analyses histologiques que je n'ai pas pu réaliser au laboratoire. Cependant, DICER ayant déjà été impliqué dans le développement du cristallin ([Li and Piatigorsky, 2009](#)), il serait maintenant intéressant d'établir, grâce à mon modèle, si l'expression de la protéine est également indispensable au maintien d'un cristallin fonctionnel au cours du vieillissement.

#### *Lésions cutanées*

La perte de poils, ou alopecie, est associée au vieillissement chez la souris comme chez l'homme ([Pettan-Brewer et M. Treuting, 2011](#); [Harkema, Youssef et de Bruin, 2016](#)). La délétion conditionnelle de *Dicer1* dans les kératinocytes (modèle K5-Cre+; *Dicer1*<sup>fl/fl</sup>) est associée au développement rapide d'une alopecie très étendue ([Teta et al., 2012](#); [Lyle et al., 2014](#)). *A contrario*, ce résultat n'est pas du

tout retrouvé chez mes souris *Dicer1*-déficientes qui présentent un pelage comparable à celui des contrôles, même à un âge avancé, impliquant un rôle plutôt limité de la protéine dans la pilosité des animaux. L'alopecie que j'ai observée (**Tableau R1**) présente des motifs particuliers, évocateur d'un « barbering » soit l'épilation localisée des vibrisses (visible sur la **figure R10**) et/ou du pelage par un congénère de cage (**Figure R11A**). Il est décrit dans la littérature que l'incidence et l'intensité du barbering varie en fonction du fond génétique, des conditions d'hébergements, de la composition du groupe et de la hiérarchie ([Garner et al., 2004](#); [Kalueff et al., 2006](#)). L'absence de différence observée entre mes deux génotypes quel que soit l'âge suggère que l'expression *Dicer1* n'aurait pas d'effet sur ce comportement social.

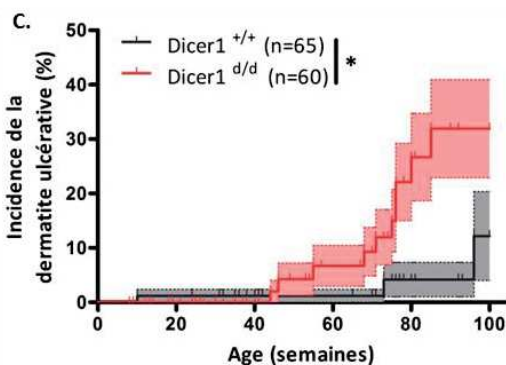


**Figure R11** : La déficience chronique en *Dicer1* n'entraîne pas d'alopecie avec l'âge mais augmente la susceptibilité à la dermatite ulcéreuse.

(A) Photographie d'une alopecie évocatrice d'un barbering, notez l'épilation nette sur des zones très localisées;

(B) Photographie d'une dermatite ulcéreuse à un stade avancé avec les lésions étendues sur la tête, le dos et les flancs (non visible) de l'animal ;

(C) Pourcentage de souris mâles *Dicer1*-déficientes (n=60) et contrôles (n=65) développant une dermatite ulcéreuse. La comparaison des distributions se fait par le test du logrank.



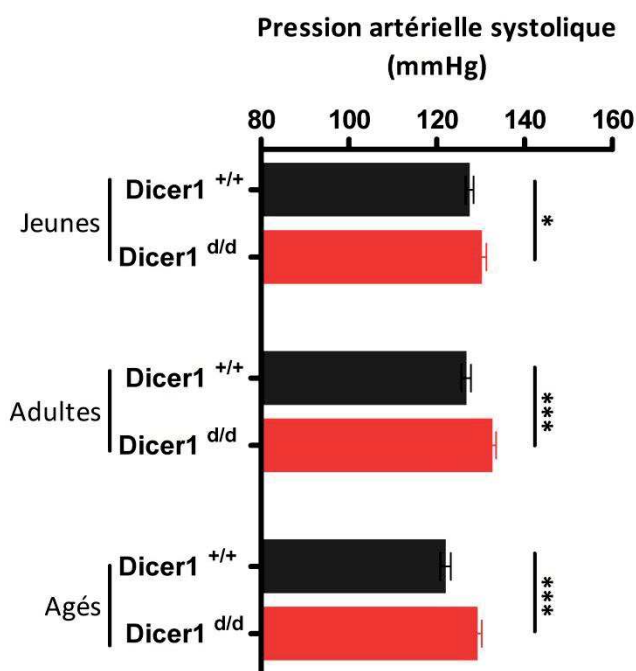
Une atteinte cutanée liée au vieillissement, particulièrement dans le fond C57Bl/6J, est la dermatite ulcéreuse. Cette pathologie se caractérise par des lésions cutanées ulcérées débutant sur la nuque puis progressant sur la tête et les flancs de l'animal par automutilation, à mesure que l'animal se gratte (**Figure R11-B**). La pathologie se déclare typiquement autour de 100 semaines et sa prévalence se situe entre 4 et 20% selon le sexe et les animaleries ([Hampton et al., 2012](#)), ce qui effectivement est retrouvé dans mon groupe d'animaux *Dicer1*<sup>+/+</sup>. Les animaux *Dicer1*-déficients eux, développent la pathologie significativement plus tôt, avec 20% des individus touchés à 75 semaines, et présentent une prévalence plus élevée avec 1/3 des animaux développant la maladie à 100 semaines (**Figure R11-C**). Il est à noter également que le traitement des souris par la coupe de la pointe des griffes proposé par [Adams et al. \(2016\)](#), efficace dans le groupe contrôle, n'a qu'un effet limité dans le temps chez les souris *Dicer1*-déficientes. La diminution de l'expression de *Dicer1* augmente donc la

susceptibilité des animaux à cette pathologie. Les kératinocytes pourraient être des acteurs clés de ce phénotype car la délétion conditionnelle de *Dicer1* induite dans ces cellules (souris K14-CreERT2<sup>tg/+</sup>; *Dicer1*<sup>fl/fl</sup>) est associée à une susceptibilité accrue au développement d'un autre type de dermatite, la dermatite atopique induite expérimentalement (Hener *et al.*, 2011), ainsi qu'à une perte de la capacité de cicatrisation des plaies (Ghatak *et al.*, 2015) qui pourrait expliquer la sévérité de la pathologie observée et l'échec du traitement.

#### Mesure de la pression artérielle

La pression artérielle, notamment systolique, augmente avec l'âge chez la souris comme chez l'Homme. L'incidence et la sévérité de cette hypertension chez la souris varie selon le fond génétique et le sexe (Barsha, Denton et Mirabito Colafella, 2016). J'ai mesuré ce marqueur de vieillissement par la technique de « tail-cuff », un manchon gonflable positionné autour de la queue de la souris vigile. Les animaux *Dicer1*-déficients développent précocement, dès 20 semaines, une hypertension systolique qui augmente significativement avec l'âge (40-80 semaines) contrairement aux individus *Dicer1*<sup>+/+</sup> dont la pression systolique reste stable (Figure R12).

De manière intéressante, l'hypertension est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies liées à l'âge comme les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, les atteintes rénales chroniques, la démence vasculaire (Lerman *et al.*, 2019) ou encore la maladie d'Alzheimer (Shih *et al.*, 2018). L'hypertension observée précocement chez les animaux *Dicer1*-déficients peut alors non seulement refléter un vieillissement accéléré, mais également participer au processus de vieillissement et au développement de pathologies liées à l'âge.



**Figure R12** : Les animaux *Dicer1*-déficients développent une hypertension précoce et sévère avec l'âge. Mesure de la pression artérielle systolique (mmHg) chez des individus jeunes (20 semaines, n=3 par groupe), adultes (40 semaines, *Dicer1*<sup>+/+</sup> n=3, *Dicer1*<sup>d/d</sup> n=4) et âgés (80 semaines, *Dicer1*<sup>+/+</sup> n=3, *Dicer1*<sup>d/d</sup> n=4). L'apparente baisse générale de tension à 80 semaines est un artéfact dû à l'augmentation de l'épaississement et de la pigmentation de la peau avec l'âge chez la souris.

#### *Autres observations : Nécropsies*

Après l'autopsie des animaux, des signes supplémentaires de vieillissement prématuré chez les mutants *Dicer1*<sup>d/d</sup> sont observés à une fréquence plus élevée comparé aux contrôles (**Tableau R1**) ; il s'agit de la splénomégalie (Loukov *et al.*, 2016), la cardiomégalie (Boyle *et al.*, 2011) et l'élargissement des vésicules séminales (Chigurupati *et al.*, 2008). Bien que le nombre d'animaux étudiés soit trop faible pour atteindre une différence significative, ces observations pointent néanmoins toutes dans la direction d'un vieillissement généralisé accéléré chez les animaux *Dicer1*<sup>d/d</sup>.

Les individus *Dicer1*-déficients présentent donc une variété de phénotypes évocateurs d'un vieillissement prématuré, et qui suggèrent une atteinte globale touchant tous les organes que j'ai été en mesure d'étudier. Cependant, le vieillissement se caractérise également par des altérations du métabolisme que j'ai essayé d'évaluer chez les animaux dans la section suivante.

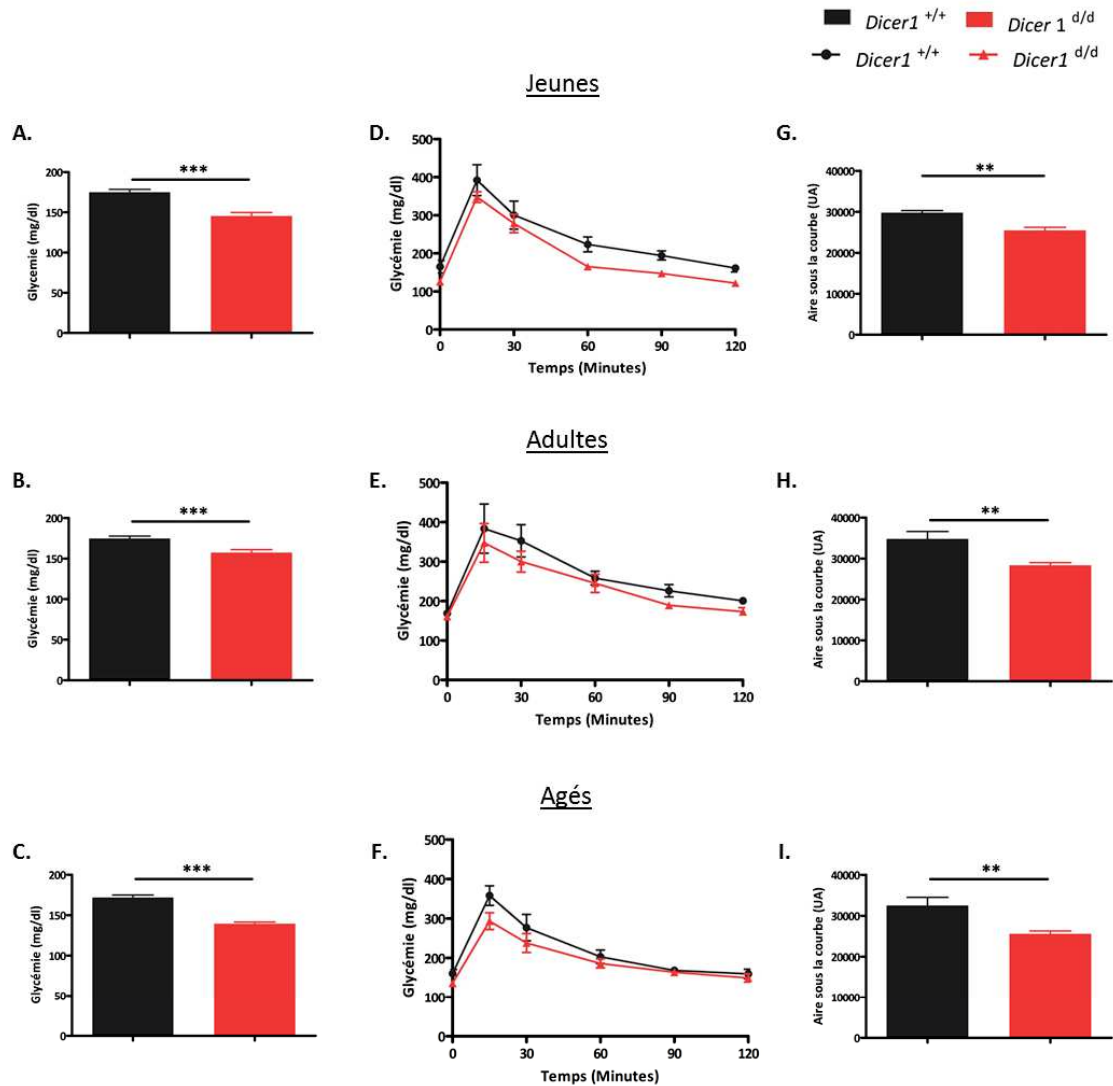
### **III. La déficience en *Dicer1* provoque des altérations du métabolisme**

#### **A) Les animaux *Dicer1*-déficients présentent une altération de la glycémie basale et une meilleure tolérance au glucose.**

La première mesure faite chez mes animaux est l'évaluation de la glycémie à jeun dans différents groupes d'âge : jeunes (~20 semaines), adultes (~40 semaines) et âgés (~80 semaines). De manière surprenante tous les animaux *Dicer1*-déficients, quel que soit l'âge, présentent une glycémie à jeun significativement moins élevée que dans les contrôles (**Figure R13 A-B-C**). De plus, suivant une injection intrapéritonéale de glucose, les individus *Dicer1*<sup>d/d</sup> présentent un meilleur contrôle de la glycémie, avec une tendance à un pic glycémique plus réduit et une clairance plus rapide du glucose (**Figure R13 D-E-F**). La combinaison de trois expériences indépendantes montre une tolérance au glucose significativement meilleure chez les individus *Dicer1*-déficients, un résultat qui est conservé avec l'âge (**Figure R13 G-H-I**).

Si au premier abord ces résultats semblent en contraste avec la perte du contrôle de la glycémie associée habituellement avec l'âge, ils restent potentiellement associés au vieillissement et impliqués dans l'établissement de pathologies. En effet, l'hypoglycémie chronique chez le sujet âgé diabétique est significativement associée à un déclin physique et cognitif conduisant à l'établissement de la fragilité et de l'invalidité chez ces patients (Abdelhafiz *et al.*, 2015). L'hypoglycémie est également une cause d'hospitalisation chez les individus âgés de plus de 70 ans et est associée à des maladies caractéristiques du sujet âgé comme les pathologies cardiovasculaires, une insuffisance rénale chronique ou encore des pneumopathies (Sako *et al.*, 2017). L'impact d'une hypoglycémie chronique

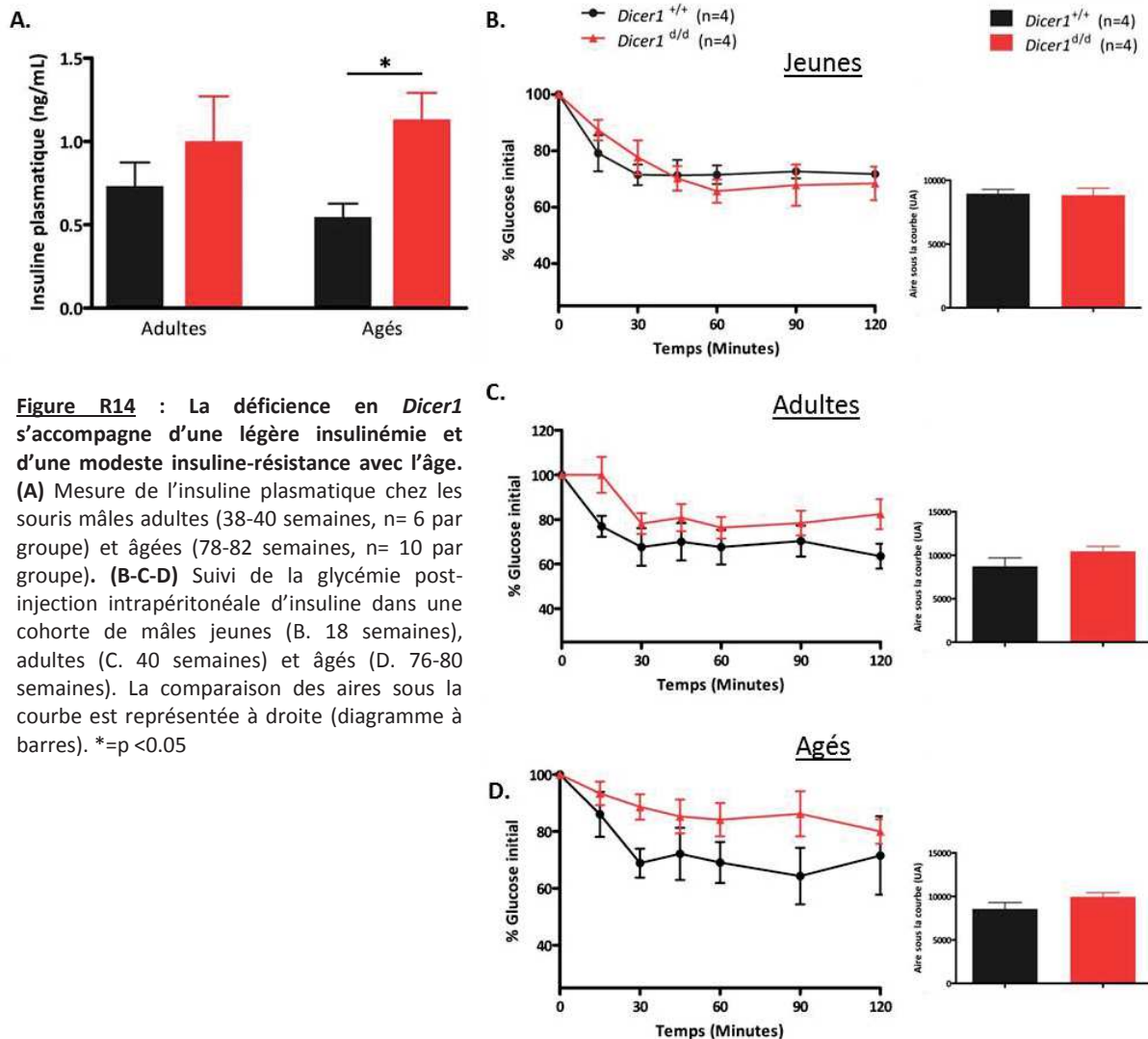
chez les individus âgés « sains » n'a jamais été évaluée mais reste très difficile à apprécier en raison de la difficulté à détecter les épisodes hypoglycémiques qui présentent des symptômes non spécifiques et/ou mal-diagnostiqués/interprétés.



**Figure R13** : Les souris mâles *Dicer1*-déficientes présentent une diminution de la glycémie basale et une meilleure tolérance au glucose. (A-B-C) Glycémie à jeun de souris mâles jeunes (A. 20-22 semaines, n=23), adultes (B. 35-40 semaines, n= 27) et âgés (C. 77-80 semaines, *Dicer1*<sup>+/+</sup> n=25, *Dicer1*<sup>d/d</sup> n=20); (D-E-F) tests représentatifs de tolérance au glucose chez les animaux jeunes (D. n=3 par groupe), adultes (E. n=4 par groupe) et âgés (F. n=3 par groupe). (G-H-I) Comparaison des aires sous la courbe de trois expériences indépendantes chez les individus jeunes (G. n=13 par groupe), adultes (H. n=14 par groupe) et âgés (I. n=13 par groupe). \*\* = p<0,01 ; \*\*\* = p<0,001

## B) La sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline sont globalement inchangées chez les individus *Dicer1*-déficients.

Les mesures par ELISA de l'insuline plasmatique montrent une légère augmentation de la sécrétion d'insuline chez les individus *Dicer1*-déficients, un phénomène conservé et plus important chez les individus âgés (Figure R14A).



**Figure R14** : La déficience en *Dicer1* s'accompagne d'une légère insulïnémie et d'une modeste insulino-résistance avec l'âge. (A) Mesure de l'insuline plasmatique chez les souris mâles adultes (38-40 semaines, n= 6 par groupe) et âgées (78-82 semaines, n= 10 par groupe). (B-C-D) Suivi de la glycémie post-injection intrapéritonéale d'insuline dans une cohorte de mâles jeunes (B. 18 semaines), adultes (C. 40 semaines) et âgés (D. 76-80 semaines). La comparaison des aires sous la courbe est représentée à droite (diagramme à barres). \* = p < 0.05

L'augmentation de la sécrétion d'insuline, bien que significative chez les individus âgés, reste modeste et n'expliquerait, à mon avis, qu'en partie l'hypoglycémie observée chez les souris *Dicer1*<sup>d/d</sup>. Toutefois, ce phénotype est associé dans la littérature à l'établissement d'une insulino-résistance, *i.e.* les tissus ne captent plus le glucose sanguin en réponse à l'insuline, et est un marqueur du diabète de type II et du vieillissement. Les individus *Dicer1*-déficients présentent une insulino-résistance peu importante mais qui augmente avec l'âge (Figure R14 B-C-D) ce qui concorde avec le phénotype de vieillissement accéléré décrit jusqu'ici. L'effectif réduit des animaux testés ne permet toutefois pas



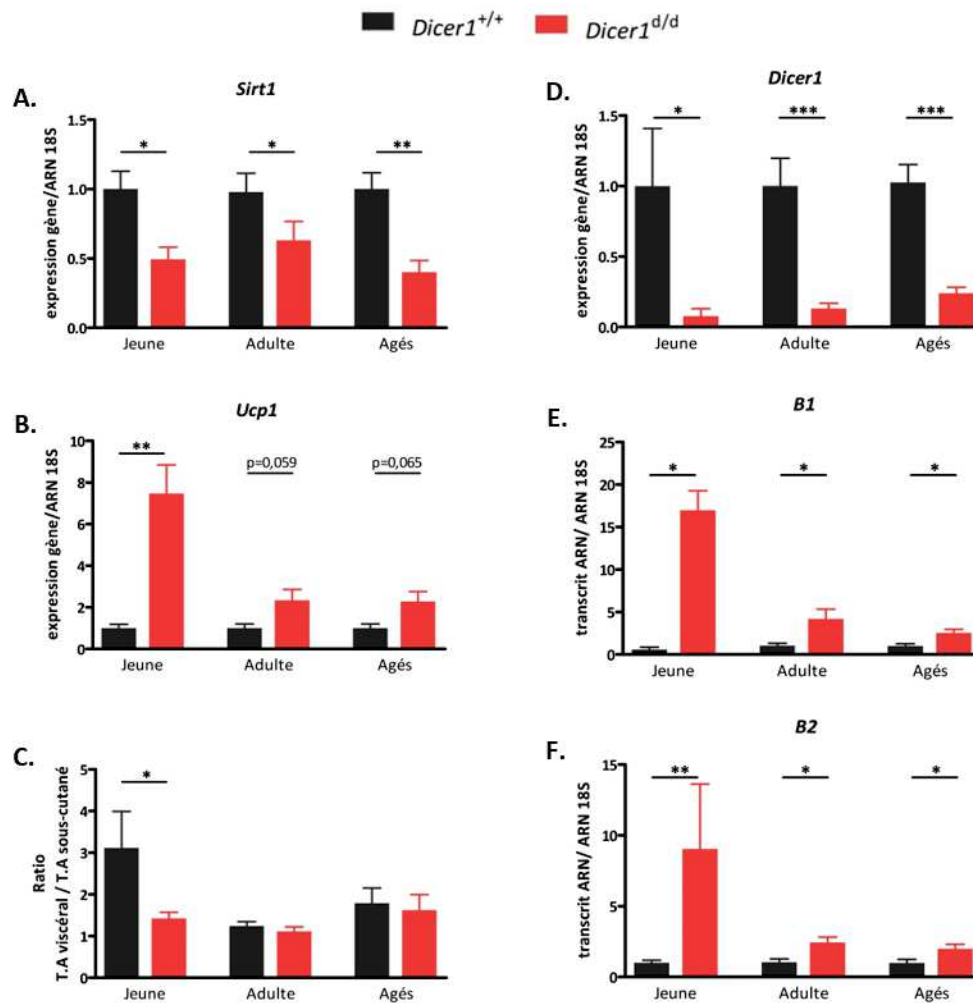
d'atteindre un niveau significativement différent et les tests sont à reproduire pour plus de robustesse.

### **C) L'expression des régulateurs du métabolisme énergétique *Sirt1* et *Ucp1* est altérée dans le tissu adipeux blanc des animaux *Dicer1*-déficients et corrèle avec l'accumulation de transcrits SINEs.**

Les altérations observées dans la glycémie, l'insulinémie et le poids des animaux *Dicer1*-déficients suggèrent une modification de la balance énergétique en faveur de l'utilisation/dépense d'énergie plutôt que dans la synthèse/stockage des nutriments.

Un régulateur clé de l'homéostasie énergétique est la protéine SIRT1, impliquée dans le contrôle de la sécrétion d'insuline, la sensibilité à l'insuline, la maturation et le remodelage du tissu adipeux (TA) ainsi que les réponses inflammatoires (Hui *et al.*, 2017). SIRT1 est exprimée au niveau du cerveau, du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux, et la diminution de son expression dans ces tissus est une caractéristique du vieillissement (Gong *et al.*, 2014). Chez mes animaux, l'expression de *Sirt1* est significativement réduite dans le tissu adipeux blanc viscéral des souris *Dicer1*-déficientes comparée aux contrôles, quel que soit l'âge (Figure R15A), suggérant une association entre expression de *Dicer1* et *Sirt1* et pouvant potentiellement expliquer les altérations du métabolisme chez ces individus.

Le métabolisme énergétique est également contrôlé par les mitochondries où le catabolisme du glucose et des lipides alimente la chaîne respiratoire qui crée un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Cette chaîne respiratoire est couplée à une ATP-synthase qui permet la production d'énergie (=ATP) par dissipation du gradient de protons. Cette production d'énergie peut être « découplée » *via* la perméabilisation de la membrane interne par des protéines UCP (UnCoupling Protein) qui vont dissiper le gradient électro-chimiquement et libérer l'énergie sous forme de chaleur. L'expression de ces protéines, notamment UCP-1, que l'on pensait initialement restreinte au TA brun responsable de la thermogenèse, peut être induite dans le TA blanc et le muscle squelettique modifiant la balance énergétique. L'augmentation de l'expression d'*UCP1* dans le TA blanc viscéral chez l'homme est ainsi associée à une meilleure capture du glucose sanguin, une glycémie et un taux de triglycérides sanguin réduits, ainsi qu'une diminution du ratio TA viscéral sur TA sous-cutané (Tews *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2020). De manière intéressante chez mes souris, l'expression d'*Ucp1* dans le TA viscéral des souris *Dicer1*-déficientes jeunes est significativement plus élevée que dans le groupe contrôle ; le niveau d'expression reste plus élevé avec l'âge mais cette augmentation n'est pas significative. De plus, comme observé chez l'Homme, j'observe une relation inverse entre le niveau d'expression d'*Ucp1* et le ratio TA viscéral/TA sous-cutané (Figure R15 B-C).



**Figure R15 :** Les animaux *Dicer1*-déficients présentent une altération de l'expression des régulateurs du métabolisme *Sirt1* et *Ucp1* ainsi qu'une accumulation de transcrits SINEs dans le tissu adipeux. Analyse par RT-qPCR dans le tissu adipeux blanc viscéral de l'expression normalisée au groupe contrôle de (A) *Sirt1*, (B) *Ucp1*, (D) *Dicer1*, (E) *B1* et (F) *B2*; au moment du sacrifice, le tissu adipeux blanc est collecté et pesé pour établir le ratio tissu adipeux viscéral sur tissu adipeux sous-cutané (C) chez des mâles jeunes (20 semaines, n=5 par groupe), adultes (40 semaines, n= 10 par groupe) et âgés (80 semaines, n= 8 par groupe). \*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$

Il est intéressant de noter que de telles modifications d'expression de *Sirt1* et *Ucp1* dans le TA viscéral sont observées chez des patients obèses et constitueraient un phénomène « d'hyper-métabolisme » pour répondre et s'adapter à l'excès de nutriments disponibles (Kurylowicz *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2020). Si un état hypermétabolique peut être bénéfique pour résoudre l'obésité et les troubles métaboliques liés, son activation chronique peut devenir délétère. Par exemple, les souris délétées pour *Sirt1*, qui sont hypermétaboliques et hyperphagiques, ne peuvent plus répondre efficacement aux fluctuations de nutriments (Boily *et al.*, 2008); l'induction de l'expression d'*Ucp1* par l'exposition au froid favorise l'athérosclérose (Dong *et al.*, 2013) et l'hypermétabolisme médié par l'augmentation de l'expression d'*Ucp1* est associé à la cachexie dans le cancer (Petruzzelli *et al.*, 2014).

Outre une variation en réponse à un excès de nutriment, l'expression de *Sirt1* peut être réduite via l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Chalkiadaki and Guarente, 2012) et celle d'*Ucp1* peut augmenter en réponse à une augmentation de ROS (Han et al., 2016); deux évènements potentiellement médiés par l'accumulation de transcrits SINEs (ARNs B1 et B2). L'analyse par RT-qPCR montre que la déficience en *Dicer1* s'accompagne d'une accumulation significative des transcrits *B1* et *B2* dans le TA blanc viscéral qui est conservée avec l'âge (Figure R15 D-E-F), démontrant que le phénomène n'est pas restreint à la rétine pigmentaire. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de SINEs pourrait potentiellement être un lien mécanistique entre déficience en *Dicer1* et altération de métabolisme.

Il est important de noter que l'expression d'*Ucp1* est également induite lors d'une exposition au froid. Or, il est de plus en plus communément admis que les souris de laboratoire sont maintenues en conditions « froides » autour de 20°C (Fischer, Cannon and Nedergaard, 2018) et, suggéré par l'augmentation de l'expression d'*Ucp1*, ce stress semble impacter d'avantage les individus *Dicer1*-déficients que les contrôles. Bien que je n'aie pas mesuré de différence dans la température corporelle des animaux qui dénoterait une intolérance au froid, il serait néanmoins intéressant de tester si les altérations métaboliques et le vieillissement prématuré sont observés chez les souris *Dicer1*<sup>d/d</sup> maintenues en conditions thermo-neutre (28-30°C).

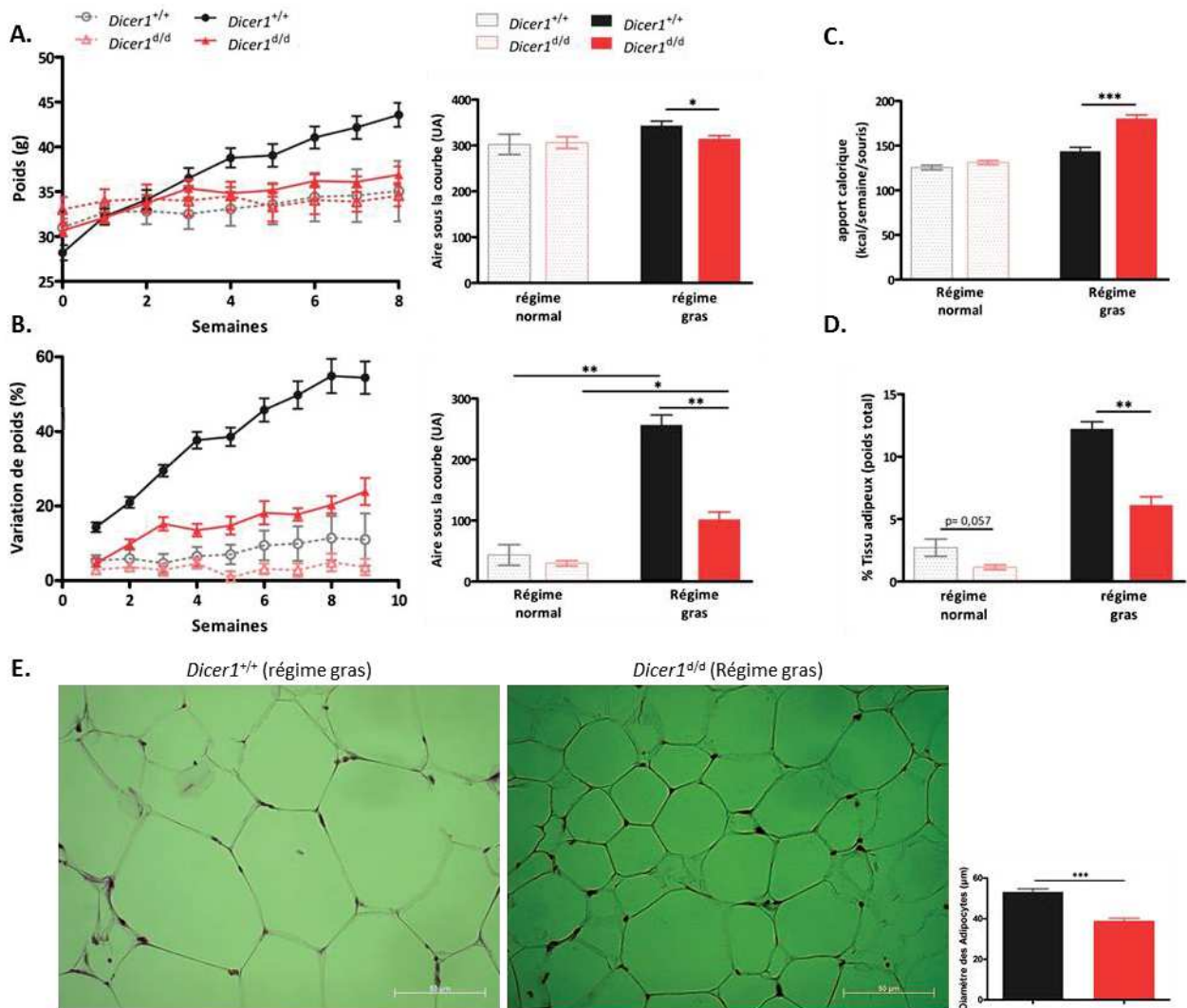
Enfin, j'ajouterai que le métabolisme énergétique est aussi contrôlé par le système nerveux adrénergique et les altérations observées jusqu'ici chez les animaux mutés – glycémie réduite, meilleure tolérance au glucose et insulïnémie augmentée- copient le phénotype des souris délétées de l' $\alpha_{2A}$ -adrenorecepteur (Savontaus et al., 2008) ce qui pourrait impliquer *Dicer1* dans l'expression ou la signalisation médiée par ce récepteur.

## **D) La déficience en *Dicer1* protège des altérations métaboliques mais non de l'inflammation provoquées par un régime gras.**

Comme mes animaux semblent présenter une altération de la réponse aux nutriments, j'ai décidé d'observer la réponse à un challenge avec un régime gras (60% calories apportées par les lipides) pendant huit semaines.

De manière surprenante, les individus *Dicer1*-déficients semblent protégés de la prise de poids induite par un régime gras ; le poids moyen reste semblable aux individus sous un régime normal et significativement inférieur au groupe contrôle sous régime gras. En effet, les individus contrôles doublent leur poids initial au terme du régime gras, en contraste avec les mutants qui ne présentent qu'environ 20% d'augmentation (Figure R16 A-B). Ceci est d'autant plus surprenant car les animaux *Dicer1*-déficients sous régime gras ingèrent davantage de nourriture et ont un apport calorique moyen bien plus élevé au cours de l'expérience (Figure R16C). Au moment du sacrifice, la différence

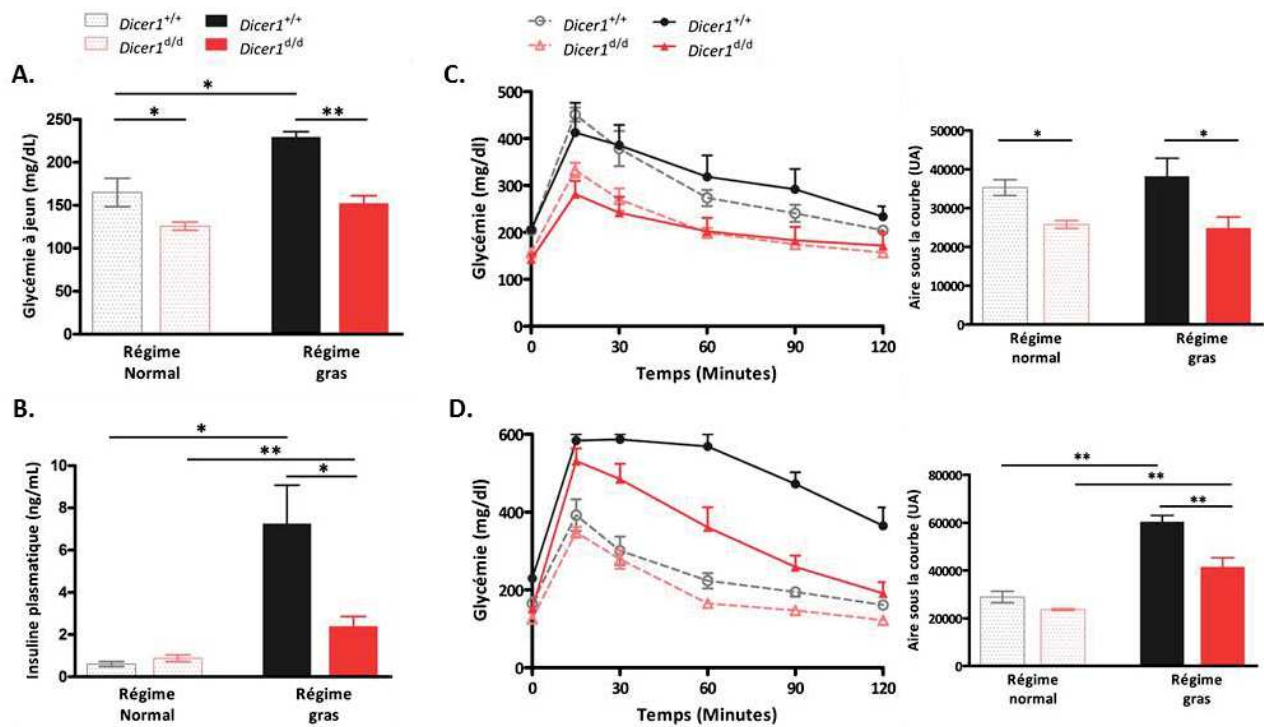
de poids entre les animaux contrôles et *Dicer1*-déficients sous régime gras s'explique par un pourcentage de TA blanc total (viscéral + sous-cutané) fortement réduit chez les animaux mutants (**Figure R16D**). Le TA viscéral des animaux *Dicer1*-déficients semble également présenter une structure désorganisée et des adipocytes de taille plus réduite comparés au TA des animaux *Dicer1*<sup>+/+</sup> (**Figure R16E**).



**Figure R16** : Les animaux *Dicer1*-déficients sont protégés de la prise de poids liée à un régime gras. **(A)** suivi sur huit semaines du poids moyen et **(B)** de la prise de poids des animaux sous régime normal (courbes discontinues, n=4 par groupe) et sous régime riche en lipide (60% calories apportées par les lipides – courbes continues, n=6 par groupe). Les aires sous la courbe sont représentées à droite du graphique par le diagramme à barres. **(C)** Apport calorique (Kcal) moyen ingéré par semaine et par souris au cours des huit semaines de suivi. **(D)** Pourcentage de tissu adipeux blanc total rapporté au poids total des animaux lors du sacrifice. **(E)** Coupes paraffine et coloration hématoxyline-éosine du tissu adipeux blanc viscéral récolté au sacrifice des animaux après huit semaines de régime gras; barre d'échelle = 50µm. La taille moyenne des adipocytes est représentée sur le diagramme à barres à droite des photographies (n=3 souris par groupe). \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001

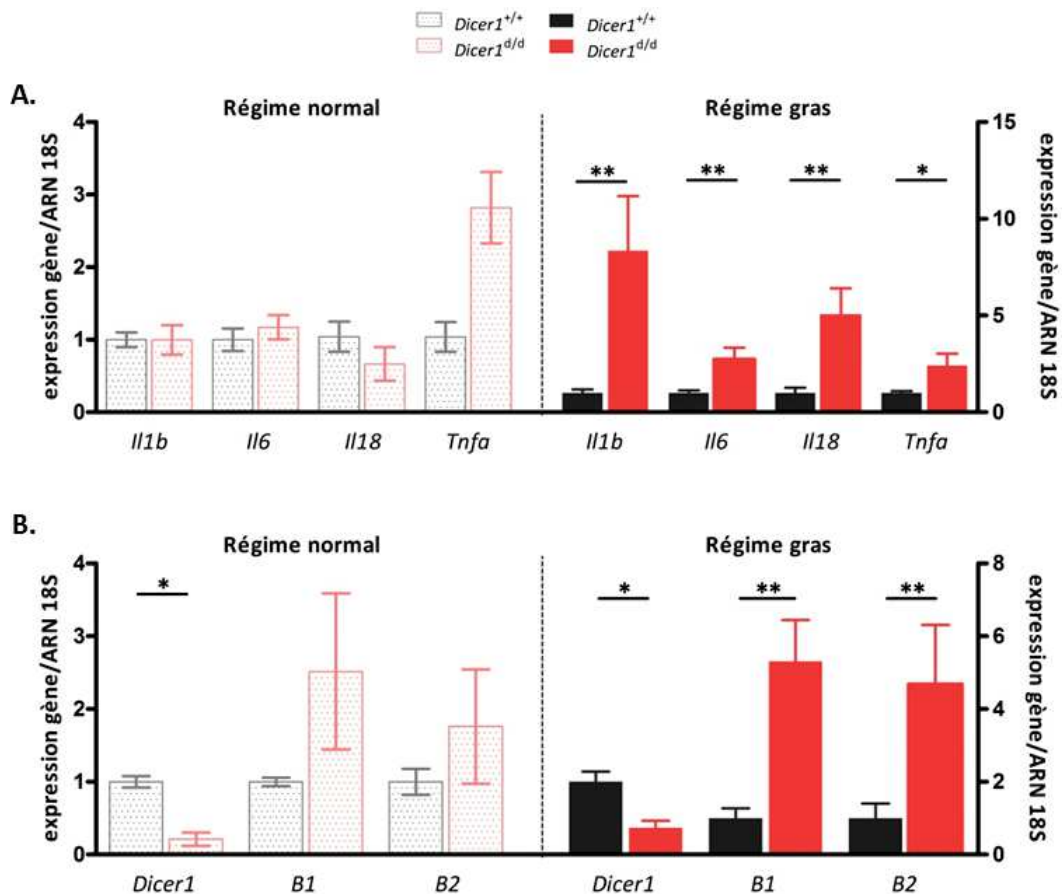
L'exposition chronique à un excès de nutriments entraîne chez la souris une augmentation de la glycémie basale ainsi qu'une insulinémie élevée, ce qui est observé chez les individus contrôles (**Figure R17 A-B**). En revanche, comme observé sous un régime normal, les animaux *Dicer1*-déficients gardent une glycémie significativement réduite en comparaison aux animaux contrôles, même sous

régime gras. Toutefois, chez ces animaux l'insulinémie est fortement réduite et suggère une altération de la réponse à l'excès nutritif. Le test de tolérance au glucose réalisé avant la mise en place du régime et au terme des huit semaines de régime gras, montre que les animaux mutés conservent une réponse au glucose plus efficace comparé aux contrôles. Même si le contrôle de la glycémie chez les mutants est en partie perdu avec le régime gras comparé au régime normal, il reste significativement meilleur comparé aux contrôles (Figure R17 C-D).



**Figure R17** : Les altérations métaboliques liées à un régime gras sont réduites chez les animaux *Dicer1*-déficients. (A) mesure de la glycémie basale et (B) de l'insuline plasmatique chez les mâles après huit semaines de régime normal (n=4 par groupe) ou régime gras (n=6 animaux par groupe). Test de tolérance au glucose (C) avant la mise en place d'un régime et (D) 8 semaines après un régime normal (courbes discontinues) ou un régime gras (courbes continues); les aires sous la courbe sont représentées à droite du graphique sur le diagramme à barres. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

L'exposition à un régime gras entraîne également une accumulation de lipides au niveau du tissu gras induisant un stress inflammatoire au niveau des adipocytes. L'évaluation de l'inflammation au niveau du TA viscéral évaluée par RT-qPCR montre que les mutants soumis à un régime gras présentent une forte activation de l'expression des gènes inflammatoires *Il1b*, *Il6*, *Il18* et *Tnfa*, qui n'est pas retrouvée sous le régime normal. Il est à noter que cette expression de gènes inflammatoires corrèle également avec l'accumulation de transcrits *B1* et *B2* (Figure R18 A-B).



**Figure R18** : Sous un régime gras, la déficience en *Dicer1* s'accompagne d'une augmentation de l'expression de gènes inflammatoires et des transcrits SINEs dans le tissu adipeux blanc viscéral. (A) Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes inflammatoires *Il1b*, *Il6*, *Il18*, *Tnfa* et (B) des transcrits *B1* et *B2* dans le tissu adipeux blanc viscéral de souris mâles après huit semaines de régime normal (n=3 par groupe) ou de régime gras (n=6 par groupe). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01

En réponse à un régime gras, la déficience en *Dicer1* a donc des effets assez contrastés. D'une part, un effet bénéfique avec la prise de poids réduite et le maintien du contrôle de la glycémie comparé aux contrôles mais d'autre part, une inflammation sévère au niveau du TA viscéral, associée à une accumulation des transcrits SINEs.

Différents éléments pourraient expliquer ces observations chez le mutant. Premièrement, le microbiote gastrique et intestinal peut moduler l'absorption des nutriments, la prise de poids ou encore l'inflammation systémique. Il est montré dans la littérature que la délétion conditionnelle de *Dicer1* dans les cellules de l'épithélium intestinal entraîne une modification du microbiote et une susceptibilité des animaux à la colite induite par le DSS (Dextran Sodium Sulfate) (Liu *et al.*, 2016). Un effet de cette dysbiose sur le métabolisme des animaux n'est pas du tout exploré dans ces travaux mais ne peut être exclu et pourrait être testé chez nos animaux *Dicer1*-déficients.

L'absorption des nutriments est également contrôlée par l'intégrité et la fonction de l'épithélium intestinal qui sont perturbés chez des animaux *Villin-Cre<sup>Tg/-</sup>; Dicer1<sup>fl/fl</sup>* (McKenna *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). Plus précisément, la délétion de *Dicer1* entraîne une augmentation de la perméabilité

intestinale ainsi qu'un défaut dans l'absorption des lipides. Entre mes mains, l'expression de facteurs contrôlant l'intégrité de la structure épithéliale (*Tjp1*, *Ocln*), sa fonction (*Muc2*) ou la capture du glucose (*Slc2a4*) ou des lipides (*Fabp2*) sont inchangés dans l'intestin grêle des animaux *Dicer1*-déficients par rapport au groupe contrôle. Cependant, je n'ai pas fait d'analyses histologiques ou de tests fonctionnels pour évaluer la perméabilité intestinale ou l'absorption des lipides ; ces fonctions peuvent donc être possiblement altérées chez les individus *Dicer1*-déficients et expliquer en partie le phénotype.

Une autre hypothèse possible au phénotype observé est une altération de la capture et/ou de l'utilisation des différents nutriments par les tissus. Dans le TA viscéral, l'expression des récepteurs au glucose (*Slc2a4*), aux lipides (*Fabp4*) ainsi que de l'enzyme responsable de la lipogenèse (*Fas*) sont inchangées entre les deux génotypes sous régime gras. Toutefois, une caractérisation plus complète de la capacité du tissu à capturer le glucose et les lipides ainsi que du métabolisme doit être réalisée *in vitro*, avec par exemple la mesure des niveaux d'ATP, NAD<sup>+</sup>, NADH, et d'acide lactique afin d'établir une explication au phénotype.

#### **IV. La déficience chronique en *Dicer1* modifie profondément le transcriptome du tissu adipeux avec l'âge.**

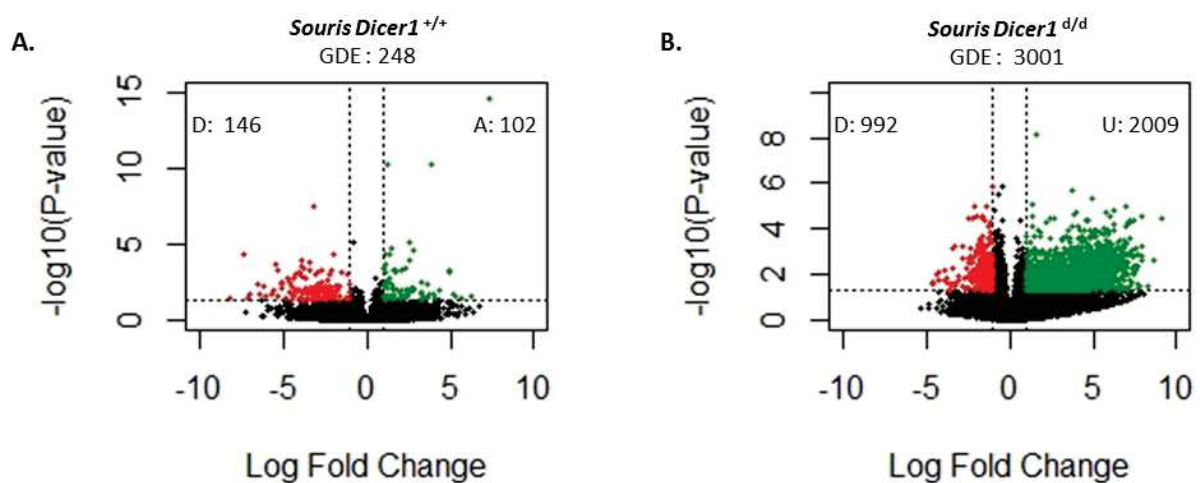
Le tissu adipeux, longtemps ignoré par la communauté scientifique car considéré comme simple tissu de stockage, se révèle être toutefois un organe impliqué de nombreux processus homéostatiques. Ce tissu, qui présente un large volume dans l'organisme y compris chez les individus « maigres », constitue un organe endocrine sécrétant une large variété de molécules avec des effets systémiques. Ces différentes molécules jouent par exemple un rôle essentiel dans la cicatrisation des plaies et la régénération des tissus (López *et al.*, 2018), le contrôle de la tension artérielle (Zhang, Curhan and Forman, 2010), les paramètres hémostatiques (Csongrádi *et al.*, 2017), la densité osseuse (Chen *et al.*, 2018), les fonctions thyroïdiennes (Calvo and Obregon, 2011) ou encore les réponses immunitaires (Trayhurn, 2005). L'ensemble de ces fonctions sont impliquées dans la régulation de la masse de tissu adipeux, la glycémie et la réponse aux nutriments, des paramètres qui sont dérégulés avec l'âge.

Les fonctions associées au TA sont principalement identifiées et caractérisées dans le cadre de l'obésité, l'accumulation anormale du tissu adipeux. Toutefois, il semble de plus en plus évident que vieillissement et l'obésité, deux conditions favorisant des problèmes de santé et augmentant le risque de maladies et de mortalité, possèdent des mécanismes sous-jacents similaires, faisant du tissu adipeux un organe particulièrement pertinent pour étudier le vieillissement.

Nous avons donc décidé d'étudier par séquençage ARN le transcriptome associé au TA viscéral au cours du vieillissement normal, qui est peu, voire pas caractérisé dans la littérature, et l'impact d'une déficience en *Dicer1* sur ce processus.

### A) Effet de l'âge sur le transcriptome du TA viscéral

En comparant individus jeunes (20 semaines) et âgés (80 semaines), nous observons une faible dérégulation de l'expression des gènes chez les individus *Dicer1*<sup>+/+</sup> (vieillesse normale, 248 gènes différentiellement exprimés (GDE), soit moins d'1% des gènes exprimés), contrastant avec la forte altération du transcriptome observée chez les individus *Dicer1*<sup>d/d</sup> (3001 GDE, soit 8,6%) (Figure R19 A-B). Ces résultats sont tous deux en contraste avec les 3-4% de GDE avec l'âge observé habituellement dans les tissus homogènes (Stegeman and Weake, 2017). Pour la condition comparant les individus *Dicer1*<sup>+/+</sup>, une explication probable est que les individus qualifiés d'âgés (80 semaines) ne sont pas si « vieux » et sont plutôt à considérer comme adultes/matures, expliquant un effet limité de l'âge sur le transcriptome. La condition comparant les souris *Dicer1*<sup>d/d</sup> combine non seulement l'effet du vieillissement, qui semble accéléré chez ces animaux, mais également l'effet de la déficience en *Dicer1*, un régulateur clé de la transcription *via* ses fonctions canoniques et non-canoniques, expliquant la forte modification du transcriptome entre les deux groupes.



**Figure R19 : Figure R14 : La déficience en *Dicer1* augmente le nombre de gènes différentiellement exprimés dans le TA viscéral avec l'âge.** Volcano Plot des gènes différentiellement exprimés dans le TA viscéral entre souris mâles jeunes (20 semaines) et âgés (80 semaines) (A) *Dicer1*<sup>+/+</sup> ou (B) *Dicer1*<sup>d/d</sup> (n=6 animaux par groupe). GDE : nombre total de gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée <0,05); D : nombre de gènes à l'expression diminuée (rouge); A : nombre de gènes à l'expression augmentée (vert).

La caractérisation de l'ontologie des GDE selon les voies de signalisation est réalisée grâce au logiciel IPA (Ingenuity Pathways Analysis) et les cinq voies de signalisation les plus enrichies sont représentées pour chaque condition sur les figures R20 A et D.

De manière intéressante, quatre des cinq voies de signalisation les plus enrichies dans le vieillissement « normal » (individus *Dicer1*<sup>+/+</sup>, figure R20A) sont impliquées dans le métabolisme du glucose, un phénomène qui décroît bien avec l'âge, soulignant l'importance du tissu adipeux dans

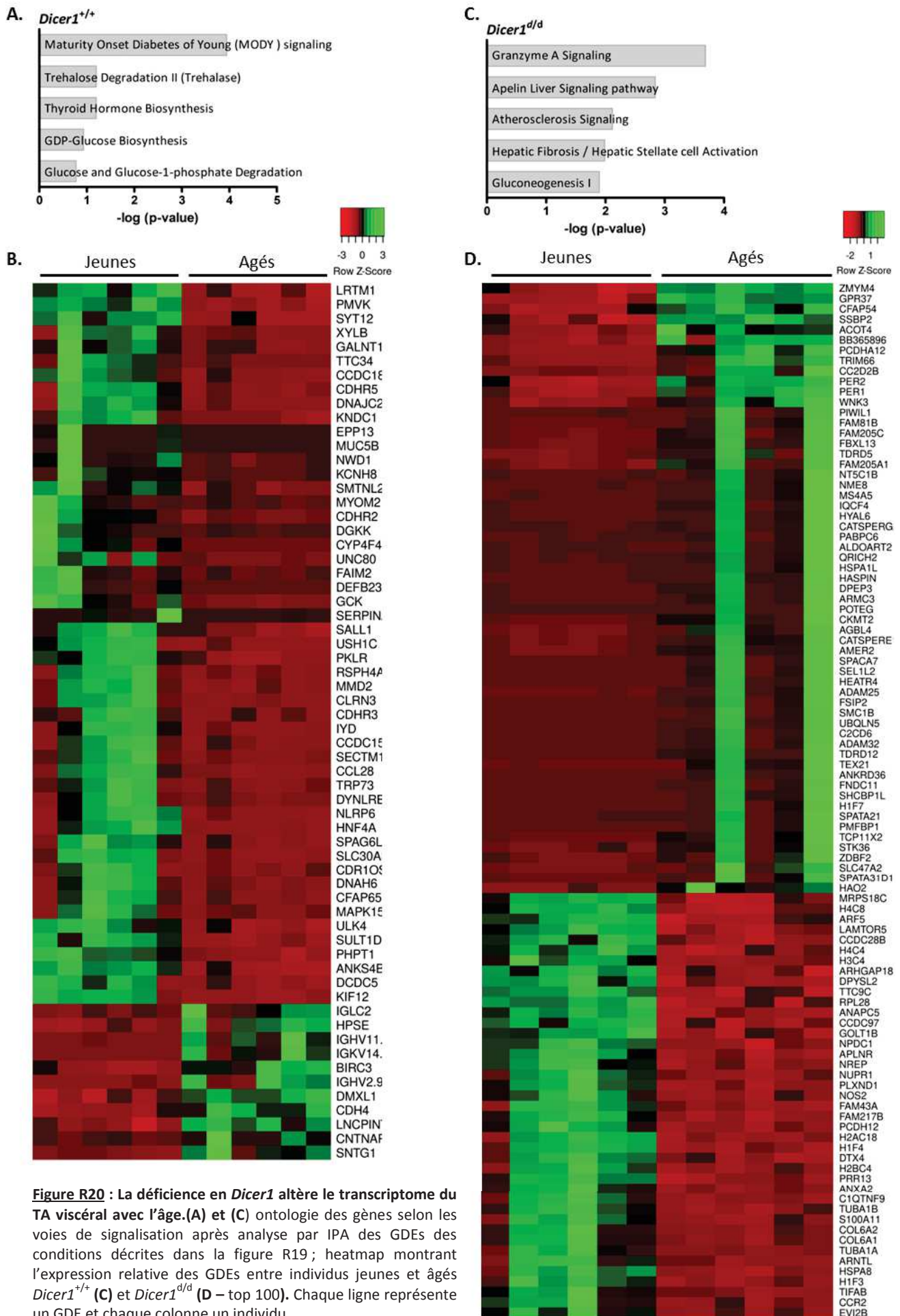


l'établissement de ce phénotype. Il est à noter que la voie « MODY » (Maturity Onset Diabetes of the Young) rassemble des gènes qui, mutés, provoquent l'établissement d'un diabète précoce caractérisé par une insulino-résistance et une perte du contrôle de la glycémie, deux phénomènes caractéristiques du vieillissement. La diminution significative dans le tissu adipeux viscéral avec l'âge de l'expression des gènes *Hnf4a*, *Gck*, tous deux mutés dans les pathologies MODY, suggère des mécanismes communs entre l'établissement de ces pathologies et les altérations du métabolisme liées à l'âge.

La représentation des GDE avec une p-value ajustée <0.01 sur une heatmap (**Figure R20B**) apporte quelques éléments supplémentaires intéressants, en accord avec des données de la littérature. Parmi les gènes réprimés avec le vieillissement se trouvent de nombreux acteurs du fonctionnement et de la structure de fibres nerveuses (*Kf12*, *Kcnh8*, *Unc80* pour n'en citer que quelques-uns) qui pourraient refléter la perte d'innervation du tissu adipeux au cours du vieillissement, observée dans les travaux de [Blaszkiwicz et al. \(2019\)](#). De même, l'augmentation de l'expression de gènes impliquées dans la synthèse d'immunoglobuline pourraient évoquer une accumulation de cellules B dans le tissu adipeux avec le vieillissement, corrélant avec les observation de [Camell et al. \(2019\)](#). En revanche, nous ne retrouvons pas l'emblématique augmentation de l'expression de gènes inflammatoires (*Il1b*, *IL6*, *Tnfa*, *Cox2*) ni la diminution du régulateur clé de la fonction adipocytaire *Pparg* rapporté par les travaux de [Wu et al. \(2007\)](#) ; encore une fois, il est possible que l'âge peu « avancé » des individus explique l'absence de ces marqueurs caractéristiques du vieillissement du TA.

Dans la condition comparant les mutants, les voies de signalisations les plus enrichies en GDE suggèrent des altérations plus variées, avec des dérégulations du métabolisme (Gluconéogenèse, Apeline), des processus inflammatoires (Granzyme A, Athérosclérose) et/ou touchant l'activation, la prolifération et la survie cellulaire (Fibrose Hépatique). La diminution de l'expression d'*Apln* et de son récepteur est fort intéressante et pourrait constituer une preuve supplémentaire du vieillissement accéléré chez les individus *Dicer1*<sup>d/d</sup>. En effet, cette diminution d'expression est caractéristique du vieillissement et est impliqué dans virtuellement toutes les altérations liées à l'âge : dérégulation de l'autophagie, de l'inflammation, de la sénescence, de la réponse aux nutriments ou encore de la capacité de régénération. Elle est également associée à des pathologies du vieillissement comme l'hypertension, l'obésité, l'athérosclérose et l'insulino-résistance ([Zhou et al., 2018](#)). La dérégulation de son expression dans notre modèle appuie notre hypothèse d'un vieillissement accéléré, pointe un responsable potentiel de la plupart des phénotypes observés et suggère une implication de *Dicer1* dans le contrôle de son expression et/ou celle de son récepteur.

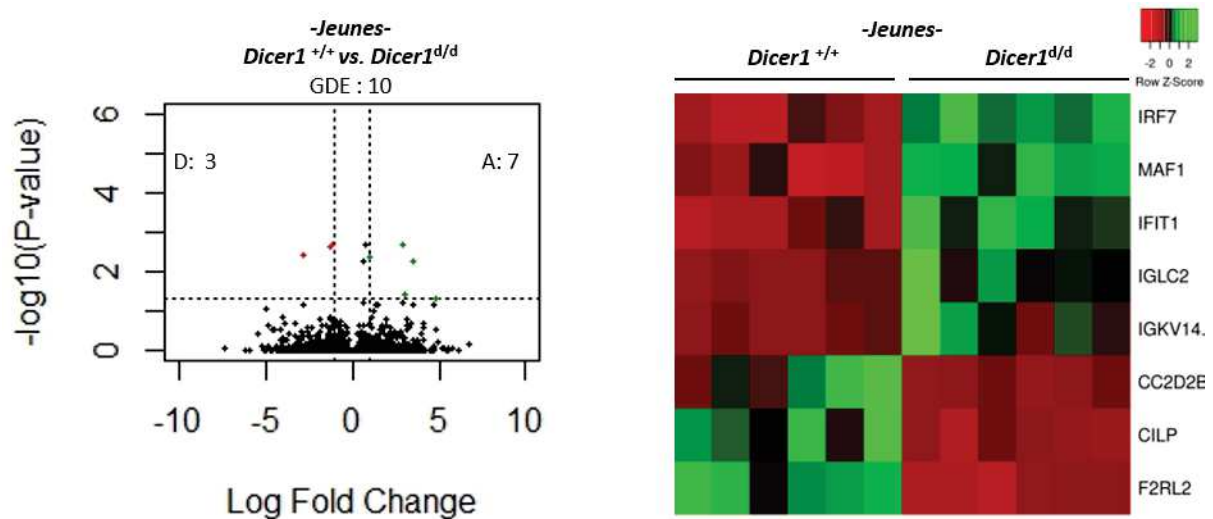
Il est également intéressant de noter que parmi les GDE (p-value ajustée <0.01 (**Figure R20D**)) se trouvent 8 des 73 gènes différentiellement exprimé avec le vieillissement, communs à l'Homme, le rat et la souris pour de nombreux tissus (base de donnée HAGR, ([de Magalhães, Curado and Church, 2009](#))).



**Figure R20** : La déficience en *Dicer1* altère le transcriptome du TA viscéral avec l'âge. (A) et (C) ontologie des gènes selon les voies de signalisation après analyse par IPA des GDEs des conditions décrites dans la figure R19; heatmap montrant l'expression relative des GDEs entre individus jeunes et âgés *Dicer1*<sup>+/+</sup> (B) et *Dicer1*<sup>d/d</sup> (D – top 100). Chaque ligne représente un GDE et chaque colonne un individu.

## B) Effet de la déficience en *Dicer1* sur le transcriptome du TA viscéral.

De manière assez surprenante, le transcriptome du TA viscéral entre animaux *Dicer1*<sup>+/+</sup> et *Dicer1*<sup>d/d</sup> est quasiment identique (GDE = 10), suggérant un impact très limité de la déficience en *Dicer1* chez des animaux jeunes (Figure R21).

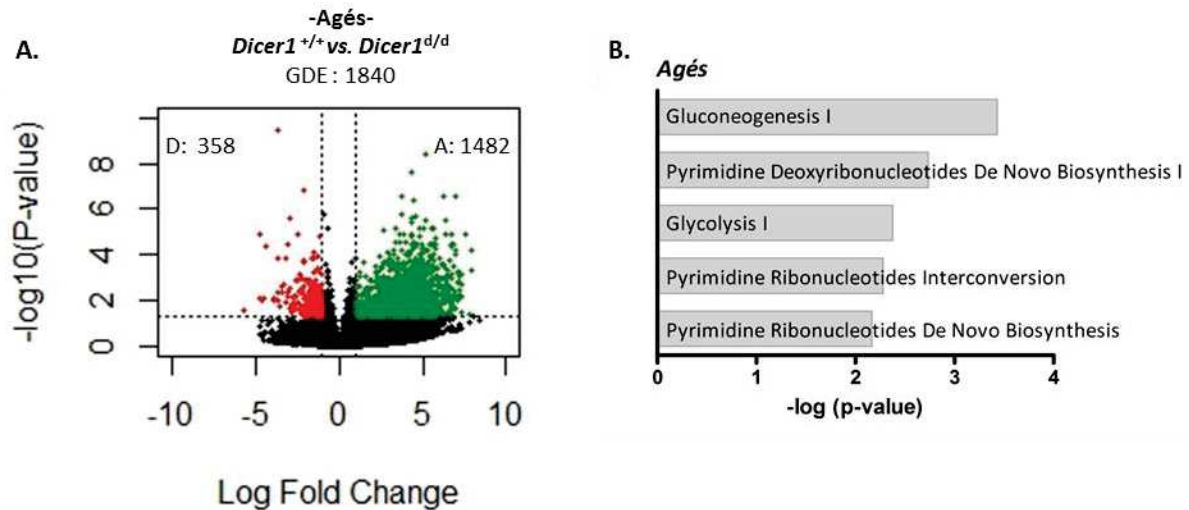


**Figure R21** : La déficience en *Dicer1* a un impact très limité sur le transcriptome des animaux jeunes. Volcano Plot des gènes différentiellement exprimés dans le TA viscéral entre souris mâles jeunes (20 semaines) *Dicer1*<sup>+/+</sup> et *Dicer1*<sup>d/d</sup> (n=6 animaux par groupe). GDE : nombre total de gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée <0,05); D : nombre de gènes à l'expression diminuée (rouge); A : nombre de gènes à l'expression augmentée (vert). Une heatmap des GDE est représentée à droite du volcano plot. Chaque ligne représente un GDE, chaque colonne un individu.

Il est cependant intéressant de noter que les animaux *Dicer1*-déficients présentent une augmentation de l'expression des gènes *Irf7* et *Ifit1*, tous deux évocateur de l'activation d'une signature interféron déjà décrite dans ce modèle (Ostermann et al., 2012)(Figure R21). MAF-1 est un répresseur de l'ARN polymérase III impliqué dans l'adipogenèse et le contrôle de la différenciation des adipocytes (Chen et al., 2018). Ce facteur est également impliqué dans le métabolisme des lipides et le contrôle de la balance énergétique (Bonhoure et al., 2015) et l'altération de son expression chez les jeunes mutants pourrait contribuer aux altérations métaboliques observées à cet âge.

Les gènes dont l'expression est diminuée ne sont pas très informatifs ; *Cc2d2b* code pour une protéine à l'expression ubiquitaire et dont la fonction n'est pas encore décrite ; *F2rl2* code pour un récepteur activé par les protéases (PAR-3) décrit uniquement à ce jour sur les plaquettes des souris et rat. Enfin, *Cilp* pourrait avoir un rôle intéressant, aujourd'hui décrit que dans les chondrocytes, où la protéine qu'il code agit comme un antagoniste de l'IGF-1 (Johnson et al., 2003).

La situation est totalement différente en comparant des individus âgés entre eux. La déficience en *Dicer1* s'accompagne d'une altération profonde du transcriptome du TA viscéral avec 1840 GDE (**Figure R22A**). La plupart de ces GDE sont sur-exprimés dans la condition *Dicer1*<sup>d/d</sup> ce qui pourrait refléter la dérégulation globale des miRs chez ces individus, responsables de la répression de la transcription.



**Figure R22 : Avec l'âge, le transcriptome du TA viscéral est modifiée par la déficience en *Dicer1*.** (A) Volcano Plot des gènes différentiellement exprimés dans le TA viscéral entre souris mâles âgés (80 semaines) *Dicer1*<sup>+/+</sup> et *Dicer1*<sup>d/d</sup> (n=6 animaux par groupe). GDE : nombre total de gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée <0,05); D : nombre de gènes à l'expression diminuée (rouge); A : nombre de gènes à l'expression augmentée (vert). (B) Top cinq des voies de signalisation enrichies par les GDEs trouvés en (A)(Analyse IPA).

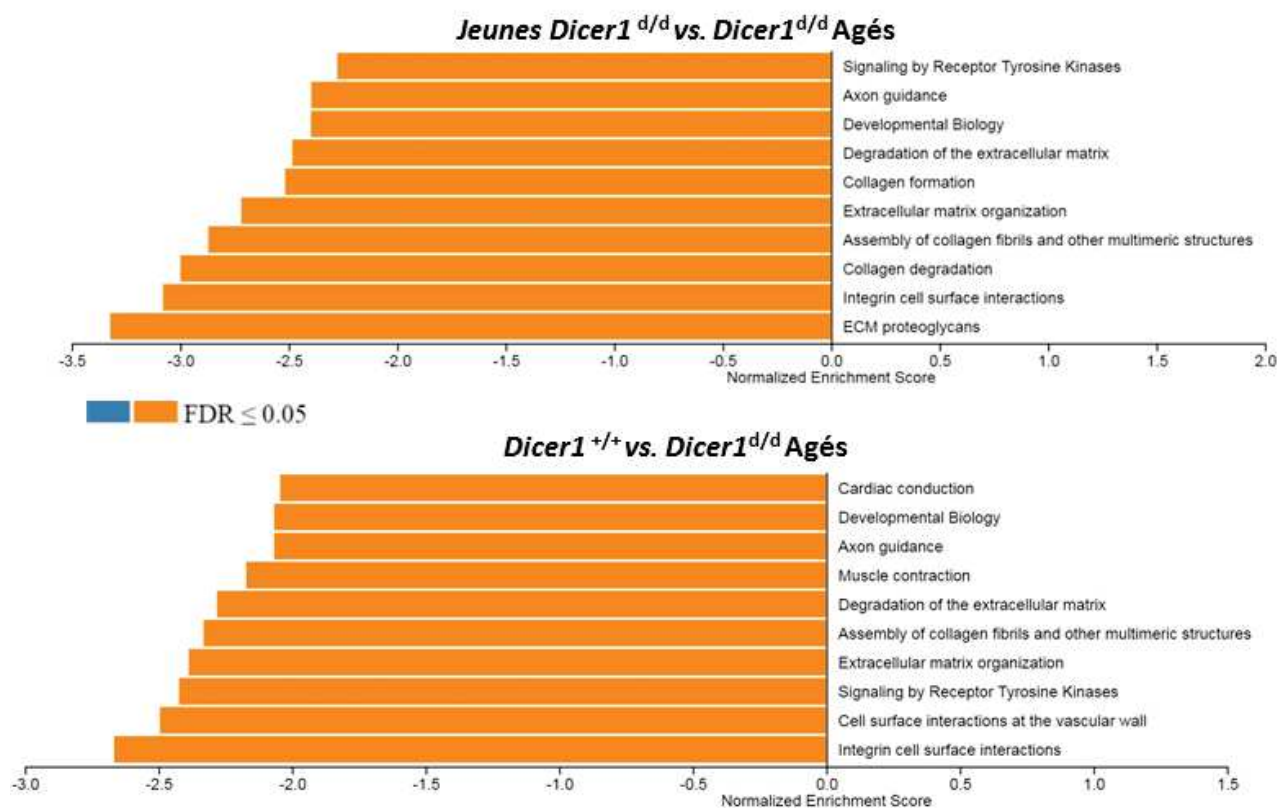
L'analyse des voies de signalisation les plus enrichies montre des différences comparée aux autres conditions, avec notamment des altérations d'expression de gènes dans les voies du métabolisme des pyrimidines, une relation qui n'a jamais été établie dans la littérature auparavant (**Fig R22B**). Nous observons en revanche toujours une altération de l'expression de gènes dans certaines voies d'utilisation du glucose, déjà présentes dans les conditions évaluant l'impact de l'âge.

L'analyse IPA du « top 5 » des fonctions cellulaires et moléculaires enrichies par les GDE montre également que quatre de ces fonctions sont similaires entre cette condition et la condition comparant individus *Dicer1*-déficients jeunes et âgés ; ces fonctions ne sont ni retrouvées en comparant les jeunes individus entre eux, ni lors du vieillissement normal (**Tableau R2**). Cette analyse suggère une implication spécifique de *Dicer1* dans l'altération de l'expression des gènes liés à ces fonctions, un impact qui se révèle notamment avec l'âge (effet chronique).

Vieillesse normale <i>Dicer1</i> <sup>+/+</sup> (J vs. Ag)		Vieillesse <i>Dicer1</i> -déficients (J vs. Ag)		Souris Agées <i>Dicer1</i> <sup>+/+</sup> vs. <i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup>	
GO term	Échelle p-value	GO term	Échelle p-value	GO term	Échelle p-value
Cell Death and Survival	4,70 <sup>E</sup> -02 1,26 <sup>E</sup> -04	<b>Cellular Development (81)</b>	1,45 <sup>E</sup> -02 9,20 <sup>E</sup> -20	<b>Cellular Movement (64)</b>	2,02 <sup>E</sup> -02 9,65 <sup>E</sup> -20
Carbohydrate metabolism	3,39 <sup>E</sup> -02 3,91 <sup>E</sup> -04	<b>Cellular Growth and Proliferation (91)</b>	1,45 <sup>E</sup> -02 9,20 <sup>E</sup> -20	Cellular Function and Maintenance (58)	1,93 <sup>E</sup> -02 1,56 <sup>E</sup> -17
Energy Production	2,50 <sup>E</sup> -02 3,91 <sup>E</sup> -04	<b>Cell movement (30)</b>	9,68 <sup>E</sup> -03 3,45 <sup>E</sup> -09	<b>Cell Development (65)</b>	2,02 <sup>E</sup> -02 2,73 <sup>E</sup> -16
Cell Morphology	4,28 <sup>E</sup> -02 5,82 <sup>E</sup> -04	<b>Cell morphology (46)</b>	1,42 <sup>E</sup> -02 1,98 <sup>E</sup> -09	<b>Cell growth and proliferation (58)</b>	1,93 <sup>E</sup> -02 2,73 <sup>E</sup> -16
Cell-to-cell signaling and intercation	4,75 <sup>E</sup> -02 2,11 <sup>E</sup> -03	Cell death and survival (49)	1,42 <sup>E</sup> -02 9,45 <sup>E</sup> -08	<b>Cell morphology (53)</b>	2,02 <sup>E</sup> -02 4,68 <sup>E</sup> -08

**Tableau R2 : Top cinq des fonctions cellulaire et moléculaire enrichies par les GDE dans les différentes conditions testées.** Le nombre de gènes altérés impliqués dans la fonction est indiqué entre parenthèse ainsi que l'étendue des p-value ajustées des gènes concernés. J. : Jeunes (20 semaines) ; Ag : Agés (80 semaines).

Des analyses complémentaires GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) ont été réalisées pour les deux jeux de données incluant les souris *Dicer1*<sup>d/d</sup> âgées. Un élément ressort de la plupart des fonctions, processus et pathways analysés : la dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse, dégradation ou la signalisation de la matrice extra-cellulaire (MEC), représentée en partie par la **figure R23**. L'altération de l'homéostasie de la MEC est une caractéristique de la vieillesse, probablement une des plus visible chez l'Homme, avec la perte d'élasticité de la peau et le développement de rides ainsi que la susceptibilité aux plaies. L'altération des processus de synthèse et de dégradation des composants de la MEC peuvent non seulement modifier les propriétés mécaniques des tissus mais également altérer sa fonctionnalité. Dans le TA murin par exemple, il est décrit qu'une diminution de l'expression de la périostine avec le vieillissement s'associe à une altération du métabolisme des lipides et une réponse anormale au régime gras (Graja et al., 2018). Nos données transcriptomiques suggèrent que l'expression de *Dicer1* intervient dans un phénomène similaire, *i.e* la diminution de l'expression de composants de la MEC, notamment des collagènes, et une altération de leur synthèse/dégradation et voies de signalisation. Cette modification de l'homéostasie de la MEC chez les mutants pourrait alors participer à l'établissement des altérations métaboliques, voire aux autres phénotypes de vieillissement en supposant que cette dérégulation n'est pas restreinte au TA.



**Figure R23 :** L'analyse GSEA de la voie de signalisation « Reactome » associe la déficience en *Dicer1* à une altération de l'homéostasie des composants de la matrice extra-cellulaire. Analyse GSEA de la condition opposant individus *dicer1*-déficients jeunes et âgés (en haut) et de la condition comparant individus âgés *Dicer1*<sup>+/+</sup> contre *Dicer1*<sup>d/d</sup> (en bas).

Le tissu adipeux viscéral constitue un organe endocrine important avec la sécrétion de divers adipokines et cytokines et son volume et sa localisation, juste en amont de la veine porte hépatique, suggère un rôle non négligeable de ce tissu dans le contrôle systémique de l'inflammation et du métabolisme. Il est établi dans la littérature que la synthèse et la sécrétion des adipokines/cytokines peut être modifiée et qu'elle dépend notamment de la masse de TA (Mancuso and Bouchard, 2019) mais cette modulation au cours du vieillissement reste peu explorée. Nous avons donc étudié cet aspect dans nos différents jeux de données.

Aucunes des principales cytokines et adipokines dérégulée dans des conditions pathologiques et potentiellement avec l'âge n'ont leurs expressions modifiées dans la condition comparant animaux contrôles jeunes et âgés, ce qui conforte l'idée que la différence d'âge entre les deux groupes n'est pas suffisante pour voir apparaître de différences avec le vieillissement normal. Les deux conditions incluant les animaux *Dicer1*<sup>d/d</sup> âgés présentent elles des différences qui sont récapitulées dans le **tableau R3**.

Adipokines	<i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup> jeunes vs. <i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup> Agés	<i>Dicer1</i> <sup>+/+</sup> vs <i>Dicer1</i> <sup>d/d</sup> âgés
Leptine ( <i>Lep</i> )	↓	↓
Recepteur Leptine ( <i>Lepr</i> )	↑	
Résistine ( <i>Rtnla</i> )	↓	
Chémérine ( <i>Rarres2</i> )	↓	↓
Apeline ( <i>Apln</i> )	↓	
Recepteur Apelin ( <i>Ap1nr</i> )	↓	
CTRPs ( <i>C1qtnf</i> )	<i>C1qtnf6</i> ↓ <i>C1qtnf9</i> ↓ <i>C1qtnf4</i> ↑	<i>C1qtnf4</i> ↑

**Tableau R3 : Le vieillissement s'accompagne d'une altération de l'expression d'adipokines chez les souris *Dicer1*<sup>d/d</sup>.** Les adipokines dérégulées et leurs gènes entre parenthèses. ↑ Gène surexprimés ou ↓ sousexprimé chez les souris âgées *Dicer1*-déficientes.

Si un certain nombre d'adipokines ou molécules associées (Adipokine, Vaspine, Omentine, PAI-1) ne montrent pas de variation entre les conditions, celles qui sont différenciellement exprimées suggèrent une diminution globale de l'expression des adipokines avec le vieillissement chez les individus *Dicer1*<sup>d/d</sup>. Ces adipokines jouent un rôle essentiel dans le métabolisme de l'organisme en régulant la prise de nourriture, la dépense énergétique, ainsi que l'utilisation du glucose et des lipides. En plus d'un effet sur le métabolisme, il est montré que la Leptine possède des effets sur le système nerveux central où elle améliore les processus de mémorisation, de neurogenèse et possède une action neuroprotectrice (Arnoldussen, Kiliaan and Gustafson, 2014). La dérégulation globale des adipokines chez les individus *Dicer1*-déficients pourrait alors contribuer à un panel de phénotypes observés chez ce mutant.

Il est par ailleurs intéressant de noter que la plupart des adipokines dont l'expression est diminuée chez le mutant sont des adipokines décrites comme pro-inflammatoires (Leptine, Résistine, Chémérine). L'Apeline a des effets variables, plutôt décrits comme anti-inflammatoires mais elle est également capable de favoriser l'inflammation dans un contexte de maladie métabolique (Heinonen et al., 2009; Leeper et al., 2009). Les CTRP (C1q complement/TNF-related proteins) sont, elles, plutôt associées à des propriétés anti-inflammatoires. De manière assez contrastée avec ce qui est décrit dans la littérature (Wu et al., 2007), le tissu adipeux de nos animaux âgés ne montre donc pas/peu d'éléments inflammatoires ; d'ailleurs aucunes des interleukines classiquement décrites dans le vieillissement (*Il1b*, *Il6*, *Il18*, *Tnfa*) n'est différenciellement exprimée dans les différentes conditions. Nos résultats rejoignent les observations de Ziegler et al. (2019) qui décrivent un phénotype anti-inflammatoire dans le tissu adipeux viscéral de souris très âgées (souris C57Bl/6J, 24 mois). À cet âge avancé, leurs souris présentent une diminution de la taille des adipocytes et un tissu adipeux viscéral réduit qui résulteraient d'après les auteurs d'une activité lypolytique accentuée ou un défaut de stockage des lipides. Avec leur volume de tissu adipeux réduit, une signature transcriptomique peu

inflammatoire, nos souris *Dicer1-déficientes* de 80 semaines s'approchent donc d'un phénotype de souris très âgées.



# **CONCLUSION & PERSPECTIVES**



Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence que la déficience en *Dicer1* s'accompagne d'une survie médiane réduite et du développement de désordres et pathologies évoquant un vieillissement prématuré. La diminution chronique de l'expression de *Dicer1* s'associe notamment à une modification du métabolisme et de la réponse aux nutriments qui nous ont poussés à explorer l'impact de cette déficience dans le tissu adipeux blanc, un organe central dans le métabolisme et le vieillissement. L'analyse transcriptomique de ce tissu dans différentes conditions nous a permis non seulement de caractériser en partie le vieillissement « normal » de ce tissu, peu décrit dans la littérature, mais également de démontrer une altération profonde de l'expression des gènes chez les individus *Dicer1*-déficients, particulièrement au cours du vieillissement. Cette modification de l'expression de gènes pourrait participer aux dérégulations métaboliques et au vieillissement accéléré décrits chez ces animaux.

La caractérisation du mutant *Dicer1*-déficients est cependant loin d'être complète et beaucoup de données manquent encore pour compléter le phénotypage de ces individus. Toutefois ces premiers résultats posent la déficience en *Dicer1* comme un modèle d'étude du vieillissement particulièrement intéressant. En effet, l'étude du vieillissement et des effets de thérapies de rajeunissement se basent actuellement sur des modèles murins progéroïdes. Ces modèles sont tirés de maladies génétiques rares (autosomale récessive) décrite chez l'Homme, où la mutation d'un gène entraîne une survie réduite avec un vieillissement très accéléré et stéréotypé. Le vieillissement étant un phénomène complexe, multifactoriel et variable selon les individus, ces pathologies et modèles progéroïdes ne récapitulent donc qu'un extrême, touchant une population limitée, dans l'étendue des processus de vieillissement. Le modèle *Dicer1*-déficient semble lui un modèle plus *physiologique*, plus proche du vieillissement observé chez la majorité des individus. Premièrement, il repose sur la baisse d'expression du gène plutôt que sur sa délétion, un phénomène qui peut être retrouvé physiologiquement alors sa perte n'est pas tolérée. Ensuite, la déficience en *Dicer1* récapitule la grande variété des atteintes tissulaires et fonctionnelles retrouvées au cours du vieillissement. La dynamique d'apparition de ces phénotypes se rapproche également d'un vieillissement normal, avec une « précipitation » des pathologies et désordres se déclarant à un âge avancé, après les stades les plus jeunes et adultes en contraste avec les syndromes progéroïdes se diagnostiquant dès l'enfance ou à la puberté. Enfin, le modèle *Dicer1*-déficient présente une variabilité interindividuelle dans la vitesse et la sévérité du développement des pathologies liées à l'âge ainsi que dans la survie des animaux qui résume ce qui peut être observé dans le vieillissement. Tous ces éléments suggèrent que le vieillissement associé à la déficience en *Dicer1* est très proche d'un vieillissement « physiologique » si ce n'est que le processus est accéléré.

Les données du séquençage ARN dans le TA montrent clairement que la déficience en *Dicer1* s'accompagne d'une signature transcriptomique différentielle, spécifique. Nous suggérons que cette modification des populations ARN transcrites, qui se retrouve probablement à l'échelle de l'organisme, soit à l'origine de l'accumulation d'altérations et du processus de vieillissement. Cette hypothèse s'inscrit parfaitement dans une théorie du vieillissement récente, un « modèle de

population ARN » dans laquelle les modifications des populations de transcrits codants et non-codants entraînent non seulement le processus de vieillissement mais pourraient également servir comme outil de prédiction de l'âge biologique du tissu/individu (Wang *et al.*, 2014). La variété des fonctions de *Dicer1* associées à la régulation de la transcription font de cette enzyme un acteur idéal de cette dynamique des populations ARNs.

En plus d'une signature transcriptomique différentielle, la déficience en *Dicer1* pourrait également être synonyme d'une diminution de la disponibilité de l'enzyme pour les différentes fonctions qu'elle occupe, créant une sorte de compétition pour la fixation entre ses ARN cibles. Ceci pourrait être un élément relevant entrant notamment dans la théorie du vieillissement lié au retrotransposons dans laquelle il est proposé qu'avec la levée de répression de transcription de ces éléments avec l'âge, l'accumulation des transcrits (SINEs, LINEs, *etc...*) détourne des facteurs et processus cellulaires de leur fonction initiale/normale dans une tentative de les réguler, empêchant un fonctionnement correct des cellules (Maxwell, 2016). Il est alors tentant de supposer que l'accumulation des transcrits de rétrotransposons avec l'âge pourrait, dans un contexte *Dicer1*-déficient, « épuiser » l'enzyme et la détourner de ses autres fonctions, comme la maturation des miRs et la production de siRNA, la réparation de l'ADN, ou la maintenance des télomères qui sont essentielles à une réponse fonctionnelle au stress ainsi qu'à l'intégrité et à la survie des cellules.

Le modèle *Dicer1*-déficient, très prometteur à mes yeux, reste bien sûr encore à amplement explorer. Il s'agira de caractériser les marqueurs de vieillissement associés au modèle et aux différents phénotypes observés. S'agit-il d'une accumulation de dommage à l'ADN, de l'établissement de sénescence cellulaire ? D'une inflammation ou d'une accumulation de transcrits SINEs/LINEs non contrôlée ? Il sera également nécessaire de compléter et/ou d'expliquer certains aspects relevés chez le mutant. Quels sont les mécanismes sous-jacents à l'hypertension par exemple ? Aux troubles métaboliques ? Il reste en outre un travail d'identification et de caractérisation d'autres atteintes potentielles emblématiques du vieillissement. Des données très préliminaires et sur un effectif réduit d'animaux suggèreraient par exemple une atteinte prématurée des fonctions cognitives chez les animaux *Dicer1*-déficient ; un versant qui reste à explorer entièrement. Enfin, la caractérisation et l'intérêt du modèle ne seraient pas complets sans évaluer la réponse de ces organismes à des thérapies de rajeunissement, nous envisageons ainsi par exemple de tester des agents sénolytiques. Le mutants *Dicer1*-déficient pourrait également servir de modèle afin de déterminer et définir les effets d'une restriction calorique chez des individus âgés, un bénéfice qui reste encore controversé pour cette population dans la littérature (Kim and Kim, 2013).

Les travaux de ma thèse définissent ainsi l'expression de *Dicer1* comme un acteur indéniable de la balance entre altérations et réparation qui conditionne la vitesse de vieillissement et l'établissement des pathologies liées à l'âge. Ces données font des souris *Dicer1*-déficientes un modèle murin

attrayant pour explorer les mécanismes physiopathologiques du processus de vieillissement et pour évaluer les effets de thérapies de rajeunissement.



# **BIBLIOGRAPHIE**





- Abdelhafiz, A. H. *et al.* (2015) 'Hypoglycemia in older people - A less well recognized risk factor for frailty', *Aging and Disease*, 6(2), pp. 156–167. doi: 10.14336/AD.2014.0330.
- Abdelmohsen, K. *et al.* (2012) 'RNA-binding protein AUF1 represses Dicer expression', *Nucleic Acids Research*, 40(22), pp. 11531–11544. doi: 10.1093/nar/gks930.
- Adams, S. C. *et al.* (2016) 'A "Pedi" cures All: Toenail trimming and the treatment of ulcerative dermatitis in Mice', *PLoS ONE*, 11(1). doi: 10.1371/journal.pone.0144871.
- Allen, T. A. *et al.* (2004) 'The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock', *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(9), pp. 816–821. doi: 10.1038/nsmb813.
- Alsaleh, G. *et al.* (2016) 'Reduced DICER1 expression bestows rheumatoid arthritis synoviocytes proinflammatory properties and resistance to apoptotic stimuli.', *Arthritis*, 68(8), pp. 1839–1848. doi: 10.1002/art.
- Anderson, R. *et al.* (2019) 'Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence', *The EMBO Journal*, 38(5), pp. 1–21. doi: 10.15252/embj.2018100492.
- Arnoldussen, I. A. C., Kiliaan, A. J. and Gustafson, D. R. (2014) 'Obesity and dementia: Adipokines interact with the brain', *European Neuropsychopharmacology*. Elsevier, 24(12), pp. 1982–1999. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.03.002.
- Aryal, N. K. *et al.* (2019) 'Constitutive Dicer1 phosphorylation accelerates metabolism and aging in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(3), pp. 960–969. doi: 10.1073/pnas.1814377116.
- Ayala, J. E. *et al.* (2010) 'Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice', *DMM Disease Models and Mechanisms*, 3(9–10), pp. 525–534. doi: 10.1242/dmm.006239.
- Baker, D. J. *et al.* (2011) 'Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders', *Nature*. Nature Publishing Group, 479(7372), pp. 232–236. doi: 10.1038/nature10600.
- Baker, D. J. *et al.* (2016) 'Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan', *Nature*. Nature Publishing Group, 530(7589), pp. 184–189. doi: 10.1038/nature16932.
- Barbi, E. *et al.* (2018) 'The plateau of human mortality : Demography of longevity pioneers', *Science*, 360(6396), pp. 1459–1461. doi: 10.1126/science.aat3119.
- Barnhoorn, S. *et al.* (2014) 'Cell-Autonomous Progeroid Changes in Conditional Mouse Models for Repair Endonuclease XPG Deficiency', *PLoS Genetics*, 10(10), pp. 7–9. doi: 10.1371/journal.pgen.1004686.
- Barsha, G., Denton, K. M. and Mirabito Colafella, K. M. (2016) 'Sex- and age-related differences in arterial pressure and albuminuria in mice', *Biology of Sex Differences*. Biology of Sex Differences, 7(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s13293-016-0110-x.
- Bernstein, E. *et al.* (2001) 'Role for bidentate ribonuclease in the initiation site of RNA interference', *Nature*, 409(1997), pp. 363–366.
- Bernstein, E. *et al.* (2003) 'Dicer is essential for mouse development', *Nature Genetics*, 35(3), pp. 215–217. doi: 10.1038/ng1253.
- Berry, R. *et al.* (2014) *Imaging of adipose tissue*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-411619-1.00004-5.
- Bhullar, K. S. and Hubbard, B. P. (2015) 'Lifespan and healthspan extension by resveratrol', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1852(6), pp. 1209–1218. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.012.
- Blaszkiwicz, M. *et al.* (2019) 'Neuropathy and neural plasticity in the subcutaneous white adipose

- depot', *PLoS ONE*, 14(9), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.pone.0221766.
- Boehm, M. and Slack, F. (2005) 'A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*', *Science*, 310(5756), pp. 1954–1957. doi: 10.1126/science.1115596.
- Boily, G. *et al.* (2008) 'SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice', *PLoS ONE*, 3(3). doi: 10.1371/journal.pone.0001759.
- Bon, C. *et al.* (2019) 'SINEUP non-coding RNAs rescue defective frataxin expression and activity in a cellular model of Friedreich's Ataxia', *Nucleic acids research*, 47(20), pp. 10728–10743. doi: 10.1093/nar/gkz798.
- Bonhoure, N. *et al.* (2015) 'Loss of the RNA polymerase III repressor MAF1 confers obesity resistance', *Genes and Development*, 29(9), pp. 934–947. doi: 10.1101/gad.258350.115.
- Borrás, C. *et al.* (2017) 'Centenarians maintain miRNA biogenesis pathway while it is impaired in octogenarians', *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier, 168, pp. 54–57. doi: 10.1016/j.mad.2017.07.003.
- Boyle, A. J. *et al.* (2011) 'Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy', *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc., 46(7), pp. 549–559. doi: 10.1016/j.exger.2011.02.010.
- Buchman, A. S. *et al.* (2012) 'Nigral pathology and parkinsonian signs in elders without Parkinson disease', *Annals of Neurology*, 71(2), pp. 258–266. doi: 10.1002/ana.22588.
- Burger, K. and Gullerova, M. (2015) 'Swiss army knives : non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer', *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 16(July), pp. 417–430. doi: 10.1038/nrm3994.
- Calvo, R. M. and Obregon, M. J. (2011) 'Presence and regulation of D1 and D2 deiodinases in rat white adipose tissue', *Metabolism: Clinical and Experimental*. Elsevier Inc., 60(9), pp. 1207–1210. doi: 10.1016/j.metabol.2011.01.014.
- Camell, C. D. *et al.* (2019) 'Aging Induces an Nlrp3 Inflammasome-Dependent Expansion of Adipose B Cells That Impairs Metabolic Homeostasis', *Cell Metabolism*, 30(6), pp. 1024–1039. doi: 10.1016/j.cmet.2019.10.006.
- Caravia, X. M. and López-Otín, C. (2015) 'Regulatory Roles of miRNAs in Ageing', in Santulli, G. (ed.) *microRNA : Basic Science*. Springer, Cham, pp. 213–230. doi: 10.1007/978-3-319-22380-3.
- Carrieri, C. *et al.* (2012) 'Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat', *Nature*. Nature Publishing Group, 491(7424), pp. 454–457. doi: 10.1038/nature11508.
- Cecco, M. De *et al.* (2013) 'Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements', *Aging Cell*, 12(2), pp. 247–256. doi: 10.1111/accel.12047.Genomes.
- De Cecco, M. *et al.* (2013) 'Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues', *Aging*, 5(12), pp. 867–883. doi: 10.1111/j.0954-6820.1985.tb01633.x.
- Chalkiadaki, A. and Guarente, L. (2012) 'High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 16(2), pp. 180–188. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.003.
- Chen, C. Y. *et al.* (2018) 'Maf1 and Repression of RNA Polymerase III-Mediated Transcription Drive Adipocyte Differentiation', *Cell Reports*. Elsevier Company., 24(7), pp. 1852–1864. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.046.

- Chen, L. L. and Yang, L. (2017) 'ALU alternative Regulation for Gene Expression', *Trends in Cell Biology*, 27(7), pp. 480–490. doi: 10.1016/j.tcb.2017.01.002.
- Chen, Y. Y. *et al.* (2018) 'Body fat has stronger associations with bone mass density than body mass index in metabolically healthy obesity', *PLoS ONE*, 13(11), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0206812.
- Chigurupati, S. *et al.* (2008) 'Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice', *Journal of Endocrinology*, 199(2), pp. 333–341. doi: 10.1677/JOE-08-0306.
- Chitale, S. and Richly, H. (2017) 'DICER and ZRF1 contribute to chromatin decondensation during nucleotide excision repair', *Nucleic Acids Research*, 45(10), pp. 5901–5912. doi: 10.1093/nar/gkx261.
- Christensen, K. *et al.* (2009) 'Ageing populations: the challenges ahead', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 374(9696), pp. 1196–1208. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61460-4.
- Chu, W. *et al.* (1998) 'Potential Alu Function : Regulation of the Activity of', *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), pp. 58–68.
- Ciabattini, A. *et al.* (2018) 'Vaccination in the elderly: The challenge of immune changes with aging', *Seminars in Immunology*. Elsevier, 40(September), pp. 83–94. doi: 10.1016/j.smim.2018.10.010.
- Ciaudo, C. *et al.* (2013) 'RNAi-Dependent and Independent Control of LINE1 Accumulation and Mobility in Mouse Embryonic Stem Cells', *PLoS Genetics*, 9(11). doi: 10.1371/journal.pgen.1003791.
- Conboy, I. M. *et al.* (2005) 'Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment', *Nature*, 433(7027), pp. 760–764. doi: 10.1038/nature03260.
- Csongrádi *et al.* (2017) 'Adipokines as atherothrombotic risk factors in obese subjects: Associations with haemostatic markers and common carotid wall thickness', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Elsevier B.V, 27(6), pp. 571–580. doi: 10.1016/j.numecd.2017.02.007.
- Cullen, B. R. (2009) 'Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs', *Nature*, 457(7228), pp. 421–425. doi: 10.1038/nature07757.
- Deacon, R. M. J. (2013) 'Measuring the strength of mice', *Journal of visualized experiments : JoVE*, (76), pp. 1–4. doi: 10.3791/2610.
- Deddouche, S. *et al.* (2008) 'The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila', *Nature Immunology*, 9(12), pp. 1425–1432. doi: 10.1038/ni.1664.
- Demaria, M. *et al.* (2014) 'An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA', *Developmental Cell*, 31(6), pp. 722–733. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.
- Dias, C. *et al.* (2014) 'β-catenin mediates stress resilience through Dicer1/microRNA regulation', *Nature*, 516(729), pp. S1–S5. doi: 10.1038/nature13976.
- Dong, M. *et al.* (2013) 'Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis', *Cell Metabolism*, 18(1), pp. 118–129. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.003.
- Drake, M. *et al.* (2014) 'A Requirement for ERK-Dependent Dicer Phosphorylation in Coordinating Oocyte-to-Embryo Transition in C.elegans', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 31(5), pp. 614–628. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.004.
- Dunker, W. *et al.* (2017) 'Recognizing the SINEs of infection: Regulation of retrotransposon expression and modulation of host cell processes', *Viruses*, 9(12). doi: 10.3390/v9120386.
- Dutta, S. and Sengupta, P. (2016) 'Men and mice: Relating their ages', *Life Sciences*. Elsevier Inc., 152, pp. 244–248. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025.
- Elbarbary, R., Lucas, B. and Maquat, L. (2016) 'Retrotransposons as regulators of gene expression', *Science*, 351(6274), pp. 679–686. doi: 10.1126/science.aac7247.

- Fasolo, F. *et al.* (2019) 'The RNA-binding protein ILF3 binds to transposable element sequences in SINEUP lncRNAs', *The FASEB Journal*, pp. 13572–13589. doi: 10.1096/fj.201901618rr.
- Fischer, A. W., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2018) 'Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study', *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH, 7(October 2017), pp. 161–170. doi: 10.1016/j.molmet.2017.10.009.
- Flemer, M. *et al.* (2013) 'A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes', *Cell*. Elsevier Inc., 155(4), p. 807. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.001.
- Folgueras, A. R. *et al.* (2018) 'Mouse models to disentangle the hallmarks of human aging', *Circulation Research*, 123(7), pp. 905–924. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312204.
- Fontana, L., Partridge, L. and Longo, V. D. (2010) 'Extending healthy life span-from yeast to humans', *Science*, 328(5976), pp. 321–326. doi: 10.1126/science.1172539.
- Franceschi, C. *et al.* (2017) 'Inflammaging and "Garb-aging"', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(3), pp. 199–212. doi: 10.1016/j.tem.2016.09.005.
- Franceschi, C. *et al.* (2018) 'The continuum of aging and age-related diseases: Common mechanisms but different rates', *Frontiers in Medicine*, 5(MAR). doi: 10.3389/fmed.2018.00061.
- Frasca, D. and Blomberg, B. B. (2016) 'Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans', *Biogerontology*, 17(1), pp. 7–19. doi: 10.1007/s10522-015-9578-8.
- García-Alcalde, F. *et al.* (2012) 'Qualimap: Evaluating next-generation sequencing alignment data', *Bioinformatics*, 28(20), pp. 2678–2679. doi: 10.1093/bioinformatics/bts503.
- García-pérez, L. and Moran, J. V (2015) 'The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes', *Mobile DNA III*, 3(60), pp. 1165–1208. doi: 10.1128/microbiolspec.mdna3-0061-2014.
- Garinis, G. A. *et al.* (2008) 'DNA damage and ageing: New-age ideas for an age-old problem', *Nature Cell Biology*, 10(11), pp. 1241–1247. doi: 10.1038/ncb1108-1241.
- Garner, J. P. *et al.* (2004) 'Social and husbandry factors affecting the prevalence and severity of barbering ("whisker trimming") by laboratory mice', *Applied Animal Behaviour Science*, 89(3–4), pp. 263–282. doi: 10.1016/j.applanim.2004.07.004.
- Ge, X. *et al.* (2016) 'Grip strength is potentially an early indicator of age-related decline in mice', *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*, 6(1), p. 32981. doi: 10.3402/pba.v6.32981.
- Ghatak, S. *et al.* (2015) 'Barrier function of the repaired skin is disrupted following arrest of dicer in keratinocytes', *Molecular Therapy*, 23(7), pp. 1201–1210. doi: 10.1038/mt.2015.65.
- Gibbins, D. *et al.* (2012) 'Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 14(12), pp. 1314–1321. doi: 10.1038/ncb2611.
- Girardi, E. *et al.* (2015) 'Cross-species comparative analysis of Dicer proteins during Sindbis virus infection', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–12. doi: 10.1038/srep10693.
- Gong, H. *et al.* (2014) 'Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice', *Molecular Medicine Reports*, 10(6), pp. 3296–3302. doi: 10.3892/mmr.2014.2648.
- Gorbunova, V. *et al.* (2007) 'Changes in DNA repair during aging', *Nucleic Acids Research*, 35(22), pp. 7466–7474. doi: 10.1093/nar/gkm756.
- Graja, A. *et al.* (2018) 'Loss of periostin occurs in aging adipose tissue of mice and its genetic ablation impairs adipose tissue lipid metabolism', *Aging Cell*, 17(5). doi: 10.1111/acer.12810.
- Gross, T. J. *et al.* (2014) 'A MicroRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to sumoylation of the endonuclease DICER', *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), pp. 12823–12834.

doi: 10.1074/jbc.M114.565473.

Guo, H. *et al.* (2014) 'Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms6276.

Ha, M. and Kim, V. N. (2014) 'Regulation of microRNA biogenesis', *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 15(8), pp. 509–524. doi: 10.1038/nrm3838.

Hampton, A. L. *et al.* (2012) 'Progression of ulcerative dermatitis lesions in c57bl/6crl mice and the development of a scoring system for dermatitis lesions', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(5), pp. 586–593.

Han, Y. H. *et al.* (2016) 'Adipocyte-specific deletion of manganese superoxide dismutase protects from diet-induced obesity through increased mitochondrial uncoupling and biogenesis', *Diabetes*, 65(9), pp. 2639–2651. doi: 10.2337/db16-0283.

Harkema, L., Youssef, S. A. and de Bruin, A. (2016) 'Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging', *Veterinary Pathology*, 53(2), pp. 366–389. doi: 10.1177/0300985815625169.

Harries, L. W. (2014) 'MicroRNAs as mediators of the ageing process', *Genes*, 5(3), pp. 656–670. doi: 10.3390/genes5030656.

Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Experimental Cell research*, 25, pp. 585–621.

Heinonen, M. V. *et al.* (2009) 'Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Elsevier Ltd, 19(9), pp. 626–633. doi: 10.1016/j.numecd.2008.12.008.

Hekimi, S., Lapointe, J. and Wen, Y. (2011) 'Taking a "good" look at free radicals in the aging process', *Trends in Cell Biology*, 21(10), pp. 569–576. doi: 10.1016/j.tcb.2011.06.008.

Hener, P. *et al.* (2011) 'Aggravated TSLP-induced atopic dermatitis in mice lacking Dicer in adult skin keratinocytes', *Journal of Investigative Dermatology*, 131(11), pp. 2324–2327. doi: 10.1038/jid.2011.208.

Heydari, A. R. *et al.* (2007) 'Caloric restriction and genomic stability', *Nucleic Acids Research*, 35(22), pp. 7485–7496. doi: 10.1093/nar/gkm860.

Hoareau-aveilla, C., Henry, Y. and Leblanc, T. (2008) 'La dyskératose congénitale', *Medecine/SciencesSciences*, 24, pp. 390–398.

Hoffend, N. C., Magner, W. J. and Tomasi, T. B. (2017) 'The epigenetic regulation of Dicer and microRNA biogenesis by Panobinostat', *Epigenetics*. Taylor & Francis, 12(2), pp. 105–112. doi: 10.1080/15592294.2016.1267886.

Horvitz, R. H. and Sulston, J. E. (1980) 'Isolation and genetic characterization of cell lineage mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 96, pp. 435–454. doi: 10.1016/0166-2236(85)90104-3.

Hu, Q. *et al.* (2012) 'DICER-and AGO3-dependent generation of retinoic acid-induced DR2 Alu RNAs regulates human stem cell proliferation', *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(11), pp. 1168–1175. doi: 10.1038/nsmb.2400.

Huang, T. C. *et al.* (2012) 'Regulation of Lipid Metabolism by Dicer Revealed through SILAC mice', *journal of proteome research*, 11(4), pp. 2193–2205. doi: 10.1021/pr2009884.

Hui, X. *et al.* (2017) 'Adipocyte SIRT 1 controls systemic insulin sensitivity by modulating macrophages in adipose tissue', *EMBO reports*, 18(4), pp. 645–657. doi: 10.15252/embr.201643184.

Hwang, Y. E. *et al.* (2019) 'Oxidative stress causes Alu RNA accumulation via PIWIL4 sequestration into stress granules', *BMB Reports*, 52(3), pp. 196–201. doi: 10.5483/BMBRep.2019.52.3.146.

- Ivanova, E. *et al.* (2015) 'Alu RNA regulates the cellular pool of active ribosomes by targeted delivery of SRP9/14 to 40S subunits', *Nucleic Acids Research*, 43(5), pp. 2874–2887. doi: 10.1093/nar/gkv048.
- Jafarnejad, S. M. *et al.* (2013) 'Sox4-mediated Dicer expression is critical for suppression of melanoma cell invasion', *Oncogene*, 32(17), pp. 2131–2139. doi: 10.1038/onc.2012.239.
- Jin, K. (2010) 'Modern biological theories of aging', *Aging and Disease*, 1(2), pp. 72–74. doi: 10.1093/jn/119.6.952.
- Johanson, T. M., Lew, A. M. and Chong, M. M. W. (2013) 'MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Droscha and Dicer.', *Open biology*, 3(10), p. 130144. doi: 10.1098/rsob.130144.
- Johnson, K. *et al.* (2003) 'One of two chondrocyte-expressed isoforms of cartilage intermediate-layer protein functions as an insulin-like growth factor 1 antagonist', *Arthritis and Rheumatism*, 48(5), pp. 1302–1314. doi: 10.1002/art.10927.
- Kalueff, A. V. *et al.* (2006) 'Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research', *Behavioural Processes*, 71(1), pp. 8–15. doi: 10.1016/j.beproc.2005.09.004.
- Kaneko, H. *et al.* (2011) 'DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration.', *Nature*, 471(7338), pp. 325–30. doi: 10.1038/nature09830.
- Kanfi, Y. *et al.* (2012) 'The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice', *Nature*. Nature Publishing Group, 483(7388), pp. 218–221. doi: 10.1038/nature10815.
- Kerur, N. *et al.* (2013a) 'TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(12), pp. 7395–7401. doi: 10.1167/iovs.13-12500.
- Kerur, N. *et al.* (2013b) 'TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(12), pp. 7395–7401. doi: 10.1167/iovs.13-12500.
- Kerur, N. *et al.* (2018) 'CGAS drives noncanonical-inflammasome activation in age-related macular degeneration', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 24(1), pp. 50–61. doi: 10.1038/nm.4450.
- Keyes, B. E. and Fuchs, E. (2018) 'Stem cells: Aging and transcriptional fingerprints', *Journal of Cell Biology*, 217(1), pp. 79–92. doi: 10.1083/jcb.201708099.
- Kim, K. I. and Kim, C. H. (2013) 'Calorie restriction in the elderly people', *Journal of Korean Medical Science*, 28(6), pp. 797–798. doi: 10.3346/jkms.2013.28.6.797.
- Kim, S. and Jazwinski, S. M. (2018) 'The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review', *Gerontology*, 64(6), pp. 513–520. doi: 10.1159/000490615.
- Kim, Y. *et al.* (2014) 'DICER1/Alu RNA dysmetabolism induces Caspase-8-mediated cell death in age-related macular degeneration.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), pp. 16082–7. doi: 10.1073/pnas.1403814111.
- Knuckles, P. *et al.* (2012) 'Droscha regulates neurogenesis by controlling Neurogenin 2 expression independent of microRNAs', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 962–969. doi: 10.1038/nn.3139.
- Kobayashi, S. *et al.* (2006) 'Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, RhoX5/Pem, at preimplantation stages', *Current Biology*, 16(2), pp. 166–172. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.071.
- Kovacs, E. J. *et al.* (2009) 'Aging and innate immunity in the mouse : impact of intrinsic and extrinsic factors', *Trends in Immunology*, 30(7), pp. 319–324. doi: 10.1016/j.it.2009.03.012.
- Krishnamurthy, J. *et al.* (2004) 'Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging', *The Journal of Clinical Investigation*, 114(9), pp. 1299–1307. doi: 10.1172/JCI22475.

- Kurylowicz, A. *et al.* (2016) 'SIRT1 and SIRT7 expression in adipose tissues of obese and normal-weight individuals is regulated by microRNAs but not by methylation status', *International Journal of Obesity*. Nature Publishing Group, 40(11), pp. 1635–1642. doi: 10.1038/ijo.2016.131.
- Kurzynska-Kokorniak, A. *et al.* (2016) 'Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(April), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep23989.
- Lee, Y. S. *et al.* (2004) 'Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways', *Cell*, 117(1), pp. 69–81. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00261-2.
- Leeper, N. J. *et al.* (2009) 'Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 296(5), pp. 1329–1335. doi: 10.1152/ajpheart.01341.2008.
- Lerman, L. O. *et al.* (2019) *Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association*, *Hypertension*. doi: 10.1161/HYP.000000000000090.
- Levy, C. *et al.* (2010) 'Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes', *Cell*. Elsevier Ltd, 141(6), pp. 994–1005. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.004.
- Li, H. *et al.* (2007) 'Deletion of Ku70, Ku80, or Both Causes Early Aging without Substantially Increased Cancer', *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), pp. 8205–8214. doi: 10.1128/mcb.00785-07.
- Li, Y. *et al.* (2012) 'Iron homeostasis regulates the activity of the microRNA pathway through poly(C)-binding protein 2', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 15(6), pp. 895–904. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.021.
- Li, Y. *et al.* (2013) 'RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals', *Science*, 342(6155), pp. 231–234. doi: 10.1126/science.1241911.
- Li, Y. and Piatigorsky, J. (2009) 'Targeted deletion of dicer disrupts lens morphogenesis, corneal epithelium stratification, and whole eye development', *Developmental Dynamics*, 238(9), pp. 2388–2400. doi: 10.1002/dvdy.22056.
- Liguori, I. *et al.* (2018) 'Oxidative stress, aging, and diseases', *Clinical Interventions in Aging*, 13, pp. 757–772. doi: 10.2147/CIA.S158513.
- Lim, J. *et al.* (2020) 'Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers', *International Journal of Obesity*. Springer US. doi: 10.1038/s41366-020-0528-4.
- Liu, N. *et al.* (2012) 'The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in Drosophila', *Nature*. Nature Publishing Group, 482(7386), pp. 519–523. doi: 10.1038/nature10810.
- Liu, S. *et al.* (2016) 'The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA', *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 19(1), pp. 32–43. doi: 10.1016/j.chom.2015.12.005.
- López-otín, C. *et al.* (2013) 'The Hallmarks of Aging', *Cell*, 153(6), pp. 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.The.
- López-Otín, C. *et al.* (2013) 'The hallmarks of aging', *Cell*, 153(6), p. 1194. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- López, J. F. *et al.* (2018) 'Adipose tissue extract shows potential for wound healing: in vitro proliferation and migration of cell types contributing to wound healing in the presence of adipose tissue preparation and platelet rich plasma', *Cytotechnology*, 70(4), pp. 1193–1204. doi: 10.1007/s10616-018-0211-y.
- Loukov, D. *et al.* (2016) 'Tumor necrosis factor drives increased splenic monopoiesis in old mice', *Journal of Leukocyte Biology*, 100(1), pp. 121–129. doi: 10.1189/jlb.3ma0915-433rr.
- Love, M. I., Huber, W. and Anders, S. (2014) 'Moderated estimation of fold change and dispersion for

RNA-seq data with DESeq2', *Genome Biology*, 15(12), pp. 1–21. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

Lyle, S. *et al.* (2014) 'Dicer cooperates with p53 to suppress DNA damage and skin carcinogenesis in mice', *PLoS ONE*, 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0100920.

de Magalhães, J. P., Curado, J. and Church, G. M. (2009) 'Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging', *Bioinformatics*, 25(7), pp. 875–881. doi: 10.1093/bioinformatics/btp073.

Mahesh Kumar, M. J. *et al.* (2004) 'Case report and short communication: Rectal prolapse associated with an unusual combination of pinworms and citrobacter species infection in FVB mice colony', *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 31(4), pp. 221–223.

Mahmoudi, S., Xu, L. and Brunet, A. (2019) 'Turning back time with emerging rejuvenation strategies', *Nature Cell Biology*. Springer US, 21(1), pp. 32–43. doi: 10.1038/s41556-018-0206-0.

Maillard, P. V. *et al.* (2013) 'Antiviral RNA interference in mammalian cells', *Science*, 342(6155), pp. 235–238. doi: 10.1126/science.1241930.

Malone, C. D. and Hannon, G. J. (2009) 'Small RNAs as guardians of the Genome', *Cell*, 136(4), pp. 656–668. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Mancuso, P. and Bouchard, B. (2019) 'The impact of aging on adipose function and adipokine synthesis', *Frontiers in Endocrinology*, 10(MAR), pp. 1–12. doi: 10.3389/fendo.2019.00137.

Marín-Aguilar, F. *et al.* (2019) 'NLRP3 inflammasome suppression improves longevity and prevents cardiac aging in male mice', *Aging Cell*, (March), pp. 1–14. doi: 10.1111/accel.13050.

Mariño, G. *et al.* (2010) 'Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), pp. 16268–16273. doi: 10.1073/pnas.1002696107.

Martin-Montalvo, A. *et al.* (2013) 'Metformin improves healthspan and lifespan in mice', *Nature Communications*, 4. doi: 10.1038/ncomms3192.

Maxwell, P. H. (2016) 'What might retrotransposons teach us about aging?', *Current Genetics*, 62(2), pp. 277–282. doi: 10.1007/s00294-015-0538-2.

McKenna, L. B. *et al.* (2010) 'MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 139(5), pp. 1654-1664.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2010.07.040.

Van Meter, M. *et al.* (2014) 'SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5. doi: 10.1038/ncomms6011.

Miller, C. L. *et al.* (2014) 'Isolation of Helicobacter spp. from mice with rectal prolapses', *Comparative Medicine*, 64(3), pp. 171–178.

Min, J.-N. *et al.* (2008) 'CHIP Deficiency Decreases Longevity, with Accelerated Aging Phenotypes Accompanied by Altered Protein Quality Control', *Molecular and Cellular Biology*, 28(12), pp. 4018–4025. doi: 10.1128/mcb.00296-08.

Mori, M. A. *et al.* (2012) 'Role of microRNA processing in adipose Tissue in Stress Defense and Longevity', *Cell metabolism*, 16(3), pp. 336–347. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.017.Role.

Moskalev, A. A. *et al.* (2013a) 'The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria', *Ageing Research Reviews*. Elsevier B.V., 12(2), pp. 661–684. doi: 10.1016/j.arr.2012.02.001.

Moskalev, A. A. *et al.* (2013b) 'The role of DNA damage and repair in aging through the prism of



- Koch-like criteria', *Ageing Research Reviews*. Elsevier B.V., 12(2), pp. 661–684. doi: 10.1016/j.arr.2012.02.001.
- Mostoslavsky, R. *et al.* (2006) 'Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6', *Cell*, 124(2), pp. 315–329. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.044.
- Mudhasani, R. *et al.* (2008) 'Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells', *Journal of Cell Biology*, 181(7), pp. 1055–1063. doi: 10.1083/jcb.200802105.
- Mukherjee, K., Campos, H. and Kolaczowski, B. (2013) 'Evolution of animal and plant dicers: Early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants', *Molecular Biology and Evolution*, 30(3), pp. 627–641. doi: 10.1093/molbev/mss263.
- Muñoz-Espín, D. *et al.* (2013) 'Programmed cell senescence during mammalian embryonic development', *Cell*, 155(5), p. 1104. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019.
- Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014) 'Cellular senescence: From physiology to pathology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 482–496. doi: 10.1038/nrm3823.
- Murga, M. *et al.* (2009) 'A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging', *Nature Genetics*, 41(8), pp. 891–898. doi: 10.1038/ng.420.
- Nagaraj, R. H., Shipanova, I. N. and Faust, F. M. (1996) 'Protein Cross-linking by the Maillard Reaction', *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), pp. 19338–19345. doi: 10.1074/jbc.271.32.19338.
- Nelson, P. T. *et al.* (2012) 'Correlation of alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 71(5), pp. 362–381. doi: 10.1097/NEN.0b013e31825018f7.
- Noren Hooten, N. *et al.* (2016) 'Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence', *Aging Cell*, 15(3), pp. 572–581. doi: 10.1111/accel.12469.
- Ohnishi, Y. *et al.* (2012) 'Active role of small non-coding RNAs derived from SINE/B1 retrotransposon during early mouse development', *Molecular Biology Reports*, 39(2), pp. 903–909. doi: 10.1007/s11033-011-0815-1.
- Ojcius, D. M. *et al.* (2019) 'Dicer regulates activation of the NLRP3 inflammasome', *PLoS ONE*, 14(4), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0215689.
- Ostermann, E. *et al.* (2012) 'Deregulation of type I IFN-dependent genes correlates with increased susceptibility to cytomegalovirus acute infection of Dicer mutant mice', *PLoS ONE*, 7(8). doi: 10.1371/journal.pone.0043744.
- Ostermann, E. *et al.* (2015) 'Increased viral dissemination in the brain and lethality in mcmv-infected, Dicer-deficient neonates', *Viruses*, 7(5), pp. 2308–2320. doi: 10.3390/v7052308.
- Otsuka, M. *et al.* (2007) 'Hypersusceptibility to Vesicular Stomatitis Virus Infection in Dicer1-Deficient Mice Is Due to Impaired miR24 and miR93 Expression', *Immunity*, 27(1), pp. 123–134. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.014.
- Otsuka, M. *et al.* (2008) 'Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 118(5), pp. 1944–1954. doi: 10.1172/JCI33680.
- Pasquinelli, A. E. *et al.* (2000) 'Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA', *Nature*, 408(6808), pp. 86–89. doi: 10.1038/35040556.
- Patro, R. *et al.* (2017) 'Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 14(4), pp. 417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197.
- Peshti, V. *et al.* (2017) 'Characterization of physiological defects in adult SIRT6<sup>-/-</sup> mice', *PLoS ONE*, 12(4), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0176371.

- Petruzzelli, M. *et al.* (2014) 'A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 20(3), pp. 433–447. doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.011.
- Pettan-Brewer, C. and M. Treuting, P. (2011a) 'Practical pathology of aging mice', *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*, 1(1), p. 7202. doi: 10.3402/pba.v1i0.7202.
- Pettan-Brewer, C. and M. Treuting, P. (2011b) 'Practical pathology of aging mice', *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*, 1(1), p. 7202. doi: 10.3402/pba.v1i0.7202.
- Pizarro, J. G. and Cristofari, G. (2016) 'Post-transcriptional control of LINE-1 retrotransposition by cellular host factors in somatic cells', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(14). doi: 10.3389/fcell.2016.00014.
- Rau, R. *et al.* (2008) 'Continued reductions in mortality at advanced ages', *Population and Development Review*, 34(4), pp. 747–768. doi: 10.1111/j.1728-4457.2008.00249.x.
- Reis, F. C. G. *et al.* (2016) 'Fat-specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction in mice', *Aging*, 8(6), pp. 1201–1222. doi: 10.18632/aging.100970.
- Roichman, A. *et al.* (2017) 'SIRT6 overexpression improves various aspects of mouse healthspan', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 72(5), pp. 603–615. doi: 10.1093/gerona/glw152.
- Rossiello, F. *et al.* (2017) 'DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs', *Nature Communications*, 8(May 2016). doi: 10.1038/ncomms13980.
- Roy Sarkar, S. and Banerjee, S. (2019) 'Gut microbiota in neurodegenerative disorders', *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier, 328(October 2018), pp. 98–104. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.01.004.
- Rudin, C. M. and Thompson, C. B. (2001) 'Transcriptional activation of short interspersed elements by DNA-damaging agents', *Genes Chromosomes and Cancer*, 30(1), pp. 64–71. doi: 10.1002/1098-2264(2000)9999:9999::AID-GCC1066>3.0.CO;2-F.
- Rybak-Wolf, A. *et al.* (2014) 'A variety of dicer substrates in human and *C. elegans*', *Cell*. Elsevier Inc., 159(5), pp. 1153–1167. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.040.
- Sakata, Y. *et al.* (2017) 'Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast', *Development (Cambridge)*, 144(15), pp. 2784–2797. doi: 10.1242/dev.149138.
- Sako, A. *et al.* (2017) 'Hospitalization with hypoglycemia in patients without diabetes mellitus: A retrospective study using a national inpatient database in Japan, 2008-2012', *Medicine (United States)*, 96(25), pp. 1–7. doi: 10.1097/MD.00000000000007271.
- Savontaus, E. *et al.* (2008) 'Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in  $\alpha$ 2A-adrenoceptor knockout mice', *European Journal of Pharmacology*, 578(2–3), pp. 359–364. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.09.015.
- Sena, L. A. and Chandel, N. S. (2012) 'Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 48(2), pp. 158–167. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.
- Serna, E. *et al.* (2012) 'Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs', *Scientific Reports*, 2, pp. 1–5. doi: 10.1038/srep00961.
- Shih, Y. H. *et al.* (2018) 'Hypertension accelerates Alzheimer's disease-related pathologies in pigs and 3xTg mice', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(MAR), pp. 1–17. doi: 10.3389/fnagi.2018.00073.
- Song, M. S. and Rossi, J. J. (2017) 'Molecular mechanisms of Dicer: Endonuclease and enzymatic activity', *Biochemical Journal*, 474(10), pp. 1603–1618. doi: 10.1042/BCJ20160759.
- Speakman, J. R. (2005) 'Body size, energy metabolism and lifespan', *Journal of Experimental Biology*,

208(9), pp. 1717–1730. doi: 10.1242/jeb.01556.

Stegeman, R. and Weake, V. M. (2017) 'Transcriptional Signatures of Aging', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 429(16), pp. 2427–2437. doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.019.

Steinhubl, S. R. (2008) 'Why Have Antioxidants Failed in Clinical Trials?', *American Journal of Cardiology*, 101(10 SUPPL.), pp. 14D-19D. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.02.003.

Storer, M. *et al.* (2013) 'Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning', *Cell*. Elsevier Inc., 155(5), p. 1119. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.041.

Su, X. *et al.* (2010) 'Tap63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs', *Nature*. Nature Publishing Group, 467, pp. 986–990. doi: 10.1038/nature09459.

Tarallo, V. *et al.* (2012) 'DICER1 Loss and Alu RNA Induce Age-Related Macular Degeneration via the NLRP3 Inflammasome and MyD88', *Cell*, 149, pp. 847–859. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.036.

Taylor, D. W. *et al.* (2013) 'Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 20(6), pp. 662–670. doi: 10.1038/nsmb.2564.

Teta, M. *et al.* (2012) 'Inducible deletion of epidermal Dicer and Drosha reveals multiple functions for miRNAs in postnatal skin', *Development*, 139(8), pp. 1405–1416. doi: 10.1242/dev.070920.

Tews, D. *et al.* (2019) 'Elevated UCP1 levels are sufficient to improve glucose uptake in human white adipocytes', *Redox Biology*. Elsevier B.V., 26(July), p. 101286. doi: 10.1016/j.redox.2019.101286.

Thalyana, S. V. and Slack, F. J. (2012) 'MicroRNAs and their roles in aging', *Journal of Cell Science*, 125(1), pp. 7–17. doi: 10.1242/jcs.099200.

Tomaru, U. *et al.* (2012) 'Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities', *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc., 180(3), pp. 963–972. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.012.

Trayhurn, P. (2005) 'Endocrine and signalling role of adipose tissue: New perspectives on fat', *Acta Physiologica Scandinavica*, 184(4), pp. 285–293. doi: 10.1111/j.1365-201X.2005.01468.x.

Ungvari, Z. *et al.* (2013) 'Aging-induced dysregulation of Dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 68(8), pp. 877–891. doi: 10.1093/gerona/gls242.

Vaupel, J. W. (2010) 'Biodemography of human ageing', *Nature*, 464, pp. 536–542. doi: 10.1038/nature08984.

Vaupel, J. W. and Loichinger, E. (2006) 'Redistributing work in aging Europe', *Science*, 312(5782), pp. 1911–1913. doi: 10.1126/science.1127487.

Vijg, J. and Le Bourg, E. (2017) 'Aging and the Inevitable Limit to Human Life Span', *Gerontology*, 63(5), pp. 432–434. doi: 10.1159/000477210.

Vilchez, D., Saez, I. and Dillin, A. (2014) 'The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5. doi: 10.1038/ncomms6659.

Villeda, S. A. *et al.* (2011) 'The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function', *Nature*, 477(7362), pp. 90–96. doi: 10.1038/nature10357.

Wagener, A., Müller, U. and Brockmann, G. A. (2013) 'The age of attaining highest body weight correlates with lifespan in a genetically obese mouse model', *Nutrition and Diabetes*, 3(MARCH). doi: 10.1038/nutd.2013.4.

Wang, J., Gong, C. and Maquat, L. E. (2013) 'Control of myogenesis by rodent SINE containing

- lncRNAs', *Genes & Development*, 27, pp. 793–804. doi: 10.1101/gad.212639.112.et.
- Wang, W. *et al.* (2016) 'Alu RNA accumulation in hyperglycemia augments oxidative stress and impairs eNOS and SOD2 expression in endothelial cells', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 426, pp. 91–100. doi: 10.1016/j.mce.2016.02.008.
- Wang, X. *et al.* (2014) 'A genetic program theory of aging using an RNA population model', *Ageing Research Reviews*. Elsevier B.V., 13(1), pp. 46–54. doi: 10.1016/j.arr.2013.11.001.
- Wei, W. *et al.* (2012) 'A role for small RNAs in DNA double-strand break repair', *Cell*. Elsevier Inc., 149(1), pp. 101–112. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.002.
- White, E. *et al.* (2014) 'Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 21(6), pp. 552–559. doi: 10.1038/nsmb.2827.
- Wiesen, J. L. and Tomasi, T. B. (2009) 'Dicer is regulated by cellular stresses and interferons', *Molecular Immunology*, 46(6), pp. 1222–1228. doi: 10.1016/j.molimm.2008.11.012.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993) 'Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*', *Cell*, 75(5), pp. 855–862. doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.
- Wilkinson, J. E. *et al.* (2012) 'Rapamycin slows aging in mice', *Aging Cell*, 11(4), pp. 675–682. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00832.x.
- Winter, J. E. *et al.* (2014) 'BMI and all-cause mortality in older adults: A meta-analysis', *American Journal of Clinical Nutrition*, 99(4), pp. 875–890. doi: 10.3945/ajcn.113.068122.
- Wright, C. B. *et al.* (2020) 'Chronic Dicer1 deficiency promotes atrophic and neovascular outer retinal pathologies in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.1909761117.
- Wu, D. *et al.* (2007) 'Aging Up-Regulates Expression of Inflammatory Mediators in Mouse Adipose Tissue', *The Journal of Immunology*, 179(7), pp. 4829–4839. doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4829.
- Yan, Y. *et al.* (2013) 'Dicer expression exhibits a tissue-specific diurnal pattern that is lost during aging and in diabetes.', *PloS one*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0080029.
- Ye, X., Paroo, Z. and Liu, Q. (2007) 'Functional anatomy of the Drosophila microRNA-generating enzyme', *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), pp. 28373–28378. doi: 10.1074/jbc.M705208200.
- Youm, Y. H. *et al.* (2013) 'Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging', *Cell Metabolism*, 18(4), pp. 519–532. doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.010.
- Zhang, L., Curhan, G. C. and Forman, J. P. (2010) 'Plasma resistin levels associate with risk for hypertension among nondiabetic women', *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(7), pp. 1185–1191. doi: 10.1681/ASN.2009101053.
- Zhao, Y. *et al.* (2015) 'Down-regulation of Dicer1 promotes cellular senescence and decreases the differentiation and stem cell-supporting capacities of mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndrome', *Haematologica*, 100(2). doi: 10.3324/haematol.2014.109769.
- Zhou, Q. *et al.* (2018) 'Apelin/APJ system: A novel promising target for anti-aging intervention', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier, 487(July), pp. 233–240. doi: 10.1016/j.cca.2018.10.011.
- Ziegler, A. K. *et al.* (2019) 'An anti-inflammatory phenotype in visceral adipose tissue of old lean mice, augmented by exercise', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-019-48587-2.
- Zimmermann, A. *et al.* (2014) 'When less is more: Hormesis against stress and disease', *Microbial Cell*, 1(5), pp. 150–153. doi: 10.15698/mic2014.05.148.

# ANNEXES



# Annexe 1 : Matériel et Méthodes

## A) Animaux :

### 1. Génération des animaux et stratégie de génotypage

Les différentes cohortes étudiées sont générées en croisant des individus hétérozygotes (*Dicer1*<sup>+/-</sup>) entre eux, permettant d'obtenir les mutants et leurs littermate contrôles. Mutants et contrôles sont maintenus ensemble dans les cages afin de s'affranchir d'un effet potentiel du microbiote intestinal sur les phénotypes observés.

Le génotypage est réalisé à partir d'ADN extrait de fragments de queues. Les échantillons sont digérés dans un volume de soude (NaOH 50mM) à 95°C pendant 1h. La réaction est ensuite stoppée par 10% de Tris-HCL (1M, pH 8 (v/v)) et les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à leur analyse.

Le génotypage est réalisé par une PCR basée sur une taq polymérase (GoTaq Flexi – Proméga). Le milieu de réaction et le programme de thermocycleur utilisés sont détaillés ainsi :

Milieu de réaction PCR			Programme thermocycleur
Composants	Volume/réaction	Concentration finale	
Tampon 5X	5µL	1X	95°C – 2 min
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	2µL	2mM	95°C – 30 sec
DMSO	1,25µL	5% (v/v)	58°C – 30sec
Mix dNTP, 10mM	0,5µL	0,2mM	72°C – 45sec
i2, 20µM	0.25µL	0,2µM	72°C – 10 min
Ex25, 10µM	0.25µL	0.1µM	4°C - ∞
Entn, 10µM	0.25µL	0.1µM	
GoTaq 5U/µL	0.1µL	0.5U	
ADN	2.5µL	-	
H2O, QSP :	25µL	-	

Les amorces utilisées sont les suivantes :

i2 : 5'- TCA GTG ACA GGG CGA CTG GG -3'

Ex25 : 5'- TTC TCC TCA TCC TCC TCG GAT CTC -3'

Entn : 5' – CAC TCC AAC CTC CGC AAA CTC CTA -3'

Le couple d'amorces i2 et Ex25 est spécifique du gène *Dicer1* tandis que l'amorce Entn est spécifique de la cassette de sélection.

### 2. Condition d'hébergements/procédures.

Tous les animaux utilisés au cours de ma thèse sont issus de l'animalerie du centre d'hématologie de d'immunologie, agréée par les services vétérinaires du Bas-Rhin (N° agrément C67-482-33). Les souris sont hébergées et élevées dans une animalerie conventionnelle maintenue à température et hygrométrie constantes (21°C, 50-60% humidité) et en condition SPF (Specific pathogen-free). Les animaux *Dicer1*-déficients ne nécessitent pas de conditions d'élevage particulières et l'ensemble des

procédures réalisées dans le cadre de ma thèse sont validées dans le cadre d'un projet APAFIS (N°2019061317371610).

## **B) Suivi de la survie et des paramètres métaboliques**

### **1. Analyse de la survie.**

Afin d'évaluer la survie des animaux *Dicer1*-déficients, l'ensemble des individus présents à l'animalerie ont été suivis de manière hebdomadaire afin de détecter (i) l'apparition de signes de pathologies ou (ii) un état « morbide », défini comme proche de la fin de vie. Les signes de types « pathologie » incluent le prolapsus rectal/vaginal, les lésions cutanées, les atteintes des muqueuses et le développement de masses palpables. L'état « morbide » décrit une dégradation de l'état de santé générale de l'animal (perte de poids prononcée, prostration, manque de soin et/ou respiration laborieuse) en l'absence de signes pathologiques qui justifie toutefois la mise-à-mort de l'animal.

A l'apparition de l'un ou l'autre de ces événements, l'animal est mis-à-mort et son âge (en semaine) est enregistré pour l'analyse de la survie de la colonie *Dicer1*-déficiente.

### **2. Mesure de la force**

Le test des poids est réalisé d'après les travaux de [Deacon \(2013\)](#) en faisant porter à l'animal différents poids, de plus en plus importants et permet d'établir un « score de force ». Les poids sont constitués d'une éponge métallique d'environ 20g que les animaux vont pouvoir attraper, à laquelle est fixée ou non une chaîne de maillons ; le nombre de maillons diffère de 1 à 5, et chaque maillon pèse environ 13g. Les poids testés sont donc : 20, 33, 46, 59, 72, 85g. Le score est évalué à partir de la capacité de l'animal à soulever le poids pendant plus de 3 secondes. Le calcul du score est une multiplication du nombre de maillons maximum par le temps pendant lequel il est maintenu. Ainsi, une souris tenant un poids à 3 maillons pendant 3 secondes, mais incapable de soutenir 4 maillons aura un score de  $(3 \times 3) = 9$ . Si l'animal est capable de soulever le poids à 4 maillons pendant 1 seconde, il est assigné un score de  $(3 \times 3 + 1) = 10$ .

### **3. Test de tolérance au glucose.**

La mesure des différents paramètres métaboliques sont faites en suivant les recommandations décrites ailleurs ([Ayala et al., 2010](#)).

Le test de tolérance au glucose (TTG) permet d'évaluer la capacité d'un organisme à maintenir la glycémie (concentration de glucose dans le sang) sous contrôle. Pour cela, la glycémie est mesurée à différents temps après un « challenge » de glucose. Plus précisément : les souris sont mises à jeun pendant 5h (typiquement de 8h à 13h) en les plaçant dans une nouvelle cage sans aliments. En parallèle est préparée et filtrée stérilement une solution de glucose à 0.2g/mL (diluant : sérum physiologique). Vers 13h, une entaille est réalisée au bout de la queue des animaux pour générer une microgouttelette de sang utilisée pour déterminer la glycémie grâce à un glucomètre (CareSens). Une



injection intrapéritonéale de glucose telle que 2g/kg (soit 100µL pour 10g) est réalisée et la glycémie est mesurée 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après l'injection.

#### **4. Test de tolérance à l'insuline**

L'insuline est une hormone hypoglycémisante qui, une fois libérée dans l'organisme, va provoquer le stockage du glucose sanguin dans les cellules cibles, soit principalement les hépatocytes, les fibres musculaires squelettiques et les adipocytes. Le test va suivre la modification de la glycémie suite à l'apport d'insuline exogène et permet donc d'évaluer la sensibilité des tissus d'un organisme à l'hormone. En pratique, le test se déroule de la manière suivante : les animaux sont mis à jeun pendant 3h, typiquement de 10h à 13h, en les plaçant dans une nouvelle cage sans aliments. Une solution d'insuline à 5U est préparée stérilement à partir d'une solution d'insuline humaine recombinante (HUMULIN, diluant : dPBS). Vers 13h, la glycémie est évaluée de la même manière que lors du TTG. Une injection intrapéritonéale d'insuline telle que 0.5U/kg (soit 100µL pour 10g) est réalisée et la glycémie est mesurée 15, 30, 45, 60 et 90 minutes après injection.

#### **5. Prélèvement sanguin**

Différents paramètres métaboliques (glycémie, insulïnémie) sont profondément modifiés par les agents anesthésiques (hyperglycémisants) ; les prélèvements de sang sont donc faits sur animaux vigiles. Le prélèvement de sang est réalisé par ponction de la veine submandibulaire (GoldenRod Animal lancets, Bioseb) et le sang est récolté dans des tubes contenant de l'EDTA (5mM final). Les tubes sont gardés sur glace jusqu'à centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 3000rpm. Le plasma est ensuite isolé et conservé à -80°C jusqu'à son analyse.

### **C) Analyse biomoléculaire : expression des gènes**

#### **1. Préparation des échantillons (lyse)**

Le tissu adipeux est récolté immédiatement après la mise à mort des animaux afin d'éviter sa dégradation. Le tissu est pesé, rincé une fois par du dPBS, transféré en tube eppendorf avant d'être immergé dans de l'azote liquide. Le tissu est conservé à -80°C jusqu'à sa lyse. Pour cela, 250mg de tissu sont découpés en petits morceaux sur glace carbonique, transférés dans un tube polypropylène de 5mL et enfin, broyés dans 1mL de TRIzol grâce à un broyeur de tissu (Tissu-master, Omni international). Le tout est transféré en tube eppendorf de 1.5mL et centrifugé à 4°C, 5 minutes à 12000 g afin d'éliminer l'excès de lipides et les débris cellulaires. Les échantillons lysés sont conservés sur glace si l'extraction d'ARN est réalisée dans la foulée, sinon conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### **2. Extraction d'ARN**

L'extraction des ARN suit les recommandations du fabricant (TRIzol, invitrogen) qui modifie les temps de centrifugation dans le cas du tissu adipeux en raison de sa nature lipidique. Premièrement, les différentes phases sont séparées de la manière suivante : ajout de chloroforme (200µL pour 1mL

de TRIzol), incubation des échantillons à température ambiante pendant 2 minutes et centrifugation à 4°C, 12000g, pendant 40 minutes. Les échantillons présentent alors 3 phases : une phase protéique (basse), un anneau médian d'ADN génomique et une phase aqueuse (supérieure) contenant l'ARN. Cette dernière est délicatement prélevée pour être transférée dans un nouveau tube eppendorf (DNA low-bind, RNase free). Un volume d'isopropanol (500µL pour 1mL de TRIzol) est doucement ajouté et les échantillons sont homogénéisés par inversions du tube avant d'être incubés 10 minutes à température ambiante et centrifugés à 4°C, 12000g pendant 15 minutes afin de précipiter l'ARN en culot. Le surnageant est éliminé en pipetant puis le culot est lavé deux fois à l'éthanol 75% glacé (1 mL d'éthanol pour 1mL de TRIzol, puis centrifugation à 4°C, 7500g pendant 5 minutes). Le culot est ensuite séché avant d'être resuspendu dans 50µL d'eau DEPC. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **3. Retrotranscription**

#### *Dosage des échantillons*

La quantité et la qualité de l'ARN dans l'échantillon est évaluée par spectrophotométrie (NanoDrop 2000) en mesurant les absorbances à 260 et 280nm. Un ratio A260/A280 supérieur ou égale à 1,8 est considéré comme bon et l'échantillon exploitable. Un ratio inférieur indique soit une mauvaise dissolution du culot d'ARN soit une mauvaise extraction. Si le ratio n'est pas modifié après une incubation de l'échantillon 10 minutes à 55°C (potentialise la dissolution), une nouvelle extraction est réalisée à partir de l'échantillon ou du tissu le cas échéant.

#### *Traitement à la DNase I*

Afin de purifier l'ARN et d'éliminer toute traces d'ADN génomique qui pourrait fausser les résultats de qPCR, les échantillons sont traités à la DNase I recombinante (Roche). Le traitement est réalisé pour chaque échantillon selon les recommandations du fabricant. Les échantillons sont ensuite incubés 20 minutes à 25°C, puis 10 minutes à 75°C afin d'inactiver l'enzyme.

#### *Retrotranscription*

L'ARN traité par la DNase I est ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire grâce au kit iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). Pour cela, les échantillons sont dilués afin d'obtenir 1µg dans un volume final de 16µL (diluant : eau nuclease-free). A chaque échantillon ainsi dilué est ajouté 4µL de mix contenant la transcriptase inverse. La réaction est réalisée en incubant les échantillons 5 minutes à 25°C (activation de l'enzyme), puis 30 minutes à 46°C (élongation) et 95°C pendant 1 minute (inactivation). La quantité d'ADNc obtenue est dosée par NonoDrop. Les échantillons sont ensuite conservés sur glace pour utilisation immédiate ou stockés à -20°C.

#### 4. PCR quantitative (qPCR)

##### *Préparation des échantillons et réaction de qPCR*

Les échantillons d'ADNc obtenus lors de la rétrotranscription sont dilués afin d'obtenir une concentration de 250ng/μL (diluant : eau nucléase-free). La réaction de PCR quantitative est réalisée à l'aide de Sybr-Green (Bio-Rad), un composé fluorescent fixant l'ADN double brin. Les échantillons sont préparés selon les recommandations du fabricant pour un volume final de 10μ/réaction, avec 250ng de cDNA/réaction. La réaction est ensuite réalisée dans un thermocycleur Rotor Gene (Corbette research) avec le protocole suivant : une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C, suivi de 35 cycles alternant une phase de dénaturation à 95°C (5 secondes) et une phase d'hybridation/élongation à 60°C (20 secondes). Le cycle est modifié et adapté selon les travaux de (Tarallo *et al.*, 2012) pour les réactions amplifiant B1 et B2 : une phase de dénaturation de 2 minutes à 95°C, suivi de 20 cycles alternant dénaturation à 95°C pendant 15s et hybridation/élongation à 58°C pendant 40 secondes. Les différents couples d'amorces utilisés sont indiqués dans le tableau suivant.

Transcrit cible	Amorce sens 5' >3'	Amorce antisens 5'>3'
<i>18S</i>	GGGAGCCTGAGAAACGGC	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT
<i>B1</i>	TGCCTTTAATCCCAGCACTT	GCTGCTCACACAAGGTTGAA
<i>B2</i>	GAGTTCAAATCCCAGCAACCA	AAGAGGGTCTCAGATCTTGTTACAGA
<i>Dicer1</i>	AAGAACGAAATGCAGGAATGGA	TCTTCTTCTCCTCATCCTCCTCG
<i>Il1b</i>	AATTGGTCATAGCCCGCACT	AAGCAATGTGCTGGTGCTTC
<i>Il6</i>	ATGAACAACGATGATGCACTTG	TATCCAGTTTGGTAGCATCCAT
<i>Il18</i>	TCCTTGAAGTTGACGCAAGA	CTTCTGCAACCTCCAGATC
<i>Sirt1</i>	CAGTGAGAAAATGCTGGCCTA	TTGGTGGTACAAACAGGTATTGA
<i>Tnfa</i>	CTACTCCCAGGTTCTTCAA	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC
<i>Ucp1</i>	TCAGGATTGGCCTCTACGAC	TTAAGCCGGCTGAGATCTTG

##### *Analyse*

Les résultats sont analysés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  pour obtenir le « fold-change ». Pour cela, le Ct (Cycle threshold) obtenu des échantillons est normalisé par le gène de référence (ARN 18S) pour obtenir le  $\Delta Ct$ . À ce résultat est soustrait le  $\Delta Ct$  moyen des échantillons contrôles pour obtenir le  $\Delta\Delta Ct$ . Le fold-change est calculé de la manière suivante :  $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 5. Séquençage ARN

L'ARN total du tissu adipeux viscéral est isolé grâce au kit RNeasy® Mini (Qiagen, Hilden). L'intégrité de l'ARN extrait est évaluée sur un bioanalyseur Agilent 2100 grâce au Kit RNA 6000 Pico (Agilent Technologies). Les librairies sont ensuite construites avec le kit SMARTer® Stranded Total RNA-Seq v2 – Pico input mammalian (TaKaRa) en suivant les recommandations du fabricant. Le pool de librairies est alors séquençé sur NextSeq 500 en utilisant le kit NextSeq 500/550 High Output v2 selon les recommandations du fabricant (Illumina).

L'analyse du séquençage est réalisée en suivant le « pipeline » Bcbio-nextgen. Brièvement, pour chaque échantillon la qualité des « reads » générés par le séquençage est évaluée par l'outil FastQC (Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data) puis les reads sont alignés au génome souris mm10 à l'aide de STAR. La qualité de l'alignement est évaluée par Qualimap ([García-Alcalde et al., 2012](#)). L'intégralité de ces « reads » ainsi générés et alignés permet d'extraire les données de comptage brutes ; ce comptage est réalisé à l'aide de l'outil Salmon ([Patro et al., 2017](#)). Enfin, les analyses différentielles sont réalisées à l'aide du package DESeq2 pour « R » et les gènes différentiellement exprimés sont sélectionnés sur la base de leur valeur p ajustée (<0.05) sur le fold-change (>1,5) ([Love, Huber and Anders, 2014](#)).

## D) Histologie

### 1. Préparation des échantillons en paraffine

L'analyse histologique du tissu adipeux se réalise en suivant les recommandations décrites dans [Berry et al. \(2014\)](#). Brièvement, le tissu adipeux est récolté immédiatement après la mise à mort des animaux, rincé une fois par du dPBS et est incubé une nuit dans une solution de paraformaldéhyde (PFA 4%). Le tissu est ensuite lavé 3 fois par du PBS et placé dans une cassette d'inclusion. Les échantillons sont ensuite traités par un automate (Leica TP 1020) qui immerge les cassettes dans différents bains (éthanol 75% - 30 min, éthanol 95% - 1h30 x2, éthanol 100% - 1h x2, Toluène – 1h x2, paraffine fondue – 1h x2 puis paraffine fondue une nuit). Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine puis sectionnés au microtome (section 7µm). Les sections sont transférées sur lame et séchées une nuit à 40°C.

### 2. Coloration Hématoxyline & Eosine

Les lames vont être plongées dans une série de bains successifs afin de déparaffiner et réhydrater les échantillons avant d'être colorés. Le protocole est le suivant : 3 bains de 20s de toluène, 3x20s d'éthanol 100%, 1x15s d'éthanol 95%, 1x15s d'eau distillée, 1x5min Hématoxyline, 1x45s eau distillée, 1x15s d'alcool-acide, 1x10min eau courante, 1x15s Eosine, 3x15s éthanol 95%, 1x15s éthanol 100%, 1x45s éthanol 100%, 1x1min toluène. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre avant de pouvoir coller la lamelle et d'imager les échantillons.

## **E) Logiciels utilisés**

Les graphiques et les statistiques associées sont réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 5. Les schémas et les figures sont faits grâce à Microsoft PowerPoint et les coupes histologiques sont visualisées et photographiées grâce au logiciel AxioVision (Carl Zeiss).



## **Annexe 2: Article proposé**





***Dicer1* deficient mice exhibit premature ageing and metabolic perturbations of adipocytes**

Aurore DeCauwer<sup>1,2</sup>, XXX, Angélique Pichot<sup>1,2</sup>, Martin Verniquet<sup>1,2</sup>, Tristan Stemmelen<sup>1,2</sup>, Raphael Carapito<sup>1,2</sup>, Seiamak Bahram<sup>1,2</sup> and Philippe Georgel<sup>1,2,\*</sup>.

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Médecine ; Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Service de Médecine Intensive et Réanimation, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

<sup>2</sup>ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR\_S1109, LabEx TRANSPLANTEX, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

\* Corresponding author: Philippe Georgel. INSERM UMR\_S 1109 ImmunoRhumatologie Moléculaire, Centre d'Hématologie et d'Immunologie, 1 Place de l'Hôpital. 67085 Strasbourg, France. Phone: +33 (0) 368.853.984 ; email: pgeorgel@unistra.fr

**Keywords:** Dicer, premature aging, metabolism, senescence, adipocyte.

## Abstract

### Introduction

Ageing can be defined at the molecular, cellular or organismal levels but its most understandable and tangible definition is the inevitable, time-dependent “physiological deterioration”. Indeed, several changes that accumulate with time are quite obvious: hair loss, cognitive decline, reduced reproductive capacities, impaired muscle strength...to cite only a few of them. Yet, these manifestations are highly variable and while “super-agers” (people in their 70s and 80s who have the mental or physical capability of their decades-younger counterparts) with preserved memory (or physical) performance abilities were described (Sun et al., 2016), others exhibit accelerated deteriorations, as that seen in progeria patients (Ahmed, Ikram, Bibi, & Mir, 2018). This illustrates that our current knowledge on aging is still limited and providing a universal description of this process and its markers is a challenging task (de Magalhaes & Passos, 2018; Johnson & Stolzing, 2019; Neves & Sousa-Victor, 2019). This point to the necessity to better describe the molecular and cellular processes that are at play during ageing *in vivo*.

A crucial observation which sustains ageing and the limitation of life is the finite capacity of mammalian cells to divide (Hayflick & Moorhead, 1961), which led to the concept of “cellular senescence” characterized by permanent withdrawal from the cell cycle and acquisition of a pro-inflammatory, proteolytic secretome (Childs et al., 2017). This low-grade inflammatory phenotype, or “inflammaging”, is postulated to be an important contributor to tissue dysfunctions that accompanies age-related decline (van Deursen, 2014). Of note, the relationship (cause / effect) between inflammation and aging has not yet formally been established. Several stressors, such as reactive oxygen species (ROS) or DNA damage are known inducers of senescence, but it has also recently been suggested that the accumulation of self-molecules (which are normally processed and eliminated by mechanisms such as autophagy) might be an important source of inflammation (Franceschi, Garagnani, Vitale, Capri, & Salvioli, 2017). In this regard, the role of DICER1 appears of particular importance. DICER1 is essentially known for its canonical role in the RNA interference pathway through processing of pre-miRNA transcripts into mature miRNAs (Ha & Kim, 2014). However, additional functions have been attributed to this RNase III, among which the processing of long non-coding RNAs such as those derived from the transcription of Alu sequences (Song & Rossi, 2017). While the role of miRNAs in ageing has been amply investigated (Kinser & Pincus, 2019), the impact of Alu RNAs accumulation caused by DICER1 deficiency on inflammation and an age-related disease has been demonstrated in human retinal cells (Gelfand et al., 2015; Kaneko et al., 2011; Kim et al., 2014; Tarallo et al., 2012). Importantly, mutant mice (*Dicer* 1<sup>d/d</sup>) characterized by reduced *Dicer* 1 expression are more prone to develop joint inflammation during experimental arthritis (Alsaleh et

al., 2016) and have recently been shown to also exhibit age-related macular degeneration (Wright et al., 2020).

In this manuscript, we describe reduced life span and increased age-related diseases in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice. This mouse mutant line therefore represents a novel and physiologically relevant model of premature aging. Next, we focused our investigation of the adipose tissue and explored in more details the mechanistic relationships between reduced *Dicer1* expression, inflammation and cellular senescence. Altogether, our data point to a major role of *Dicer1* in aging, probably through its canonical and non-canonical functions.

## Results

### ***Dicer1*-deficient mice (*Dicer1*<sup>d/d</sup>) die prematurely and exhibit age-related diseases**

Increased susceptibility to viral infections ((Ostermann, Macquin, Krezel, Bahram, & Georgel, 2015; Ostermann et al., 2012; Otsuka et al., 2007) and induced colon cancer (Yoshikawa et al., 2013) of *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice have previously been described. However, in the absence of any infectious or tumorigenic trigger, we observed a reduced lifespan of *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice (Fig.1A). Animals were kept in the same room of our animal facility and both genotypes (*Dicer1*<sup>+/+</sup> and *Dicer1*<sup>d/d</sup>) were co-housed in the same cages to avoid microbiota-specific effects. In these conditions, we could calculate a median survival of 80 weeks for *Dicer1* mutant mice, while that of their littermate controls exceeds 2 years. For practical reasons, we could not keep the control animals until their natural death, but the median survival of C57Bl/6 males mice is considered to be of 125 weeks (Kunstyr & Leuenberger, 1975). This means that the average life time of *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice is 30% shorter than controls. Importantly, mutant mice develop more severe and/or more prematurely a morbid state and a set of age-related defects/pathologies. Indeed, ageing of mutant mice is accompanied with the development of severe dermatitis (Fig.1B) and kyphosis (Fig.1C), both conditions frequently uncoupled in aged populations in humans (Ailon, Shaffrey, Lenke, Harrop, & Smith, 2015; Hahnel, Lichterfeld, Blume-Peytavi, & Kottner, 2017) and associated with adverse health effects. Of note, these manifestations were not observed in mice until they were aged at least 40 weeks (see Table I). Additional signs of premature ageing were also occasionally seen in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mutants following necropsy (Table I): conjunctivitis (illustrated Fig. 1D) (Coursey et al., 2017), splenomegaly (Loukov, Naidoo, Puchta, Marin, & Bowdish, 2016), cardiomegaly (Eisenberg et al., 2016) or enlarged seminal vesicles (Fritz, Lin, Moore, Cooke, & Peterson, 2005) but the occurrence of such events was too rare to reach statistical significance. Notably, other defects unrelated to ageing, such as alopecia (caused by social behavior (Kalueff, Minasyan, Keisala, Shah, & Tuohimaa, 2006)) or rectal prolapses (resulting from intestinal dysbiosis (Buonocore et al., 2010)) were not modified in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice.

We also noted lower body weight of aged mutant mice, a phenotype that can be observed in 60-weeks old animals and beyond. This is accompanied by reduced adipose tissue in 80-weeks old mutant mice (Fig. 2A, B). Indeed, while control mice gain weight and accumulate fat with age, this was not seen in *Dicer1*<sup>d/d</sup> animals. Importantly, age-dependent weight loss is now considered as a key biological marker of ageing and reflects the fragility and vulnerability to pathogens seen in elderly people as well as aged animals (Dutta & Sengupta, 2016). Of note, controls and *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice reach a similar maximum weight (38g), which is achieved at week 30 for mutants and week 70 for wild-type animals. The difference (40 weeks) is similar to the loss of life expectancy seen in *Dicer1* mutants. This observation is in line with previous reports showing that the age at which the maximum body weight is attained, rather than the body weight itself, correlates with lifespan (Wagener, Muller, & Brockmann, 2013).

Besides those visible signs, we also quantified several parameters, such as blood pressure and glucose tolerance. As seen in Fig. 3, 20-weeks-old *Dicer1*<sup>d/d</sup> mutants exhibited a slight increase of blood pressure, which appeared very significantly augmented in older mice (40- and 80-weeks-old). This indicates that *Dicer1* deficiency promotes hypertension, a classical feature of ageing (Buford, 2016).

#### **Altered glucose metabolism in Dicer 1 mutants**

To gain more insights into potential metabolic dysfunctions in *Dicer1* mutants, we first performed glucose tolerance tests in cohorts of 20- (young), 40- (adult) and 80-weeks (aged) old mice. Figure 4 shows that, following intra-peritoneal injection, glucose clearance is more efficient in *Dicer1* deficient animals, regardless of their age (Panels A to C, I and ii). In addition, fasting glycaemia is systematically reduced in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice, whether young, adults or aged (iii). Accordingly, ELISA quantification of plasmatic insulin showed increased insulin secretion in aged *Dicer1* mutants (Fig. 5A), which is associated to insulin resistance visualized during an Insulin Tolerance Test (ITT) (Fig. 5B). These data provide additional evidence of hypoglycemia and type II diabetes associated to premature ageing caused by reduced *Dicer1* expression (Koks et al., 2016).

#### **Adipose tissue dysfunctions in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice**

Such defects in insulin-dependent glucose homeostasis seen in aged *Dicer* mutant animals, in conjunction to reduced body weight (Fig. 2), pointed to changes in the energetic balance towards consumption rather than synthesis or storage of nutrients. SIRT1 is a key regulator of energy production through its involvement in insulin secretion as well as maturation and remodeling of the adipose tissue (Hui et al., 2017). Furthermore, *Sirt1* reduced expression in muscle, liver, brain and adipose tissue has been observed during ageing (Gong et al., 2014). Interestingly, we observed

diminished *Sirt1* expression in the visceral white adipose tissue of *Dicer1* mice (Fig. 6B). Energy metabolism is also controlled by mitochondria in which glucose and lipid degradation enables ATP production, a process that can be impaired by Uncoupling Proteins (UCP). In humans, increased *UCP1* expression in visceral adipose tissue is associated to more efficient glucose uptake, reduced blood glycemia and triglyceride levels, combined to a diminished ratio of visceral / subcutaneous adipose tissue (Lim et al., 2020; Tews et al., 2019). Of note, young (20 weeks-old) *Dicer1* mutant mice exhibit increased *Ucp1* expression in white adipose tissue (Fig. 6C) and similarly to the situation in humans, *Ucp1* expression levels negatively correlates with the ratio visceral / cutaneous adipose tissue (Fig. 6D). Such changes in *Sirt1* and *Ucp1* gene expression in the visceral adipose tissue have been observed in obese patients and might activate an “hyper-metabolism” response in order to adapt to excessive nutrients availability (Lim et al., 2020). However, a chronic hyper activation of the energy metabolism also induces pathogenic situations, such as cachexia upon increased expression of *Ucp1* (Petruzzelli et al., 2014). In addition, activation of the NLRP3 inflammasome drives reduced *Sirt1* expression (Chalkiadaki & Guarente, 2012) and *Ucp1* increased expression is the consequence of ROS production (Han et al., 2016) which suggest that the accumulation of SINEs transcripts (*B1* and *B2* RNAs in mice) could be involved in these processes. As seen in Fig. 6E and F, *B1* and *B2* RNAs accumulate in visceral white adipose tissue, in young as well as in aged *Dicer1* mutants compared to controls. This important observation indicates that this phenomenon is not restricted to the retinal pigment epithelial cells (Kaneko et al., 2011; Kim et al., 2014; Tarallo et al., 2012), but could potentially represent a more conserved mechanism linking reduced *Dicer1* expression, metabolic defects and ageing.

Since *Dicer1* mutants likely exhibit altered metabolic responses in the white adipose tissue, we decided to analyze their behavior in response to high fat diet (HFD) challenge. In these experiments, 10 weeks-old wild-type and *Dicer1*-deficient mice were subjected to an obesogenic diet for 9 weeks. In these conditions, *Dicer1*-deficient mice exhibited a surprising resistance to weight gain and adipose tissue formation (Fig. 7A-C). Unexpectedly, *Dicer1*-deficient animals ingest more food than the littermates controls and have an increased caloric intake (Fig. 7D). In addition, histological examination of the white adipose tissue shows that adipocytes from *Dicer1*-deficient animals are significantly smaller compared to controls (Fig. 7E, F).

Such chronic exposure to an excess of nutrients induced an increased fasting glycemia and blood insulin concentration in wild type mice (Fig. 8A, B), while *Dicer1* animals appeared resistant, maintaining a reduced basal glycemia and exhibiting a limited rise in insulin secretion. Glucose tolerance tests also showed that *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice exhibited a markedly improved glucose clearance even 8 weeks post HFD (Fig. 8C, D).

Because HFD is known to induce inflammatory stress in adipocytes, we quantified by RT-qPCR the expression levels of prominent inflammatory markers. As seen in Figure 9A, *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Il-18* and *Tnf- $\alpha$*  gene expression is markedly increased in the adipose tissue harvested from *Dicer1<sup>d/d</sup>* mice subjected to HFD. Importantly, the expression of *B1* and *B2* RNAs also appeared increased in these samples (Fig. 9B).

Finally, we sought to obtain a comprehensive view (using RNAseq approach) of the changes in gene expression that occur in adipocytes during ageing and the concomitant impact of reduced *Dicer1* expression. A first hint into global transcriptomic changes is illustrated by the Volcano plots in Figure 10. Panel A shows that ageing (in that case between 20 to 80 weeks) of adipocytes in control (wild-type) mice is accompanied by the statistically significant ( $P_{adj} < 0.01$ ) up regulation (2 fold) of 31 genes and down modulation (2 fold) of 52 genes. In contrast, 792 genes are upregulated and 151 down modulated in the aged compared to young *Dicer1<sup>d/d</sup>* mice (Panel B). Interestingly, only 9 genes are differentially expressed between 20 weeks-old *Dicer1* mutants compared to controls, clearly showing that the mutation has almost no impact in this tissue in young animals (Panel C). This is in sharp contrast to the comparison between aged (80 weeks-old) *Dicer1<sup>d/d</sup>* and controls (Panel D), which reveals that the expression of 747 genes is increased while that of 99 genes is reduced. To stratify some of the relevant genes which exhibit differential gene expression, we used heatmap representations and performed Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Qiagen) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, <http://www.webgestalt.org/>). Using these tools, we first managed to highlight several genes involved in ageing of wild-type adipocytes (Fig. 11), among which HNF4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha) and Pyruvate Kinase L/R (PKLR) that participate in the Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) Signaling and are down-regulated in aged mice. Of note, reduced *Hnf4a* expression has been noted in pancreatic islet of aged rats (Sandovici et al., 2011). Because of the limited amount of differentially expressed genes, GSEA did not allow to identify specific enrichment in gene sets, which likely indicates that 80 week-old does probably not really correspond to an advanced age in these wild-type mice. The second dataset that we analyzed compared aged to young *Dicer1<sup>d/d</sup>* mice (Fig. 12). IPA revealed, amongst the top affected pathways, the Apelin signaling pathway ( $p = 1.44E-4$ ). Given the role of the adipokine Apelin and its receptor in age-related diseases (Luo, Han, & Xu, 2020; Vinel et al., 2018), reduced expression of both genes in aged *Dicer1*-deficient adipocytes appears particularly relevant and interesting. Additionally, GSEA pointed to significant ( $FDR < 0.05$ ) negative Normalized Enrichment Scores (NES) for gene sets involved in biological processes (such as ossification, tissue migration or response to wounding) which reflects an ongoing ageing process. For instance, the gene set involved in ossification (NES = - 2.31; FDR = 0.0019949) includes Leptin (*Lep*), Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (*Sparc*), Noggin (*Nog*), Collagen, type I, alpha 1 (*Col1a1*), Refilin B (*Rflnb*), Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2

(Trp53inp2), Asporin (Asp) and cAMP responsive element binding protein 3-like 1 (Creb3l1). We also noted the down modulation of several genes encoding extracellular matrix components (Collagens, Tenascin C), which is also a hallmark of ageing (Birch, 2018). Altogether, these data point to premature ageing phenotype in these mutant mice, as a result of reduced expression of many genes involved in tissue renewal and homeostasis. Finally, we compared the transcriptome of aged mutant adipocytes to that of controls (Fig. 13). IPA highlighted deregulation of metabolic pathways such as gluconeogenesis ( $p=3.7E-5$ ) or glycolysis ( $p=4.2E-4$ ) in mutant adipocytes. Furthermore, many diseases (dermatological, injury) and cellular functions (cellular maintenance and proliferation) which were identified by IPA in this dataset are evocative of ageing-associated processes. GSEA also identified negative Normalized Enrichment Scores (NES) for genes involved in immune functions (phagocytosis, cytokine production) or tissue homeostasis, correlating with negative NES indicating abnormal skeleton physiology or immune responses.

## Discussion

### **Dicer1<sup>d/d</sup> mice, a relevant model for ageing studies**

Several animal models have been developed to investigate ageing at the cellular and molecular levels, among which mice exhibit many advantages like its physiological and genetic similarities with humans. However, genetically engineered mice with modified (reduced or increased) lifespan either mimic extreme phenotypes (such as progeroid syndromes which are very rare in humans) or affect targeted functions (such as inflammation, metabolism or DNA repair) or specific organs (adipose tissue, liver) (Koks et al., 2016). Dicer1-deficient mice appear as an attractive alternative for several reasons: (i) mutant mice exhibit many defects affecting most organs (retina (Wright et al., 2020); joints (Alsaleh et al., 2016); ovaries (Otsuka et al., 2008); skin and adipose tissue (this study)) and, as demonstrated here, are also characterized by reduced lifespan (Fig.1 and 2). Interestingly, a mutant mouse expressing a constitutively phosphorylated form of DICER1 also exhibits premature ageing (Aryal et al., 2019). Of course, more investigations will be necessary to explore in more details phenotypes (like kyphosis or hypertension) observed in aged Dicer1<sup>d/d</sup> mice. These future studies will enable a better understanding of age-related pathologies (osteoarthritis, cardio-vascular diseases) of major importance in humans. (ii) Dicer1<sup>d/d</sup> mice are hypomorphic, which means that the animals exhibit only a reduced *Dicer1* expression. Indeed, gene deletions are uncommon in humans, in which diversity is more caused by genetic variations and subsequent changes in gene expression and / or activity. Additionally, the mutation induces inter-individual variability; while such variations make the analysis of Dicer1<sup>d/d</sup> mice complex and costly (requiring large cohorts), they mimic the wide spectrum of age-related phenotypes in humans in which ageing is not an evolution with stereotypic features. (iii) The dynamic of appearance of the phenotypes seen in Dicer1<sup>d/d</sup> mice is evocative of an

accelerated, progressive ageing. Indeed, we could calculate that 50% of *Dicer1*-deficient mice can reach an age (80 weeks) which is equivalent to 62 years for humans (Dutta & Sengupta, 2016), while 50% of the controls can reach 120 weeks (92 years for humans). This likely represents the physiological evolution and diversity seen in human populations.

Nevertheless, the mechanism by which *Dicer1*-reduced expression triggers premature ageing remains to be fully elucidated. A first clue is the overexpression of *B1* and *B2* RNAs detected in adipocytes of *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice fed with a lipid-rich diet (Fig. 9). This observation, in line with those performed in retinal epithelial pigment cells (Kaneko et al., 2011; Kim et al., 2014; Tarallo et al., 2012), suggests that non-canonical functions of DICER1 (Alu sequences processing) could participate in the inflammatory setting of adipocytes and mediate the inflammaging phenotype. Alternatively, reduced *Dicer1* expression also entails an impairment of nuclear DICER1 functions, such as the maintenance of telomeres or the response to DNA damages (Burger & Gullerova, 2015), whose dysfunction might also drive cellular senescence. Finally, the canonical role of DICER1 (i.e, the maturation of miRNAs) is certainly an important player in the accelerated aging seen in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice. This is visualized by the large number of deregulated genes in aged adipocytes harvested from aged mutant mice compared to controls. Indeed, many of these genes might be under transcriptional control by miRNAs, as demonstrated by others (Mori et al., 2014).

### **Transcriptomic analyses of adipocytes highlight multiple pathways involved in ageing**

Adipocytes have long been under-estimated and explored for their energy storage functions only. Yet, the adipose tissue represents an important proportion (20%, depending on age, sex) of the total body mass in humans (Jackson, Janssen, Sui, Church, & Blair, 2012) (30% in mice, depending on strains (Reed, Bachmanov, & Tordoff, 2007)) and is able to secrete many signaling molecules (adipokines) involved in the regulation of multiple processes like wounding (Lee, Song, Lee, Cho, & Kim, 2018), bone density (Reid, Baldock, & Cornish, 2018) or immune responses (Francisco et al., 2018). Furthermore, the relationships between lipid metabolism and age-related disease appear more and more functionally related (Arai, Kamide, & Hirose, 2019). To better characterize the changes that occur in these cells during ageing and the impact of reduced *Dicer1* expression in this process at the molecular level, we performed a transcriptomic analysis by RNAseq. First, we focused on “normal” ageing by comparing gene expression levels between aged (80 weeks-old) and young (20 weeks-old) wild-type mice (Fig. 11). Setting the cutoff for significant changes to a  $p \text{ adj} < 0.01$  and a fold change  $> 2$  and  $< -2$ , we found few (83) modulated genes, which likely indicates that 80 weeks does not correspond to old animals, but rather to “mature adults” which are not so different, at least with regards to the adipose tissue, from 20 weeks-old, “young adults”. Nevertheless, we observed that the top pathways which were predicted to be deregulated by IPA play a role in glucose



metabolism. Importantly, the MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) pathway is among them, in line with premature diabetes and insulin-resistance, two importance features of ageing. We also observed increased expression of several immunoglobulin-encoding genes, possibly reflecting the accumulation of B cells in the adipose tissue during ageing, as reported previously (Camell et al., 2019). Interestingly, GSEA highlighted the reduced expression of many genes encoding components of the extracellular matrix (Tenascin C, various Collagens, Asporin) in *Dicer1<sup>d/d</sup>* mice. Such alterations drive probably the most visible effect of ageing in humans, the loss of skin elasticity and the appearance of wrinkles. Surprisingly, the comparison of young *Dicer1* mutants and age-matched controls (Fig. 13) reveal almost no difference (8 differentially expressed genes), except an over expression of *Irf7* and *Ifit1* genes, evocative of an interferon signature that we described earlier (Ostermann et al., 2012). Transcriptomic differences were much more marked when we compared aged and young *Dicer1<sup>d/d</sup>* adipocytes (Fig. 12) and highlighted several deregulated genes (*Nrep*, *Fabp3*, *Col1a1*, *H1f2*, *Lyz1*, *Col3a1*, *B2m*, *S100a4*) common to human, rat and mouse which are listed in the Human Ageing Genomic Resources database (<https://genomics.senescence.info/>) (de Magalhaes, Curado, & Church, 2009). Several deregulated metabolic pathways were identified by IPA (i.e neoglucogenesis), as well as the Apelin signaling cascade. Indeed, reduced expression of Apelin and its receptor have been recently described as important events promoting senescence (Zhou, Chen, Tang, Guo, & Li, 2018). Finally, we analyzed the impact of *Dicer1*-reduced expression in aged animals (Fig. 14). Firstly, we noted that most genes were up-regulated (Fig. 10), reflecting the reduced expression of miRs (which exhibit essentially negative regulatory roles) as a result of low DICER1 levels. Next, IPA confirmed the deregulation of metabolic pathways that occurs in *Dicer1*-deficient aged animals and GSEA confirmed the negative enrichment of genes participating in extracellular matrix and phenotypes (immune, bone-related), reflecting an overall degradation of major physiological functions and premature ageing.

### **Delaying ageing and the occurrence of age-related diseases.**

According to the United Nations Department of Social and Economic Affairs, the proportion of elderly is constantly increasing in developed countries. This ageing population is at risk to develop chronic diseases, such as cardiovascular, rheumatic and neurodegenerative conditions, thereby creating a massive economic burden to the social security systems. Hence, the development of drugs enabling enhanced lifespan, in the absence of age-related diseases is a major challenge and the focus of intense research. To this end, rejuvenation strategies are considered and can be divided into two main categories: (i) those that are based on dietary restriction and (ii) the ablation of senescent cells by chemotherapy (senolytics) (Mahmoudi, Xu, & Brunet, 2019). In this work, we showed that high fat diet (HFD) promoted enhanced inflammatory genes expression in *Dicer1* mutant mice (Fig. 9).

Concomitantly, we observed that *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice are also resistant to adipogenesis and weight gain in these conditions (Fig. 7) and are still able to control their glycemia better than wild-type animals (Fig. 8). These contrasting observations will require additional investigations, like a quantification of lipid absorption in the intestinal lumen. However, they can be connected to recent observations in humans suggesting that a reduced BMI is associated to a greater risk of mortality in elderly (Winter, MacInnis, Wattanapenpaiboon, & Nowson, 2014). In this work, neither did we evaluate the impact of HDF on mortality in *Dicer1* mutants, nor the consequences of diet restrictions. These experiments will have to be performed in the future.

An important message from our transcriptomic analyses is the potential impact of adipokines on the accelerated ageing seen in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice. Indeed, in addition to Apelin and its receptor, the genes encoding Leptin, Resistin, Chemerin are also down modulated in aged mutant animals. These observations suggest that, in addition to senolytics (Xu et al., 2018) or anti-inflammatory molecules (Neves & Sousa-Victor, 2020), the modulation of physiological processes such as food intake or energy expenditure by adipokines (which also possess some neuroprotective activities (Arnoldussen, Kiliaan, & Gustafson, 2014)) might become an attractive pharmacological tool to enhance lifespan in healthy conditions. .

In conclusion, our work enabled us to provide a comprehensive description of the functions of *Dicer1* in adipocytes and during ageing. Although still imperfectly characterized, *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice represent a physiologically-relevant model to thoroughly investigate ageing *in vivo* and evaluate the efficacy of molecules which will be used in humans to postpone the occurrence of age-related diseases.

## Materials and Methods

### Figure legends

**Figure 1: *Dicer1* mutant mice exhibit visible phenotypes evocative of premature ageing.** **A.** The survival of a cohort of 62 wild-type (*Dicer1*<sup>+/+</sup>) and 60 mutant (*Dicer1*<sup>d/d</sup>) mice was followed for 80 weeks. **B.** The occurrence of ulcerative dermatitis was quantified and expressed as a percentage (%) of mutant (60) and control (65) animals showing the phenotype. **C.** Kyphosis in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice (bottom) is shown by a red arrow. **D.** Conjunctivitis in *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice (bottom). Control mice (*Dicer1*<sup>+/+</sup>) are shown in the top pictures. In A and B, data were analyzed with the Logrank test. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

**Figure 2: Reduced weight and adipose tissue in aged *Dicer1* mutant mice.** **A.** Weight (expressed in grams, g) was measured for 30 controls (*Dicer1*<sup>+/+</sup>) and 30 mutants (*Dicer1*<sup>d/d</sup>) for 100 weeks. **B.** The amount of adipose tissue (expressed as a percentage of the total body weight) was quantified in 20

weeks-, 40 weeks- and 80 weeks-old control ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutant ( $Dicer1^{d/d}$ ) mice following necropsy. In A and B, data were analyzed by comparing two datasets with a Mann-Whitney U test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 3: Hypertension in aged Dicer1 mutant mice.** Systolic blood pressure (expressed in mmHg) was measured with the tail-cuff method in 20 weeks-, 40 weeks- and 80 weeks-old controls ( $Dicer1^{+/+}$ , N=4) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ , N=4). Data were analyzed with a Student's t test. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**Figure 4: Dicer1 mutant mice exhibit improved clearance in a Glucose tolerance test.** **A.** Glucose tolerance assay performed in control ( $Dicer1^{+/+}$ , N=13) and mutant ( $Dicer1^{d/d}$ , N=13) 20 weeks-old mice. (i) After Glucose intraperitoneal (ip) injection, glycemia (expressed in mg/dL) was quantified during a 120 minutes (min) period. (ii) The area under the curve (AUC, expressed in arbitrary units-AU) was calculated. (iii) Quantification of the fasting glycemia (expressed in mg/dL) in the same animals. **B.** Similar experiments were performed in 40 weeks-old mice. **C.** Similar experiments were performed in 80 weeks-old mice.

**Figure 5: Insulin-resistance in Dicer1 mutant mice.** **A.** Quantification of blood insulin (expressed in ng/ml) by ELISA in 40 weeks- (Adults) and 80 weeks-old (Aged) wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ , N=7) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ , N=6 or N=7). **B.** Insulin-Tolerance Test (ITT). Following insulin ip injection in 20 weeks-, 40 weeks- and 80 weeks-old wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ , N=4) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ , N=4), glucose was quantified in the blood for 120 minutes (min) and expressed as a percentage of the initial Glucose concentration

**Figure 6: Relative gene expression quantified by RT-qPCR in the adipose tissue of wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ).** **A.** Dicer1. **B.** Sirt1. **C.** Ucp1. **E.** B1 RNA. **F.** B2 RNA. **D.** Ucp1 expression was correlated to the ratio between visceral (V) and subcutaneous (S) white adipose tissue for selected controls ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ).

**Figure 7: Dicer1 mutants are resistant to high fat diet.** **A.** Absolute weight (expressed in grams, g) or **B.** expressed as a percentage of the initial weight was measured in 10 weeks-old wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ) mice fed with normal (chow) or high fat (HFD) diet for 9 weeks. **C.** The amount of white adipose tissue (expressed as a percentage of the body mass) was measured in selected wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ) mice at the end of the experiment. **D.** The caloric intake (expressed in kcal/week/mouse) was measured in the course of the experiment for

wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ) animals. **E.** Histological examination of white adipose tissue harvested from a wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutant ( $Dicer1^{d/d}$ ) mouse 9 weeks after high fat diet (HFD) and following hematoxylin/eosin staining. **F.** Quantification of the size (expressed in  $\mu\text{m}$ ) of the adipocytes from control ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutant ( $Dicer1^{d/d}$ ) adipocytes upon HFD. Data were analyzed using Mann Whitney U test. Curves in panels A and B were compared following determination of the area under the curve. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 8: Improved Glucose tolerance in Dicer1 mutants after HFD.** **A.** Fasting glycemia in the blood (expressed in mg/dL) of wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ) animals following normal (chow) or high fat diet (HFD). **B.** Blood insulin (expressed in ng/ml) was quantified by ELISA in the same animals as in A. **C.** Blood glucose (expressed in mg/dL) following glucose ip injection was quantified for 120 minutes (min) in wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ) animals before (week 0) providing a control or a high fat diet (HFD). The right panel shows the area under the curve (AUC, expressed in arbitrary units-AU). **D.** Similar experiments as in C were performed in mice following 9 weeks of normal (chow) or high fat diet (HFD). Data were analyzed with Mann Whitney U test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

**Figure 9: Increased inflammatory signature in Dicer1 mutant adipocytes upon high fat diet.** **A.** relative gene expression of inflammatory genes (*Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Il-18* and *Tnf $\alpha$* ) in the adipose tissue harvested from wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ) animals following normal (chow) or high fat diet (HFD). **B.** relative quantification of *Dicer1*, *B1* and *B2* transcripts in the same conditions as in A.

**Figure 10. Transcriptomic analysis of adipocytes harvested from young and aged wild-type ( $Dicer1^{+/+}$ ) and mutants ( $Dicer1^{d/d}$ ) animals.** **A.** Volcano plot showing the comparison of aged (Ag, 80 weeks-old) and young (Y, 20 weeks-old) wild-type (WT) adipocytes. **B.** Volcano plot showing the comparison of aged (Ag) and young (Y)  $Dicer1^{d/d}$  adipocytes. **C.** Volcano plot showing the comparison of young (Y)  $Dicer1^{d/d}$  and wild-type (WT) adipocytes. **D.** Volcano plot showing the comparison of aged (Ag)  $Dicer1^{d/d}$  and wild-type (WT) adipocytes. Genes exhibiting significant ( $p < 0.05$ , with  $\log_2$  Fold Change  $> 1$  and  $< -1$ ) overexpression are shown in green, those which are downregulated in red.

**Figure 11. Bioinformatic analysis of the transcriptome of aged (Ag, 80 weeks-old) and young (Y, 20 weeks-old) wild-type (WT) adipocytes.** **A.** Heatmap representation. Overexpressed genes are shown in green, down modulated ones in red. **B.** Schematic representation of the Maturity Onset Diabetes

of the Young (MODY) predicted by Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Down modulated genes are shown in green.

**Figure 12. Bioinformatic analysis of the transcriptome of aged (Ag, 80 weeks-old) and young (Y, 20 weeks-old) *Dicer1*<sup>d/d</sup> adipocytes.** **A.** Heatmap representation of the top 100 genes with significant different gene expression. **B.** Schematic representation of the Apelin (APLN) pathway predicted by IPA. **C.** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showing significant (FDR<0.05) negative Normalized Enrichment Scores of biological processes.

**Figure 13. Bioinformatic analysis of the transcriptome of young (Y, 20 weeks-old) *Dicer1*<sup>d/d</sup> adipocytes compared to age-matched controls (*Dicer1*<sup>+/+</sup>).** Heatmap representing genes with statistically different expression patterns.

**Figure 14. Bioinformatic analysis of the transcriptome of aged (80 weeks-old) *Dicer1*<sup>d/d</sup> adipocytes compared to age-matched controls (*Dicer1*<sup>+/+</sup>).** **A.** Heatmap representation of the top 100 genes with significant different gene expression. **B.** Top 5 enriched diseases (top) and molecular functions (bottom) predicted by IPA. **C.** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showing significant (FDR<0.05) negative Normalized Enrichment Scores of Biological processes (top) and Phenotype (bottom).

**Table I: Clinical manifestations (a) in live adult males or following necropsy (b).** The number of animals and the corresponding percentage (%) are indicated. NO : non observed. P values were calculated using the exact Fisher's test.

#### **Abbreviations**

#### **Author Contributions**

#### **Acknowledgments**

#### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest

#### **Funding**

Work in our laboratory is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX), the INSERM (UMR\_S 1109), the Institut Universitaire de France (IUF), the University of Strasbourg (IDEX UNISTRA), the European regional development fund (European Union) INTERREG V program (project n°3.2 TRIDIAG) and MSD-Avenir grant AUTOGEN.

#### **References**

- Ahmed, M. S., Ikram, S., Bibi, N., & Mir, A. (2018). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. *Mol Neurobiol*, 55(5), 4417-4427. doi:10.1007/s12035-017-0610-7
- Ailon, T., Shaffrey, C. I., Lenke, L. G., Harrop, J. S., & Smith, J. S. (2015). Progressive Spinal Kyphosis in the Aging Population. *Neurosurgery*, 77 Suppl 4, S164-172. doi:10.1227/NEU.0000000000000944
- Alsaleh, G., Nehmar, R., Bluml, S., Schleiss, C., Ostermann, E., Dillenseger, J. P., . . . Georgel, P. (2016). Reduced DICER1 Expression Bestows Rheumatoid Arthritis Synoviocytes Proinflammatory Properties and Resistance to Apoptotic Stimuli. *Arthritis Rheumatol*, 68(8), 1839-1848. doi:10.1002/art.39641
- Arai, Y., Kamide, K., & Hirose, N. (2019). Adipokines and Aging: Findings From Centenarians and the Very Old. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 142. doi:10.3389/fendo.2019.00142
- Arnoldussen, I. A., Kiliaan, A. J., & Gustafson, D. R. (2014). Obesity and dementia: adipokines interact with the brain. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(12), 1982-1999. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.03.002
- Aryal, N. K., Pant, V., Wasylshen, A. R., Parker-Thornburg, J., Baseler, L., El-Naggar, A. K., . . . Arur, S. (2019). Constitutive Dicer1 phosphorylation accelerates metabolism and aging in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(3), 960-969. doi:10.1073/pnas.1814377116
- Birch, H. L. (2018). Extracellular Matrix and Ageing. *Subcell Biochem*, 90, 169-190. doi:10.1007/978-981-13-2835-0\_7
- Buford, T. W. (2016). Hypertension and aging. *Ageing Res Rev*, 26, 96-111. doi:10.1016/j.arr.2016.01.007
- Buonocore, S., Ahern, P. P., Uhlig, H. H., Ivanov, I., Littman, D. R., Maloy, K. J., & Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*, 464(7293), 1371-1375. doi:10.1038/nature08949
- Burger, K., & Gullerova, M. (2015). Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(7), 417-430. doi:10.1038/nrm3994
- Camell, C. D., Gunther, P., Lee, A., Goldberg, E. L., Spadaro, O., Youm, Y. H., . . . Dixit, V. D. (2019). Aging Induces an Nlrp3 Inflammasome-Dependent Expansion of Adipose B Cells That Impairs Metabolic Homeostasis. *Cell Metab*, 30(6), 1024-1039 e1026. doi:10.1016/j.cmet.2019.10.006
- Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2012). High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab*, 16(2), 180-188. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.003
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*, 16(10), 718-735. doi:10.1038/nrd.2017.116
- Coursey, T. G., Bian, F., Zaheer, M., Pflugfelder, S. C., Volpe, E. A., & de Paiva, C. S. (2017). Age-related spontaneous lacrimal keratoconjunctivitis is accompanied by dysfunctional T regulatory cells. *Mucosal Immunol*, 10(3), 743-756. doi:10.1038/mi.2016.83
- de Magalhaes, J. P., Curado, J., & Church, G. M. (2009). Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*, 25(7), 875-881. doi:10.1093/bioinformatics/btp073
- de Magalhaes, J. P., & Passos, J. F. (2018). Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev*, 170, 2-9. doi:10.1016/j.mad.2017.07.001
- Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*, 152, 244-248. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025
- Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., . . . Madeo, F. (2016). Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med*, 22(12), 1428-1438. doi:10.1038/nm.4222
- Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., & Salvioli, S. (2017). Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab*, 28(3), 199-212. doi:10.1016/j.tem.2016.09.005

- Francisco, V., Pino, J., Gonzalez-Gay, M. A., Mera, A., Lago, F., Gomez, R., . . . Gualillo, O. (2018). Adipokines and inflammation: is it a question of weight? *Br J Pharmacol*, *175*(10), 1569-1579. doi:10.1111/bph.14181
- Fritz, W. A., Lin, T. M., Moore, R. W., Cooke, P. S., & Peterson, R. E. (2005). In utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure: effects on the prostate and its response to castration in senescent C57BL/6J mice. *Toxicol Sci*, *86*(2), 387-395. doi:10.1093/toxsci/kfi189
- Gelfand, B. D., Wright, C. B., Kim, Y., Yasuma, T., Yasuma, R., Li, S., . . . Ambati, J. (2015). Iron Toxicity in the Retina Requires Alu RNA and the NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep*, *11*(11), 1686-1693. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.023
- Gong, H., Pang, J., Han, Y., Dai, Y., Dai, D., Cai, J., & Zhang, T. M. (2014). Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice. *Mol Med Rep*, *10*(6), 3296-3302. doi:10.3892/mmr.2014.2648
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(8), 509-524. doi:10.1038/nrm3838
- Hahnel, E., Lichterfeld, A., Blume-Peytavi, U., & Kottner, J. (2017). The epidemiology of skin conditions in the aged: A systematic review. *J Tissue Viability*, *26*(1), 20-28. doi:10.1016/j.jtv.2016.04.001
- Han, Y. H., Buffolo, M., Pires, K. M., Pei, S., Scherer, P. E., & Boudina, S. (2016). Adipocyte-Specific Deletion of Manganese Superoxide Dismutase Protects From Diet-Induced Obesity Through Increased Mitochondrial Uncoupling and Biogenesis. *Diabetes*, *65*(9), 2639-2651. doi:10.2337/db16-0283
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, *25*, 585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
- Hui, X., Zhang, M., Gu, P., Li, K., Gao, Y., Wu, D., . . . Xu, A. (2017). Adipocyte SIRT1 controls systemic insulin sensitivity by modulating macrophages in adipose tissue. *EMBO Rep*, *18*(4), 645-657. doi:10.15252/embr.201643184
- Jackson, A. S., Janssen, I., Sui, X., Church, T. S., & Blair, S. N. (2012). Longitudinal changes in body composition associated with healthy ageing: men, aged 20-96 years. *Br J Nutr*, *107*(7), 1085-1091. doi:10.1017/S0007114511003886
- Johnson, A. A., & Stolzing, A. (2019). The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. *Aging Cell*, e13048. doi:10.1111/accel.13048
- Kalueff, A. V., Minasyan, A., Keisala, T., Shah, Z. H., & Tuohimaa, P. (2006). Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research. *Behav Processes*, *71*(1), 8-15. doi:10.1016/j.beproc.2005.09.004
- Kaneko, H., Dridi, S., Tarallo, V., Gelfand, B. D., Fowler, B. J., Cho, W. G., . . . Ambati, J. (2011). DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*, *471*(7338), 325-330. doi:10.1038/nature09830
- Kim, Y., Tarallo, V., Kerur, N., Yasuma, T., Gelfand, B. D., Bastos-Carvalho, A., . . . Ambati, J. (2014). DICER1/Alu RNA dysmetabolism induces Caspase-8-mediated cell death in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(45), 16082-16087. doi:10.1073/pnas.1403814111
- Kinser, H. E., & Pincus, Z. (2019). MicroRNAs as modulators of longevity and the aging process. *Hum Genet*. doi:10.1007/s00439-019-02046-0
- Koks, S., Dogan, S., Tuna, B. G., Gonzalez-Navarro, H., Potter, P., & Vandenbroucke, R. E. (2016). Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mech Ageing Dev*, *160*, 41-53. doi:10.1016/j.mad.2016.10.001
- Kunstyr, I., & Leuenberger, H. G. (1975). Gerontological data of C57BL/6J mice. I. Sex differences in survival curves. *J Gerontol*, *30*(2), 157-162. doi:10.1093/geronj/30.2.157
- Lee, B. C., Song, J., Lee, A., Cho, D., & Kim, T. S. (2018). Visfatin Promotes Wound Healing through the Activation of ERK1/2 and JNK1/2 Pathway. *Int J Mol Sci*, *19*(11). doi:10.3390/ijms19113642

- Lim, J., Park, H. S., Kim, J., Jang, Y. J., Kim, J. H., Lee, Y., & Heo, Y. (2020). Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers. *Int J Obes (Lond)*. doi:10.1038/s41366-020-0528-4
- Loukov, D., Naidoo, A., Puchta, A., Marin, J. L., & Bowdish, D. M. (2016). Tumor necrosis factor drives increased splenic monopoiesis in old mice. *J Leukoc Biol*, *100*(1), 121-129. doi:10.1189/jlb.3MA0915-433RR
- Luo, H., Han, L., & Xu, J. (2020). Apelin/APJ system: A novel promising target for neurodegenerative diseases. *J Cell Physiol*, *235*(2), 638-657. doi:10.1002/jcp.29001
- Mahmoudi, S., Xu, L., & Brunet, A. (2019). Turning back time with emerging rejuvenation strategies. *Nat Cell Biol*, *21*(1), 32-43. doi:10.1038/s41556-018-0206-0
- Mori, M. A., Thomou, T., Boucher, J., Lee, K. Y., Lallukka, S., Kim, J. K., . . . Kahn, C. R. (2014). Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *J Clin Invest*, *124*(8), 3339-3351. doi:10.1172/JCI73468
- Neves, J., & Sousa-Victor, P. (2019). Regulation of inflammation as an anti-aging intervention. *FEBS J*. doi:10.1111/febs.15061
- Neves, J., & Sousa-Victor, P. (2020). Regulation of inflammation as an anti-aging intervention. *FEBS J*, *287*(1), 43-52. doi:10.1111/febs.15061
- Ostermann, E., Macquin, C., Krezel, W., Bahram, S., & Georgel, P. (2015). Increased Viral Dissemination in the Brain and Lethality in MCMV-Infected, Dicer-Deficient Neonates. *Viruses*, *7*(5), 2308-2320. doi:10.3390/v7052308
- Ostermann, E., Tuddenham, L., Macquin, C., Alsaleh, G., Schreiber-Becker, J., Tanguy, M., . . . Georgel, P. (2012). Deregulation of type I IFN-dependent genes correlates with increased susceptibility to cytomegalovirus acute infection of dicer mutant mice. *PLoS One*, *7*(8), e43744. doi:10.1371/journal.pone.0043744
- Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., . . . Han, J. (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*, *27*(1), 123-134. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.014
- Otsuka, M., Zheng, M., Hayashi, M., Lee, J. D., Yoshino, O., Lin, S., & Han, J. (2008). Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest*, *118*(5), 1944-1954. doi:10.1172/JCI33680
- Petruzzelli, M., Schweiger, M., Schreiber, R., Campos-Olivas, R., Tsoli, M., Allen, J., . . . Wagner, E. F. (2014). A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab*, *20*(3), 433-447. doi:10.1016/j.cmet.2014.06.011
- Reed, D. R., Bachmanov, A. A., & Tordoff, M. G. (2007). Forty mouse strain survey of body composition. *Physiol Behav*, *91*(5), 593-600. doi:10.1016/j.physbeh.2007.03.026
- Reid, I. R., Baldock, P. A., & Cornish, J. (2018). Effects of Leptin on the Skeleton. *Endocr Rev*, *39*(6), 938-959. doi:10.1210/er.2017-00226
- Sandovici, I., Smith, N. H., Nitert, M. D., Ackers-Johnson, M., Uribe-Lewis, S., Ito, Y., . . . Ozanne, S. E. (2011). Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(13), 5449-5454. doi:10.1073/pnas.1019007108
- Song, M. S., & Rossi, J. J. (2017). Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochem J*, *474*(10), 1603-1618. doi:10.1042/BCJ20160759
- Sun, F. W., Stepanovic, M. R., Andreano, J., Barrett, L. F., Touroutoglou, A., & Dickerson, B. C. (2016). Youthful Brains in Older Adults: Preserved Neuroanatomy in the Default Mode and Salience Networks Contributes to Youthful Memory in Superaging. *J Neurosci*, *36*(37), 9659-9668. doi:10.1523/JNEUROSCI.1492-16.2016
- Tarallo, V., Hirano, Y., Gelfand, B. D., Dridi, S., Kerur, N., Kim, Y., . . . Ambati, J. (2012). DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell*, *149*(4), 847-859. doi:10.1016/j.cell.2012.03.036



- Tews, D., Pula, T., Funcke, J. B., Jastroch, M., Keuper, M., Debatin, K. M., . . . Fischer-Posovszky, P. (2019). Elevated UCP1 levels are sufficient to improve glucose uptake in human white adipocytes. *Redox Biol*, *26*, 101286. doi:10.1016/j.redox.2019.101286
- van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, *509*(7501), 439-446. doi:10.1038/nature13193
- Vinel, C., Lukjanenko, L., Batut, A., Deleruyelle, S., Pradere, J. P., Le Gonidec, S., . . . Dray, C. (2018). The exerkin apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat Med*, *24*(9), 1360-1371. doi:10.1038/s41591-018-0131-6
- Wagener, A., Muller, U., & Brockmann, G. A. (2013). The age of attaining highest body weight correlates with lifespan in a genetically obese mouse model. *Nutr Diabetes*, *3*, e62. doi:10.1038/nutd.2013.4
- Winter, J. E., MacInnis, R. J., Wattanapenpaiboon, N., & Nowson, C. A. (2014). BMI and all-cause mortality in older adults: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, *99*(4), 875-890. doi:10.3945/ajcn.113.068122
- Wright, C. B., Uehara, H., Kim, Y., Yasuma, T., Yasuma, R., Hirahara, S., . . . Gelfand, B. D. (2020). Chronic Dicer1 deficiency promotes atrophic and neovascular outer retinal pathologies in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(5), 2579-2587. doi:10.1073/pnas.1909761117
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., . . . Kirkland, J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*, *24*(8), 1246-1256. doi:10.1038/s41591-018-0092-9
- Yoshikawa, T., Otsuka, M., Kishikawa, T., Takata, A., Ohno, M., Shibata, C., . . . Koike, K. (2013). Unique haploinsufficient role of the microRNA-processing molecule Dicer1 in a murine colitis-associated tumorigenesis model. *PLoS One*, *8*(9), e71969. doi:10.1371/journal.pone.0071969
- Zhou, Q., Chen, L., Tang, M., Guo, Y., & Li, L. (2018). Apelin/APJ system: A novel promising target for anti-aging intervention. *Clin Chim Acta*, *487*, 233-240. doi:10.1016/j.cca.2018.10.011

Figure 1

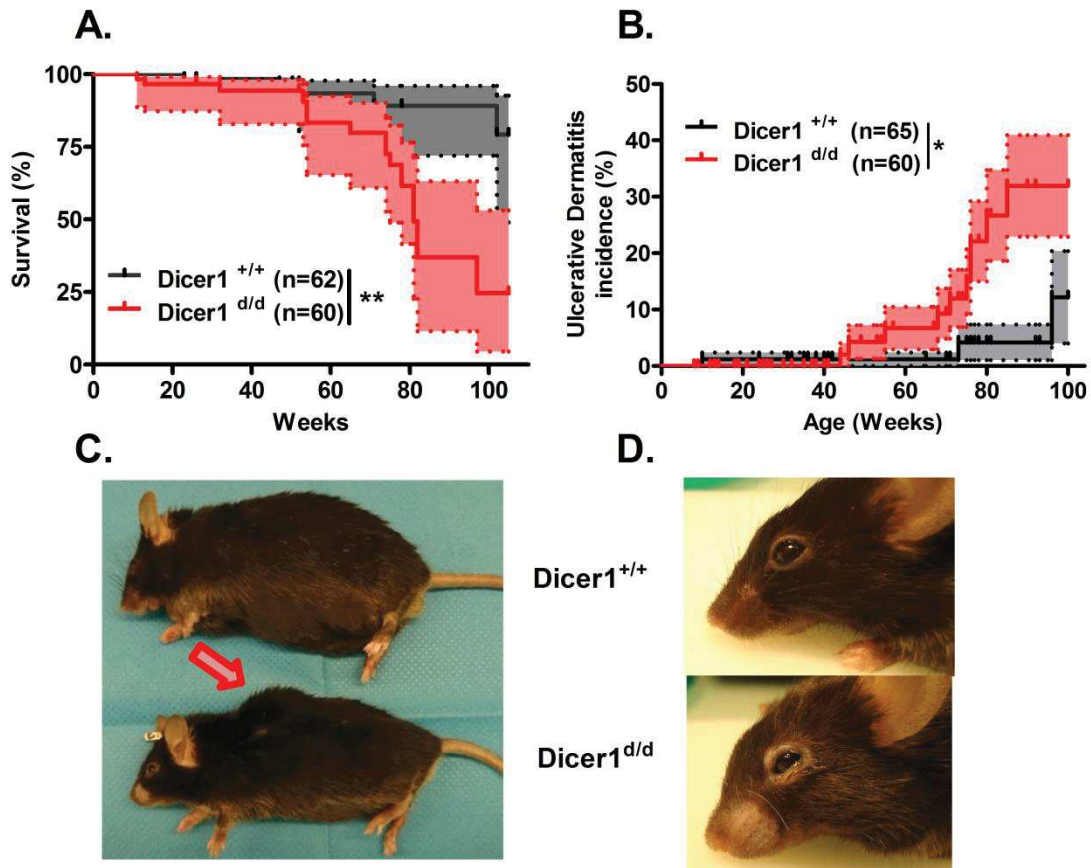


Figure 2

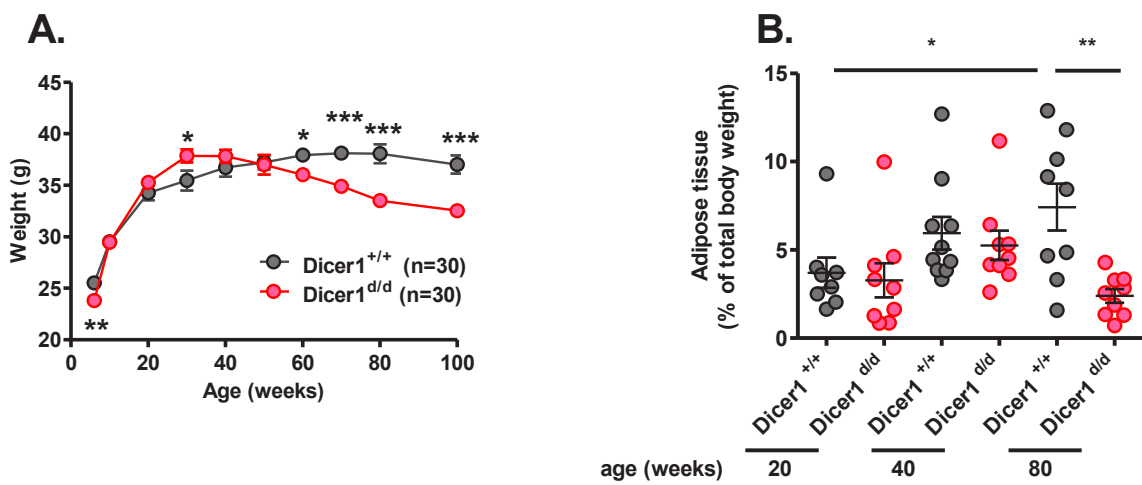


Figure 3

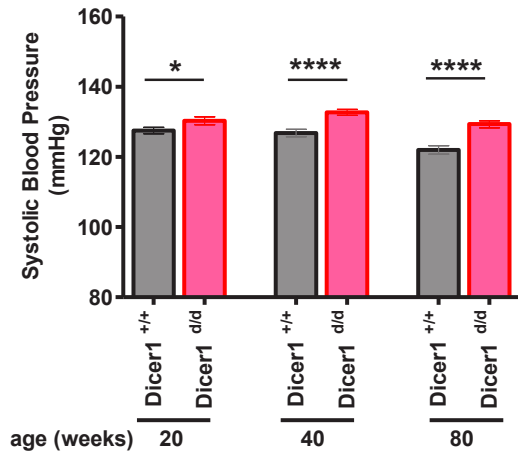


Figure 4

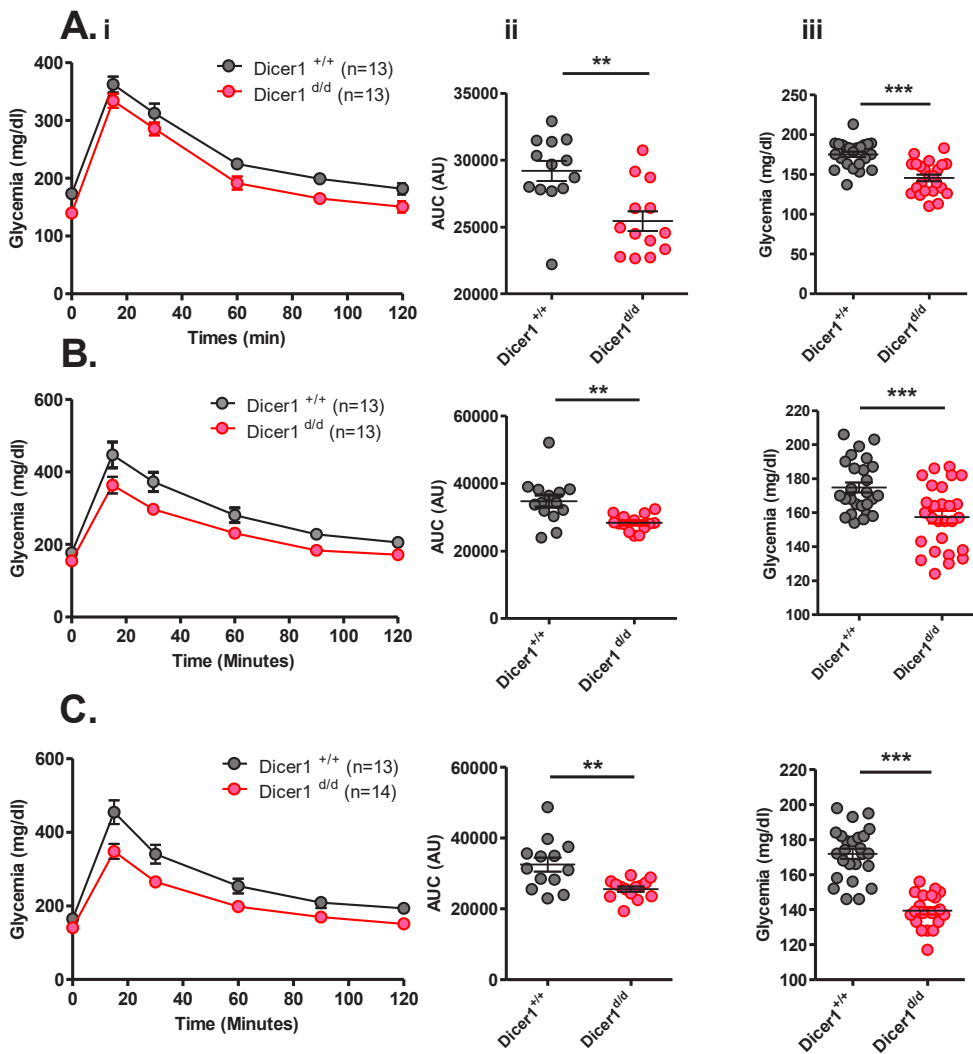


Figure 5

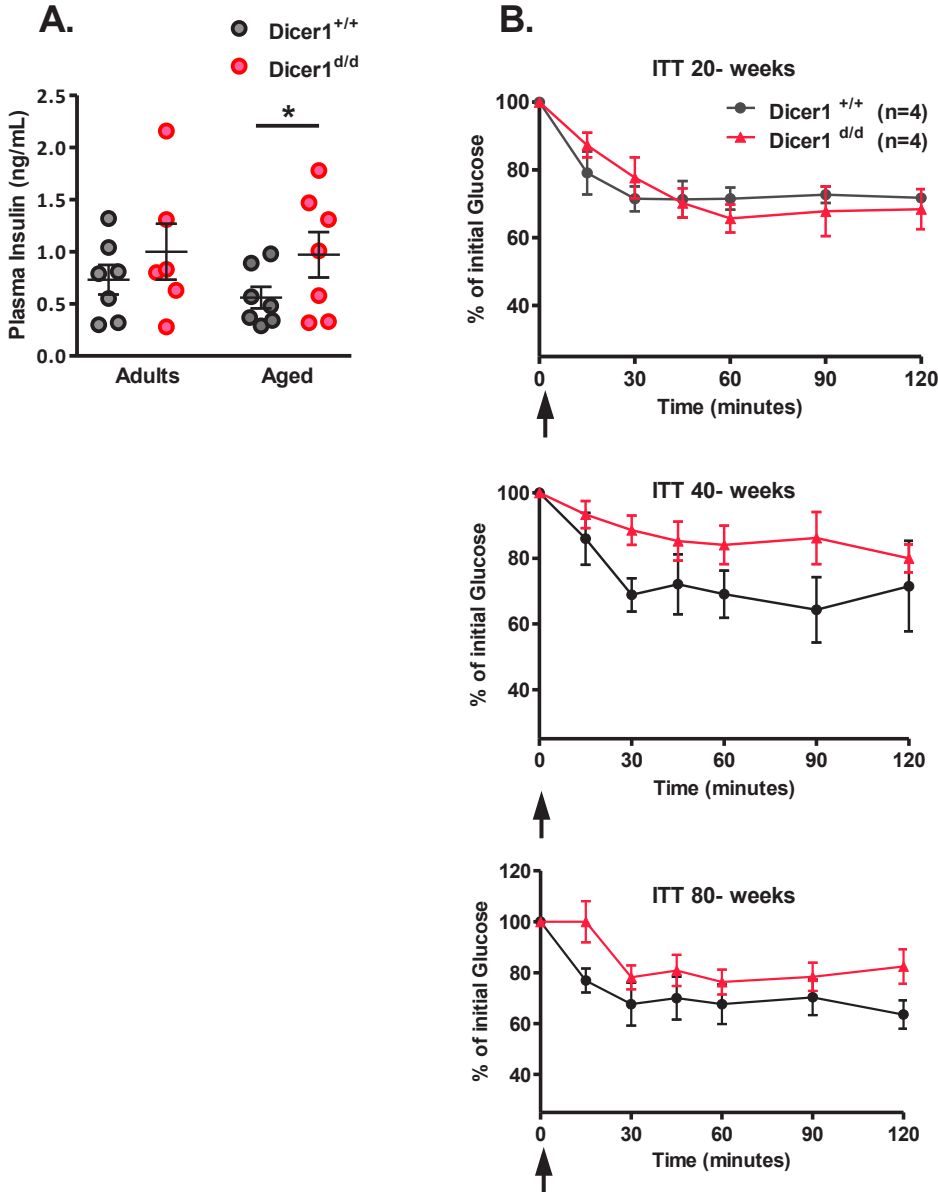


Figure 6

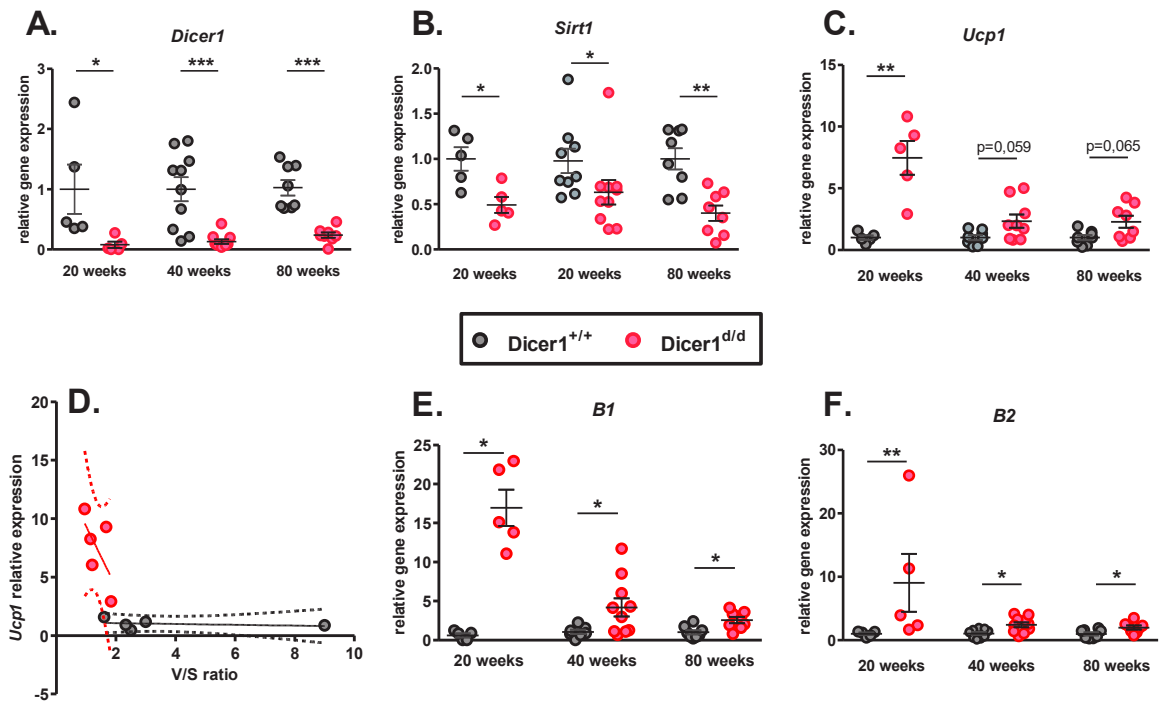


Figure 7

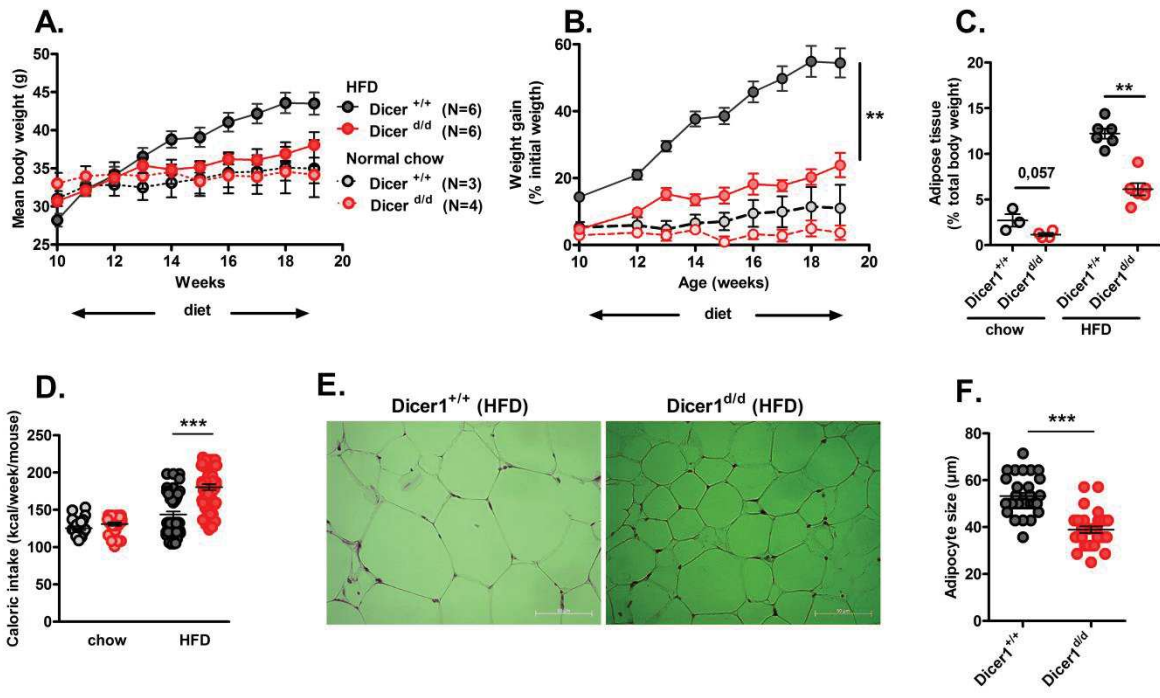


Figure 8

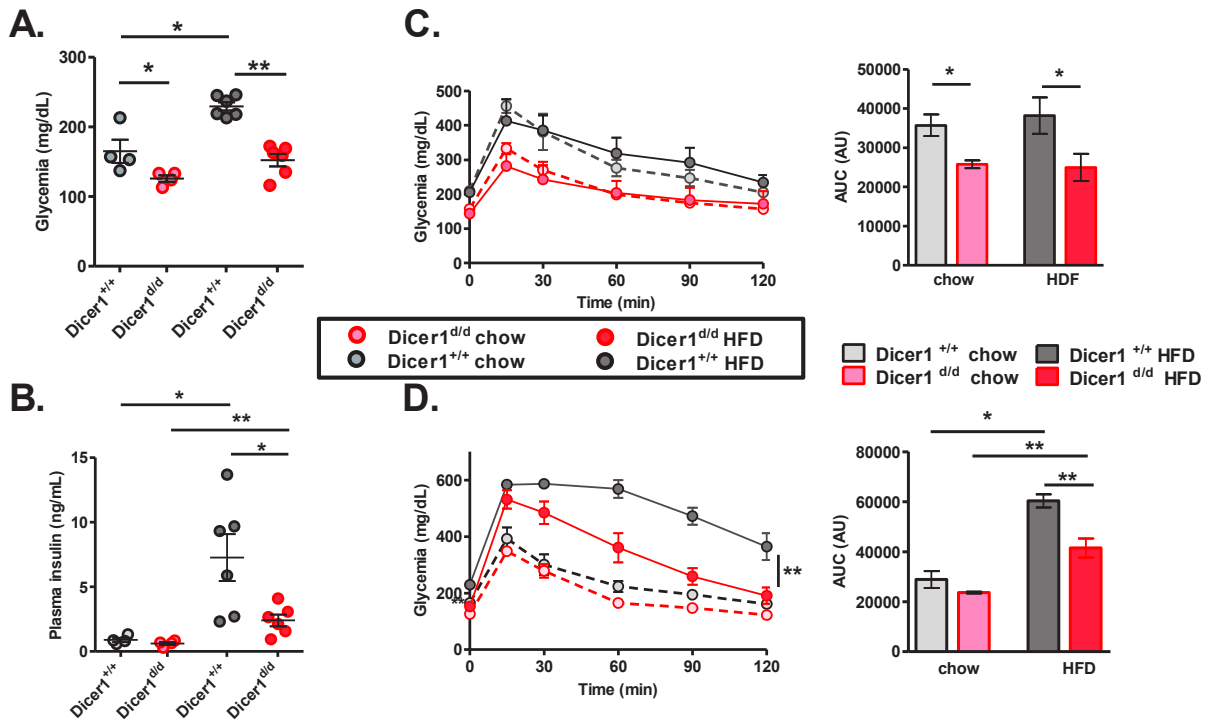


Figure 9

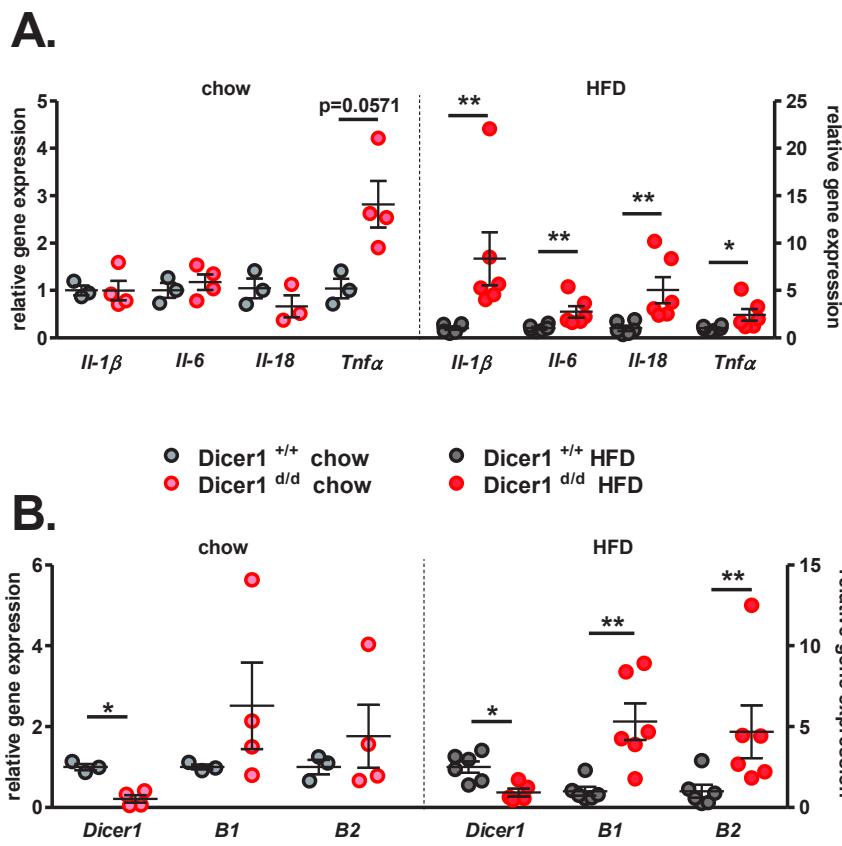


Figure 10

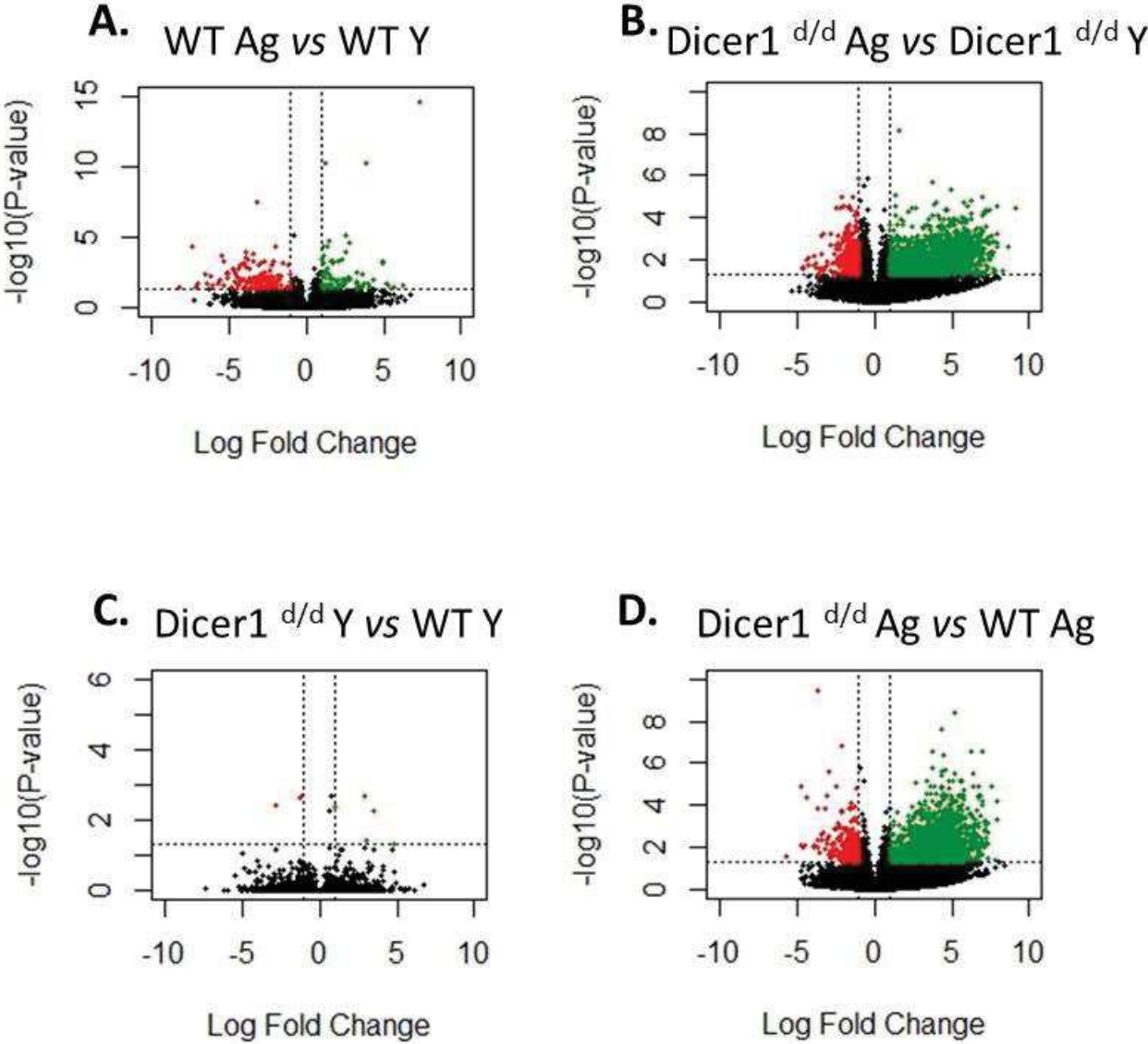


Figure 11

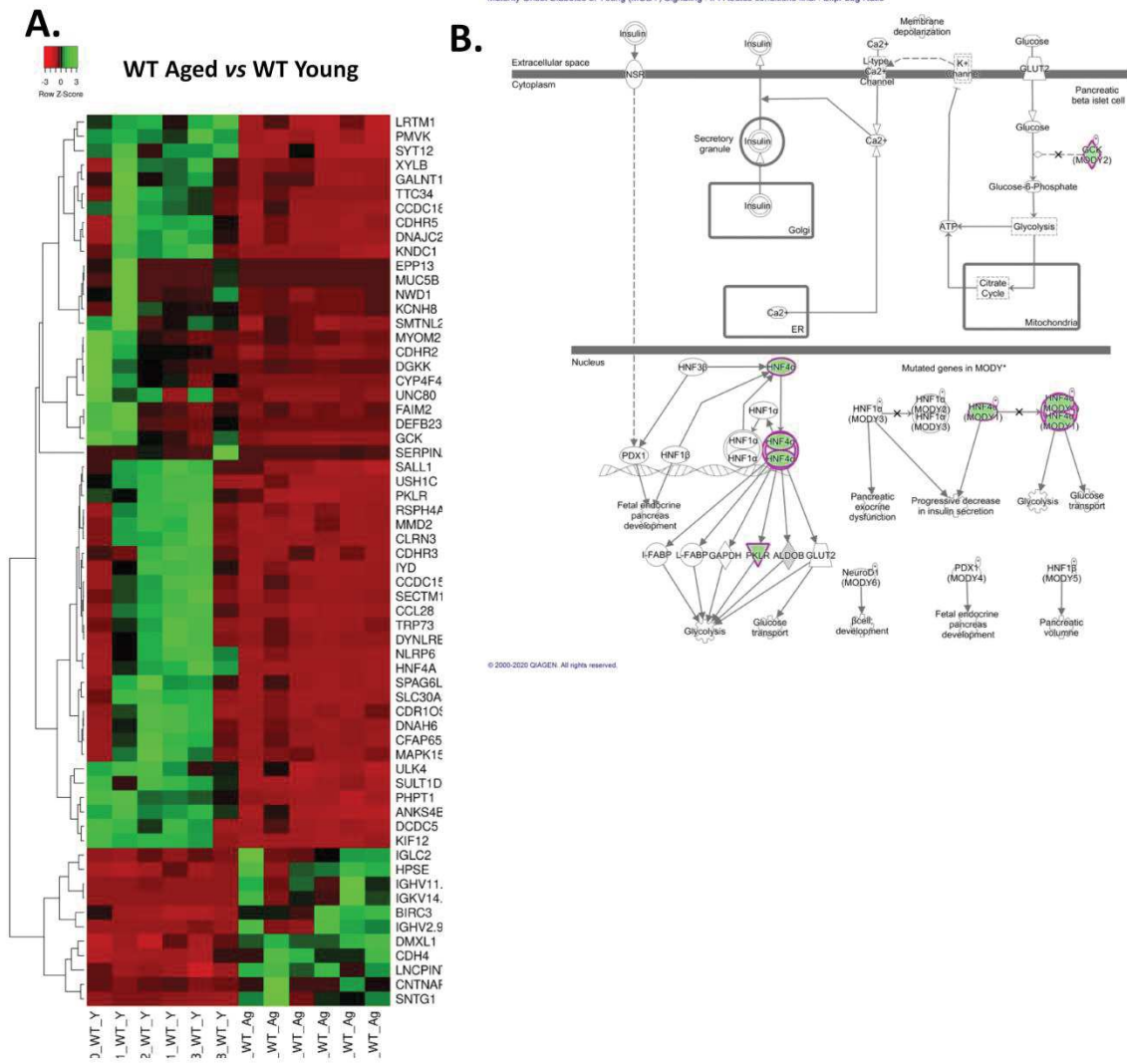




Figure 12

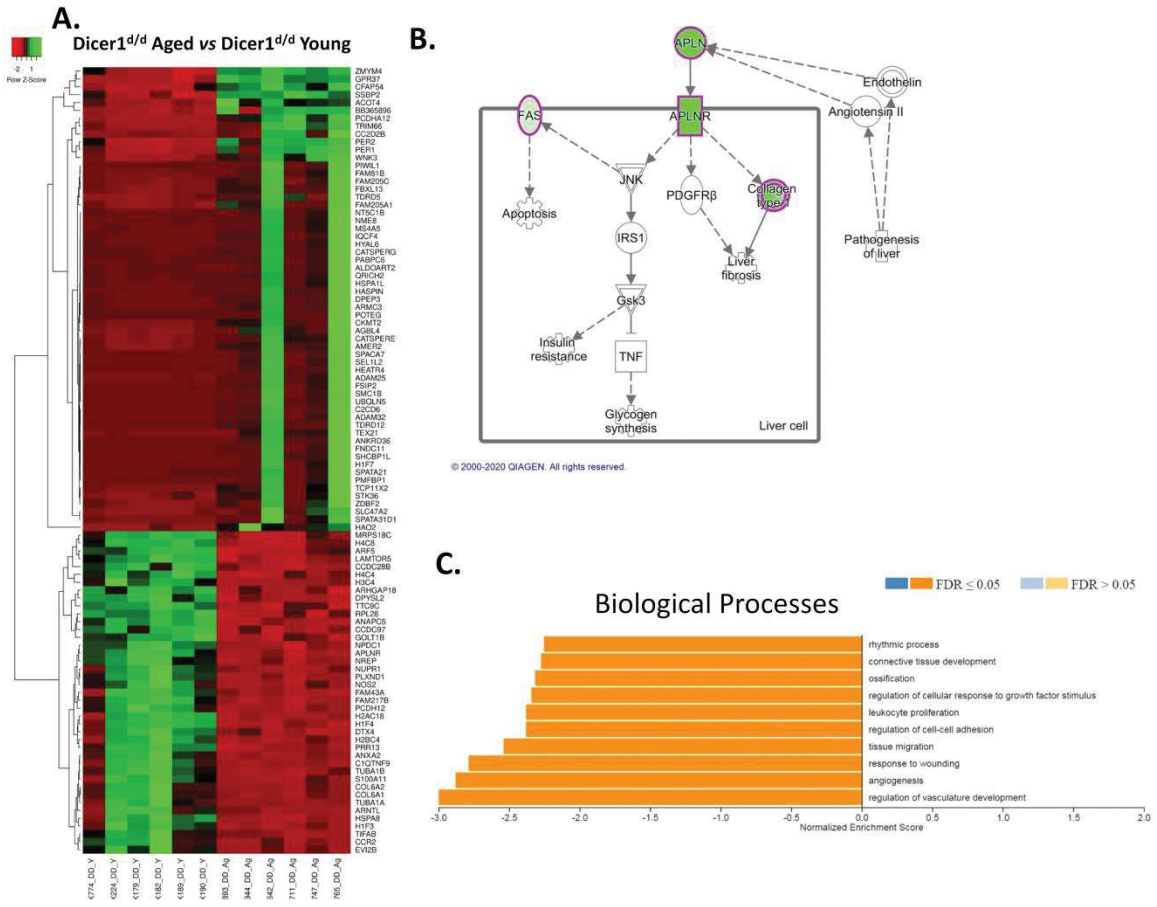


Figure 13

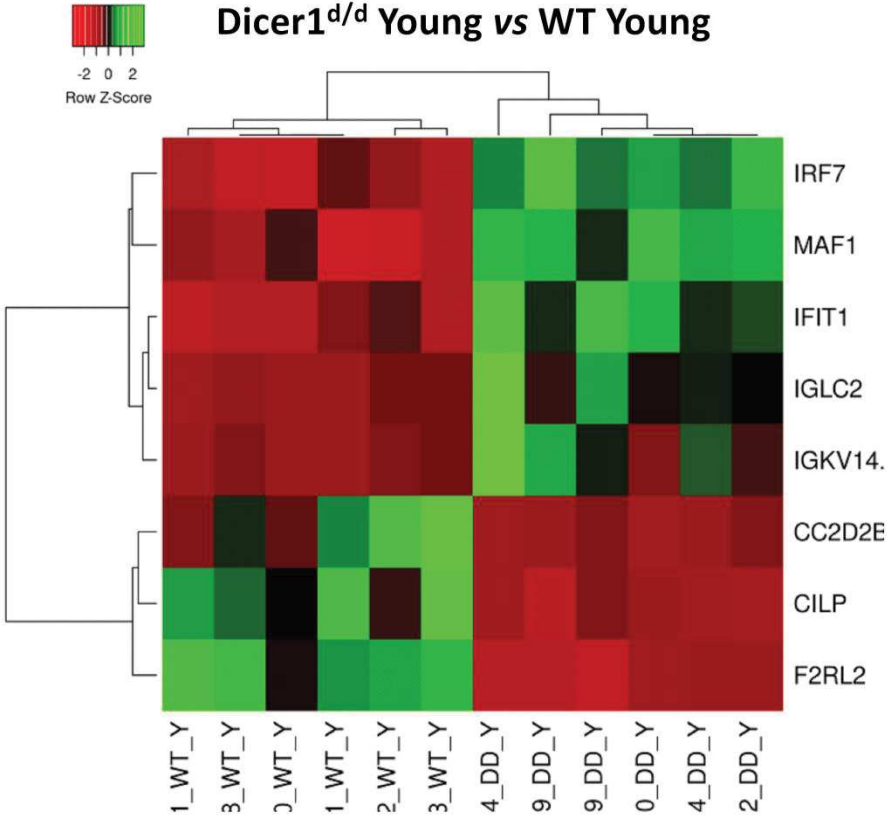


Figure 14

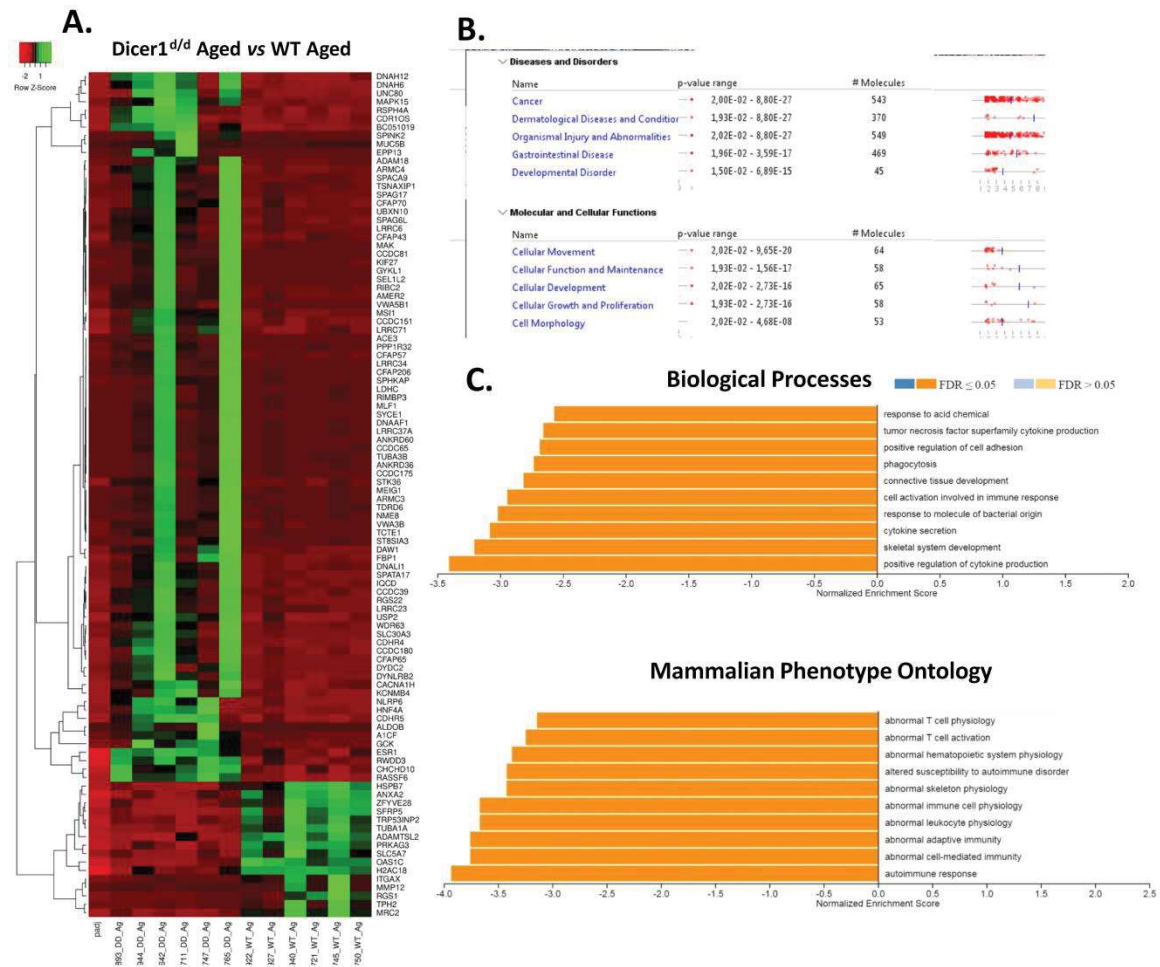


Table 1

Pathologies	35-40 weeks			75-80 weeks		
	Dicer1 <sup>+/+</sup> (N=107)	Dicer1 <sup>d/d</sup> (N=98)	p value	Dicer1 <sup>+/+</sup> (N=65)	Dicer1 <sup>d/d</sup> (N=60)	p value
Alopecia (a)	24 (22%)	25 (25%)	0.623	16 (24%)	14 (23%)	1
Rectal prolapse (a)	2 (2%)	4 (4%)	0.428	3 (4%)	3 (5%)	1
Kyphosis (a)	NO	NO	1	NO	19 (32%)	1.514e-7
Ulcerative dermatitis (a)	NO	2 (2%)	0.227	3 (4%)	14 (23%)	0.00321
Conjunctivitis (a)	NO	5 (5%)	0.02364	2 (3%)	11 (19%)	0.00696
	Dicer1 <sup>+/+</sup> (N=33)	Dicer1 <sup>d/d</sup> (N=31)		Dicer1 <sup>+/+</sup> (N=21)	Dicer1 <sup>d/d</sup> (N=18)	
Splenomegaly (b)	NO	2 (6%)	0.2307	2 (10%)	5 (28%)	0.2155
Cardiomegaly (b)	NO	1 (3%)	0.4844	NO	1 (6%)	0.4615
Enlarged Sem. Vesicles (b)	1 (3%)	4 (13%)	0.1896	4 (19%)	4 (22%)	1

Clinical manifestations (a) in live adult males or following necropsy (b). The number of animals and the corresponding percentage (%) are indicated. NO : non observed. P values were calculated using the exact Fisher's test.



## **Annexe 3: Opinion**

### **Therapeutic Perspectives for Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells in Rheumatoid Arthritis**

Ramzi Nehmar, Alexandre Mariotte, Aurore De Cauwer, Jean Sibilia, Seimak Bahram and Philippe Georgel. Trends in Molecular Medicine (2018)24:4

Cet article décrit le rôle des différents types d'interférons (IFN), très controversé, dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde, une pathologie multifactorielle complexe et dont les réponses aux traitements actuels restent très hétérogènes.

Nous proposons un modèle dans lequel la stimulation de la production d'IFN par l'application cutanée d'une crème contenant de l'Imiquimod limiterait l'infiltration et l'activation des neutrophiles dans l'articulation et limiterait le processus inflammatoire – production de ROS, libération d'auto-antigènes lors de la nétose- à l'origine de l'initiation d'un cercle vicieux entre destruction osseuse et production d'auto-anticorps. Cette régulation locale de la production d'IFN pourrait être efficace dans la polyarthrite rhumatoïde mais également dans d'autres pathologies inflammatoires caractérisées par une activation délétère des neutrophiles, comme la goutte ou les vascularites.



## Opinion

## Therapeutic Perspectives for Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells in Rheumatoid Arthritis

Ramzi Nehmar,<sup>1,2,4</sup> Alexandre Mariotte,<sup>1,2,4</sup> Aurore de Cauwer,<sup>1,2</sup> Jean Sibilia,<sup>1,2,3</sup> Seiamak Bahram,<sup>1,2</sup> and Philippe Georgel<sup>1,2,\*</sup>

**Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial immune disease exhibiting diverse clinical responses to specific therapeutic agents. Such heterogeneity reflects variable activation of signaling pathways. Consequently, RA physiopathology has been linked to many immune cells and factors, with controversial observations for interferons (IFNs). In this opinion article, we review the roles of these cytokines and the cells that produce them in light of recent data: clinical observations showing that expression of IFN-dependent genes does not reflect RA activity and RA mouse models in which the stimulation of IFN-dependent pathways provided disease protection. We suggest that epicutaneous stimulation of the IFN network is an attractive possibility to limit neutrophil infiltration or activation, thus providing therapeutic benefits to RA patients refractory to current therapies.**

### Rheumatoid Arthritis Pathogenesis Is Heterogeneous

Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial disease resulting from genetic, epigenetic, and environmental specificities leading to immune alterations. RA is characterized by swelling, stiffness, and inflammatory pain, mainly in the small joints of hands and feet [1]. In addition, systemic manifestations (such as pulmonary and cardiovascular complications) also contribute to a significant alteration of the quality of life and reduced life expectancy of RA patients [1]. Several MHC Class II alleles such as HLA-DRB1\*0401 and HLA-DRB1\*0404 have been described as major contributors to the disease [2] and genome-wide association studies have identified numerous additional loci (such as *PTPN22*, *PADI4*, *TNFAIP3*) encoding genes that participate in its initiation and/or development [3]. Furthermore, epigenetic regulation of gene expression provided by miRNAs and histone modifications have been recently identified as an additional layer of complexity in the heritability of RA [4]. Finally, environmental exposures to chemical (such as those generated during smoking [5]) or to specific microorganisms (*Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in the oral cavity [6,7], *Prevotella copri* in the gut [8]) also participate in the pathogenesis of RA. The complexity of this disease is also particularly illustrated by the diversity of the currently available RA therapies. Up to now, available therapies include conventional synthetic **disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs)**; see [Glossary](#)) (like methotrexate), biological DMARDs, and more recently also targeted synthetic DMARDs (such as Janus kinase inhibitors; see [Box 1](#)) [9]. Biological DMARDs target several cells types (T cells with cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 mimics, B cells with anti-CD20 antibodies) and signaling molecules – tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) whose modulation with **monoclonal antibody (mAb)** is highly potent, and also IL-1 or IL-17, which may also be usefully targeted in some RA patients

### Highlights

Type I ( $\alpha/\beta$ ) and Type II ( $\gamma$ ) interferons involvement in rheumatoid arthritis is highly controversial.

Type III interferons are secreted by epithelial cells and exhibit potent anti-inflammatory properties.

Interferon properties depend on the immune context (infectious or not) and the cellular microenvironment (containing immune and stromal cells).

Epicutaneous application of imiquimod is a potential therapeutic option for the treatment of neutrophil-driven joint inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, INSERM, IRM UMR-S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 67085 Strasbourg, France

<sup>4</sup>Equal first authors

\*Correspondence: [pgeorgel@unistra.fr](mailto:pgeorgel@unistra.fr) (P. Georgel).

## Box 1. Clinician's Corner

- Despite impressive progresses in the management of RA following the introduction of biological DMARDs, 30–40% of the patients still fail to achieve long-term remission.
- Current conventional synthetic or biological DMARDs are systematically delivered and may induce adverse events such as infections due to global immunosuppression; although highly effective, biological DMARDs represent a huge economic burden to the social security systems in developed countries. In other countries, this high cost might limit the availability of these treatments and thereby creates inequity.
- Like in other rheumatic diseases, RA patients express increased interferon-responsive genes in white blood cells or synovial tissue, a feature dubbed as 'the interferon response'. In RA animal models, the therapeutic potential of Type I and Type II interferons was repeatedly demonstrated. However, clinical trials in humans were unsuccessful in terms of clinical benefit but a subgroup of patients might positively respond to an interferon-based therapy.
- Contrary to Type I and Type II, Type III interferon signaling uses a specific receptor with limited distribution. Therefore, manipulating its expression may restrict the risk of adverse events.
- **Imiquimod**, a TLR7 agonist, triggers Type I and III interferon signaling. A cream containing this compound is approved to treat superficial basal cell carcinoma and genital warts for a limited cost. A clinical trial to evaluate the impact of imiquimod topical application on inflamed small joint refractory to current therapies should be initiated.

[2,10]. The diversity of the patient's responses to these compounds suggests that RA should be perhaps be considered as a syndrome, rather than a single clinical entity [2]. This heterogeneity in RA pathophysiology might also be invoked with regard to the controversial roles of Type I interferons (IFN-I), and the cells that produce them in large amounts, that is, the plasmacytoid dendritic cells (pDCs), in the etiopathology of the disease.

IFN-I is a family of cytokines mainly composed of IFN- $\beta$  and 13 isoforms of IFN- $\alpha$  sharing the same receptor and signal transduction pathway [11]. They are mostly considered as inflammatory cytokines (given their essential roles in antiviral defense mechanisms [12]) and promoters of autoimmunity [13], with the noticeable exception of their action in multiple sclerosis, an inflammatory demyelinating disease for which IFN- $\beta$  is widely used as first-line treatment in relapsing forms [14]. The positive effects of IFN- $\beta$  in multiple sclerosis are attributed to its anti-inflammatory and immunomodulatory properties [15]. Of note, IFN- $\beta$  anti-inflammatory properties are also protective against ischemic stroke [16]. Pathogenic roles of Type I IFNs are also observed, such as in systemic lupus erythematosus (SLE), a prototypical autoimmune/auto-inflammatory disease that is characterized, as in many such diseases, by a marked overexpression of IFN-stimulated genes (ISGs). This overexpression pattern is defined as the so-called **IFN signature** [17]. RA and SLE display several important opposing features: striking differences in their evolution during pregnancy (while a marked relapse and even a remission can be observed in pregnant RA patients, lupus patients experience an increased risk of flares) [18] and the incidence of sex in disease development (both disease preferentially affect women, but while lupus severity is more severe in men compared with women, RA symptoms do not depend on the sex of the patients [19]), likely reflecting major immunological particularities between these two conditions. This suggests that, opposite to SLE for which therapies that aim to reduce IFN signaling might be of interest [20,21], enhancing or increasing IFN signaling might exhibit more potential therapeutic potential in RA. Herein, we will review the possible disadvantages and benefits of IFNs' future therapeutic considerations for RA. To this end, we present a possible model based on recent findings describing the importance of Type I, Type II, and Type III IFNs in light of a possible interplay between keratinocytes, pDCs, and the cellular content in the synovial cavity, with a focus on **natural killer (NK) cells** and neutrophils.

## Evidence for Pathogenic Roles of Type I IFNs and RA

A first glimpse in favor of the potential involvement of IFN-I in RA pathogenesis was suggested by the overexpression of a subset of ISGs in blood cells isolated from preclinical RA patients [in

## Glossary

**Anticitrullinated peptide**

**antibodies:** autoantibodies directed against peptides and proteins that are citrullinated. Citrullination is a post-translational modification of proteins whereby arginine residues are enzymatically converted into citrulline.

**Collagen-induced arthritis (CIA):** a classical procedure to induce autoimmune arthritis in mice through immunization with heterologous (chicken or bovine) collagen II.

**Complete Freund's adjuvant**

**(CFA):** used to produce water-in-oil emulsions of immunogens (collagen II in the case of CIA). Antigens in emulsions stimulate high and long-lasting antibody responses.

**Dendritic epidermal T cells:**

lymphocytes present in the mouse epidermis expressing an invariant V $\gamma$ 3V $\delta$ 1 T cell receptor (TCR). Once activated, dendritic epidermal T cells locally produce cytokines (like IL-17), hence participating in the regulation of skin inflammatory responses.

**Disease modifying antirheumatic**

**drugs (DMARDs):** a set of unrelated molecules used to slow down disease progression in rheumatoid arthritis patients. They are subdivided into two classes: (i) synthetic DMARDs (comprising conventional synthetic DMARDs, such as methotrexate, and target-specific DMARDs, such as Janus kinase inhibitors); and (ii) biological DMARDs (like monoclonal antibodies against TNF- $\alpha$ ) which comprise biological original and biosimilar DMARDs.

**Fibroblast-like synoviocyte (FLS):**

a specialized cell type present in the synovial membrane of the normal joint, responsible for the synthesis of essential components of the synovial fluid (such as hyaluronic acid). In RA patients, FLS proliferation leads to hyperplasia of the synovial membrane. Furthermore, RA FLSs acquire and aggressive phenotype characterized by their capacity to produce pro-inflammatory molecules (e.g., IL-6) and metalloproteases.

**Human TNF- $\alpha$  transgenic mice:**

transgenic mice that over-express human TNF- $\alpha$  and develop an erosive polyarthritis with many characteristics observed in rheumatoid arthritis patients.



which autoantibodies directed against post-translationally modified proteins/peptides including citrullinated (**anticitrullinated peptide antibodies**), carbamylated (anticarbamylated peptide antibodies), and acetylated proteins/peptides (antiacetylated proteins/peptide antibodies) can be detected, in the absence of clinical symptoms], hence supporting this ‘Type I IFN signature’ as a biomarker predictive of arthritis development [22]. While current belief postulates that increased Type I IFN expression contributes to autoimmunity by promoting dendritic cells maturation [23], their exact role in RA pathogenesis is not clearly established. A correlation between ISGs expression levels [quantified in whole blood by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)] and antibodies against citrullinated and carbamylated proteins has been observed [24]; however, increasing evidence to the hypothesis suggests that IFN-I might promote the production of pathogenic autoantibodies. Furthermore, this Type I IFN signature seems now to describe a subgroup of RA patients and does not correlate with disease clinical scores, as evidenced by the absence or correlation of an IFN score (reflecting mean expression of 19 IFN-responsive genes quantified by RT-qPCR in whole blood) and the disease activity score, the occurrence of erosion or autoantibody positivity [25]. Therefore, the position of IFN-I, as a cause or a consequence in RA pathogenesis, is questionable. Additional support for a pathogenic role attributed to IFN-I is provided by clinical observations of RA occurring after pegylated-IFN- $\alpha$  plus ribavirin treatment for cellular hepatocarcinoma in hepatitis C virus (HCV)-infected patients [26]. However, treatment with IFN- $\alpha$  (once the standard of care for HCV infection) may also lead to substantial clinical improvement of HCV-related arthritis [27]. Because these discrepancies may originate from differences in patient’s characteristics, using animal models might provide better, more controlled approaches to tackle this issue. Since polymorphisms in the gene encoding IFN regulatory factor 5 (*IRF5*, an important transcription factor regulating *Irfn-a* genes expression) were previously associated with increased risk of several autoimmune diseases, including RA [28], experimental arthritis was evaluated in mice deficient in this transcription factor involved in IFN-I production. In this model, arthritis induced by arthritogenic K/BxN serum transfer was less pronounced in *Irf5*<sup>-/-</sup> and *Tlr7*<sup>-/-</sup> (which triggers IRF5 activation and nuclear translocation following single-stranded RNA binding) mouse mutants compared with wild-type animals [29]. In addition, **collagen-induced arthritis (CIA)** severity was also reduced in *Tlr7*-deficient mice [30]. This observation also suggested that IFN-I, which is a well-known (but not exclusive) target of Toll-like receptor 7 (TLR7) signaling, may promote RA pathogenesis. Altogether, both human clinical data and mouse experimental observations that favor an arthritogenic effect of IFN-I appear rather scarce and questionable.

### Protective Effects of Type I IFNs in RA

Many observations point, in fact, to protective effects of IFN-I in RA. First, genome-wide association studies performed on 1348 RA patients and 3000 controls have identified protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (*PTPN22*) 1858T (or R620W) allele as the strongest non-human leukocyte antigen (HLA) genetic predisposition factor for RA [31–33]. *PTPN22* is a phosphatase that binds TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3) and promotes TRAF3 Lys63-linked autoubiquitination in bone marrow-derived macrophages after engagement of TLRs [34]. This effect on TRAF3 enables *PTPN22* to mediate production of IFN-I. Transgenic mice with the human *PTPN22*R620W variant (introduced in a murine *Ptpn22* knockout background) fail to promote Type 1 IFN-dependent suppression of arthritis in response to poly I:C injection [34]. **polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)** injection [34]. Multiple experiments have been subsequently performed in mice to evaluate the potential therapeutic benefits of IFN-I with regard to various models of experimental arthritis. To cite a few examples, intra-articular injections of IFN- $\alpha$  protected wild-type mice against methylated bovine serum albumin-induced arthritis [35] and intraperitoneal injection of IFN- $\beta$  reduced arthritis symptoms

**IFN-III:** Type III interferons comprise IFN- $\lambda$ 1 (also named IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL28A), IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), and IFN- $\lambda$ 4 in humans. In mice, only IFN- $\lambda$ 2 and IFN- $\lambda$ 3 are expressed. IFN-III bind to a receptor complex consisting of the specific IFN- $\lambda$  receptor chain 1 associated to the IL-10 receptor chain 2.

**IFN signature:** a specific increased activation of interferon signaling, leading to overexpression on interferon-responsive genes in circulating blood cells.

**Ikaros:** a transcription factor containing a Zinc finger DNA binding motif required for lymphocytes development and differentiation. In mice, Ikaros hypomorphic mutants are characterized by an absence of pDCs in the periphery.

**Imiquimod:** a synthetic compound mimicking single-stranded RNA capable of activating Toll-like receptor 7 and inducing IFN-I synthesis. Under the brand name ‘Aldara’, a cream containing imiquimod is prescribed to treat genital warts and basal cell carcinoma.

**K/BxN serum transfer:** a procedure based on intraperitoneal injection of serum harvested from K/BxN mice (obtained upon crossing transgenic KRN mice in a C57BL/6 background with NOD1 animals) that spontaneously develop arthritis.

**Monoclonal antibody (mAb):** when used to treat rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases, they are named biological DMARDs.

**Natural killer (NK) cells:** cytotoxic innate lymphocytes. Once activated by a combination of cytokines (such as IL-12, IFN-I), they secrete IFN- $\gamma$ .

**Plasmacytoid dendritic cell (pDC):** an innate immune cell particularly responsive to ligands activating endosomal Toll-like receptors and capable of secreting massive amounts of interferons.

**Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C):** a synthetic ligand of Toll-like receptor 3, used to mimic viral infections and inducing IFN-I production.

**NETosis:** neutrophil extracellular trap formation. The process by which neutrophils release their nuclear contents into the extracellular milieu. This results in the formation of fibers formed by decondensed chromatin,

in the **K/BxN serum transfer** mouse model [36] as well as in the CIA mouse model [37]. Furthermore, the beneficial effects of IFN-I on RA evolution were also observed in a non-human primate model, rhesus monkeys: IFN- $\beta$  injected daily subcutaneously reduced soft tissue swelling and redness of the affected joints [38]. While these encouraging results were supported by additional mouse models, such as those carrying a deficiency in the *Irf7* gene in which arthritis induced by K/BxN serum transfer is exacerbated [39], clinical trials aiming at translating this novel therapeutic opportunity to the bedside had disappointing results: at the doses tested, treatment with IFN- $\beta$  in combination with methotrexate three times a week did not have measurable clinical or radiological effects in RA patients [40]. Despite interesting *ex vivo* data explaining the anti-inflammatory effects of IFN-I, whether at the level of the IL-1 receptor [36] or inflammasome repression [41], further explorations of the therapeutic potential of IFN-I have not been pursued, possibly because of its well-known side effects observed in HCV-infected patients [42].

### IFN- $\gamma$ , a Pleiotropic Immunomodulatory Cytokine with Contrasting Effects in RA

The complex immunomodulatory activities of IFN- $\gamma$  on the regulation of RA severity have been known for almost three decades. Indeed, in the adjuvant arthritis rat model, administration of this cytokine could either enhance the severity of the disease when provided 24 h before **complete Freund's adjuvant (CFA)** or reduce the symptoms if injected 48 h after CFA [33], which suggests that IFN- $\gamma$  plays opposite roles at the initiation and during the course of disease in the CIA model. This concept of a biphasic effect of IFN- $\gamma$  was later confirmed in the CIA model in mice [43]. Similar to Type I IFNs, some research has indicated a disease-enhancing role for IFN- $\gamma$  [44], while multiple reports demonstrated its beneficial effects in various RA models (reviewed in [45]). These immunomodulatory effects of IFN- $\gamma$  prompted clinical trials to explore its therapeutic potential; however, IFN- $\gamma$  injections in RA patients provided limited amelioration and intramuscular injections of anti-IFN- $\gamma$  antibodies improved articular symptoms [46], and so this treatment strategy was abandoned. However, research on RA mouse models has continued to elucidate the mechanisms driving the anti-inflammatory effects of IFN- $\gamma$ . CpG-mediated immune-suppressive effects in the K/BxN serum transfer mouse model was shown to involve IL-12-activation of NK cells and their subsequent IFN- $\gamma$  secretion, which inhibited neutrophils recruitment in the joints [47]. More recently, TNF- $\alpha$ -induced necroptosis was reduced and Th17 differentiation was increased in splenocytes obtained from IFN- $\gamma$ -knockout mice compared with wild-type mice [48], highlighting an additional potential mechanism accounting for IFN- $\gamma$ 's anti-inflammatory properties [48]. Altogether, these recent reports provide additional evidence supporting the potential use of IFN- $\gamma$ -based therapies for RA patients.

### Type III IFNs, New Players in RA Pathophysiology

While the clinical interest for IFN-I decreased, a new family of IFNs, Type III IFNs (**IFN-III**), was simultaneously described in mammals. IFN-III members, which comprise IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A), IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), and IFN- $\lambda$ 4 in humans (mice possess only IFN- $\lambda$ 2 and IFN- $\lambda$ 3), bind to a receptor complex consisting of the specific IFN- $\lambda$  receptor chain 1 associated to the IL-10 receptor chain 2 [43]. While the receptor for IFN-I is ubiquitously expressed, the cellular distribution of the IFNs- $\lambda$  receptor is highly restricted and is expressed at the cell surface of dedicated hematopoietic cells (such as pDCs, see below) and epithelial cells [49]. This specificity might partially explain the limited adverse events observed during clinical trials with recombinant IFN- $\lambda$ 1 in HCV-infected patients [50] because IFN-I and IFN-III induce otherwise many overlapping intracellular signaling events. This unique characteristic of IFNs- $\lambda$  makes it an attractive therapeutic tool, including in RA, as has been suggested by other

which are capable of trapping microorganisms. As such, NETosis represents an important defense mechanism against infections. However, excessive or uncontrolled NET formation is also associated with autoimmune diseases and the production of autoantibodies directed for instance against DNA, nucleosomes, or citrullinated histones.

researchers [51]. Indeed, daily intraperitoneal injection of recombinant IFN- $\lambda$ 2 provides remarkable protection, as judged by reduction of disease score and joint swelling in CIA in mice, and even reversal of some joint damage [52]. In this assay, IFN- $\lambda$ 2 was shown to exert its anti-inflammatory properties through reduced neutrophils recruitment in the joints and subsequent lower expression of transcripts encoding IL-1 $\beta$ . In this paper, neutrophils, which express IFN-III receptor, appeared as plausible targets of IFN- $\lambda$ 2 therapy. These observations indicate that IFN-III-based therapies could be of major interest for several autoinflammatory diseases [49]. However, the mechanisms of action of these cytokines still require extensive work to be fully elucidated.

### Plasmacytoid Dendritic Cells: Damaging or Protective in RA?

Consistent with the conflicting activities of IFN-I in RA, dual roles have been attributed to pDCs, which are the main producers of these cytokines. First, reduced numbers of pDCs were observed in the peripheral blood of RA patients [53]. Second, both myeloid and pDCs harvested from RA donors exhibit an immature (inactive) phenotype as judged by reduced expression of cell surface markers CD80 and CD83; pDCs with an immature phenotype are thought to be less capable of responding to environmental triggers, and are poor producers of IFNs. By contrast, pDCs purified from RA patients express IFN- $\alpha$  at higher levels compared with healthy donors. This, together with a reduction in expression of the pro-Th2 cytokine IL-4 by activated pDCs, might contribute to the Th1 imbalance, which characterizes RA patients. Finally, that C-C chemokine receptor type 7 is overexpressed by RA pDCs suggests an increased migration of immature cells from the bone marrow to lymph nodes upon recognition of the chemokines CCL19 and CCL21. This is in agreement with augmented generation of pDC precursors from CD34<sup>+</sup> cells in the bone marrow of RA patients compared with osteoarthritis donors [54]. The reduction of circulating pDC numbers in the blood of RA patients was confirmed in a study in which pDCs were additionally observed in the synovial fluid of RA patients. While remaining fully responsive to TLR agonists, these pDCs exhibited an immature (low CD62L as quantified by flow cytometry) phenotype [55,56]. Infiltration of pDCs in synovial tissue from RA patients was confirmed by immunohistochemical staining and their numbers correlate with anticitrullinated peptide antibody levels [57]. The reduction of circulating pDC, which is nevertheless difficult to reconcile with the 'IFN signature' seen in blood cells isolated from RA patients, might be caused by their preferential migration to arthritic joints. Altogether, these data have been interpreted by us and other researchers [54–56] in favor of a pathogenic role of pDCs, favoring antigenic stimulation and promoting a proarthritogenic cytokinic environment. By contrast, however, pDC mobilization in joint tissues could also be a response to a dangerous inflammatory milieu. In this respect, these cells could be seen as trying to avoid further damages caused by inflammatory cells. This aspect was explored in a mouse arthritis model induced by injection of Th1 polarized, ovalbumin-specific T-cell receptor (TCR) transgenic T cells. In this model, which is characterized by high T-(proliferation) and B- (IgG secretion) cell responses to the joint-specific self-protein collagen II, antibody-mediated depletion of pDCs increased the severity of the disease, which suggests a regulatory, suppressive role for these cells [58]. This dichotomy in the functions of pDC could explain why researchers might hesitate to undertake therapeutic trials that aim to modulate pDC activity and why they have not been done. By contrast, trials have been undertaken in which myeloid dendritic cells (mDCs) polarized toward a tolerogenic phenotype have been injected into the joints of RA patients [59]. While this invasive procedure performed on 12 RA patients appeared safe (adverse events were judged mild), no clinical effects improving the patients' condition were detectable, although some exhibited a stabilization of their disease. Up to now, increasing the number of synovial pDCs upon local

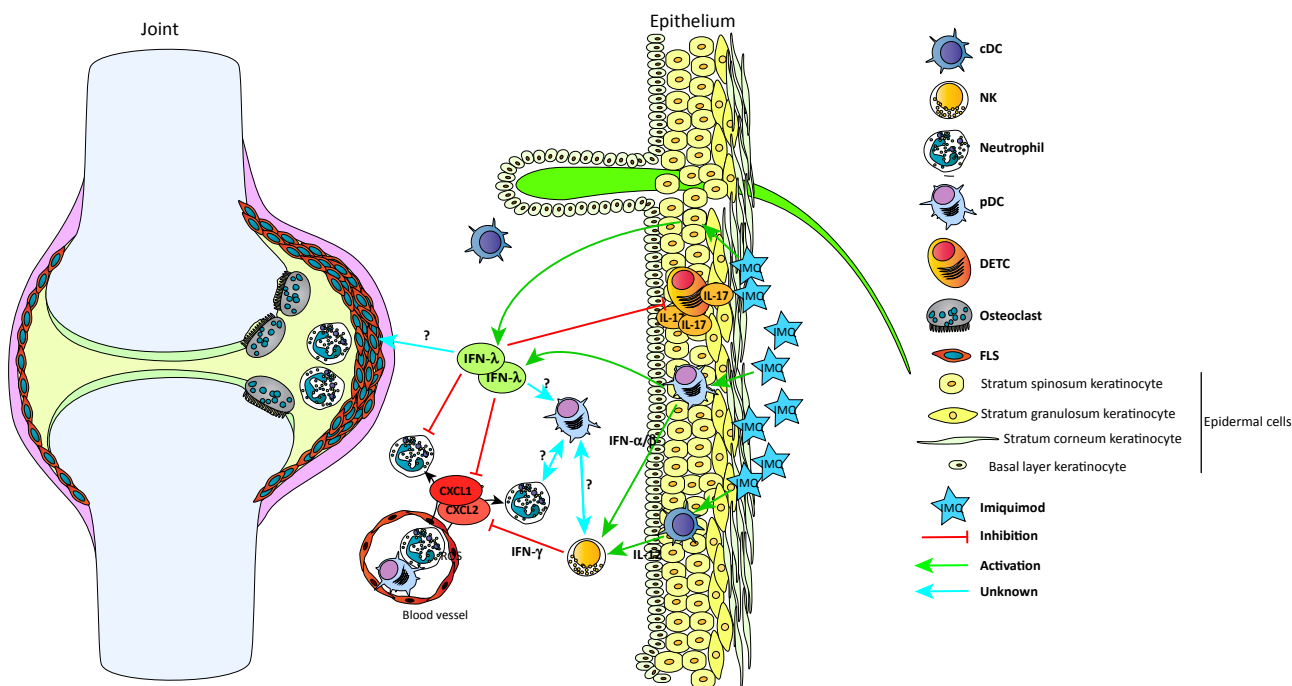
injection of FMS-like tyrosine kinase 3 ligand in a trial setting has only been theoretically considered [60].

### The Skin and Synovium Communication: A Novel Opportunity to Modulate pDC Activity and Dampen Local Joint Inflammation

We reported recently that pDC depletion, whether of genetic origin (in **Ikaros** mutant mice) or in inducible conditions (i.e., upon pDC-specific antibody injection or following diphtheria toxin administration to BDCA2-DTR transgenic animals), augmented joint arthritic symptoms (inflammation, bone erosion, osteoclasts mobilization) in the K/BxN serum transfer model [61]. To provide further evidence supporting their suppressive functions with regard to inflammation, we performed topical application (on inflamed joints) of imiquimod (IMQ), a well-known TLR7 agonist inducing pDC recruitment and activation [62], to mice with three models of joint inflammation (K/BxN serum transfer, CIA, and **human TNF- $\alpha$  transgenic mice**, which are assumed to display normal pDC recruitment). In all of these mouse models of inflammation, topical application of IMQ induced a marked improvement of clinical symptoms (redness, swelling) and histomorphological parameters (bone destruction, inflammatory infiltrate, osteoclasts density). Analyses of the periarticular tissue both at the cellular infiltrate (by flow cytometry) and at the transcriptomic (by RT-qPCR) levels indicated that neutrophil recruitment was impaired in treated animals and that the therapeutic benefits of IMQ, which was lost in mice depleted for the IFN-I receptor, therefore required IFN-I signaling [61]. However, the exact nature of the events connecting skin IMQ application and reduced joint inflammation still requires extensive work (potentially involving high-throughput transcriptomic analysis by RNA-seq and immunohistochemistry of joint section to visualize stromal and immune cell types and their interactions) to be fully understood. Both IFN- $\lambda$ 2 and IFN- $\gamma$  have previously been reported to reduce neutrophils infiltration in the K/BxN serum transfer and CIA mouse models [47,52]. Combined with our data, these papers enable us to propose a comprehensive but hypothetical model (Figure 1, Key Figure) accounting for the therapeutic action of topical IMQ on the inflamed joint and orienting future molecular and cellular investigations. In this model, keratinocytes, as expected from epithelial cells [63], respond to IMQ application by producing IFN-III. It is also possible that skin-resident pDCs, similar to those isolated from blood [64], produce IFN- $\lambda$ 3 in response to IMQ. These cells likely also respond to TLR7 stimulation by producing IFN-I. As a major consequence and in agreement with a previous study that reported expression of the receptor for IL- $\lambda$ 2 on CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup>-sorted neutrophils from mouse bone marrow [52], we observed that reduced neutrophils infiltrate in the joints of IMQ-treated, K/BxN-injected mice. In addition, IFN-III can inhibit functions of neutrophils, such as ROS production, which is potentially responsible for severe tissue damage. Altogether, these data indicate that neutrophils, which are key players in RA pathogenesis [65] and whose mobilization in the inflamed joint is the hallmark of all RA animal models [66], might be the primary targets of IFN-III. IFN-III might also impair IL-17 secretion by  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> **dendritic epidermal T cells** [52], thereby further limiting the inflammatory burden. The function of IFN-I produced upon TLR7-dependent signaling in keratinocytes and skin-resident pDCs [67] would enable pDCs survival and maintain their production from bone marrow precursors [68]. It is also possible that pDC, once primed by IFN-I, could shift toward an IFN-III-secreting phenotype. This would account for the requirement of IFNAR1 in the therapeutic effect of IMQ [61], as well as for the failures of the IFN-I-based therapies. A crucial role for IFN- $\gamma$  produced by NK cells in CpG-mediated, mDCs-dependent inhibition of K/BxN-dependent arthritis has been reported [47]. We suggest that this mDC–NK crosstalk, which culminates in IFN- $\gamma$  production limiting neutrophils infiltration and resorbing joint inflammation, can also be implemented in our model. Indeed, IL-12 expressed by IMQ-activated conventional DCs might activate (together with IFN-I) NK cells, which, following IFN- $\gamma$  secretion, can directly participate in the reduction of the neutrophilic infiltrate. Furthermore, IFN-

## Key Figure

## Our Proposed Model for Anti-inflammatory Effects of Interferons on Joint Arthritis and Cellular Interactions



Trends in Molecular Medicine

**Figure 1.** We hypothesize that application of imiquimod (IMQ) on the skin of inflamed joints would induce Toll-like receptor 7 (TLR7)-dependent Type III interferon (IFN-III) secretion in keratinocytes and IFN-I release by skin-resident plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which might also produce IFNs- $\lambda$ . IFN-III might then exert its anti-inflammatory properties through the inhibition of chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1)-dependent neutrophils recruitment and ROS production. In addition, IMQ may trigger conventional dendritic cells (cDCs) activation and interleukin-12 (IL-12) production. IL-12 and IFN-I might then contribute to natural killer (NK) cells activation and IFN- $\gamma$  release, which might further contribute to inhibition of neutrophils chemotaxis. Several putative cellular interactions, such as neutrophils-pDC or NK-pDC, still require substantial investigations. Finally, the roles of IFN-III on aggressive rheumatoid fibrocyte-like synoviocytes (FLSs), or on pDC activation and/or proliferation are not documented yet (see Outstanding Questions).

$\gamma$  can also help pDC survival and differentiation. Of course, this model leaves many questions unanswered. For instance, **fibrocyte-like synoviocytes (FLSs)**, which also actively participate in RA pathogenesis through their capacity to secrete IL-6 and metalloproteases [69], may be impacted by IFN-I, IFN-II, or IFN-III, reducing their aggressive behavior and resistance to apoptotic stimuli. In this regard, analysis of the crosstalk between pDCs and FLS represents a challenging issue. In addition, while the impact of IFNs on the migration and function of neutrophils appears robustly demonstrated, their role on the inhibition of neutrophil extracellular trap formation (**NETosis**) or their apoptosis is still not documented. Finally, we suggest in our model the existence of pDCs neutrophils dialog in which the latter, for instance through their secretion of IL-1 $\beta$ , orient pDCs toward an IFN-III-secreting, anti-inflammatory phenotype. In the

absence of neutrophils, IMQ topical application drives pDC secretion of mainly IFN-I, which, in a specific cytokinic microenvironment, may exhibit massive inflammatory properties leading to the development of a lupuslike disease [70] or psoriasis [62]. Of course, our model presently applies to the specific mouse skin and joint microenvironment which, for instance, harvests dendritic epidermal T cells [71] and will require further analysis in human skin biopsies. Nevertheless, we hypothesize that efficient IFN-based therapies in RA in the future could benefit from a topical, joint-specific mobilization of these cytokines using IMQ or other, less toxic TLR ligands. In addition to being totally painless, this procedure avoids (or limits) the systemic induction of IFN-dependent signaling pathways, which likely trigger undesirable and uncontrolled effects. Of course, a careful stratification of patients that may respond to such therapy (as well as to current biological DMARDs) is key for its future use; establishing such stratification of patients would require extensive genomics and transcriptomics analyses of RA patients.

### Concluding Remarks

IFNs (Type I–II), through their coordinated action, appear to exhibit powerful inhibition of neutrophils recruitment and activation. These cells possess extensive damaging potential through their capacity to release ROS and proteases. In addition, their capacity to perform NETosis represents an important mean to expose autoantigens and therefore, to trigger autoimmunity. Thus, reducing their density as early as possible during the ignition phase of the inflammatory process in RA is an effective approach to avoid the initiation of a vicious circle, characterized by further bone destruction and autoantibody production which, in return, enhance the inflammatory reaction. Clinical trials aimed at modulating pDCs recruitment and activation with local application of IMQ might be effective in RA, as well as in other inflammatory disease in which uncontrolled activities of neutrophils are responsible for severe damages, such as vasculitides or gout. Furthermore, because IMQ mostly drives IFN-I expression by pDCs, future research to target its delivery within a specific population might be considered. This could be achieved, for instance, through coupling IMQ to a monoclonal antibody designed against this – yet to be identified – high IFN-III producing cell. This strategy to promote IFN-III production might be of interest to decrease IMQ inherent toxicity. Finally, developing appropriate vectorization systems to enable joint-specific delivery across the skin of other molecules, such as those targeting neutrophil functions, like protein arginine deiminase inhibitors, might also provide considerable benefits to RA patients.

### Acknowledgments

This work was supported by institutional funding from INSERM, Strasbourg University, the Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTE) and the PRTS ANR program (SPIRALE).

### References

- McInnes, I.B. and Schett, G. (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365, 2205–2219
- Firestein, G.S. and McInnes, I.B. (2017) Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* 46, 183–196
- Okada, Y. *et al.* (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376–381
- Ospelt, C. *et al.* (2017) Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin. Immunopathol.* 39, 409–419
- Sparks, J.A. and Karlson, E.W. (2016) The roles of cigarette smoking and the lung in the transitions between phases of preclinical rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 18, 15
- König, M.F. *et al.* (2016) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 8, 369ra176
- Koziel, J. *et al.* (2014) The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr. Rheumatol. Rep.* 16, 408
- Maeda, Y. and Takeda, K. (2017) Role of gut microbiota in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Med.* 6, 60
- Ramiro, S. *et al.* (2017) Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1101–1136
- Burmester, G.R. and Pope, J.E. (2017) Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet* 389, 2338–2348
- Schreiber, G. (2017) The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 292, 7285–7294

### Outstanding Questions

What are the reciprocal transcriptional relationships between Type I, Type II, and Type III interferons?

Which cells produce interferons following epicutaneous application of imiquimod? Keratinocytes? Langerhans cells? Other resident dendritic cells?

What is the impact of Type III interferons on the activation and/or the proliferation of pDCs? On FLSs? On NETosis?

Why does imiquimod application on a normal skin promote neutrophils infiltration and inflammation (resembling psoriasis) while reducing neutrophils recruitment and ROS production when delivered on an inflamed epithelium?

Is there a crosstalk between pDCs and neutrophils? What kind of dialog could mediate this crosstalk – cytokines, cell contacts, or both?

Will it be possible to reconstitute the joint microenvironment to investigate the complex cellular interactions involving immune/stromal cells in rheumatoid arthritis?

12. Zuniga, E.I. *et al.* (2007) Type I interferon during viral infections: multiple triggers for a multifunctional mediator. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 316, 337–357
13. Ronnblom, L. (2016) The importance of the type I interferon system in autoimmunity. *Clin. Exp. Rheumatol.* 34, 21–24
14. Kieseier, B.C. (2011) The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25, 491–502
15. Kasper, L.H. and Reder, A.T. (2014) Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1, 622–631
16. Kuo, P.C. *et al.* (2016) Interferon-beta modulates inflammatory response in cerebral ischemia. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002610
17. Bennett, L. *et al.* (2003) Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.* 197, 711–723
18. Tavakolpour, S. and Rahimzadeh, G. (2016) New insights into the management of patients with autoimmune diseases or inflammatory disorders during pregnancy. *Scand. J. Immunol.* 84, 146–149
19. Tedeschi, S.K. *et al.* (2013) Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. *Clin. Immunol.* 149, 211–218
20. Yao, Y. *et al.* (2009) Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 60, 1785–1796
21. Greth, W. *et al.* (2017) Targeting the interferon pathway with sifalimumab for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Immunotherapy* 9, 57–70
22. Lubbers, J. *et al.* (2013) The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 776–780
23. Sozzani, S. *et al.* (2017) Dendritic cell recruitment and activation in autoimmunity. *J. Autoimmun.* 85, 126–140
24. Castaneda-Delgado, J.E. *et al.* (2017) Type I interferon gene response is increased in early and established rheumatoid arthritis and correlates with autoantibody production. *Front. Immunol.* 8, 285
25. de Jong, T.D. *et al.* (2016) Type I interferon response gene expression in established rheumatoid arthritis is not associated with clinical parameters. *Arthritis Res. Ther.* 18, 290
26. Cacopardo, B. *et al.* (2013) Rheumatoid arthritis following PEG-interferon-alfa-2a plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *BMC Res. Notes* 6, 437
27. Zuckerman, E. *et al.* (2000) Hepatitis C virus-related arthritis: characteristics and response to therapy with interferon alpha. *Clin. Exp. Rheumatol.* 18, 579–584
28. Vernerova, L. *et al.* (2016) A combination of CD28 (rs1980422) and IRF5 (rs10488631) polymorphisms is associated with seropositivity in rheumatoid arthritis: a case control study. *PLoS One* 11, e0153316
29. Duffau, P. *et al.* (2015) Promotion of inflammatory arthritis by interferon regulatory factor 5 in a mouse model. *Arthritis Rheumatol.* 67, 3146–3157
30. Alzabin, S. *et al.* (2012) Investigation of the role of endosomal Toll-like receptors in murine collagen-induced arthritis reveals a potential role for TLR7 in disease maintenance. *Arthritis Res. Ther.* 14, R142
31. Viatte, S. *et al.* (2013) Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 141–153
32. Stanford, S.M. and Bottini, N. (2014) PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 602–611
33. Jacob, C.O. *et al.* (1989) Heterogeneous effects of IFN-gamma in adjuvant arthritis. *J. Immunol.* 142, 1500–1505
34. Wang, Y. *et al.* (2013) The autoimmunity-associated gene PTPN22 potentiates Toll-like receptor-driven, type I interferon-dependent immunity. *Immunity* 39, 111–122
35. Ying, F. *et al.* (2011) Type I IFN protects against antigen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 41, 1687–1695
36. Corr, M. *et al.* (2011) Interleukin 1 receptor antagonist mediates the beneficial effects of systemic interferon beta in mice: implications for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 858–863
37. van Holten, J. *et al.* (2004) Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6, R239–R249
38. Tak, P.P. *et al.* (1999) The effects of interferon beta treatment on arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38, 362–369
39. Sweeney, S.E. *et al.* (2012) Role of interferon regulatory factor 7 in serum-transfer arthritis: regulation of interferon-beta production. *Arthritis Rheum.* 64, 1046–1056
40. van Holten, J. *et al.* (2005) A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 64–69
41. Guarda, G. *et al.* (2011) Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34, 213–223
42. Calvaruso, V. *et al.* (2011) Pegylated-interferon-alpha(2a) in clinical practice: how to manage patients suffering from side effects. *Expert Opin. Drug Saf.* 10, 429–435
43. Boissier, M.C. *et al.* (1995) Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 25, 1184–1190
44. Miyata, M. *et al.* (2000) Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 43, 2578–2582
45. Schurgers, E. *et al.* (2011) Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 917–926
46. Sigidin, Y.A. *et al.* (2001) Randomized, double-blind trial of anti-interferon-gamma antibodies in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 30, 203–207
47. Wu, H.J. *et al.* (2007) Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J. Exp. Med.* 204, 1911–1922
48. Lee, S.H. *et al.* (2017) Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci. Rep.* 7, 10133
49. Eslam, M. and George, J. (2016) Targeting IFN-lambda: therapeutic implications. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 1425–1432
50. Muir, A.J. *et al.* (2010) Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52, 822–832
51. Buckland, J. (2015) Experimental arthritis: antiviral IFN-lambda2 has unexpected roles in inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 383
52. Blazek, K. *et al.* (2015) IFN-lambda resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1beta production. *J. Exp. Med.* 212, 845–853
53. Sennikov, S.V. *et al.* (2016) Maturation and cytokine production potential of dendritic cells isolated from rheumatoid arthritis patients peripheral blood and induced *in vitro*. *Hum. Immunol.* 77, 930–936
54. Hirohata, S. *et al.* (2014) Increased generation of pre-plasmacytoid dendritic cells in bone marrow of rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 24, 443–447
55. Jongbloed, S.L. *et al.* (2006) Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8, R15
56. Lande, R. *et al.* (2004) Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J. Immunol.* 173, 2815–2824
57. Lebre, M.C. *et al.* (2008) Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP-dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am. J. Pathol.* 172, 940–950
58. Jongbloed, S.L. *et al.* (2009) Plasmacytoid dendritic cells regulate breach of self-tolerance in autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 182, 963–968
59. Bell, G.M. *et al.* (2017) Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 227–234

60. Lebre, M.C. and Tak, P.P. (2009) Dendritic cells in rheumatoid arthritis: which subset should be used as a tool to induce tolerance? *Hum. Immunol.* 70, 321–324
61. Nehmar, R. *et al.* (2017) Therapeutic modulation of plasmacytoid dendritic cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 69, 2124–2135
62. Glitzner, E. *et al.* (2014) Specific roles for dendritic cell subsets during initiation and progression of psoriasis. *EMBO Mol. Med.* 6, 1312–1327
63. Lazear, H.M. *et al.* (2015) Interferon-lambda: immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity* 43, 15–28
64. Murata, K. *et al.* (2014) *Ex vivo* induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J. Gastroenterol.* 49, 126–137
65. Wright, H.L. *et al.* (2014) The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 593–601
66. Christensen, A.D. *et al.* (2016) K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis. *Front. Immunol.* 7, 213
67. Palamara, F. *et al.* (2004) Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* 173, 3051–3061
68. Chen, Y.L. *et al.* (2013) A type I IFN-Fit3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* 210, 2515–2522
69. Bustamante, M.F. *et al.* (2017) Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 19, 110
70. Yokogawa, M. *et al.* (2014) Epicutaneous application of Toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 66, 694–706
71. Pasparakis, M. *et al.* (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 289–301



## Annexe 4: Revue

**DICER1: A key player in rheumatoid arthritis, at the crossroads of cellular Stress, innate immunity and chronic inflammation in Aging (Revue)**

Aurore De Cauwer, Alexandre Mariotte, Jean Sibilis, Seimak Bahram and Philippe Georgel. *Frontiers in Immunology* (2018)9 :1647

Cette revue décrit comment la protéine DICER participe au maintien des processus cellulaires par ses fonctions canoniques (micro-ARNs) et non canoniques. La réduction de son expression chez la souris corrèle avec l'aggravation de symptômes dans un modèle d'inflammation chronique articulaire. L'expression de la protéine est également réduite dans les fibroblastes de type synoviocyte de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, mais non chez les patients atteints d'arthrose, suggérant une implication de la protéine dans la pathogenèse de la maladie auto-immune.

Nous proposons qu'un faible niveau d'expression de DICER s'associe à l'établissement de stress cellulaires capables d'activer le compartiment immunitaire et de créer une inflammation chronique systémique. Nous suggérons ainsi que la baisse d'expression de DICER contribue à un cercle vicieux entre stress cellulaire et inflammation qui constitue les conditions appropriées à l'initiation et/ou la progression de pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, ou inflammatoires comme celles qui sont retrouvées au cours du vieillissement.





# DICER1: A Key Player in Rheumatoid Arthritis, at the Crossroads of Cellular Stress, Innate Immunity, and Chronic Inflammation in Aging

Aurore De Cauwer<sup>1,2†</sup>, Alexandre Mariotte<sup>1,2†</sup>, Jean Sibilia<sup>1,2,3</sup>, Seiamak Bahram<sup>1,2</sup> and Philippe Georgel<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, INSERM, ImmunoRhumatologie Moléculaire UMR\_S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France, <sup>2</sup> Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Strasbourg, France, <sup>3</sup> Centre de Référence des Maladies Autoimmunes Rares, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Moncef Zouali,  
Institut National de la Santé et  
de la Recherche Médicale  
(INSERM), France

### Reviewed by:

Laura Mandik-Nayak,  
Lankenau Institute for Medical  
Research, United States  
Erika H. Noss,  
University of Washington,  
United States

### \*Correspondence:

Philippe Georgel  
pgeorgel@unistra.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted  
to Autoimmune and  
Autoinflammatory Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 09 May 2018

**Accepted:** 04 July 2018

**Published:** 24 July 2018

### Citation:

De Cauwer A, Mariotte A, Sibilia J,  
Bahram S and Georgel P (2018)  
DICER1: A Key Player in Rheumatoid  
Arthritis, at the Crossroads of  
Cellular Stress, Innate Immunity, and  
Chronic Inflammation in Aging.  
Front. Immunol. 9:1647.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.01647

Loss-of-function or knockout mouse models have established a fundamental role for the RNase III enzyme DICER1 in development and tissue morphogenesis and/or homeostasis. These functions are currently assumed to result mainly from the DICER1-dependent biogenesis of microRNAs which exhibit important gene expression regulatory properties. However, non-canonical DICER1 functions have recently emerged. These include interaction with the DNA damage response (DDR) pathway and the processing of cytotoxic non-coding RNAs, suggesting that DICER1 might also participate in the regulation of major cellular processes through miRNA-independent mechanisms. Recent findings indicated that reduced *Dicer1* expression, which correlates with worsened symptoms in mouse models of joint inflammation, is also noted in fibroblast-like synoviocytes (FLS) harvested from rheumatoid arthritis (RA) patients, as opposed to FLS cultured from biopsies of osteoarthritic patients. In addition, low DICER1 levels are associated with the establishment of cellular stress and its associated responses, such as cellular senescence. Senescent and/or stressed cells are associated with an inflammatory secretome (cytokines and chemokines), as well as with “find-me” and “eat-me” signals which will attract and activate the innate immune compartment (NK cells, macrophages, and neutrophils) to be eliminated. Failure of this immunosurveillance mechanism and improper restoration of homeostasis could lead to the establishment of a systemic and chronic inflammatory state. In this review, we suggest that reduced DICER1 expression contributes to a vicious cycle during which accumulating inflammation and premature senescence, combined to inadequate innate immunity responses, creates the appropriate conditions for the initiation and/or progression of autoimmune-autoinflammatory diseases, such as RA.

**Keywords:** Dicer1, inflammation, rheumatoid arthritis, senescence, ageing

## BIOLOGICAL ROLES OF DICER1

### The Canonical Role of DICER1: MicroRNA (miRNA) Biogenesis

Since its discovery by Bernstein et al. (1), the RNase III enzyme DICER (encoded by the *DICER1* gene in *H. sapiens* and *Dicer1* in *Mus musculus*, the nomenclature that will be used throughout this review) has been extensively studied and its role in the miRNA biogenesis is today well described [reviewed in Ref. (2)]. miRNA synthesis usually begins with the RNA polymerase II-dependent

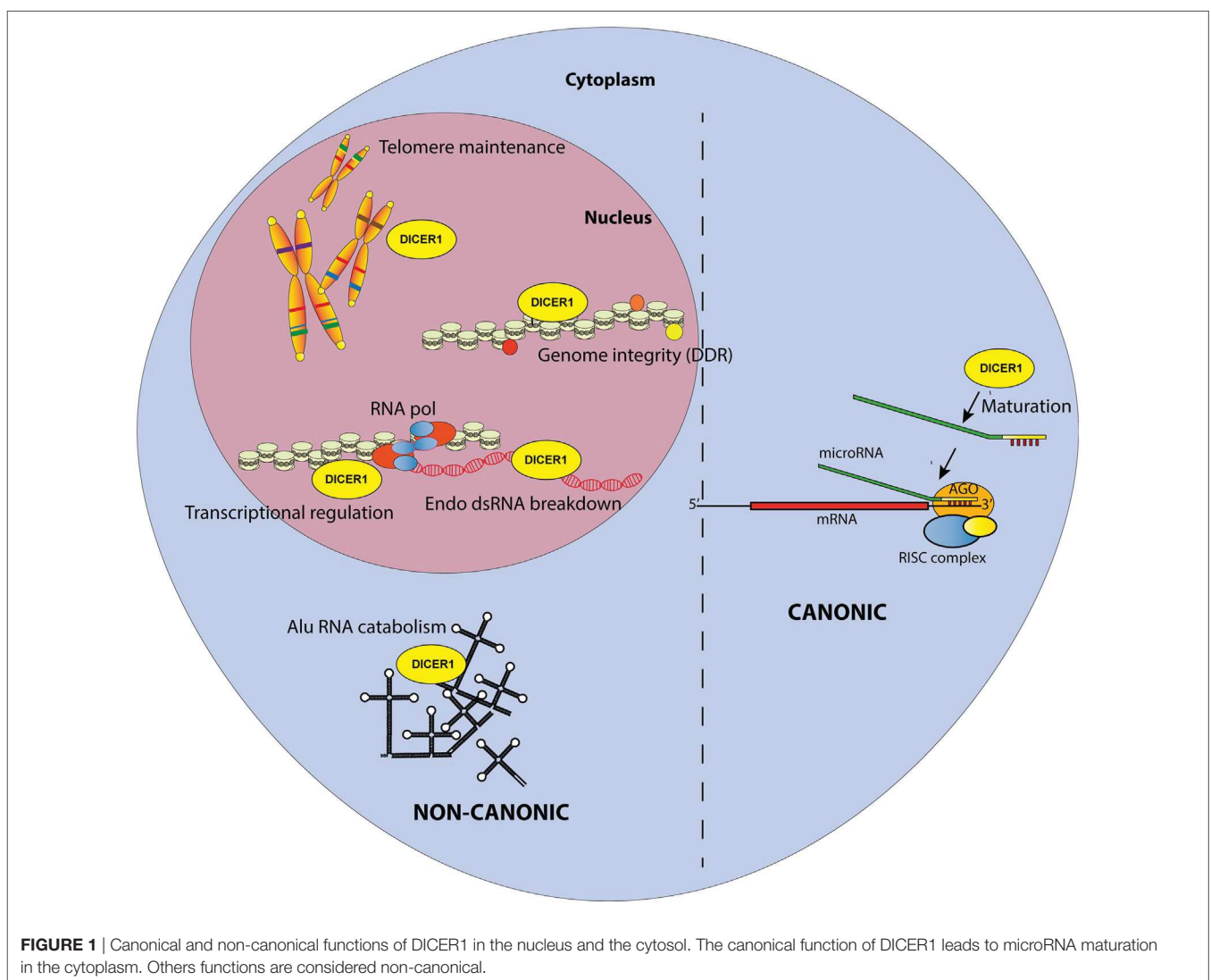
transcription of genes encoding primary-miRNAs (pri-miRNAs), which are several kilobase-long stem-loop transcripts. Alternatively, pri-miRNAs can also originate from introns of protein coding genes. Whatever their origin, pri-miRNAs are then processed by the nuclear microprocessor complex DROSHA/DiGeorge syndrome Critical Region 8 (DGCR8) into precursor microRNAs (pre-miRNAs). Those 60–80 nucleotide-long precursors are then exported to the cytoplasm where they are recognized and cleaved by DICER1 into a 20–22 nucleotide-long RNA duplex (**Figure 1**). One miRNA strand is conserved and loaded into the RNA-induced silencing complex (RISC) composed of argonaute proteins. Guided by the miRNA, the RISC complex hybridizes with complementary mRNAs leading to either their degradation or translational inhibition. Therefore, DROSHA, DICER1, and miRNA are core factors of the Post-Transcriptional Gene Silencing process, a key regulatory mechanism of gene expression. In addition, several miRNAs are produced upon non-canonical pathway because their synthesis bypasses some of the aforementioned steps; those are Mirtons (whose synthesis is DROSHA-independent) (3) and

miR-451, the only DICER1-independent miRNA described up to now (4, 5).

Interestingly, a study aiming at re-evaluating the contribution of the different key factors in miRNA biogenesis showed that while DROSHA is actually irreplaceable in the canonical miRNA synthesis, some miRNAs are still produced, albeit at reduced levels, without DICER1 (6). These observations, along with ours showing that reduced expression of DICER1 in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from rheumatoid arthritis (RA) patients is associated with no more than a modest reduction of miRNA production (7), strongly suggest that other roles, besides miRNAs maturation, might be attributed to DICER1. Indeed, marked phenotypes have been observed in targeted (tissue-specific) *Dicer1* knockout mouse mutants, despite a noticeable preserved (and even sometimes increased) expression of many mature miRNAs.

### DICER1 Non-Canonical Roles

Accordingly, multiple reports have now described the existence of non-canonical, miRNA-independent, roles of DICER1



(**Figure 1**). Those functions are essentially implicated in nuclear RNAi and have been thoroughly reviewed elsewhere (8). In brief, DICER1, associated with TAR RNA Binding Protein and Protein activator of protein kinase R (PKR) (TRBP/PACT), was shown to regulate the transcription of a subset of hormone-inducible genes by interacting with their promoters in a dsRNA-dependent manner. Nuclear DICER1 is also implicated in the processing of endogenous dsRNA originating from overlapping transcription units, thereby protecting the cells from interferon (IFN)-mediated apoptosis. In addition, DICER1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity (9), especially through interactions with the DNA damage response (DDR) pathway. It has been shown that in response to double-strand breaks in DNA, DICER1-dependent accumulation of break-specific dsRNAs facilitates the recruitment of repair factors. Interestingly, this mechanism is also needed for the maintenance of telomeres (10).

Furthermore, the cytoplasm is also a major site of DICER1 non-canonical functions, which have been extensively studied over the last decade. A first hint for such roles was discovered in patients with age-related macular degeneration, which exhibit reduced DICER1 expression in retinal pigmented epithelium cells. In these cells, low *Dicer1* (but, importantly, not any of the other genes involved in miRNA production) expression triggered by shRNA knockdown in mice leads to cytotoxic accumulation of non-coding dsRNA formed upon the transcription Alu sequences (repetitive elements abundantly present in the human genome and classified as short interspersed nuclear elements (SINE)—retrotransposon family) (11). Accumulating Alu RNAs lead to a toll-like receptor (TLR)-independent, P2X7- and ROS-dependent activation of the NLRP3 inflammasome. The resulting maturation and secretion of IL-18 induces an MYD88-dependent pathway and caspase-8-mediated cell death, leading to macular degeneration (12–14).

Altogether, these data point to potentially devastating effects of *DICER1* mis-expression which can theoretically affect all steps of gene expression in both nuclear (replication/transcription/splicing) and cytoplasmic (translation) compartments.

## DICER1 IN INFLAMMATION

### miRNAs in Inflammation: Prominent Roles for miR-155 and -146a

There are 1,917 human miRNA sequences in the most recent miR database. This relatively large number, together with the capacity of every miRNA to target hundreds of mRNAs (15), indicates that they are able to virtually impact every biological function. It is therefore very much expected for miRNAs to be involved in most pathophysiological settings, among which inflammation and associated diseases were particularly scrutinized. In this context, miR-155 and -146a have been extensively described because they clearly exhibit crucial regulatory functions in innate and adaptive immunity. Indeed, miR-146a has been described as a mandatory regulator of the NF- $\kappa$ B pathway in T cells, targeting TRAF6 and IRAK1 (16). miR-146a was also correlated and functionally associated with the control of TNF- $\alpha$

production downstream of several TLRs and to the LPS tolerance phenomenon (17). In this report, it was notably observed that miR-146a is increased in human monocytic cells following LPS re-exposure. Until now, many groups found a pronounced inflammation-limiting role for miR-146a in various inflammatory settings, from atopic dermatitis (18) to sepsis (19). Strong evidence also attests that miR-146a participates in inflammatory disorders such as gout (20, 21) and RA [Ref. (22, 23) and see below].

miR-155, encoded by the *bic* locus, has been described as a major actor in inflammatory responses (24–26). miR-155 is considered a main driver of inflammatory responses through a large array of networks and its down-modulation is associated with termination of acute inflammation, as exemplified in the case of glucocorticoid treatments (27). Interestingly, the inflammatory effects of miR-155 are counteracted by miR-146a, as evidenced by a murine model where the deletion of the former is able to abrogate the inflammation induced by the loss of the latter (28). In essence, miR-155 and -146a, which roles were comprehensively analyzed in mouse knockout models, are considered as major players in the regulation of inflammatory responses.

Interestingly, miRNA biogenesis and the cellular stress response are tightly interconnected (29). This can be illustrated by the reciprocal interactions between type I IFNs-I, cytokines of paramount importance in the resolution of a virus-induced stress, which can modulate *DICER1* gene expression (30). In return, mice carrying a mutation in the *DICER1* gene exhibit an altered transcriptional profile of miRNA-regulated, IFN-stimulated genes (31). It is also noteworthy to observe that miR-124, a major player in the regulation of stress-induced genes in the brain (32), has recently been shown to modulate inflammation in a rat model of arthritis (33).

### Non-Canonical Roles of DICER1 in Inflammation

Evidence directly implicating non-canonical roles of DICER1 in inflammatory responses is scarce. To date, only two examples can be mentioned: (1) the DICER1-dependent processing of Alu RNAs which precludes the harmful activation of NLRP3 Inflammasome and the maturation/secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 (11) (see above) and (2) the involvement of nuclear DICER1 in the processing of dsRNA transcripts from overlapping loci, thus preventing an uncontrolled IFN response (34).

Regulation of IFN secretion and IFN-mediated responses are of high interest because excessive production of these cytokines is associated with several autoimmune diseases. Of note, dysregulation of *DICER1* expression has been linked to the modulation IFN responses, a feature which is considered to result from global miRNA deregulation. *DICER1* ablation in endometrial cancer cells was also linked to an increased IFN- $\beta$  secretion and subsequent upregulation of IFN-stimulated genes (35). However, this response was interpreted as the consequence of cytoplasmic accumulation of pre-miRNAs which are able to trigger the activation of dsRNA sensors, hence leading to an IFN

response. More recently, DICER1's ablation in tumor-associated macrophages was shown to polarize the cells toward an M1-like phenotype associated with hyperactive IFN $\gamma$ /STAT1 signaling. This observation, described as the result of decreased expression of the let-7 miRNA, can only be partially rescued by transduction with a lentivirus expressing let-7 (36). It is then conceivable that non-canonical roles of DICER1 might also play a role in the M1/M2 macrophage polarization. Nevertheless, this model, whereby unprocessed dsRNAs accumulate in the cytosol upon DICER1 deficiency and drive inflammatory responses, has been poorly explored so far.

Of note, an increase in cytoplasmic Alu RNA following stress promotes disassembly of stress granules (SGs) (37). Since SGs decrease the interactions between DICER1 and its co-factors, thereby reducing its activity (38), a cross-talk between stress-induced pathways and miRNA-independent functions of DICER1 appears also plausible. Furthermore, SGs negatively regulate the production of inflammatory cytokine such as IL-1 $\beta$  by controlling mRNAs stability and decay (39). Hence, impairment of this activity upon Alu RNA accumulation would also contribute to promote inflammation.

## DICER1 in Aging

Aging is an important risk factor for the development of inflammatory disorders/diseases (40). In rodents, aging has been associated with a decreased expression of *DICER1* in the adipose tissue (41). In human, octogenarians, compared with centenarians, exhibit global decrease in miRNA expression as well as reduced expression of miRNA biogenesis factors including DICER1 in blood cells (42, 43). However, these observations do not provide mechanistic insights for the contribution of DICER1 in the aging process. Of course, many miRNAs (such as miR-34) targeting emblematic pathways involved in senescence (e.g., P53/P21) have been described (44) and are likely to play a role in aging. Nevertheless, aging is a complex process characterized by nine hallmarks: genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, loss of proteostasis, deregulated nutrient-sensing, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, stem cell exhaustion, and altered intercellular communication (45), all of which are possibly impacted by *DICER1* misexpression, not only through impaired miRNAs maturation but also because non-canonical DICER1 functions may be affected as well.

With regards to genomic instability, the role of DICER1 in the processing of RNAs transcribed from retrotransposons belonging to long- or short-interspersed nuclear elements (line or SINE) families participates in the prevention of retrotransposition deleterious events (46). In addition, accumulation of Alu RNAs was found to restrain "stemcellness" and is associated with persistent DNA damage preventing tissue renewal (47). Their DICER1-dependent elimination is therefore required to maintain tissue homeostasis. Next, DICER1 is implicated in the DDR pathway by processing dsRNA essential for the DNA double-strand break repair. This process seems also to be necessary to prevent a second hallmark of aging, telomere shortening (10). Moreover, *DICER1* deletion has been associated with epigenetic alterations, such as chromatin remodeling, DNA methylation, and histone modification in mammalian cells (48, 49).

Evidence in favor of a role of DICER1 in altered nutrient sensing and mitochondrial dysfunction is less documented. However, it was demonstrated that DICER1-depletion in adipocytes (i) overactivates the sensing signaling molecule mTORC1 and (ii) reduces mitochondria numbers, which are also irregularly shaped and associated with reduced oxidative metabolism in response to caloric restriction (50). As mentioned above, senescence has been amply described in relation to modified miRNA expression [e.g., Ref. (51)] but was also linked to Alu RNAs accumulation (47). Finally, downregulation of *Il-8* expression in endothelial cells upon *DICER1* knockdown (52) illustrates the potential impact of this multifunctional enzyme in the last hallmark of aging: cellular communication.

With regards to RA, normal aging of the immune system (immunosenescence) is associated with a higher risk to develop autoimmune disorders, including RA (53, 54). Alternatively, systemic joint inflammation may enhance the progression of immunosenescence and favor the development of comorbidities in RA patients (55).

## DICER1 AND MIRNAS ARE MAJOR PLAYERS IN RA

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disease affecting around 1% of the global population. This rheumatic disease is characterized by multiple joint swelling, stiffness, and inflammatory pain, mainly in the small joints of hands and feet (56). Although the auto-immune feature of RA is clearly demonstrated, several decades of research have established a major role for the innate immune system and stromal cells in this disease (57). It is now commonly admitted that RA is a multifactorial disease, where its initiation and development requires concomitant participation of genetic, epigenetic, and environmental factors. Among epigenetic players involved in RA, miRNAs have been the focus of intense attention over the past decade (58).

There are presently more than 20 miRNAs, expression of which is deregulated in various cells (T cells, monocytes, and FLS)/compartments (blood and synovial fluid) harvested from RA patients (59, 60), and our lab has contributed to the identification of several of them within the miR-17~92 cluster (61–63). However, likely because RA etiology relies on innate and adaptive immune systems, miR-146a and -155, both of which have been involved in the regulation of adaptive (such as T cells-mediated) and inflammatory (e.g., in monocytes) responses, have been extensively studied in this disease. miR-146a is increased in RA patients (64–66) and is supposed to be integrated in a feedback loop, triggered by the unrestrained inflammation (67). Furthermore, murine models of RA have clearly shown that miR-146a restrains osteoclastogenesis (23). miR-155 is also upregulated in FLS and peripheral blood CD14-positive cells of RA patients (68, 69). In addition, its expression was correlated to the Disease Activity Score on 28 joints (DAS28) (70). Interestingly, miR-155 is also required for the development of the disease in the collagen-induced arthritis model, a commonly used mouse model of autoimmune arthritis (71). In FLS, upregulation of both miR-146a and miR-155 was

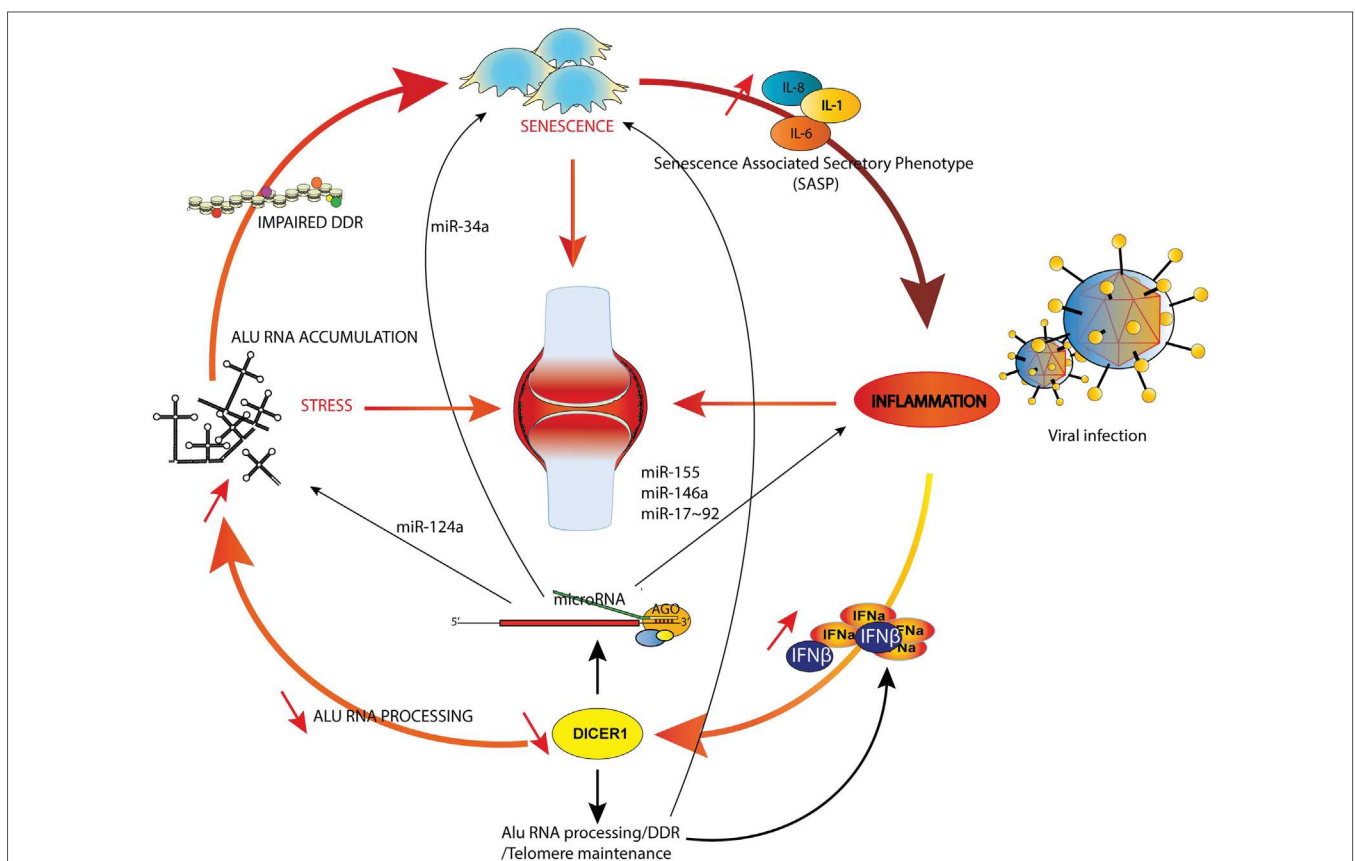
correlated to negative regulation of osteoclastogenesis/MMP production. Therefore, this increased expression was interpreted as a way to limit the RA-associated osteoarticular destruction processes (64).

On the other hand, reduced miR-146a and -155 expression in regulatory T cells (Treg) has also been incriminated in RA (22), which illustrates that a global perturbation (driving either an overexpression or a down-modulation) of miRNA production is unlikely to represent a major trigger of RA pathogenesis. Indeed, increased (or decreased) miRs in activated T cells might be compensated by similar alterations in Tregs, and *vice versa*. In this regard, our observations indicating that (i) *Dicer1*-deficient mice exhibit worsened symptoms following experimental (upon K/BxN serum transfer) arthritis induction and (ii) that FLS cultivated from biopsies harvested in RA patients exhibit reduced *DICER1* expression (7) pinpoint to a potential involvement of non-canonical, miRNA-independent activities of DICER1 in joint inflammation. Several possibilities might be considered in line with the abovementioned roles of DICER1 in the processing of Alu sequences. For instance, abolishing DICER1 activity may lead to reduced production of Alu repeat-induced small RNAs (riRNAs) in the nucleus, thereby limiting the proliferative capacities of stem cells (72) and

impairing tissue renewal in the joint. Combined with increased DNA damage (73) which is accompanied with the initiation of senescence, reduced DICER1 non-canonical activities might drive the accumulation of aged FLS resistant to apoptotic stimuli (7) and exhibiting pro-inflammatory capabilities [through IL-6, an essential component of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) (74)], a dangerous cocktail likely driving their aggressive phenotype observed in RA patients. As mentioned above, *Dicer1* expression is negatively regulated by inflammatory cytokines such as type I IFNs, further aggravating the inflammatory response.

## DICER1 AT THE CROSSROADS BETWEEN SENESCENCE AND INFLAMMATION IN RA

These multiple interactions are integrated in the model illustrated in **Figure 2**. We considered three main triggers (or hallmarks) of RA, aging (75), inflammation [through specific cytokines (76)], and stress (77) and their reciprocal interconnections mediated by canonical and non-canonical functions of DICER1. For sake of simplicity, we emphasized only specific miRNAs and other



**FIGURE 2** | DICER1 functions at the crossroads of inflammation, senescence and aging. Examples of microRNAs involved in both rheumatoid arthritis (RA) and inflammation (miR-155 and -146a), RA and senescence (miR-34a) or RA and stress (miR-124a) are shown. The model illustrates how an initial trigger (e.g., a viral infection) might initiate a vicious circle (see text).

DICER1 ligands (such as Alu RNAs), but nevertheless, our model supports the notion that DICER1 alterations might perturb every trigger of RA and initiate a chain reaction actually driving pathogenesis. Indeed, their interactions create the appropriate conditions to build a vicious circle which can for instance, start with IFN-dependent *DICER1* down-modulation (for example, as a result of a chronic viral infection). This initial event might contribute to accumulation of Alu RNAs and other dsRNAs in the cytoplasm, which favor the survival of senescent cells in which DNA damages are poorly fixed (hence increasing the inflammatory settings through the SASP) and reduced formation of SGs, leading to an impaired degradation of viral RNAs. Viral RNAs and cytoplasmic endogenous dsRNAs will ultimately enhance type I IFN production and amplify the vicious circle. Of course, this model is incomplete and could also, for instance, integrate metabolism (or other environmental factors contributive to RA). Interestingly, interactions between PKR, TRBP, and DICER1 were described, suggesting an additional (miRNA-independent) role for DICER1 in immunometabolism (78).

## CONCLUDING REMARKS

Precisely evaluating the various roles of DICER1 appears a challenging task due to its complex and pleiotropic roles. Furthermore, factors that influence *DICER1* gene expression in specific cells and at defined developmental stages are still poorly described. In addition, *DICER1* transcripts and protein levels are not always correlated (79), adding another layer of complexity. Moreover, DICER1 activity appears regulated by post-translational modification such as phosphorylation and SUMOylation (80), and the protein can shuttle between the

cytosol and the nucleus and exert different activities in these two compartments, depending on associations with various co-factors. For instance, DICER1-efficient processing activity of Alu RNAs depends on poly(C)-binding protein 2 binding, which is inhibited by iron overload (81).

Here, we provided several examples of reciprocal interactions between DICER1 and mechanisms (stress, inflammation, and aging) that can be either considered as triggers (or inducers of *DICER1* expression) or effectors (i.e., that are able to respond to DICER1-dependent products such as miRNAs or metabolites of Alu or other long non-coding RNAs). We suggest that within this complex network of interactions, DICER1 occupies a central position. In this model, perturbations of these interactions modify homeostasis and drive pathogenesis. The focus of this review has been RA, but this network can be extended to other age-dependent pathological conditions, beyond autoimmune or inflammatory diseases, such as cancer or neurodegeneration.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

PG, AC, AM, JS, and SB participated in discussions; drafted and approved the manuscript.

## FUNDING

The work in our laboratory is supported by funding from INSERM, Strasbourg University, the Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTE) and the PRTS ANR program (SPIRALE), Institut Universitaire de France and MSD Avenir program AUTOGEN.

## REFERENCES

- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* (2001) 409(6818):363–6. doi:10.1038/35053110
- Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell* (2018) 173(1):20–51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* (2007) 448(7149):83–6. doi:10.1038/nature05983
- Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* (2010) 465(7298):584–9. doi:10.1038/nature09092
- Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* (2010) 328(5986):1694–8. doi:10.1126/science.1190809
- Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, xport in 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113(13):E1881–9. doi:10.1073/pnas.1602532113
- Alsaleh G, Nehmar R, Bluml S, Schleiss C, Ostermann E, Dillenseger JP, et al. Reduced DICER1 expression bestows rheumatoid arthritis synovocytes proinflammatory properties and resistance to apoptotic stimuli. *Arthritis Rheumatol* (2016) 68(8):1839–48. doi:10.1002/art.39641
- Burger K, Gullerova M. Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2015) 16(7):417–30. doi:10.1038/nrm3994
- Hawley BR, Lu WT, Wilczynska A, Bushell M. The emerging role of RNAs in DNA damage repair. *Cell Death Differ* (2017) 24(4):580–7. doi:10.1038/cdd.2017.16
- Rossiello F, Aguado J, Sepe S, Iannelli F, Nguyen Q, Pitchiaya S, et al. DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs. *Nat Commun* (2017) 8:13980. doi:10.1038/ncomms13980
- Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* (2011) 471(7338):325–30. doi:10.1038/nature09830
- Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, Dridi S, Kerur N, Kim Y, et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* (2012) 149(4):847–59. doi:10.1016/j.cell.2012.03.036
- Kim Y, Tarallo V, Kerur N, Yasuma T, Gelfand BD, Bastos-Carvalho A, et al. DICER1/Alu RNA dysmetabolism induces Caspase-8-mediated cell death in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(45):16082–7. doi:10.1073/pnas.1403814111
- Kerur N, Hirano Y, Tarallo V, Fowler BJ, Bastos-Carvalho A, Yasuma T, et al. TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2013) 54(12):7395–401. doi:10.1167/iovs.13-12500
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* (2009) 136(2):215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea CK, Ramakrishnan P, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med* (2012) 209(9):1655–70. doi:10.1084/jem.20112218
- Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity. *J Biol Chem* (2009) 284(50):34590–9. doi:10.1074/jbc.M109.056317
- Rebane A, Runnel T, Aab A, Maslovskaja J, Ruckert B, Zimmermann M, et al. MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis



- through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134(4):836–47.e11. doi:10.1016/j.jaci.2014.05.022
19. Gao M, Wang X, Zhang X, Ha T, Ma H, Liu L, et al. Attenuation of cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by MicroRNA-146a is mediated via targeting of IRAK1 and TRAF6 expression. *J Immunol* (2015) 195(2):672–82. doi:10.4049/jimmunol.1403155
  20. Zhang QB, Qing YF, Yin CC, Zhou L, Liu XS, Mi QS, et al. Mice with miR-146a deficiency develop severe gouty arthritis via dysregulation of TRAF6, IRAK1 and NALP3 inflammasome. *Arthritis Res Ther* (2018) 20(1):45. doi:10.1186/s13075-018-1546-7
  21. Dalbeth N, Pool B, Shaw OM, Harper JL, Tan P, Franklin C, et al. Role of miR-146a in regulation of the acute inflammatory response to monosodium urate crystals. *Ann Rheum Dis* (2015) 74(4):786–90. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205409
  22. Zhou Q, Haupt S, Kreuzer JT, Hammitzsch A, Proft F, Neumann C, et al. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2015) 74(6):1265–74. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204377
  23. Saferding V, Puchner A, Goncalves-Alves E, Hofmann M, Bonelli M, Brunner JS, et al. MicroRNA-146a governs fibroblast activation and joint pathology in arthritis. *J Autoimmun* (2017) 82:74–84. doi:10.1016/j.jaut.2017.05.006
  24. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(5):1604–9. doi:10.1073/pnas.0610731104
  25. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* (2010) 33(4):607–19. doi:10.1016/j.immuni.2010.09.009
  26. Alivernini S, Gremese E, McSharry C, Tulusso B, Ferraccioli G, McInnes IB, et al. MicroRNA-155 at the critical interface of innate and adaptive immunity in arthritis. *Front Immunol* (2017) 8:1932. doi:10.3389/fimmu.2017.01932
  27. Zheng Y, Xiong S, Jiang P, Liu R, Liu X, Qian J, et al. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by downregulating microRNA-155: a novel anti-inflammation mechanism. *Free Radic Biol Med* (2012) 52(8):1307–17. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.031
  28. Mann M, Mehta A, Zhao JL, Lee K, Marinov GK, Garcia-Flores Y, et al. An NF-kappaB-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses. *Nat Commun* (2017) 8(1):851. doi:10.1038/s41467-017-00972-z
  29. Emde A, Hornstein E. miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *EMBO J* (2014) 33(13):1428–37. doi:10.15252/embj.201488142
  30. Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* (2009) 46(6):1222–8. doi:10.1016/j.molimm.2008.11.012
  31. Ostermann E, Tuddenham L, Macquin C, Alsaleh G, Schreiber-Becker J, Tanguy M, et al. Deregulation of type I IFN-dependent genes correlates with increased susceptibility to cytomegalovirus acute infection of dicer mutant mice. *PLoS One* (2012) 7(8):e43744. doi:10.1371/journal.pone.0043744
  32. Sun Y, Luo ZM, Guo XM, Su DF, Liu X. An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front Cell Neurosci* (2015) 9:193. doi:10.3389/fncel.2015.00193
  33. Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(3):601–8. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206417
  34. White E, Schlackow M, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ, Gullerova M. Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* (2014) 21(6):552–9. doi:10.1038/nsmb.2827
  35. Chiappinelli KB, Haynes BC, Brent MR, Goodfellow PJ. Reduced DICER1 elicits an interferon response in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Res* (2012) 10(3):316–25. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0520
  36. Baer C, Squadrino ML, Laoui D, Thompson D, Hansen SK, Kiiialainen A, et al. Suppression of microRNA activity amplifies IFN-gamma-induced macrophage activation and promotes anti-tumour immunity. *Nat Cell Biol* (2016) 18(7):790–802. doi:10.1038/ncb3371
  37. Berger A, Ivanova E, Gareau C, Scherrer A, Mazroui R, Strub K. Direct binding of the Alu binding protein dimer SRP9/14 to 40S ribosomal subunits promotes stress granule formation and is regulated by Alu RNA. *Nucleic Acids Res* (2014) 42(17):11203–17. doi:10.1093/nar/gku822
  38. Emde A, Eitan C, Liou LL, Libby RT, Rivkin N, Magen I, et al. Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J* (2015) 34(21):2633–51. doi:10.15252/embj.201490493
  39. Battu S, Afroz S, Giddaluru J, Naz S, Huang W, Khumukcham SS, et al. Amino acid starvation sensing dampens IL-1beta production by activating ribocustering and autophagy. *PLoS Biol* (2018) 16(4):e2005317. doi:10.1371/journal.pbio.2005317
  40. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2013) 13(12):875–87. doi:10.1038/nri3547
  41. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, et al. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab* (2012) 16(3):336–47. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.017
  42. Serna E, Gambini J, Borrás C, Abdelaziz KM, Belenguer A, Sanchis P, et al. Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs. *Sci Rep* (2012) 2:961. doi:10.1038/srep00961
  43. Borrás C, Serna E, Gambini J, Ingles M, Vina J. Centenarians maintain miRNA biogenesis pathway while it is impaired in octogenarians. *Mech Ageing Dev* (2017) 168:54–7. doi:10.1016/j.mad.2017.07.003
  44. Munk R, Panda AC, Grammatikakis I, Gorospe M, Abdelmohsen K. Senescence-associated microRNAs. *Int Rev Cell Mol Biol* (2017) 334:177–205. doi:10.1016/bs.ircmb.2017.03.008
  45. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* (2013) 153(6):1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
  46. Heras SR, Macias S, Caceres JF, Garcia-Perez JL. Control of mammalian retrotransposons by cellular RNA processing activities. *Mob Gen Elements* (2014) 4:e28439. doi:10.4161/mge.28439
  47. Wang J, Geesman GJ, Hostikka SL, Atallah M, Blackwell B, Lee E, et al. Inhibition of activated pericentromeric SINE/Alu repeat transcription in senescent human adult stem cells reinstates self-renewal. *Cell Cycle* (2011) 10(17):3016–30. doi:10.4161/cc.10.17.17543
  48. Haussecker D, Proudfoot NJ. Dicer-dependent turnover of intergenic transcripts from the human beta-globin gene cluster. *Mol Cell Biol* (2005) 25(21):9724–33. doi:10.1128/MCB.25.21.9724-9733.2005
  49. Chitale S, Richly H. DICER and ZRF1 contribute to chromatin decondensation during nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* (2017) 45(10):5901–12. doi:10.1093/nar/gkx261
  50. Reis FC, Branquinho JL, Brandao BB, Guerra BA, Silva ID, Frontini A, et al. Fat-specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction in mice. *Aging* (2016) 8(6):1201–22. doi:10.18632/aging.100970
  51. Noren Hooten N, Martin-Montalvo A, Dluzen DF, Zhang Y, Bernier M, Zonderman AB, et al. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence. *Aging Cell* (2016) 15(3):572–81. doi:10.1111/acer.12469
  52. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* (2007) 100(8):1164–73. doi:10.1161/01.RES.0000265065.26744.17
  53. van Onna M, Boonen A. The challenging interplay between rheumatoid arthritis, ageing and comorbidities. *BMC Musculoskelet Disord* (2016) 17:184. doi:10.1186/s12891-016-1038-3
  54. Straub RH, Scholmerich J, Cutolo M. The multiple facets of premature aging in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2003) 48(10):2713–21. doi:10.1002/art.11290
  55. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol* (2018) 9:586. doi:10.3389/fimmu.2018.00586
  56. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* (2011) 365(23):2205–19. doi:10.1056/NEJMr1004965
  57. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* (2017) 46(2):183–96. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.006

58. Ospelt C, Gay S, Klein K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Immunopathol* (2017) 39(4):409–19. doi:10.1007/s00281-017-0621-5
59. Vicente R, Noel D, Pers YM, Apparailly F, Jorgensen C. Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2016) 12(4):211–20. doi:10.1038/nrrheum.2015.162
60. Chen XM, Huang QC, Yang SL, Chu YL, Yan YH, Han L, et al. Role of micro RNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: novel perspectives based on review of the literature. *Medicine* (2015) 94(31):e1326. doi:10.1097/MD.0000000000001326
61. Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibilia J, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* (2012) 188(1):454–61. doi:10.4049/jimmunol.1102348
62. Philippe L, Alsaleh G, Pichot A, Ostermann E, Zuber G, Frisch B, et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis* (2013) 72(6):1071–9. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201654
63. Alsaleh G, Francois A, Philippe L, Gong YZ, Bahram S, Cetin S, et al. MiR-30a-3p negatively regulates BAFF synthesis in systemic sclerosis and rheumatoid arthritis fibroblasts. *PLoS One* (2014) 9(10):e111266. doi:10.1371/journal.pone.0111266
64. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2008) 58(4):1001–9. doi:10.1002/art.23386
65. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* (2008) 58(5):1284–92. doi:10.1002/art.23429
66. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubbs MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* (2008) 10(4):R101. doi:10.1186/ar2493
67. Chan EK, Ceribelli A, Satoh M. MicroRNA-146a in autoimmunity and innate immune responses. *Ann Rheum Dis* (2013) 72(Suppl 2):ii90–5. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202203
68. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(27):11193–8. doi:10.1073/pnas.1019536108
69. Long L, Yu P, Liu Y, Wang S, Li R, Shi J, et al. Upregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* (2013) 2013:296139. doi:10.1155/2013/296139
70. Elmesmari A, Fraser AR, Wood C, Gilchrist D, Vaughan D, Stewart L, et al. MicroRNA-155 regulates monocyte chemokine and chemokine receptor expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* (2016) 55(11):2056–65. doi:10.1093/rheumatology/kew272
71. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum* (2011) 63(5):1281–8. doi:10.1002/art.30281
72. Hu Q, Tanasa B, Trabucchi M, Li W, Zhang J, Ohgi KA, et al. DICER- and AGO3-dependent generation of retinoic acid-induced DR2 Alu RNAs regulates human stem cell proliferation. *Nat Struct Mol Biol* (2012) 19(11):1168–75. doi:10.1038/nsmb.2400
73. Patchesung M, Settayanon S, Pongpanich M, Mutirangura D, Jintarith P, Mutirangura A. Alu siRNA to increase Alu element methylation and prevent DNA damage. *Epigenomics* (2018) 10(2):175–85. doi:10.2217/epi-2017-0096
74. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15(7):482–96. doi:10.1038/nrm3823
75. Chalan P, van den Berg A, Kroesen BJ, Brouwer L, Boots A. Rheumatoid arthritis, immunosenescence and the hallmarks of aging. *Curr Aging Sci* (2015) 8(2):131–46. doi:10.2174/1874609808666150727110744
76. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis – shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol* (2016) 12(1):63–8. doi:10.1038/nrrheum.2015.171
77. Rahmati M, Moosavi MA, McDermott MF. ER stress: a therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Trends Pharmacol Sci* (2018) 39(7):610–23. doi:10.1016/j.tips.2018.03.010
78. Nakamura T, Kunz RC, Zhang C, Kimura T, Yuan CL, Baccaro B, et al. A critical role for PKR complexes with TRBP in immunometabolic regulation and eIF2alpha phosphorylation in obesity. *Cell Rep* (2015) 11(2):295–307. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.021
79. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res* (2015) 43(9):4365–80. doi:10.1093/nar/gkv328
80. Gross TJ, Powers LS, Boudreau RL, Brink B, Reisetter A, Goel K, et al. A microRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to SUMOylation of the endonuclease DICER. *J Biol Chem* (2014) 289(18):12823–34. doi:10.1074/jbc.M114.565473
81. Gelfand BD, Wright CB, Kim Y, Yasuma T, Yasuma R, Li S, et al. Iron toxicity in the retina requires Alu RNA and the NLRP3 inflammasome. *Cell Rep* (2015) 11(11):1686–93. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.023

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 De Cauwer, Mariotte, Sibilia, Bahram and Georgel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Annexe 5: Article

**A mouse model of MSU-induced acute inflammation in vivo suggests imiquimod-dependent targeting of IL-1 $\beta$  as relevant therapy for gout patients. *Theranostics*, 2020;10(5)**

Alexandre Mariotte, Aurore De Cauwer, Chrystelle Po, Chérine Abou-Faycal, Angélique Pichot, Nicodème Paul, Ismael Aouadi, Raphael Carapito, Benoit Frich, Cécile Macquin, Emmanuel Chatelus, Jean Sibilia, Jean-Paul Armspach, Seimak Bahram and Philippe Georgel.

Les cristaux d'urate de monosodiques (MSU) provoquent l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 *in vitro* mais cette relation est très mal caractérisée *in vivo*.

Pour répondre à cette problématique, nous avons caractérisé un modèle d'injection sous-cutanée de MSU chez différentes lignées de souris, mutée ou non pour différents inflammasomes. L'injection sous-cutanée de MSU représente un bon modèle d'inflammation aigue uratique avec une forte production d'IL1 $\beta$  et des lésions touchant les tissus mous, reproduisant partiellement la pathologie de la goutte chez l'Homme. Le développement de l'inflammation chez des souris *Nlrp3<sup>-/-</sup>*, *AIM2<sup>-/-</sup>* ou *Nlrp3<sup>-/-</sup>; Aim2<sup>-/-</sup>* montre une contribution très limitée de ces inflammasomes dans la pathologie et implique que la maturation de l'IL1 $\beta$  est (au moins partiellement) indépendante des inflammasomes dans un contexte expérimental réalisé *in vivo*. L'application d'une crème contenant de l'Imiquimod chez la souris permet de réduire la production d'IL1 $\beta$  et l'infiltrat de neutrophiles et suggère que ce traitement pourrait être transposé chez l'Homme comme alternative possible aux traitements généraux qui comportent des effets secondaires graves et invalidants.



Research Paper

# A mouse model of MSU-induced acute inflammation *in vivo* suggests imiquimod-dependent targeting of *IL-1 $\beta$* as relevant therapy for gout patients

Alexandre Mariotte<sup>1,2</sup>, Aurore De Cauwer<sup>1,2</sup>, Chrystelle Po<sup>3</sup>, Chérine Abou-Faycal<sup>1,2</sup>, Angélique Pichot<sup>1,2</sup>, Nicodème Paul<sup>1,2</sup>, Ismael Aouadi<sup>1,2</sup>, Raphael Carapito<sup>1,2</sup>, Benoit Frisch<sup>4</sup>, Cécile Macquin<sup>1,2</sup>, Emmanuel Chatelus<sup>5</sup>, Jean Sibilia<sup>1,2,5</sup>, Jean-Paul Armspach<sup>3</sup>, Seiamak Bahram<sup>1,2</sup> and Philippe Georgel<sup>1,2</sup>✉

1. Université de Strasbourg, INSERM, ImmunoRhumatologie Moléculaire UMR\_S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, F-67000 Strasbourg, France.
2. Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 67085 Strasbourg, France.
3. ICube, University of Strasbourg, CNRS, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), France.
4. Laboratoire de Conception et Applications des Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, UMR 7199 CNRS/Université de Strasbourg, France.
5. Centre de Référence des Maladies Autoimmunes Rares, Service de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

✉ Corresponding author: pgeorgel@unistra.fr, tel +33 (0) 368.853.984, Fax +33 (0) 368.853.965

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2019.09.25; Accepted: 2019.10.24; Published: 2020.01.12

## Abstract

**Rationale:** The role of Monosodium Urate (MSU) crystals in gout pathophysiology is well described, as is the major impact of IL-1 $\beta$  in the inflammatory reaction that constitutes the hallmark of the disease. However, despite the discovery of the NLRP3 inflammasome and its role as a Pattern Recognition Receptor linking the detection of a danger signal (MSU) to IL-1 $\beta$  secretion *in vitro*, the precise mechanisms leading to joint inflammation in gout patients are still poorly understood.

**Methods:** Acute urate crystal inflammation was obtained by subcutaneous injections of MSU crystals in mice. Symptoms were followed by scoring, cytokine quantification by ELISA and western blot, gene expression by RT-qPCR and RNAseq; Magnetic Resonance Imaging was also used to assess inflammation.

**Results:** We provide an extensive clinical, biological and molecular characterization of an acute uratic inflammation mouse model which accurately mimics human gout. We report the efficacy of topical imiquimod treatment and its impact on Interferon-dependent down modulation of *IL-1 $\beta$*  gene expression in this experimental model.

**Conclusion:** Our work reveals several key features of MSU-dependent inflammation and identifies novel therapeutic opportunities for gout patients.

## Introduction

Gout is a painful inflammatory arthritis, which exhibits an increasing prevalence worldwide, thereby representing a public health issue [1]. While systemic hyperuricemia leading to the accumulation of Monosodium Urate (MSU) crystals is a well-established etiological cause of the disease, the precise understanding of the molecular and cellular

mechanisms driving joint inflammation is no yet achieved. Genome-wide association studies (GWAS) performed in Japanese patients and controls evidenced variants in genes encoding proteins involved in urate transport and metabolism [2], and the prominent role of urate transporters was confirmed in various populations [3]. More recently, a

GWAS realized on Taiwanese patients revealed 36 loci associated with gout, among which rs2231142 in the *ABCG2* gene exhibited the strongest linkage [4]. Of note, *ABCG2* knockdown in endothelial cells induces increased secretion of the neutrophil chemoattractant IL-8, which might provide some mechanistic insights into gout pathophysiology. Surprisingly, none of these pan-genomic studies - some of which were performed in considerably large cohorts (e.g. 70,000 patients [5]) - revealed any linkage with genes encoding components of the NLRP3 inflammasome. Gain-of-function mutations in *NLRP3* are responsible for cryopyrin-associated autoinflammatory syndrome (CAPS) characterized by systemic inflammation (fever and urticaria-like rash) not evocative of gout, although arthralgia and periarticular swelling can occur [6]. This appears in sharp contrast with the standard model which stipulates that MSU crystals trigger activation of the NLRP3 inflammasome, ultimately leading to IL-1 $\beta$  secretion [7]. Indeed, a large body of evidence indicates that *Nlrp3* deficiency prevents IL-1 $\beta$  secretion by murine macrophages following MSU crystals stimulation [8]. Human mononuclear cells also respond to MSU crystals which, in synergy with lipopolysaccharide (LPS), enhance IL-1 $\beta$  production [9]. However, these experiments require the presence of LPS as a “priming signal” necessary for optimal IL-1 $\beta$  release, a component which is likely absent in gout patients. Recently, neutrophils, which are abundant in the inflamed synovial fluids of acute gout patients, also appeared as major players in gouty arthritis [10]. Moreover, these cells are also involved during the resolutive phase through NETosis [11]. In the present work, we sought to gain additional insights into cellular and molecular interactions driving gouty arthritis and for this, we performed subcutaneous (s.c) injections of MSU crystals in the hind paws of mice, a model that accurately mimics the human disease, both clinically as well as pharmacologically. In this setting, we observed that both the NLRP3 and AIM2 inflammasomes are, at best, only partially required for the full development of the disease *in vivo*. This likely indicates that multiple pathways may act redundantly to promote the release of bioactive IL-1 $\beta$ , and highlights the necessity to target *Il-1 $\beta$*  gene expression for efficient therapeutic purposes.

## Materials and Methods

### Reagents

MSU crystals were generated as described [12]. Briefly, we dissolved 1,68g of uric acid (Sigma-Aldrich) into 500mL of water containing 0,01M of NaOH by heating at 70°C, pH was adjusted

to 7,1-7,2. Then, the uric acid solution was left at room temperature until the crystals formed under mild agitation. Crystals were then washed in ethanol, dried, weighted and thermally treated (250°C for an hour) and finally sonicated to obtain crystals <50 $\mu$ m in length. They were aliquoted in sterile PBS and frozen at -20°C until use. Poly-(dA:dT) and Lipofectamine 3000 were purchased from Invivogen and Invitrogen, respectively; LPS (*Salmonella abortus equi*), ATP and Colchicine from Sigma-Aldrich; ELISA kits (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , MPO) from Biotechne. Thioglycolate was home-made from brewer's thioglycolate (BD). The various antibodies used for Western blot were from Biotechne (anti-mouse IL-1 $\beta$ , AF401, and secondary HAF-109) or from Abcam (anti-tubulin) and Sigma-Aldrich (anti-vinculin). Anti-Gr1, Anti-CD11b, anti-CD14 and 7-AAD were obtained from eBioscience. CRT0066101 was provided from the lab of Romeo Ricci and is available from Tocris Bioscience; Anakinra was generously provided by Ommar S. Omarjee and Alexandre Belot (Lyon University, France) and Etanercept by Christian Von Frenckel (Liege University, Belgium).

### Acute uratic inflammation model

In this model, 3mg of preformed MSU crystals (described above) resuspended in 70 $\mu$ L of sterile PBS were injected by the subcutaneous route in the left hind paws of animals; the right paw was injected with PBS as control. Hind paw thickness was measured with a caliper and arthritis visual scores were established on the basis of tarsal/ankle oedema and erythema presence (0 = no arthritis, 1 = slight swelling and/or erythema, 2 = moderate swelling/erythema, 3 = severe oedema/erythema and 4 = excessive oedema spanning all over the paw). Visual scores were made by two independent experimenters. Mice were also monitored for body temperature.

### Study approval

Handling of mice and experimental procedures were conducted in accordance with the French law for the protection of laboratory animals. The procedures were approved by the “service vétérinaire de la Préfecture du Bas-Rhin” (Strasbourg, France) and by the Regional ethical committee for animal experimentation (CREMEAS) of the Strasbourg University, under the authorization number 2018083014133041.

### Mice

*Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Casp1/11*<sup>-/-</sup> mice were provided by Romeo Ricci (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire (IGBMC), Illkirch, France), *Aim2*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Veit Hornung (Ludwig-Maximilians-Universität München,

Germany) and *Ifnar1<sup>-/-</sup>* from Rolf Zinkernagel (University Hospital, Zurich, Switzerland); we generated the double knock out mice (*Aim2<sup>-/-</sup>; Nlrp3<sup>-/-</sup>*) in our animal facility. *Il-1 $\alpha$*  KO, *Il-1 $\beta$*  KO, *Il-1R1* KO and *MyD88* KO mice were provided by Bernhard Ryffel (UMR7355 CNRS - Université d'Orléans, France). Littermate controls are indicated by +/+ in all figures. All the mice used in these experiments were maintained under pathogen-free conditions in the animal facility of our laboratory (Institut d'Hématologie et d'Immunologie, Strasbourg, France) and were sex- and age-matched (12-16 weeks).

### Topical application of imiquimod

Mice were anesthetized by intramuscular injection of Ketamine/Xylazine. The imiquimod-containing cream (ALDARA) or vehicle control cream were applied on the hind paws from the ankle to the tip of digits with a pen embedded into a latex glove. 250mg of ALDARA containing 5% imiquimod were sufficient to treat 10-12 paws, corresponding approximately to 1-1,25mg of imiquimod/paw [13]. The composition of the control cream is the following: Purified water: 52.9%; paraffin: 30%; benzylic alcohol: 0.1%; glycerol: 1%; stearic acid: 3%; polysorbate: 7%; xanthan: 2%; stearate sorbitan: 4%.

### MSU-induced peritonitis model

One milligram of preformed MSU crystals was injected intraperitoneally at h0 and a peritoneal lavage was conducted 6h later, under anesthesia, with cold PBS. Peritoneal fluid was subsequently analyzed by flow cytometry and ELISA. Briefly, the liquid was filtered through a 40 $\mu$ m porosity strainer, centrifuged at 300g 5min at 4°C and cells were stained with anti-Gr1-FITC, anti-CD11b-APC and anti-CD14-PE antibodies to count the neutrophil and monocyte populations. Absolute numbers were also determined in peritoneal collections by multiplying the percentages of neutrophils/monocytes to the absolute numbers of cells in the lavage. Flow cytometry acquisitions were realized with the BD Accuri C6 cytometer (BD), data were analyzed with the BD Accuri Software.

### Magnetic resonance imagery (MRI)

To detect and localize inflammation in paws, anatomical MRI was acquired in eight *ex vivo* mice. The day before MRI exam, 3mg of MSU and PBS were injected subcutaneously in the left and right paws respectively. ALDARA cream was applied on paws in four mice; control cream was applied on the other four. Mice were sacrificed under isoflurane anesthesia just before the MRI. MRI was performed on 7/30 Biospec system (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany).

Transmission was achieved with a quadrature volume resonator (inner diameter of 86 mm), and a surface coil (~ 10 mm), installed on paw, was used for signal reception (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). MRI experiments were realized with ParaVision 6.0.1 software. T2WI anatomical dataset was acquired using RARE-3D sequence using following parameters: FOV: 15 x 15 x 8 mm<sup>3</sup>, matrix 150 x 150 x 80, TE eff = 26.7 ms, TR = 2 s, N avg = 1, RARE-Factor = 14.

### MRI Data analysis and 3D reconstruction

The signal bias of T2WI induced by the surface coil used was corrected with N4 bias correction (Advanced Normalization Tools, ANTs). Paws were automatically co-registered based on the bones to one of the control mouse using FLIRT (FMRIB Software Library, Oxford, UK). The inflammatory areas were automatically segmented using FAST (FMRIB Software Library, Oxford, UK). Volumetric images were obtained with the help of the 3D viewer module of Image J, 3D reconstruction was made using the 3D Slicer software.

### Protein preparation from paws

In order to quantify the cytokine production *in situ*, hind paws were collected from euthanized mice and stored at -80°C. Paws were first minced with a scalpel in a Petri dish placed on dry ice. Small tissue pieces were maintained on ice and 1mL of NP40 lysis buffer was added before homogenization with a tissue tearer (OMNI International Tissue MASTER 125). Tubes were then kept on ice for 45min and centrifuged at 12 000g 20min at 4°C; afterwards, the supernatants were collected in individual Eppendorf protein-low bind 1,5mL tubes (Eppendorf) and stored at -80°C. Cytokine measurements were performed by ELISA and Western Blot.

### RNA preparation from paws

RNAs were prepared similarly to proteins (collection of paws, slicing) but tissues were homogenized in 2mL of Trizol (TRI-Reagent, Sigma-Aldrich) instead of NP40 lysis buffer. Homogenates were transferred in a nuclease-free 1,5mL Eppendorf tube and RNA was purified as previously described [13]. Total RNAs were quantified using a Nanodrop device and then treated with DNase I (Roche) according to the manufacturer's instructions.

### RNA-seq

Total RNA integrity was determined with the Agilent total RNA Pico Kit on a 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Library construction was performed with the

"SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian" (TaKaRa Bio USA, Inc., Mountain View, CA, USA) with a final multiplexing of 11 libraries according to the manufacturer's instructions. The library pool was denatured according to the Illumina protocol "Denature and Dilute Libraries Guide" and then deposited at a final concentration of 1.3 pM to be sequenced on the NextSeq 500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

### Analysis of RNA-seq data

The transcriptome data set, composed of sequencing reads, was generated by an Illumina NextSeq instrument. The objective was to identify genes that are differentially expressed between two experimental conditions, namely treatment and control. For every sample, quality control was carried out and assessed with the NGS Core Tools FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Sequence reads are mapped using STAR [14] and unmapped reads are remapped with Bowtie2 [15] using with the very sensitive local option. The total reads mapped were finally available in BAM (Binary Alignment Map) format for raw read counts extraction. Read counts were found by the htseq-count tool of the Python package HTSeq [16] with default parameters to generate an abundant matrix. At last, differential analyses were performed by the DESEQ2 [17] package of the Bioconductor framework. Up-regulated and down-regulated genes were selected based on the adjusted p-value and the fold-change information. Gene expression was analyzed using dedicated R scripts to build volcano plots and graphs of Gene Ontology (GO) terms enrichment. Heatmaps were built using the online application heatmapmer (<http://www.heatmapmer.ca/>). IPA (Ingenuity pathway analysis, Qiagen) was used for pathway analysis. Predictions of immune cell population from RNAseq data were made with the ImmQuant deconvolution software [18].

### Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was reverse transcribed using the cDNA synthesis kit (iScript ready-to-use cDNA supermix, Biorad). Real-time quantitative RT-qPCR was performed in a total volume of 20 µL using the Sso-advanced universal SYBR-Green supermix (Biorad) and gene-specific primers (sequence available upon request). After a denaturing step at 95°C for 30 seconds, 40 cycles were performed (95°C for 5s and 60°C for 20s) using a Rotor-Gene 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science). Results were obtained using the SDS Software (Perkin Elmer) and evaluated using Excel (Microsoft). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of

PCR products. Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method, normalized on a control group.

### Western blot

IL-1β-maturation quantification was performed by western blot from ground paw samples (see previous sections). Briefly, total proteins were quantified in paw extracts using the Bicinchoninic acid technique (BCA) and 75-100 µg of proteins were loaded on 12% polyacrylamide gels (Biorad). The migration step was followed by a liquid transfer on PVDF membranes (100V 40min) and a blocking step for 1h with TBS-Tween 1% milk 5%. Membranes were then probed with AF-401 (IL-1β), anti-vinculine (V9131, Sigma-Aldrich) or anti-tubulin (DM1A, Abcam) antibodies at 4°C overnight. HAF-109 and goat anti-mouse antibodies were subsequently used as secondary antibodies (1h, RT). Revelation was conducted with the Femto super-signal kit. Three washes were realized between each stage.

### Cell culture

Peritoneal macrophages were collected from peritoneal exudates 72h after the injection of 2mL of Thioglycolate 4%. Cells were washed, counted and plated at a density of 5x10<sup>5</sup> cells/well (24 well-plates) in RPMI 1640 (Gibco) 10% FBS (Dutcher); the medium was changed for a fresh one 3h later.

Peritoneal neutrophils were harvested after a short course of thioglycolate (18h) and purified using Ficoll Plaque leading to a purity greater than 90%. Neutrophils were plated immediately at a density of 1x10<sup>6</sup> cells/well in RPMI 1640 10% FCS. Cell stimulations were performed *in vitro*.

### Inflammasome activation

In order to stimulate the production of pro-IL-1β, cells were pre-treated with LPS 1 µg/mL for 3h and the NLRP3 inflammasome was then activated with 2mM ATP for 1h or with MSU crystals (250 µg/mL) for 6h. The AIM2 inflammasome was activated by the transfection of 0.5 µg of poly-dA:dT using the Lipofectamine 3000 kit, the medium was collected 8h after transfection. After each activation, the supernatants were collected, centrifuged at 2000g 5min 4°C to get rid of the cell debris and the supernatants were harvested in new tubes, all samples were kept a -80°C.

### Inhibitors

The CRT0066101 inhibitor (available from Tocris bioscience) was used *in vitro* at a dose of 10 µM and introduced in the culture medium 1h prior to LPS priming and kept at this concentration all along the activation. 0.1 % DMSO was used as control.



## Statistics

Following normality tests (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk), data were analyzed with a Mann-Whitney test (two-tailed unpaired) to compare two independent groups using GraphPad 5.01 software. A probability (p) value of < 0.05 was considered significant. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

## Results

### Subcutaneous injection of MSU crystals in mice recapitulates human gouty arthritis

To investigate molecular and cellular relationships that participate in gouty arthritis, we used a mouse model in which MSU crystals are injected subcutaneously (s.c) on the dorsal face of hind paws [11, 19]. As seen in Supplementary Fig. 1 A-B, mice subjected to this protocol develop an oedema, which can reach the ankle area within 24h (acute phase). However, the inflammation gradually decreases after seven days (168h) and MSU crystals can be visible under the skin as tophi-like structures. Magnetic resonance imaging (MRI, panel C) of MSU-injected paws revealed tenosynovitis, subcutaneous oedema and crystal deposits which were absent in PBS-injected contralateral paws. These manifestations correlated with peak production of mature (17 kDa) IL-1 $\beta$  at 24h post MSU crystal injection (p.i) (Panel D). Of note, paw thickness, as well as inflammatory score (which depends on both redness and swelling) were significantly reduced when mice were treated with colchicine, the standard of care for human gout (Supplementary Fig. 2A-D). Increased body temperature, reflecting the systemic effects of MSU injection, was also impacted by colchicine therapy. Furthermore, this model was responsive to the IL-1 receptor antagonist Anakinra (Supplementary Fig. 2E-F), at least during the initial phase of the disease (which probably reflects its limited half-life [20]), but not to the TNF- $\alpha$  blocker Etanercept (Supplementary Fig. 2G-H). Because of this partial receptor-mediated IL-1 $\beta$  inhibition, we performed MSU-induced acute inflammation in *Il-1 $\beta$*  KO animals and observed a major reduction of paw swelling and clinical scores (Supplementary Fig 3A-B), concomitantly with a drastic decrease of tissue IL-6 and Myeloperoxidase (MPO, Supplementary Fig. 3 C-E). On the contrary, MSU-injected *Il-1 $\alpha$*  KO mice exhibited only limited reduction in tissue IL-1 $\beta$  and MPO, with clinical symptoms of joint inflammation similar to wild types. Altogether, these data ascertained the s.c injection of MSU crystals in mice as an acute uratic inflammation model, highly dependent on massive IL-1 $\beta$  secretion, which appears to mimic human gout.

### The PKD - NLRP3 axis is dispensable for acute uratic inflammation in mice

NLRP3 is described as a sensor of MSU crystals in macrophages [8] and considered a major player in the development of gout in various *in vivo* models [21, 22]. However, this dogma regarding the central role of NLRP3 in gout has been challenged [23, 24], although IL-1 $\beta$  remains a crucial cytokine in the development of the disease. In our model, *Nlrp3*-deficient mice exhibited similar joint swelling and clinical score compared with littermate controls (Fig. 1 A, B), despite showing reduced fever 24 h after MSU challenge (Panel C). We therefore checked IL-1 $\beta$  expression in our model. Both pro and mature forms were similarly detected by Western blot in the paws of mutant and wild type mice during the acute phase (24h) after MSU injection (Fig. 1D). Accordingly, quantification of IL-1 $\beta$  by tissue ELISA (which detects both pro and mature forms) showed equivalent amounts in paws from MSU-stimulated *Nlrp3* mutants and controls 24h post MSU injection (Fig. 1E). Finally, myeloperoxidase quantification revealed similar neutrophil infiltration in the paws of *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and wild type animals following MSU injection (Fig. 1F). Similar results were obtained following pharmacological (using CRT0066101) inhibition of Protein Kinase D (PKD), an essential component enabling NLRP3 inflammasome activation [25] (Supplementary Fig. 4 A-E). To check the validity of the genetic and pharmacological inhibition of NLRP3, we performed several *in vitro* experiments. In line with published reports [8, 25], macrophages and neutrophils harvested from *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice or wild type cells treated with CRT0066101 failed to secrete IL-1 $\beta$  upon MSU or ATP stimulation following LPS priming (Supplementary Fig 5 A, B), while TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion remained unaffected (Supplementary Fig. 5C). We also noted that neutrophils, as opposed to macrophages, appeared unresponsive to a corpuscular trigger (e.g. MSU crystals) compared to a soluble one (such as ATP) for NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  production, a feature that has been observed by others [26].

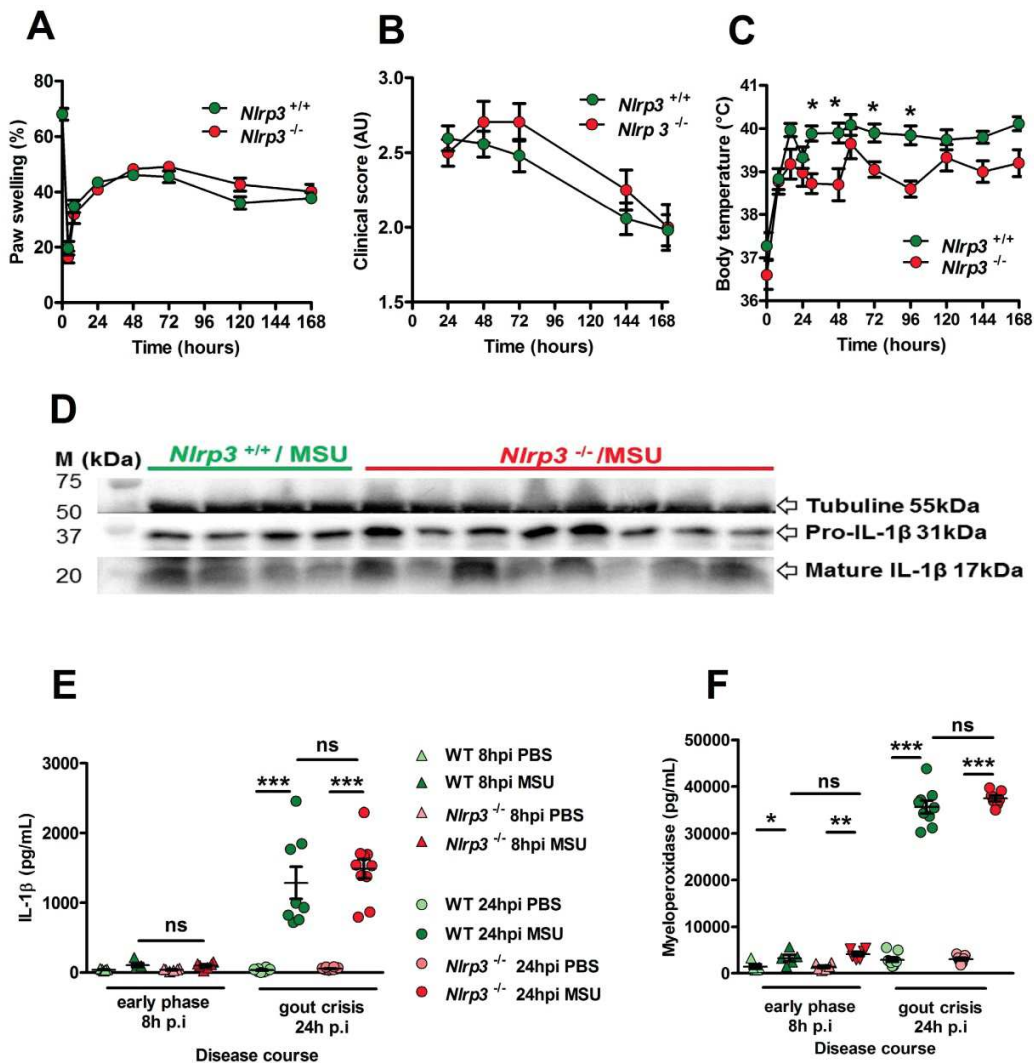
Furthermore, we performed intraperitoneal injection of MSU and observed that this inflammation model is also *Nlrp3*-independent (Supplementary Fig. 6), as assessed by similar number of infiltrating neutrophils and macrophages in the peritoneal cavity of wild type and mutant mice 6h upon MSU injection (panels B-D) and the comparable amount of IL-1 $\beta$  in the peritoneal fluid (panel E). Our data, while confirming that the NLRP3 inflammasome is mandatory in isolated cells (macrophages, neutrophils) to respond to MSU, also suggest that this

inflammasome is dispensable for *in vivo* soft tissue inflammation following s.c injection of urate crystals.

### Transcriptomic analysis following MSU-induced acute inflammation

To gain more insight into the early response (acute phase) in the paws following MSU s.c injection, we performed a genome-wide RNAseq analysis to compare MSU-injected paws to those receiving PBS as control at 24 hours post injection (hpi). As seen on the volcano plot (Supplementary Fig. 7A), a massive induction of gene transcription occurred following s.c MSU injection and the heatmap (panel B) of the significantly ( $p < 0.001$ ) 405 differentially expressed genes shows convincing unsupervised clustering of

the control (PBS) and MSU-injected samples. The heatmap of the top 100 genes (panel C) highlighted several features, among which the overexpression of *Il-1b* validated our data. Interestingly, *Tlr1* and *Tlr6* overexpression was also evidenced, pointing to a role for endogenous lipids as possible inducers of the signal I activating NF- $\kappa$ B signaling [24]. Such a signal is generally provided by LPS during experimental *in vitro* models of inflammasome activation by MSU crystals, but its physiological relevance is even more questionable in light of our data showing that *Tlr4* expression remained unaffected in MSU-challenged mice. Finally, *Ccl3* strong overexpression might also account for the high fever observed upon MSU crystals injection [27]. As expected, Gene Ontology



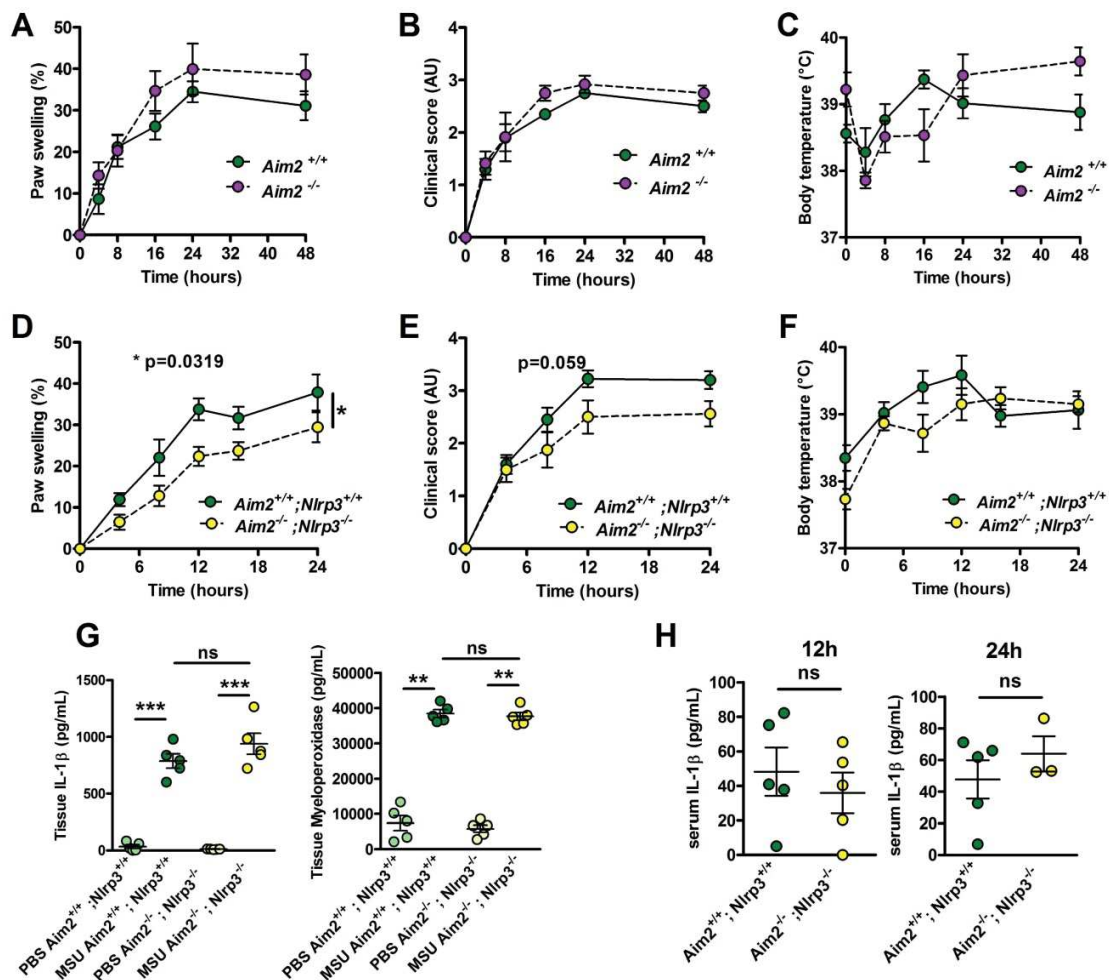
**Figure 1. The NLRP3 inflammasome is not required for IL-1 $\beta$  maturation and consecutive inflammation in the subcutaneous acute uratic inflammation model. A-F.** *Nlrp3*<sup>+/+</sup> and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were submitted to an acute uratic inflammation experiment. **A.** Paw swelling, **B.** Clinical scores and **C.** Body temperature were recorded over a 7-days-long period (n = 11 to 13 in each group). **D-F.** *In situ* (paws) analysis of IL-1 $\beta$  production/maturation and MPO quantification. **D.** 24 hours post-injection, paws were harvested and a western blot analysis was realized on 75 $\mu$ g of paw extracts to visualize pro-IL-1 $\beta$  (31kDa) and its cleaved, mature form (17kDa); Tubulin was used a loading control (n = 4 *Nlrp3*<sup>+/+</sup> and n=8 *Nlrp3*<sup>-/-</sup>). **E.** IL-1 $\beta$  and **F.** myeloperoxidase (MPO) were quantified by ELISA in paw extracts obtained at the early phase (8h post-injection, n = 5 to 6) and the peak (24hpi, n = 8 to 10). All data are representative of three independent experiments except for clinical observation (five independent experiments). Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , ns = not significant.

(GO) terms analysis (panel D) revealed an enrichment in immune responses/inflammatory responses upon MSU injection. A comparison of 211 differentially expressed genes (showing a highly statistically significant difference between PBS- and MSU-injected paws  $p < 0.0001$ ) using Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Qiagen) and Reactome (<https://reactome.org/>) revealed a significant ( $p = 2.53 \times 10^{-24}$ ) enrichment in genes required for granulocyte adhesion, diapedesis and degranulation (see IPA Network in Supplementary Fig. S8A). Finally, we used the ImmQuant tool [18] to extrapolate the immune cell composition from our RNAseq data. In line with enhanced MPO detection (Supplementary Fig. S3 and Fig. 1) and overexpression of neutrophil chemoattractants (*Cxcl1* and *Cxcl2*), MSU s.c injection triggered granulocyte and monocyte recruitment

(Supplementary Fig. S9, panels A and D).

### MSU crystal-induced inflammation can develop autonomously from both NLRP3 and AIM2 inflammasomes

Neutrophilic infiltration and subsequent NETosis, a feature of inflamed joint in gout patients [28], exposes self-DNA, which is suspected - once phagocytosed - to induce AIM2-dependent IL-1 $\beta$  secretion (reviewed in [29]). This prompted us to investigate the potential role of this alternative inflammasome in our model of acute experimental gout. Like *Nlrp3* mutants, mice lacking *Aim2* displayed inflammatory responses similar to those observed in controls following MSU crystal injection (Fig. 2 A-C). Next, to explore a possible redundancy between the two inflammasomes, we produced *Nlrp3*

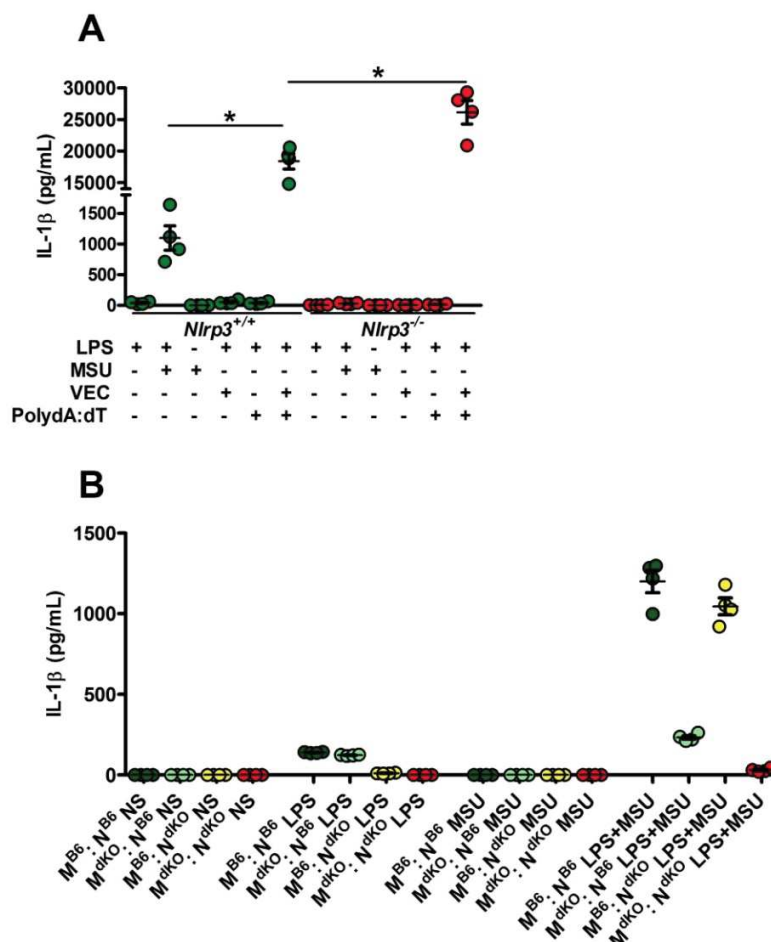


**Figure 2.** *Aim2* or *Aim2/Nlrp3* combined deficiencies do not impact on acute uratic inflammation development and severity. **A-C.** Acute uratic inflammation was induced in *Aim2*<sup>+/+</sup> and *Aim2*<sup>-/-</sup> animals (n = 3 to 6). **A.** Paw swelling, **B.** Clinical scores and **C.** Body temperature. **D-E.** *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>+/+</sup> (n = 10) and *Aim2*<sup>+/+</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (n = 8) were subjected to an acute uratic inflammation experiment. **D.** Paw swelling and **E.** Clinical scores and **F.** body temperature measures, all recorded over a 24h period. **G.** IL-1 $\beta$  and MPO quantified by ELISA in paws extracts collected at 24hpi, n = 5 in each group. **H.** IL-1 $\beta$  and MPO quantified by ELISA in serum collected 12hpi (left) and 24hpi (right) (n = 3 to 5). Symbols represent individual mice; green dots correspond to WT mice (littermate controls), purple dots to *Aim2*<sup>-/-</sup> mice and yellow dots to *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice; light colored dots represent PBS paws and bright colored dots the MSU-injected paws. Horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , ns = not significant. In graphs D. and E. the area under curve (AUC) was determined and analyzed by a Mann-Whitney test.

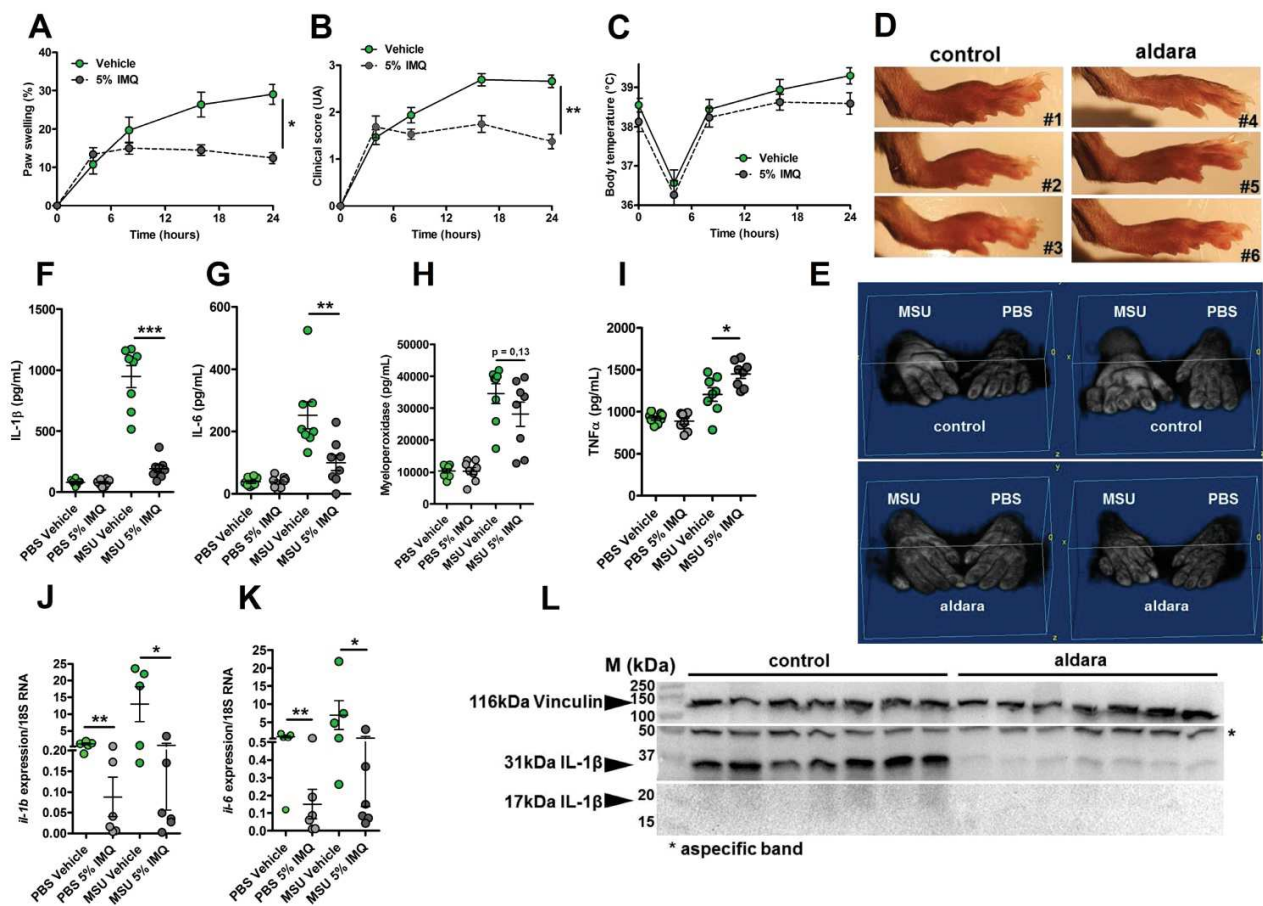
*-/-*; *Aim 2* *-/-* mice. As seen in panels D-F, double mutant mice exhibited slightly reduced clinical responses (with differences in the area under the curve of the measure of the paw swelling reaching statistical significance between wild type and double KO mice) upon MSU crystal s.c injection. However, quantification of IL-1 $\beta$  and myeloperoxidase (MPO) by tissue ELISA 24h upon MSU challenge, as well as seric IL-1 $\beta$  dosage (12 and 24 h after MSU injection, Fig 2. G-H), confirmed that MSU-dependent rise in these biological inflammatory markers can occur independently from these two inflammasomes. Similar observations could be made from the analysis of *Caspase 1/11*-deleted mice (*Casp 1**-/-*, *11* *-/-*) in which MSU injection induced a weak reduction of the inflammatory symptoms, albeit without showing any effect on IL-1 $\beta$  production (Supplementary Fig. S10).

Since *Nlrp3*-deleted macrophages can efficiently (and even more than controls) respond to transfected poly-dA:dT, a classical inducer of the AIM2

inflammasome (Fig. 3A), we tested the existence of a possible collaboration between neutrophils, in which MSU crystals poorly induce IL-1 $\beta$  secretion (Supplementary Fig. 5) but efficiently trigger DNA release through NETosis [28], and macrophages, major producers of IL-1 $\beta$  once triggered by AIM2-dependent signals (such as poly-dA:dT). For this, we performed co-cultures of both cell types isolated from wild type or *Nlrp3* *-/-*; *Aim2* *-/-* double knock-out (dKO) animals and quantified IL-1 $\beta$  in the supernatant. As seen in Fig. 3B, IL-1 $\beta$  release by control macrophages did not significantly differed whether they are cultured with neutrophils with or without MSU. This indicates that NETosis triggered by MSU ([11, 28] and our own observation) did not affect IL-1 $\beta$  release, thus suggesting that DNA exposure is not essential in this process and cannot provide the necessary signal I driving *Il-1 $\beta$*  transcription.



**Figure 3. Activated (netotic) neutrophils fail to promote IL-1 $\beta$  secretion by macrophages.** **A.** *Nlrp3*<sup>+/+</sup> and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages were seeded at 5x10<sup>5</sup> cells/well and stimulated with LPS only with LPS and MSU, LPS and lipofectamin (VEC), LPS and poly dA:dT (0,5 $\mu$ g/mL) or LPS and lipofectamin complexed with poly dA:dT (0,5 $\mu$ g/mL). Green dots represent *Nlrp3*<sup>+/+</sup> macrophages, red dots *Nlrp3*<sup>-/-</sup> cells. **B.** Wt (*C57Bl/6* or *B6*) or *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (double knock out: dKO) peritoneal macrophages (M) were plated at 5x10<sup>5</sup> cells/well together with 1x10<sup>6</sup> neutrophils (N) of both genotype making combinations (M B6 : N B6, dark green; M dKO : N B6, light green; M B6 : N dKO, yellow; M dKO : N dKO, red). Cells were left untreated (NS) or treated with LPS only (1  $\mu$ g/mL for 27h), MSU crystals only (250 $\mu$ g/mL) for 24h or both (LPS alone for 3 hours and then MSU for 24h). Cells were isolated from n=4 mice. Horizontal lines and bars correspond to mean +/- SEM; Results were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p<0.05, ns = not significant.



**Figure 4.** Topical application of an imiquimod-containing cream (ALDARA) alleviates acute uratic inflammation by down-modulating *Il-1β* and *Il-6* expression. **A-E.** C57BL/6j mice were submitted to an acute uratic inflammation experiment and immediately treated with either topical imiquimod (ALDARA® commercial cream) or a control cream. Gouty crisis was followed for 24 hours (n = 8 mice per group, data are representative of 3 independent experiments). **A.** Paw swelling, **B.** Clinical scores, **C.** Body temperature, **D.** representative pictures of the paws (16hpi) and **E.** volumetric representation of 2 pairs of control cream-treated paws (upper panel), imiquimod-treated paws (lower panel) obtained after Magnetic Resonance Imaging (MRI) and image reconstruction with 3D viewer. **F.-I.** Paws were collected at 24hpi and protein extracts were analyzed by ELISA for IL-1β (**F.**), IL-6 (**G.**), MPO (**H.**) and TNFα (**I.**). **J.-K.** Similar to **F.-I.**, paws were collected at 24hpi and analyzed by RT-qPCR analysis for *Il-1β* (**J.**) and *Il-6* expression (**K.**). **L.** Proform and mature IL-1β production was assessed by western blot of paw extracts. Vinculin was used as loading control. Green dots represent control cream-treated mice, grey dots the topical imiquimod-treated animals; light colors correspond to PBS paws, dark colors to MSU paws. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean ± SEM; Results were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001, ns = not significant. In graphs A and B, the area under the curve (AUC) was calculated and analyzed with a Mann-Whitney test.

### Imiquimod downmodulates *Il-1β* gene expression and protects from experimental acute uratic inflammation

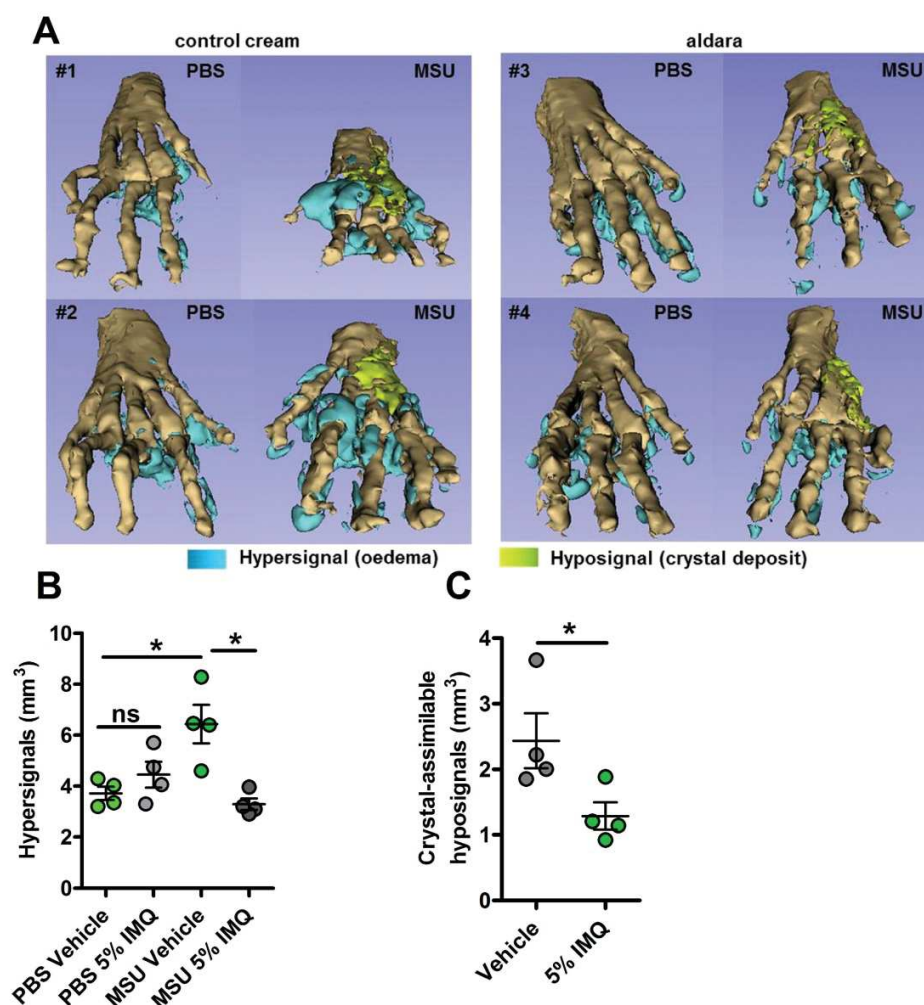
We previously reported the therapeutic effects of topical imiquimod, a known TLR7-dependent inducer of type I IFN responses in mouse models of rheumatoid arthritis [13] and its effect on neutrophil recruitment. Therefore, we questioned the potential benefits of this treatment in our present gout model, which is characterized by a transcriptomic signature revealing MSU-induced genes involved in granulocyte diapedesis and activation. Except for body temperature, topical application of imiquimod caused a marked reduction of the clinical parameters (paw swelling, redness, Fig. 4 A-E) associated with s.c injection of MSU. Tissue ELISA revealed that imiquimod specifically reduced IL-1β and IL-6 secretion in the treated paws (Panels F-G), whereas

neutrophil infiltration (visualized by MPO quantification, Panel H) and TNF-α production (panel I) remained unaffected. RTqPCR and western blot analysis further documented the negative effect of imiquimod on the transcription of the *Il-1β* and *Il-6* genes (Panels J-K) and IL-1β pro-form expression (Panel L). Finally, we used a state-of-the-art imaging approach (MRI, Fig. 5) similar to that which is currently applied to monitor patients suffering various arthritides, including gout, to quantify the beneficial effects of imiquimod. This enabled us to better demonstrate the significant reduction of oedema formation and crystal deposit in imiquimod-treated paws. MRI also enabled us to visualize the reduction of tenosynovitis in imiquimod-treated animals (Supplementary Fig. S11).

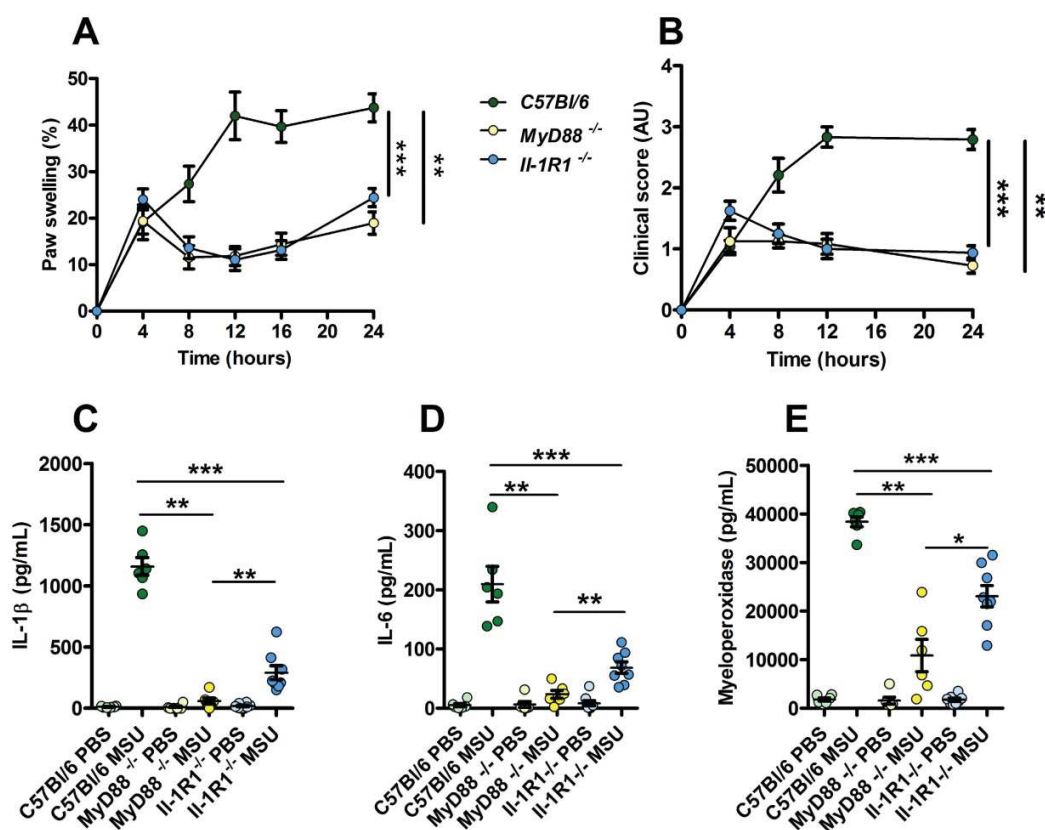
Altogether, our data support the notion that the protective effect of Imiquimod-dependent TLR7 activation involves negative transcriptional control of

genes encoding major pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-6. To better describe, at the molecular level, the pathways that are modulated by imiquimod, we performed genome-wide transcriptomic on MSU-inflamed paws treated or not with imiquimod at 24 hpi. As a control, non-inflamed (PBS-injected) paws were also treated by topical application of imiquimod. In agreement with the reported role of imiquimod on its cognate receptor (TLR7), we identified a transcriptomic signature characterized by an overexpression of Interferon-stimulated genes (ISGs, such as *Oas1* and 2, *Mx1*, *Isg15*; see Supplementary Fig. S12) in control mice (PBS-injected, imiquimod-treated). By contrast the combination MSU injection plus imiquimod induced an important down modulation of gene transcription (Supplementary Fig. S13A). Among the

genes exhibiting highly significant transcriptional repression, *Il-1 $\beta$* , as well as inflammasome components (e.g. *Nlrp3*) appeared of particular importance (Supplementary Fig. S13C) and confirmed our RT-qPCR data (Fig. 4, panels F, J and L). Furthermore, reduction of *Cxcl2* expression is likely an important event contributing to the diminution of the neutrophilic infiltrate seen by ImmQuant analysis (Supplementary Fig. S9). Interestingly, an increased skin dendritic cell signature also seemed to take part in the anti-inflammatory effect of Imiquimod in the MSU/imiquimod combination, although this intriguing observation requires additional confirmation. Finally, MSU *vs* MSU/imiquimod comparative RNAseq analysis by IPA identified interconnected type I IFN-dependent genes.



**Figure 5. MRI reveals major dampening of MSU crystal-induced oedema formation upon topical imiquimod therapy. A-C.** Acute uratic inflammation was induced and topical imiquimod or control cream were immediately applied on the paws of mice (n=4 per group). 24hpi, animals were euthanized and subjected to Magnetic Resonance Imaging (MRI). After acquisition of MRI sequences (T2, fat suppression), pictures were computed and reconstructions were made by 1) automated segmentation and 2) reconstruction of hyper-signal volumes (oedemas), hypo-signals volumes (MSU crystal-associated volume) and bones with the help of the 3D Slicer software. **A.** 3D reconstructions of 4 pairs of paws (control cream-treated, left; imiquimod-treated, right). **B.** Quantification of the hyper-signal volume. **C.** Quantification of the crystal-assimilable hypo-signal volumes. Green dots represent control cream-treated mice, grey dots imiquimod-treated animals, light colors correspond to PBS paws, dark colors to MSU-injected paws. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* =  $p < 0.05$ , ns = not significant.



**Figure 6.** Increased resistance to MSU-induced inflammation in *MyD88* KO mice compared to *IL-1R1* KO animals. *C57Bl/6* (n=6, green dots), *MyD88* KO (n=6, yellow dots) and *IL-1R1* KO (n=8, blue dots) mice were submitted to an acute uratic inflammation experiment and clinical observations were recorded over a 24h period. **A.** Paw thickness, **B.** Clinical score. **C.** IL-1 $\beta$ , **D.** IL-6 and **E.** myeloperoxidase (MPO) were quantified by ELISA in protein extracts obtained from control paws 24h post PBS injection or from the contralateral paw in which MSU was injected. Light colors correspond to PBS paws, dark colors to MSU-injected paws. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ . In graphs A. and B. the area under curve (AUC) was determined and analyzed by a Mann-Whitney test.

Interestingly, most genes involved in granulocyte adhesion and diapedesis, which were upregulated upon MSU stimulation, exhibited down-modulation in the samples from imiquimod-treated paws (see Supplementary Fig. S8B). Of note, these genes are connected in a network (predicted by IPA) in which SYK/AKT fill a central position (Supplementary Fig. S14). Although IL-1 $\beta$  repression by type I IFN has been previously described [30] and attributed to signaling through the IL-10 / STAT3 pathway [31], our dataset does not clearly point to such connection. Rather, reduced *Tlr6* expression and downstream NF- $\kappa$ B signaling is supported by the genes network built by IPA to account for diminished *Il-1b* expression. Altogether, our data suggest that the therapeutic properties of imiquimod in our experimental setting are mediated by the ability of this compound to impair two major hallmarks of inflammation: neutrophil recruitment and/or activation and IL-1 $\beta$  production.

Because our data point to a possible involvement of TLR-dependent signaling (possibly TLR1, 2 and 6) in our model of experimental acute gout, we tested the impact of MSU injection in *MyD88*- and

*IL-1R1*-deficient animals. We observed an almost complete absence of inflammatory reactions (as judged by paw swelling and clinical score) in both *MyD88* and *IL-1R1* KO mice (Fig. 6A-B). However, we noticed that *IL-1R1* KO animals exhibited a significant residual expression of inflammatory markers (IL-1 $\beta$ , IL-6 and MPO), which were nearly undetectable in *MyD88*-depleted mice (Panels C-E). Because MYD88 is an adapter used downstream of both IL-1R1- and TLR-dependent signaling pathways [32], this observation strongly suggest that TLRs are indeed essential sensors driving NF- $\kappa$ B-dependent *Il-1b* transcription in response to MSU injection *in vivo*.

## Discussion

### Inflammasomes triggered by MSU crystals and the nature of the priming inducer (signal I) *in vivo*.

Gout is a frequent arthropathy with its etiology, i.e. MSU crystal deposition in the synovial fluid of patients, known for a long time [33]. However, despite the discovery of NLRP3 as a Pattern Recognition Receptor sensing homeostatic

disturbances and subsequent IL-1 $\beta$  secretion, the molecular mechanisms driving inflammatory manifestations upon MSU exposure are still poorly described. Several animal models have been developed to better understand the relationships between MSU crystals and IL-1 $\beta$  secretion, among which *ex vivo* cultures of macrophages were instrumental in the identification of the NLRP3 inflammasome. In addition, *in vivo* injections of crystals in the peritoneal cavity [8], into an artificial air pouch [34, 35] or directly inside the joint [36] have also been used to investigate neutrophil recruitment and inflammasome-dependent cytokine release. Most of these models exhibit important flaws and do not reproduce the complete pathophysiological manifestations of human gout or the joint microenvironment. For instance, inflammation triggered by intra-articular injection of MSU crystals in mice can be prevented by anti-TNF $\alpha$  therapy [37], which is inefficacious in humans. Here, we thoroughly characterized the impact of subcutaneous injection of MSU crystals in mouse paws, an approach (previously used by others [11, 19] that induces clinical manifestations (soft tissue inflammation with tenosynovitis, as seen with relevant medical imaging techniques) that can be preventable with drugs (colchicine, anakinra) currently in use to treat gout patients. Using this model in control and genetically-deficient mice, we demonstrated that, as opposed to previous observations in isolated macrophages, MSU-induced inflammation *in vivo* can occur independently from NLRP3, while being strictly IL-1 $\beta$ -dependent, suggesting that MSU- and silica-induced inflammation may proceed by different mechanisms [38]. Therefore, we questioned whether other inflammasomes might also be involved in this process and possibly mask the NLRP3 effect. One current hypothesis postulates that neutrophils, following DNA release through NETosis (a process that can be activated by MSU crystals [28]), could provide a physiologically-relevant signal driving IL-1 $\beta$  secretion and inflammation. In this work, we tested the involvement of the AIM2 inflammasome and showed that mutant mice devoid of this DNA sensor, as well as animals in which both NLRP3 and AIM2 are lacking, develop almost normal local and systemic inflammatory responses following MSU crystals injection. Similar observations were made in *Casp 1<sup>-/-</sup>*; *11<sup>-/-</sup>* animals. These experiments reveal the complexity of the MSU-induced inflammation and IL-1 $\beta$  secretion, which, in the absence of NLRP3 and AIM2, might likely be matured by neutrophil-derived proteases such as neutrophil elastase [39] or also by Caspase 8 [40]. Because of this possible redundancy, our results do not discard the

potential involvement of NLRP3 and/or AIM2 in MSU-induced acute inflammation. Alternatively, differences between human and mouse might also account for our observation of pro IL-1 $\beta$  processing in the absence of NLRP3. Furthermore, we also addressed the question of the nature of signal I, which is necessary to activate the NF- $\kappa$ B pathway and induce *Il-1 $\beta$*  transcription. Using co-cultures of neutrophils and macrophages, we showed that NETotic neutrophils cannot drive the secretion of IL-1 $\beta$  by MSU-stimulated macrophages, indicating that extracellular DNA is not capable to substitute for LPS in this process. Therefore, even though we were unable to identify a “physiologically”-relevant primer, our RNAseq analysis, which revealed *Tlr1*, *2* and *6* overexpression upon MSU challenge, combined to experiments comparing *MyD88* and *Il-1R1* KO mice provide solid arguments supporting a role for endogenous lipids or lipopeptides (capable of triggering TLR1/2/6 signaling) as pathophysiological inducers of signal I-dependent NF- $\kappa$ B activation. Future work will aim at identifying such ligands.

### Signaling pathways supporting anti-inflammatory effects of type I IFNs

The anti-inflammatory effects of type I interferons are a matter of controversy, but can be supported by at least two lines of evidence: (i) sustained type I IFN production in chronic viral infections induces immunosuppression [41], as demonstrated in the LCMV model [42, 43]. (ii) IFN $\beta$  is an effective treatment against inflammation of the central nervous system in multiple sclerosis [44]. However, precise mechanisms underlying these immunomodulatory effects are still poorly understood. Using an alum-induced peritonitis model, the induction of the IL-10/STAT3 axis in response to type I IFN and LPS signaling was proposed as a predominant event to explain subsequent immunosuppression [31]. In our dataset of imiquimod-modulated genes, several STAT3 targets (e.g. *Ccl2*, *Cxcr2*, *Socs3*) appeared significantly repressed, which indicates that this mechanism can be at play in response to imiquimod application. However, it is important to consider that our RNAseq approach does not enable the identification of protein modifications that could reveal the potential roles of transcription factors. A combined proteomic approach would help and probably refine the likely IL-10-dependent signaling and its contribution to imiquimod-based therapy. Furthermore, the timing (24 hpi) at which gene expression was quantified may also explain why transcripts encoding anti-inflammatory players, like IL-10, were not identified.



## Imiquimod, a powerful and promising alternative in gout patients

Our work clearly demonstrates the potential benefits to use imiquimod to treat gout crisis. Indeed, for several patients exhibiting additional comorbidities, such as kidney dysfunction, the prescription of colchicine might be unadvisable and imiquimod might become an attractive alternative devoid of major side effects. As demonstrated, a single topical application was sufficient to reduce both neutrophils attraction and IL-1 $\beta$  secretion, thereby limiting the biological and clinical inflammatory symptoms that appear following MSU crystals injection. This dual activity of imiquimod appears even more attractive in view of the recent description of an inflammatory disorder (NOMID, neonatal-onset multisystem inflammatory disease) caused by GASDERMIN D (GSDMD) release and pyroptosis following inflammasome activation [45]. Indeed, some patients suffering cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) such as NOMID appear resistant to IL-1 $\beta$  blocking agents. A clinical trial will of course be necessary to evaluate the efficacy of imiquimod in humans. In addition, our work pointed to the multiplicity of actors (sensors, proteases) that are likely involved in the development of gout, which may advocate against the pharmacological targeting of only one of them, i.e the NLRP3 sensor. Finally, even though our genome-wide transcriptional analysis did not precisely identify the exact molecular pathways linking imiquimod, type I interferons and reduced IL-1 $\beta$  expression, an essential genetic network that appeared targeted by imiquimod (and predicted by IPA) brings together many genes encoding granulocyte cell surface markers (such as integrins), connected to a hub composed of the kinases SYK and PI3K. Their activation by MSU crystals binding to the plasma membrane [46] thus appears as an important contributor to neutrophil recruitment and activation, which could be impaired by already existing inhibitors developed for other pathologies, such as leukemia. Furthermore, RNAseq analysis using the ImmQuant software predicts that skin dendritic cells might be important mediators of the imiquimod-dependent anti-inflammatory response. The functional connection linking these cells and reduced neutrophil infiltrate will be a major research focus of ours.

In conclusion, our *in vivo* model in mice uncovers an unsuspected complexity of the pathogenesis of gout triggered by urate crystals, as illustrated by its independence from the NLRP3 inflammasome. In addition, novel insights emerge from RNAseq analyses, such as the possible role of TLR1, 2 and/or 6 as sensors priming the NK- $\kappa$ B pathway. This

observation paves the way for the search of lipids or lipoproteins which can be of endogenous or microbial [47] origin. Novel therapeutic options, such as topical treatment or sensory nerves modulation [48], will be necessary in order to take care of an ever-growing number of gout patients in ageing populations. Our transcriptomic analyses revealing novel potential targets are in line with this search for innovative treatments.

## Supplementary Material

Supplementary figures.

<http://www.thno.org/v10p2158s1.pdf>

## Acknowledgements

Work in our laboratory is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTE), the INSERM (UMR\_S 1109), the Institut Universitaire de France (IUF), the University of Strasbourg (IDEX UNISTRA), the European regional development fund (European Union) INTERREG V program (project n°3.2 TRIDIAG) and MSD-Avenir grant AUTOGEN. The input and advices from Roméo Ricci and Zhirong Zhang (IGBMC, Illkirch, France) at the initial step of this work is greatly acknowledged. PG thanks Dr. Stephan Blüml (Vienna Medical University, Austria) for helpful discussions and Dr. Philippe Bouillet (WEHI, Melbourne, Australia) for critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

AM conducted, acquired and analyzed data and wrote the manuscript; ADC acquired and analyzed data; CP acquired and analyzed data; CAF, AP and CM acquired data; NP, IA, RC, EC, JS and JPA analyzed data; BF provided reagents; SB analyzed data and wrote the manuscript; PG designed research studies, analyzed data and wrote the manuscript.

## Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

## References

1. Elfishawi MM, Zleik N, Kvrjic Z, Michet CJ, Jr., Crowson CS, Matteson EL, et al. The Rising Incidence of Gout and the Increasing Burden of Comorbidities: A Population-based Study over 20 Years. *J Rheumatol.* 2018; 45 (4):574-9.
2. Nakayama A, Nakaoka H, Yamamoto K, Sakiyama M, Shaikat A, Toyoda Y, et al. GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76 (5):869-77.
3. Dalbeth N, Stamp LK, Merriman TR. The genetics of gout: towards personalised medicine? *BMC Med.* 2017; 15 (1):108.
4. Chen CJ, Tseng CC, Yen JH, Chang JG, Chou WC, Chu HW, et al. ABCG2 contributes to the development of gout and hyperuricemia in a genome-wide association study. *Sci Rep.* 2018; 8 (1):3137.
5. Kottgen A, Albrecht E, Teumer A, Vitart V, Krumsiek J, Hundertmark C, et al. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat Genet.* 2013; 45 (2):145-54.

6. Kuemmerle-Deschner JB, Ozen S, Tyrrell PN, Kone-Paut I, Goldbach-Mansky R, Lachmann H, et al. Diagnostic criteria for cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS). *Ann Rheum Dis*. 2017; 76 (6):942-7.
7. So AK, Martinon F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13 (11):639-47.
8. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006; 440 (7081):237-41.
9. Giamarellos-Bourboulis EJ, Moukhtaroudi M, Bodar E, van der Ven J, Kullberg BJ, Netea MG, et al. Crystals of monosodium urate monohydrate enhance lipopolysaccharide-induced release of interleukin 1 beta by mononuclear cells through a caspase 1-mediated process. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68 (2):273-8.
10. Maueroeder C, Kienhofer D, Hahn J, Schauer C, Manger B, Schett G, et al. How neutrophil extracellular traps orchestrate the local immune response in gout. *J Mol Med (Berl)*. 2015; 93 (7):727-34.
11. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhofer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med*. 2014; 20 (5):511-7.
12. Schiltz C, Liote F, Prudhommeaux F, Meunier A, Champy R, Callebert J, et al. Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in vivo: quantitative histomorphometric analysis of cellular events. *Arthritis Rheum*. 2002; 46 (6):1643-50.
13. Nehmar R, Alsaleh G, Voisin B, Flacher V, Mariotte A, Saferding V, et al. Therapeutic Modulation of Plasmacytoid Dendritic Cells in Experimental Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017; 69 (11):2124-35.
14. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013; 29 (1):15-21.
15. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9 (4):357-9.
16. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015; 31 (2):166-9.
17. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15 (12):550.
18. Frishberg A, Brodt A, Steurman Y, Gat-Viks I. ImmQuant: a user-friendly tool for inferring immune cell-type composition from gene-expression data. *Bioinformatics*. 2016; 32 (24):3842-3.
19. Yang G, Yeon SH, Lee HE, Kang HC, Cho YY, Lee HS, et al. Suppression of NLRP3 inflammasome by oral treatment with sulforaphane alleviates acute gouty inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2018; 57 (4):727-36.
20. Liebner R, Mathaes R, Meyer M, Hey T, Winter G, Besheer A. Protein HESylation for half-life extension: synthesis, characterization and pharmacokinetics of HESylated anakinra. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014; 87 (2):378-85.
21. Amaral FA, Costa VV, Tavares LD, Sachs D, Coelho FM, Fagundes CT, et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis Rheum*. 2012; 64 (2):474-84.
22. Castelblanco M, Lugin J, Ehrlich D, Nasi S, Ishii I, So A, et al. Hydrogen sulfide inhibits NLRP3 inflammasome activation and reduces cytokine production both in vitro and in a mouse model of inflammation. *J Biol Chem*. 2018; 293 (7):2546-57.
23. Joosten LA, Ea HK, Netea MG, Busso N. Interleukin-1beta activation during acute joint inflammation: a limited role for the NLRP3 inflammasome in vivo. *Joint Bone Spine*. 2011; 78 (2):107-10.
24. Joosten LA, Netea MG, Mylona E, Koenders MI, Malireddi RK, Oosting M, et al. Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1beta production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62 (11):3237-48.
25. Zhang Z, Meszaros G, He WT, Xu Y, de Fatima Magliarelli H, Mailly L, et al. Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med*. 2017; 214 (9):2671-93.
26. Chen KW, Bezbradica JS, Gross CJ, Wall AA, Sweet MJ, Stow JL, et al. The murine neutrophil NLRP3 inflammasome is activated by soluble but not particulate or crystalline agonists. *Eur J Immunol*. 2016; 46 (4):1004-10.
27. Soares DM, Figueiredo MJ, Martins JM, Machado RR, Kanashiro A, Malvar Ddo C, et al. CCL3/MIP-1 alpha is not involved in the LPS-induced fever and its pyrogenic activity depends on CRF. *Brain Res*. 2009; 1269:54-60.
28. Chatfield SM, Grebe K, Whitehead LW, Rogers KL, Nebel T, Murphy JM, et al. Monosodium Urate Crystals Generate Nuclease-Resistant Neutrophil Extracellular Traps via a Distinct Molecular Pathway. *J Immunol*. 2018; 200 (5):1802-16.
29. Lugin J, Martinon F. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunol Rev*. 2018; 281 (1):99-114.
30. Thacker SG, Berthier CC, Mattinzoli D, Rastaldi MP, Kretzler M, Kaplan MJ. The detrimental effects of IFN-alpha on vasculogenesis in lupus are mediated by repression of IL-1 pathways: potential role in atherogenesis and renal vascular rarefaction. *J Immunol*. 2010; 185 (7):4457-69.
31. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Forster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. 2011; 34 (2):213-23.
32. Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep*. 2014; 6:97.
33. McCarty DJ, Hollander JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med*. 1961; 54:452-60.
34. Akahoshi T, Namai R, Murakami Y, Watanabe M, Matsui T, Nishimura A, et al. Rapid induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human monocytes by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheum*. 2003; 48 (1):231-9.
35. Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Medicis R, Lussier A, Poubelle PE, et al. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003; 48 (8):2310-20.
36. Joosten LA, Crisan TO, Azam T, Cleophas MC, Koenders MI, van de Veerdonk FL, et al. Alpha-1-anti-trypsin-Fc fusion protein ameliorates gouty arthritis by reducing release and extracellular processing of IL-1beta and by the induction of endogenous IL-1Ra. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75 (6):1219-27.
37. Amaral FA, Bastos LF, Oliveira TH, Dias AC, Oliveira VL, Tavares LD, et al. Transmembrane TNF-alpha is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. *Eur J Immunol*. 2016; 46 (1):204-11.
38. Benmerzoug S, Rose S, Bounab B, Gosset D, Duneau L, Chenuet P, et al. STING-dependent sensing of self-DNA drives silica-induced lung inflammation. *Nat Commun*. 2018; 9 (1):5226.
39. Joosten LA, Netea MG, Fantuzzi G, Koenders MI, Helsen MM, Sparrer H, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*. 2009; 60 (12):3651-62.
40. Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Chan FK. A RIPK3-caspase 8 complex mediates atypical pro-IL-1beta processing. *J Immunol*. 2015; 194 (4):1938-44.
41. Snell LM, McGaha TL, Brooks DG. Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends Immunol*. 2017; 38 (8):542-57.
42. Wang Y, Swiecki M, Cella M, Alber G, Schreiber RD, Gilfillan S, et al. Timing and magnitude of type I interferon responses by distinct sensors impact CD8 T cell exhaustion and chronic viral infection. *Cell Host Microbe*. 2012; 11 (6):631-42.
43. Tejaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, et al. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science*. 2013; 340 (6129):207-11.
44. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018; 378 (2):169-80.
45. Xiao J, Wang C, Yao JC, Alippe Y, Xu C, Kress D, et al. Gasdermin D mediates the pathogenesis of neonatal-onset multisystem inflammatory disease in mice. *PLoS Biol*. 2018; 16 (11):e3000047.
46. Ng G, Sharma K, Ward SM, Desrosiers MD, Stephens LA, Schoel WM, et al. Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity*. 2008; 29 (5):807-18.
47. Liu J, Cui L, Yan X, Zhao X, Cheng J, Zhou L, et al. Analysis of Oral Microbiota Revealed High Abundance of *Prevotella Intermedia* in Gout Patients. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 49 (5):1804-12.
48. Mei J, Zhou F, Qiao H, Li H, Tang T. Nerve modulation therapy in gouty arthritis: targeting increased sFRP2 expression in dorsal root ganglion regulates macrophage polarization and alleviates endothelial damage. *Theranostics*. 2019; 9 (13):3707-22.

## Annexe 6 : Article

### Temporomandibular joint damage in K/BxN arthritic mice

Sabine Kuchler-Bopp, Alexandre Mariotte, Marion Strub, Chrystelle Po, Aurore De Cauwer, Georg Schulz, Xavier Van Bellinghen, Florence Fioretti, François Clauss, Philippe Georgel, Nadia Benkirane-Jessel and Fabien Bornert. International Journal of Oral Science (2020)12 :5

L'atteinte de l'articulation temporo-mandibulaire (ATM) est fréquente chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Bien qu'il existe de nombreux modèles animaux d'arthrite, peu de ces modèles récapitulent l'inflammation retrouvée sur cette articulation.

En tirant avantage de plusieurs techniques d'imagerie (IRM, micro-CT), ce papier caractérise une atteinte de l'ATM dans le modèle génétique de polyarthrite murin K/BxN. Chez ces animaux, l'articulation présente une altération de la couche superficielle du cartilage. Les synoviocytes de type fibroblastique issus de cette articulation présentent une production accrue de médiateurs inflammatoires (IL-6) et de métalloprotéases matricielles, ce qui pourrait corrélérer avec les dégâts cartilagineux.

Les souris K/BxN représentent ainsi l'un des rares modèles d'inflammation et de dommages spontanés à l'ATM, un outil attrayant pour caractériser cette atteinte douloureuse à l'étiologie encore mal comprise.





## ARTICLE OPEN

## Temporomandibular joint damage in K/BxN arthritic mice

Sabine Kuchler-Bopp<sup>1</sup>, Alexandre Mariotte<sup>2,3</sup>, Marion Strub<sup>1,4,5</sup>, Chrystelle Po<sup>6</sup>, Aurore De Cauwer<sup>2,3</sup>, Georg Schulz<sup>7</sup>, Xavier Van Bellinghen<sup>1,4,5</sup>, Florence Fioretti<sup>1,4,5</sup>, François Clauss<sup>1,4,5</sup>, Philippe Georgel<sup>2,3</sup>, Nadia Benkirane-Jessel<sup>1,4</sup> and Fabien Bornert<sup>1,4,5</sup>

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease affecting 1% of the world population and is characterized by chronic inflammation of the joints sometimes accompanied by extra-articular manifestations. K/BxN mice, originally described in 1996 as a model of polyarthritis, exhibit knee joint alterations. The aim of this study was to describe temporomandibular joint (TMJ) inflammation and damage in these mice. We used relevant imaging modalities, such as micro-magnetic resonance imaging ( $\mu$ MRI) and micro-computed tomography ( $\mu$ CT), as well as histology and immunofluorescence techniques to detect TMJ alterations in this mouse model. Histology and immunofluorescence for Col-I, Col-II, and aggrecan showed cartilage damage in the TMJ of K/BxN animals, which was also evidenced by  $\mu$ CT but was less pronounced than that seen in the knee joints.  $\mu$ MRI observations suggested an increased volume of the upper articular cavity, an indicator of an inflammatory process. Fibroblast-like synoviocytes (FLSs) isolated from the TMJ of K/BxN mice secreted inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 $\beta$ ) and expressed degradative mediators such as matrix metalloproteinases (MMPs). K/BxN mice represent an attractive model for describing and investigating spontaneous damage to the TMJ, a painful disorder in humans with an etiology that is still poorly understood.

*International Journal of Oral Science* (2020)12:5

; <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0072-z>

## INTRODUCTION

The upper part of the temporomandibular joint (TMJ) is formed by the temporomandibular fossa or glenoid fossa, and the lower part is formed by the mandibular condyle. An ellipsoidal articular disc composed of fibrous connective tissue divides the joint into two parts: the upper and the lower articular cavities. These cavities are limited by the synovial membrane and filled with fluid. Chronic joint diseases, most often those affecting the limb joints, can also affect the temporomandibular joint, causing cartilage degradation, subchondral bone degradation (erosion and resorption), sclerosis, and a reduction in the joint space. In the case of severe condyle destruction, malocclusion (defined as an abnormal disposition of the teeth in the jaw, generating teeth and jaw pain), and sometimes vertebral damage may occur.<sup>1,2</sup>

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic articular inflammation (driving swelling, stiffness, and pain) and sometimes accompanied by extra-articular manifestations. Affecting nearly 1% of the population worldwide, RA is associated with comorbidities (such as cardiovascular disorders). Inflammation in RA is orchestrated by a complex interplay between several types of immune cells (T and B cells and macrophages) and stromal cells, such as fibroblast-like synoviocytes (FLSs). FLSs (or type B synoviocytes) are mesenchymal resident cells that have been described in recent decades as active players in cartilage damage through proliferative/invasive properties (so-called “pseudo-tumoural” behavior) and the secretion of

inflammatory (e.g., interleukin-6 (IL-6)) and degradative (e.g., matrix metalloproteinases (MMPs)) mediators.<sup>3</sup>

While RA typically affects the small peripheral joints (metacarpal-/metatarsophalangeal and proximal interphalangeal joints and wrists), TMJ involvement has also been reported, and some patients may experience chronic pain, limitation of mouth opening, and mandible deviation, especially in juvenile types.<sup>4,5</sup> Different models of osteoarthritis of the TMJ have been described.<sup>6–9</sup> However, despite the significant number of murine (poly)-arthritis models reported in the literature, few reliable TMJ arthritis animal models are currently available and have been extensively described.

The K/BxN mouse model of polyarthritis used in this work was originally described in 1996.<sup>10</sup> K/BxN mice were obtained by crossing KRN transgenic animals with non-obese diabetic mice (NOD). They develop severe inflammatory arthritis of the leg joints and bone destruction without sexual dimorphism.<sup>10</sup> This widely described model is notably used to trigger rapid and consistent joint inflammation in healthy mice by transferring serum harvested from K/BxN animals, which contains high levels of autoantibodies.<sup>11</sup> IL-6 and TNF- $\alpha$ , which are targeted by reference biologics in RA patients, are also overexpressed in the joints of K/BxN mice.<sup>12</sup> Finally, the K/BxN model was chosen for this work because of its clinical relevance for human RA; it is spontaneous and progressive, evolves to chronicity, and exhibits symmetrical distribution and joint destruction.<sup>12</sup>

<sup>1</sup>INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative NanoMedicine (RNM), FMTS, Strasbourg, France; <sup>2</sup>INSERM, UMR 1109, Immuno Rhumatologie Moléculaire (IRM), FMTS, Strasbourg, France; <sup>3</sup>Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>4</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg (UDS), 8 rue Ste Elisabeth, Strasbourg, France; <sup>5</sup>Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), 1 place de l'Hôpital, Strasbourg, France; <sup>6</sup>ICube UMR 7357, Université de Strasbourg, CNRS, FMTS, 4 rue Kirschleger, Strasbourg, France and <sup>7</sup>Department of Biomedical Engineering, Core Facility Micro- and Nanotomography, Biomaterials Science Center (BMC), University of Basel, Gewerbestrasse 14 4123, Allschwil, Switzerland

Correspondence: Sabine Kuchler-Bopp ([kuchler@unistra.fr](mailto:kuchler@unistra.fr)) or Philippe Georgel ([pgeorgel@unistra.fr](mailto:pgeorgel@unistra.fr))

These authors contributed equally: Sabine Kuchler-Bopp, Alexandre Mariotte, Marion Strub

Received: 4 October 2019 Revised: 13 December 2019 Accepted: 15 December 2019

Published online: 06 February 2020

In RA patients, the degree of arthritis is assessed through conventional radiography, cone beam multi-slice computed tomography (CBCT or MSCT), and magnetic resonance imaging (MRI).<sup>1,13,14</sup> The dose of X-ray delivered during CBCT is low, which is advantageous for exploring TMJ in children, and enables high spatial resolution with limited irradiation levels.<sup>15–18</sup> The advantage of CBCT is the visualization of dense structures, such as the temporal bone and mandibular condyle, in three dimensions. Magnetic resonance imaging seems to be the most relevant imaging modality for assessing TMJ osteoarthritis, as early changes can be detected, and both hard and soft tissues and even joint fluid can be visualized.<sup>13,19</sup> Gradient-echo T1 sequences enable evaluation of bone changes, while gradient-echo T2 sequences are mainly used to analyze less dense structures such as cartilage, joint disc, or synovial fluid in the upper and lower joint cavities.<sup>20</sup>

The aim of this study was to describe TMJ inflammation and damage in an arthritis mouse model in comparison with that in healthy controls by using histological and imaging techniques already used in clinical practice.

## RESULTS

### Characterization of K/BxN mice

Several murine arthritis models have been reported in the literature.<sup>21</sup> While defects of the limb joints have been extensively described, potential TMJ disease was addressed in only a few of these models (listed in Supplementary Table 1). In this work, we decided to use the K/BxN model, which exhibits arthritis that is highly penetrant and reproducible and typically displays progressive, chronic, severe, and deforming symmetrical arthritis. Offspring of KRN-transgene-bearing mice develops clinical arthritis manifestations from 5 weeks of age without any sexual dimorphism. In this study, we chose animals that were 6–8 months old and displayed markedly progressive ankylosis accompanied by joint swelling and limb deformities (Supplementary Fig. 1a). We quantified serum IL-6 in K/BxN mice by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The parental mouse lines NOD and ICR (imprinting control region) were used as controls (Supplementary Fig. 1b). IL-6 secretion was significantly enhanced in the blood of K/BxN mice compared with the blood of control mice (Supplementary Fig. 1b), in agreement with systemic inflammation in these animals. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were, however, below the detection threshold.

As this model is known to experience destructive limb joint damage, we assessed arthritis-associated histomorphological changes in the knee joint. Micro-computed tomography ( $\mu$ CT) examination showed clear differences in bone density (indicative of erosion) in the knees of K/BxN mice, while control animals appeared unaffected (Supplementary Fig. 1c–g); subchondral bone changes were also visible in 3D reconstructions (Supplementary Fig. 1d–h). In K/BxN mice, hematoxylin–eosin staining further revealed cartilage matrix discontinuity with remnant cartilage and residual bone-adopting irregular structures; this was accompanied by knee joint inflammation (Supplementary Fig. 1i). These observations are in sharp contrast with those found in control mice, in which the articular cavity was acellular and the cartilage appeared smooth and uniform (Supplementary Fig. 1e).

Furthermore, staining of cartilage-specific sulfated mucopolysaccharides with alcian blue (used at pH = 1) showed that K/BxN cartilage was markedly eroded (Supplementary Fig. 1j) compared with control cartilage (Supplementary Fig. 1f). Together, our observations confirm that the limb joints of K/BxN mice exhibit arthritis with destructive and cartilage-erosive features.

Histological and morphological analyses revealed previously unsuspected TMJ cartilage damage

We next considered potential TMJ alterations. First, we performed histological analyses (alcian blue, pH = 1, to specifically stain

mucopolysaccharides coupled with fast red to stain nuclei) on TMJ sections to assess cartilage integrity in K/BxN mice and controls (Fig. 1a, b, d, e and Supplementary Fig. 2). We also performed safranin O staining to reveal proteoglycans in cartilage tissue coupled with staining with fast green, an acidic dye that reacts with cytoplasmic proteins (Fig. 1c, f). As shown in Fig. 1a, d, the articular disc (D) separated the articular cavity into the upper and lower parts. We first observed a discontinuity in the fibrous layer (FL), suggesting degradation of the extracellular matrix; the cartilage thickness also seemed to be reduced in the TMJ of K/BxN mice (Fig. 1a–c and Supplementary Fig. 3b–f), whereas the subchondral bone remained unaffected. The thickness of the cartilage was evaluated and determined to be  $(56 \pm 4) \mu\text{m}$  in control mice and  $(54 \pm 12) \mu\text{m}$  in K/BxN mice. Control mouse cartilage appeared intact (Fig. 1d–f). We then used  $\mu$ CT and compared the temporal surface and the mandibular condyle of the TMJ of 6- to 8-month-old K/BxN mice (Fig. 1g and Supplementary Fig. 3b–f) with those of TMJs harvested from age-matched control mice (Fig. 1j and Supplementary Fig. 3a). Three-dimensional isosurface reconstructions were made from the DICOM dataset. Different bone abnormalities (erosion) were detected in the TMJ of K/BxN mice (Fig. 1h, i and Supplementary Fig. 3b–f) in comparison with the TMJ of controls (Fig. 1k, l and Supplementary Fig. 3a). Subchondral bone damage (subchondral cyst) was also visible in microtomography slices. These observations indicate that K/BxN mice also exhibit TMJ defects that include cartilage thinning and reduced matrix proteoglycans.

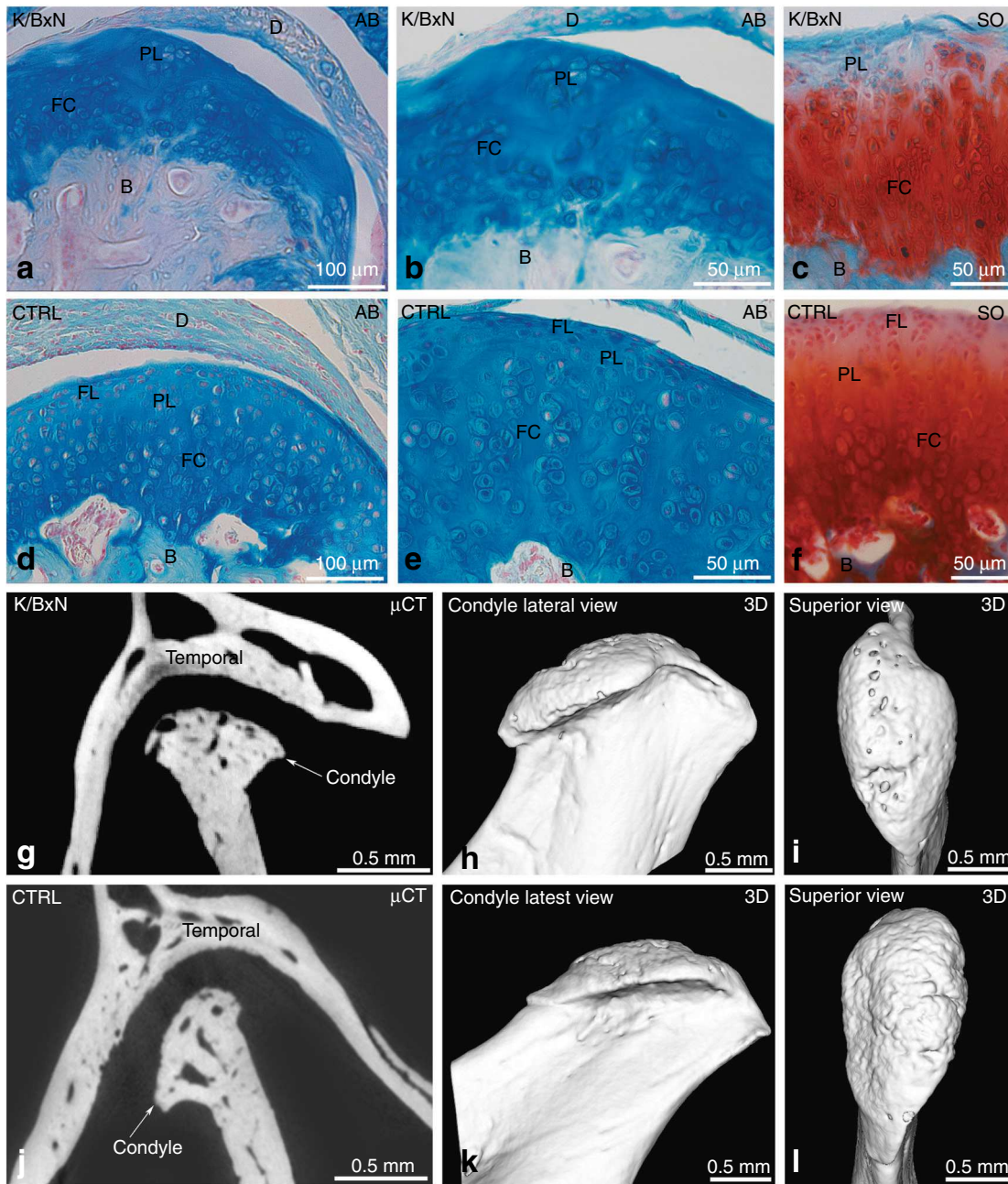
The superficial cartilage layer of the TMJ is specifically altered in K/BxN mice

Having shown that K/BxN mice display anatomical alterations in TMJ cartilage, we next monitored the expression of markers by immunofluorescence in these animals. In the control TMJ, type I collagen (Col-I) was expressed in the fibroblasts of the fibrous layer (FL), in undifferentiated mesenchymal cells of the proliferative layer (PL), in chondrocytes of the fibrocartilage (FC) of the mandibular control condyle, and in osteoblasts (Fig. 2e, f). In K/BxN, Col-I was expressed in the proliferative layer, the fibrocartilage, and bone, while its expression was no longer detected in the fibrous layer (Fig. 2a, b). Type II collagen (Col-II) expression in the fibroblasts of the fibrous layer and in chondrocytes of the fibrocartilage was globally weaker than Col-I expression in the control mandible (Fig. 2g), but similarly disappeared in the fibrous layer cartilage of K/BxN mice (Fig. 2c).

Aggrecan, the expression of which was restricted to fibrocartilage, was unchanged between diseased and healthy animals (Fig. 2d, h). We also tested the expression of bone-specific proteins, such as bone sialoprotein II (BSP II) (Fig. 2i, j), osteopontin (OPN) (Fig. 2k, l), the bone-specific transcription factor RUNX2 (Fig. 2m–o), and the vascular endothelial marker CD31 (Fig. 2k, l). BSP II and OPN were detected in the cytoplasm of osteocytes (Fig. 2i–l), while RUNX2 exhibited nuclear localization (Fig. 2m–o); CD31<sup>+</sup> endothelial cells were found close to osteocytes (Fig. 2k, l). However, we did not observe any difference between control and K/BxN TMJs by using these markers. These data suggest that TMJ defects observed in K/BxN mice (Fig. 1) are restricted to the superficial cartilage and are characterized by a significant reduction in fibrous layer matrix proteins.

Synovial fluid expansion can be observed in K/BxN TMJs

We also used magnetic resonance imaging (MRI) with T2-weighted imaging to visualize liquid in the TMJ of control and arthritic mice. In these settings (Fig. 3a, b and Supplementary Fig. 4), bone structure such as that of the mandibular condyle (shown in yellow in the reconstruction pictures) and temporal bone (red) were observed to have a low signal intensity; conversely, liquids, such as synovial fluid (blue) that was present in the upper and lower cavities, were associated with



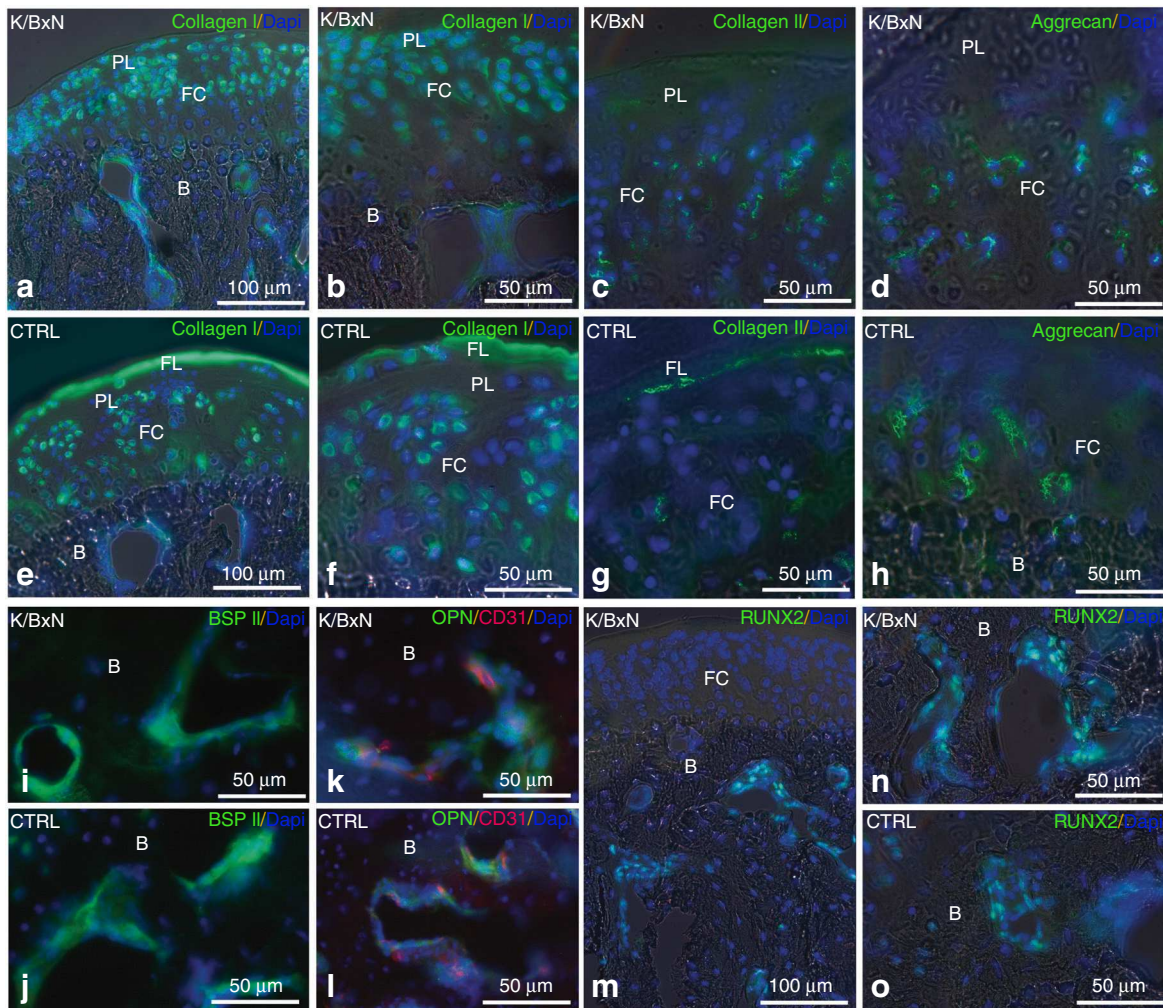
**Fig. 1** Histological and morphological analyses of K/BxN and control TMJs. Histology of the temporomandibular joint (TMJ) of an 8-month-old K/BxN mouse (a–c) and a control mouse (d–f) after alcian blue staining (a, b, d, e) and Safranin O staining (c, f). g, j Micro-computed tomography (μCT) sections of the TMJ of an 8-month-old K/BxN mouse (g) and a control mouse (j). (h, i, k, l) 3D reconstructions of the condyles of an 8-month-old K/BxN mouse (h, i) and a control mouse (k, l). B, bone; D, disc; FC, fibrocartilage; FL, fibrous layer; PL, proliferative layer

hypersignals in T2 based on water content. The articular disc was observed to have intermediate signal intensity. After 3D reconstruction, the mean volume of the synovial fluid present in the upper articular cavity (blue) was increased in several K/BxN mice (Fig. 3a and Supplementary Fig. 4) compared with control mice (Fig. 3b). The total volume of the upper articular cavity was enhanced in the K/BxN TMJ (+253.5%), albeit without reaching statistical significance (Fig. 3c). We observed heterogeneous volumes of the upper articular cavity in K/BxN mice, whereas this measure was homogeneous in control mice (Fig. 3c and Supplementary Fig. 4). Four K/BxN mice exhibited increased TMJ articular volume; in the three others, this volume was comparable to that of the controls (Fig. 3c and Supplementary Fig. 4), suggesting that synovial fluid expansion, a feature found in

various human arthropathies, may occur in some mice but not others.

#### Characterization of the fibroblast-like synoviocytes (FLSs) from K/BxN and control TMJs

Fibroblast-like synoviocytes (FLSs) are resident joint stromal cells that express mesenchymal markers. They are essential for maintaining homeostatic functions under noninflammatory conditions, such as the synthesis of the synovial fluid components proteoglycans and lubricin.<sup>22</sup> In contrast, FLSs are active contributors to synovial inflammation and cartilage damage in the context of rheumatoid arthritis.<sup>23</sup> Our observations of TMJ cartilage alterations in K/BxN mice prompted us to analyze the functional properties of TMJ FLSs in more detail. For this, we first



**Fig. 2** Immunolocalization of specific cartilage and bone proteins in K/BxN and control TMJs. Immunofluorescence for Collagen I (**a, b, e, f**), Collagen II (**c, g**), Aggrecan (**d, h**), BSP II (**i, j**), Osteopontin and CD31 (**k, l**), and RUNX2 (**m–o**) in cryostat sections of a K/BxN TMJ (**a–d, i, k, m, n**) and a control TMJ (**e–h, j, l, o**)

derived and cultured primary FLSs from TMJs dissected from K/BxN and control mice and characterized them at passage 3. When confluent, FLSs exhibited a classic spindle-shaped fibroblastic phenotype after hematoxylin–eosin staining (Fig. 4a and b). Non-inflamed and K/BxN FLSs stained positively for the stromal mesenchymal markers vimentin and fibronectin (Fig. 4c, h) and the synovial fibroblastic surface markers CD90 (Thy-1) (Fig. 4g, h) and TEM1 (Fig. 4e, f). Interestingly, immunofluorescence signals for TEM1, CD90, and fibronectin appeared to be increased in K/BxN FLSs compared with control FLSs.

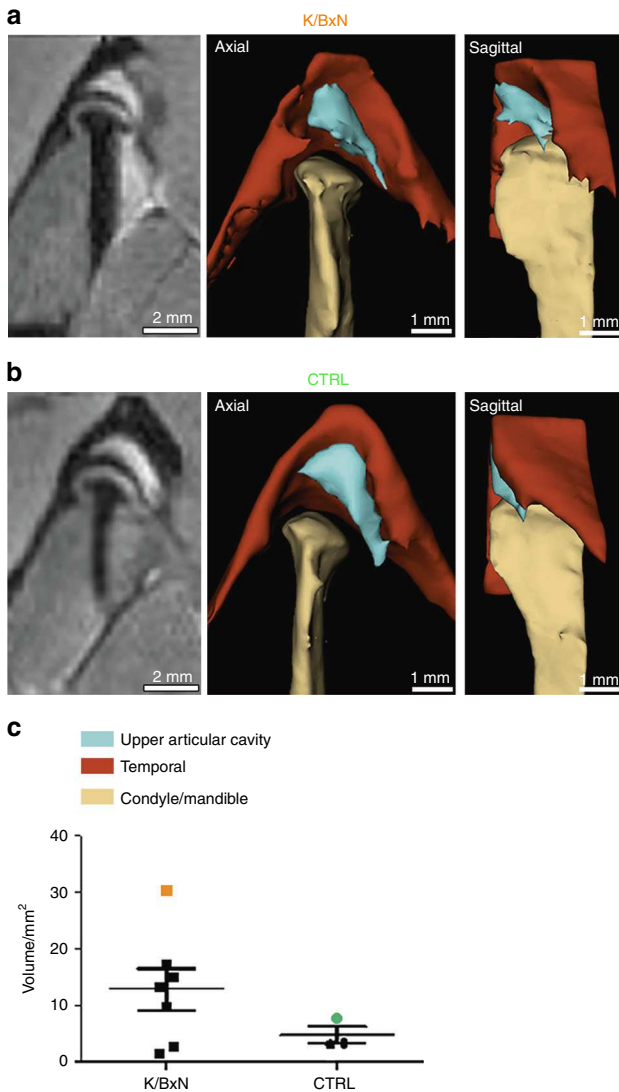
FLSs were then stimulated for 24 h with  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS from *Escherichia coli*, and we monitored IL-6 production by ELISA (Fig. 5e). We observed increased basal (unstimulated conditions) IL-6 production in K/BxN FLSs, and this difference was reinforced after LPS treatment (Fig. 5e). In contrast, no IL-1 $\beta$  production was detected in K/BxN FLSs stimulated with or without LPS (not shown). We also assessed *Il-6*, *Mmps* (*Mmp1*, *8*, *9*, *13*), and *Timp1* gene expression by RT-qPCR in FLSs treated with or without LPS for 24 h (Fig. 5f). *Il-6* transcripts were significantly enhanced in FLSs after LPS treatment, but no difference was observed between K/BxN and control FLSs. Conversely, we observed enhanced *Mmp1* and *Mmp8* expression in K/BxN and control FLSs after LPS treatment, with significantly increased expression in K/BxN FLSs compared with control FLSs. In contrast, the expression of *Mmp9* and *Mmp13* was significantly reduced after LPS treatment, but

remained significantly more elevated in K/BxN FLSs than in control FLSs. Finally, the expression of *Timp1* was reduced in K/BxN FLSs treated with or without LPS compared with control FLSs, suggesting decreased or defective MMP inhibition in K/BxN FLSs. In parallel, immunostaining in TMJ sections showed increased IL-6 and IL-1 $\beta$  expression in the synovial membrane (SM) of K/BxN mice but not control mice, revealing increased local inflammation (Fig. 5a–d). Inflammation of the synovial membrane is often accompanied by the infiltration of mononuclear cells (lymphocytes and monocytes/macrophages). The cells positive for IL-1 $\beta$  in the synovial membrane of K/BxN (Fig. 5a) were most likely mononuclear cells. Altogether, our data demonstrated that, similar to limb joints, FLSs isolated from the TMJ of K/BxN animals are characterized by an aggressive (pro-inflammatory) phenotype, which likely contributes to the damage also seen in this specific anatomical location.

## DISCUSSION

Rheumatoid arthritis typically affects the small joints, especially those of the hands and feet, but damage to other locations has also been reported. Vertebral and TMJ damage with bone erosion, pain, and decreased jaw function have been described, and the latter may affect nearly 30%–50% of RA patients.<sup>12,24,25</sup> However, such alterations have been rarely reported in polyarthritis mouse

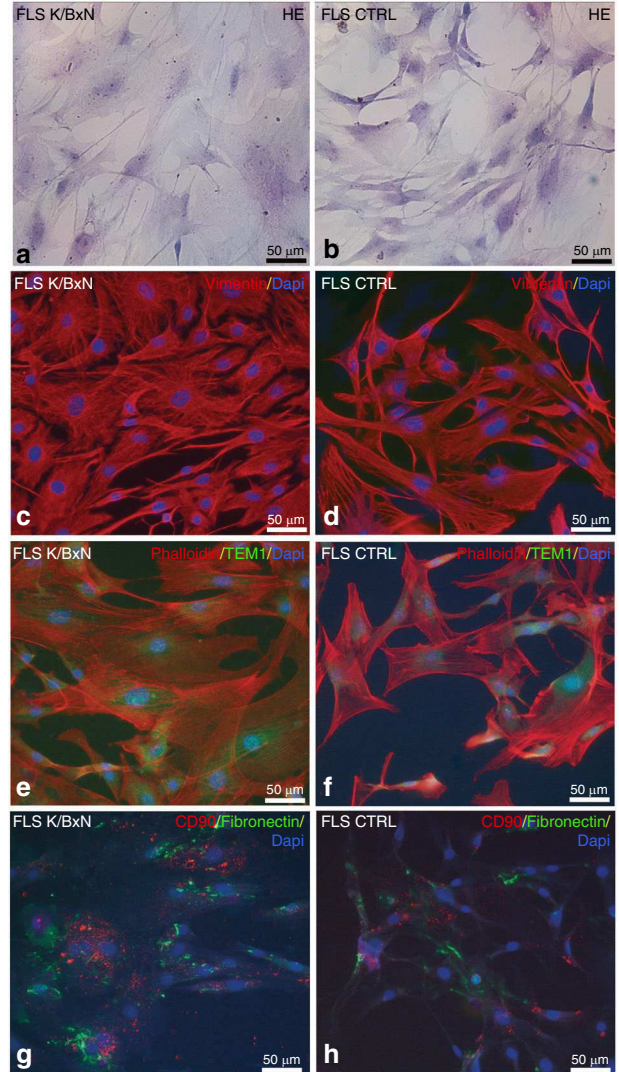




**Fig. 3** Comparison of synovial fluid volume of K/BxN and control TMJs. Magnetic resonance imaging (MRI) and 3D reconstructions of the TMJ of a K/BxN mouse (a) and a control mouse (b). c Volume measurement of the upper articular cavity of seven K/BxN mice and three control mice. The orange square represents the K/BxN mouse shown in a, and the green circle represents the control mouse shown in b

models so far. To our knowledge, morphological observations (using histology and micro-computed tomography ( $\mu$ CT)) of TMJ damage were also made in a TNF- $\alpha$  transgenic model (see Supplementary Table 1).<sup>26</sup>

In this work, we describe for the first time TMJ damage in the K/BxN model. We observed erosive changes that occurred mainly in the superficial parts of the articular cartilage, resulting in the disappearance of the TMJ cartilage fibrous layer. In the peculiar case of the TMJ, the articular surface is not covered with hyaline cartilage, but is rather covered with a fibrous layer characterized by abundant type I collagen and reduced collagen II.<sup>27</sup> Here, we noticed a dramatic loss of both collagen types together with a paucity of alcian blue staining in K/BxN TMJ sections, indicating the absence of the fibrous layer and associated matrix proteins in the condylar surface. TMJ cartilage damage was, however, less pronounced than that seen in the knee joints, as evidenced by  $\mu$ CT. Many authors have reported that X-ray imaging and especially CBCT is a very effective technique for characterizing TMJ osteoarthritis in

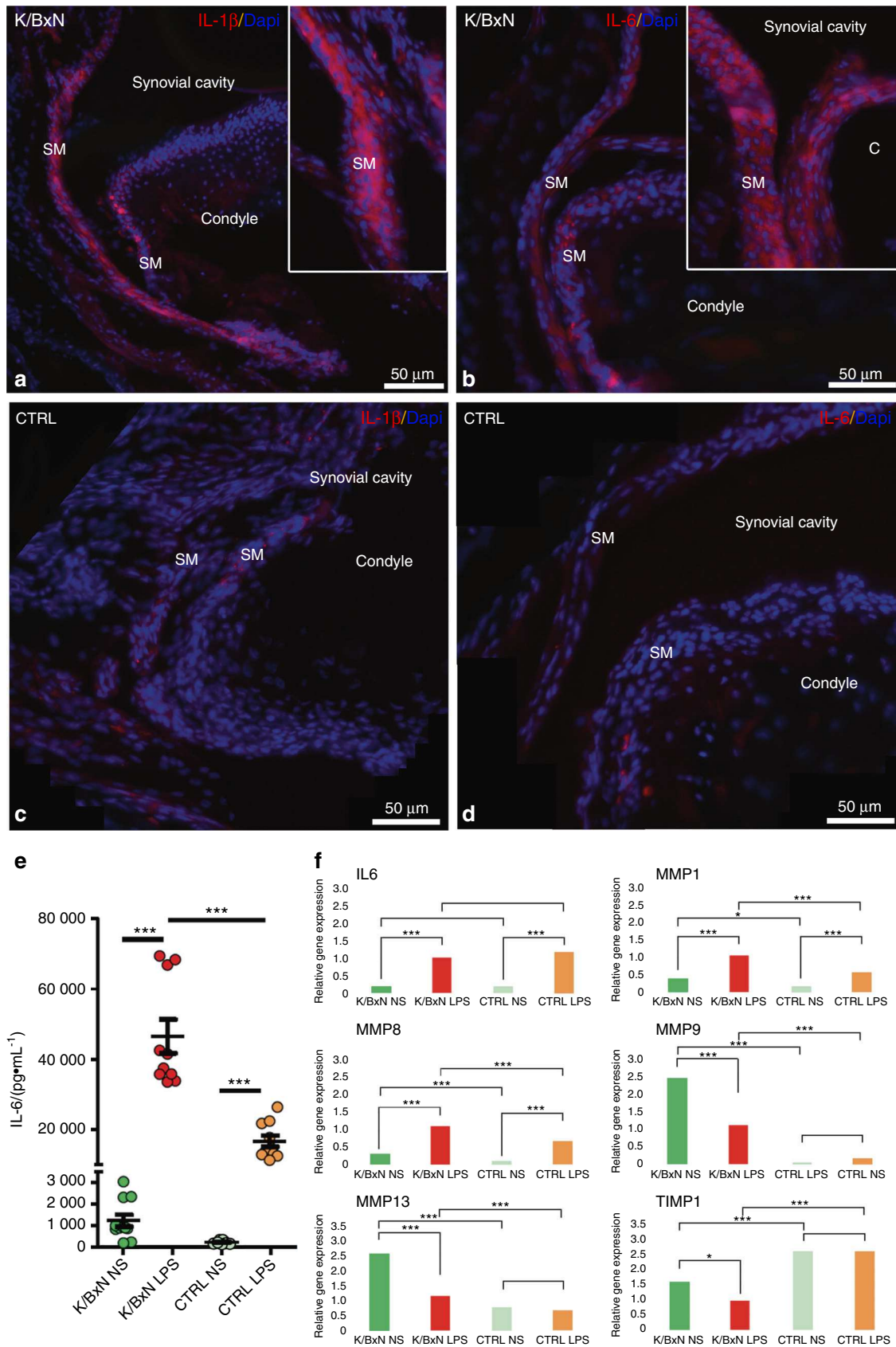


**Fig. 4** Characterization of fibroblast-like synoviocytes (FLS) from K/BxN and control TMJs. Characterization of fibroblast-like synoviocytes (FLSs) from K/BxN TMJs (a, c, e, g) and control TMJs (b, d, f, h) by using hematoxylin-eosin staining (a, b) and immunofluorescence for vimentin (c, d), phalloidin and TEM1 (e, f), and CD90 and fibronectin (g, h). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

humans,<sup>15–17</sup> and several criteria have been defined: (i) erosion with an interruption or absence of cortical lining, (ii) sclerosis with increased density of cortical lining or subchondral bone, (iii) osteophytes with marginal bone outgrowth, (iv) geodes or subchondral cysts with single or multiple pyriform-shaped subchondral lesions with sclerotic margins, and (v) joint space narrowing.<sup>28</sup>

In this study, we also examined the deeper cartilage layers, such as the fibrocartilage layer, which is schematically subdivided into proliferative and hypertrophic areas.<sup>29,30</sup> The proliferative area is known as a cell reservoir rich in type I collagen, and the hypertrophic area is enriched in aggrecan-positive chondrocytes.<sup>31</sup> Aggrecan, the major proteoglycan of articular cartilage, is a multimodular molecule expressed by chondrocytes. It plays an important role in mediating chondrocyte–chondrocyte and chondrocyte–matrix interactions through its ability to bind hyaluronan.<sup>32</sup> We did not observe any variation in aggrecan expression in fibrocartilage chondrocytes between K/BxN and control mice.

Furthermore, we did not observe any difference in the expression of several bone markers (BSP1, OPN, and RUNX2) or



**Fig. 5** Expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in K/BxN and control FLS. Immunofluorescence for IL-1 $\beta$  (**a, c**) and IL-6 (**b, d**) in sagittal sections of the TMJ of K/BxN mice (**a, b**) and control mice (**c, d**). (**e**) Quantification of IL-6 (pg·mL<sup>-1</sup>) in the culture medium of unstimulated (NS) K/BxN and control TMJ FLSs and those stimulated with LPS for 24 h. (**f**) RT-qPCR experiments to monitor *Il-6*, *Mmp1*, *8*, *9*, and *13* and *Timp1* expression in K/BxN and control FLSs treated with or without LPS for 24 h. The values are the means  $\pm$  SEMs; \* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$

CD31, an endothelial cell marker, indicating that damage only occurred at the superficial part of TMJ cartilage, with the bone and deep cartilage layers remaining intact.

To explain these results, we performed magnetic resonance imaging with T2-weighted imaging of TMJs to detect the presence of ongoing inflammation or synovial fluid expansion. Interestingly, we noted that compared with control mice, K/BxN mice exhibited an important variability in synovial volume. The difference, however, did not reach statistical significance. This observation, which suggests increased volume of the upper articular cavity, is indicative of an inflammatory process, a phenomenon that is either inconsistent between individuals or temporally discontinuous in K/BxN mice. Another explanation for this slight difference could be that the TMJ is relatively enclosed by bone walls formed by the mandibular fossa of the temporal bone, which restricts synovial fluid expansion. Interestingly, these data are in line with observations of human patients, who sometimes display such variability in synovial fluid volume.<sup>33–35</sup>

Because FLSs are active players that contribute to cartilage damage in RA, we considered their potential role in the erosive process observed in the TMJ of K/BxN mice. We obtained and cultured primary FLSs from TMJs by using a protocol adapted from one that is usually used in our laboratory to harvest FLSs from limb joints.<sup>36</sup> We characterized these cells for their expression of stromal markers, as previously described.<sup>37</sup> Indeed, the expression of CD90, CD248, fibronectin, and vimentin, together with a fibroblastic phenotype, clearly qualifies our TMJ FLSs as bona fide FLSs, as defined by Hardy et al.<sup>38</sup> Interestingly, K/BxN TMJ-derived FLSs spontaneously produced more IL-6 than TMJ FLSs derived from control mice, although this difference was not observed at the RNA level, suggesting post-transcriptional regulation. This is in line with our *in vivo* data, which showed increased serum IL-6 in K/BxN mice, indicating sustained activation of synovial FLSs and macrophages, which are responsible for systemic inflammation. Following lipopolysaccharide (LPS) stimulation, TMJ FLSs from K/BxN mice produced higher amounts of IL-6 than that produced by control cells. In addition, our RT-qPCR experiments revealed LPS-dependent upregulation of various matrix metalloproteinase (MMP) genes in K/BxN FLSs compared with control FLSs; conversely, the expression of *Timp1*, which encodes an inhibitor of MMPs, was downregulated. Altogether, our data link the pro-inflammatory and pro-degradative functions of K/BxN TMJ-derived FLSs to the cartilage alterations that we observed in these arthritic mice. Interestingly, TMJ damage was not observed upon K/BxN serum transfer, an acute arthritis model<sup>11</sup> (see Supplementary Table 1), suggesting that alterations in this articulation require longer exposure to autoantibodies, such as anti-glucose-6-phosphate isomerase autoantibodies, as described by Tanaka-Watanabe et al.<sup>39</sup>

## CONCLUSION

Ultimately, this work expands the applicability of K/BxN mice beyond a limb-restricted polyarthritis model. Using several relevant imaging techniques, we described spontaneous TMJ damage in which a local inflammatory process can engage superficial cartilage stripping, ultimately leading to condyle surface erosion. To our knowledge, this is the most extensive description of TMJ damage in an animal model of chronic polyarthritis. Our work paves the way for future studies of inflammatory processes involved in TMJ alterations and the development of innovative therapies for this painful condition in humans, for which the therapeutic options are still very limited.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

K/BxN mice generated as previously described by Kouskoff et al.<sup>10</sup> spontaneously developed arthritis. KRN transgenic mice were

crossed with non-obese diabetic mice (NOD). The resulting K/BxN mice exhibited significant reproducible joint inflammation after 30 days. Control ( $n = 23$ ) and K/BxN ( $n = 67$ ) mice aged 6–8 months were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital ( $0.05 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , Dolethal, Centravet Nancy, France) before decapitation and dissection of the heads and knees for histology, immunofluorescence, micro-computed tomography ( $\mu\text{CT}$ ), and synoviocyte cultures. Micro-magnetic resonance imaging ( $\mu\text{MRI}$ ) was performed on euthanized animals. Supplementary Table 2 summarizes the number of mice used for each experiment.

### Ethics statement

Animal experiments were authorized by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” under agreement number APAFIS #16565-2018083014246137. The local Ethics Committee “Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS)” specifically approved this study.

### Histology

The heads and knees were placed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS and demineralized with Decalcifier II (Leica Microsystems, Nanterre, France) at 37 °C for 3 h under agitation. The heads were cut longitudinally to separate the right and left TMJ before dissection. Coronal and sagittal paraffin sections, 10- $\mu\text{m}$  thick, were stained with alcian blue/fast red and safranin O/fast green. Synoviocytes at passage 3 were fixed with PFA 4% for 10 min at 4 °C and stained with hematoxylin–eosin.

### Immunofluorescence

TMJs were embedded in Tissue Tek® and frozen. Cryostat sections (10  $\mu\text{m}$ ) were fixed with 4% PFA for 10 min at 4 °C, saturated with 0.1% Triton X-100 and 1% BSA for 1 h, and then rinsed three times with PBS. The sections were incubated overnight at 4 °C with anti-IL-1 $\beta$ , biotinylated anti-IL-6, anti-osteopontin, anti-bone sialoprotein II (BSPII), anti-Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), and anti-CD31 antibodies (See Supplementary Table 3). For anti-Col-I and anti-Col-II antibodies, the sections were fixed with acetone at –20 °C for 10 min, and for the anti-aggrecan antibody, the sections were fixed with methanol at –20 °C for 10 min before saturation with BSA 1% and FBS 10% in PBS for 1 h at room temperature. After three washes with PBS, the sections were incubated for 1 h with secondary antibody (see Supplementary Table 3) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and for 5 min with 200  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Euromedex, Souffelweyersheim, France). The samples were observed under an epifluorescence microscope (Leica DM4000B).

Synoviocytes at passage 3 were fixed with PFA 4% for 10 min at 4 °C, saturated with 0.1% Triton X-100 and 1% BSA for 1 h, and then rinsed three times with PBS. The cells were incubated overnight at 4 °C with an anti-fibronectin, anti-vimentin, anti-CD248 (TEM1), or anti-CD90 antibody (see Supplementary Table 3). After three washes with PBS, some cells were incubated for 30 min with Alexa Fluor 546 phalloidin or with secondary antibodies (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

### $\mu\text{CT}$

Half of the heads were fixed with 4% PFA and then immobilized in agarose in a Falcon tube. Tomography experiments were carried out by using the  $\mu\text{CT}$  X-ray system nanotom® m (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany) equipped with a 180 kV–15 W high-power nanofocus tube with a tungsten transmission target. X-ray  $\mu\text{CT}$  was performed with an isotropic pixel size of 8  $\mu\text{m}$  and a field of view of approximately 24.6 mm  $\times$  19.2 mm.<sup>2</sup> For each measurement, the sample was irradiated by X-rays with an acceleration voltage of 70 kV and a beam current of

260 mA. At each rotation angle position, four images with an exposure time of 0.5 s were acquired and averaged to a projection. A total of 1600 projections over 360° resulted in a total scan duration of approximately 67 min.

Data acquisition and reconstruction were performed with Phoenix Datos x 2.0 software (Phoenix X-ray, GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany). After a first step of segmentation, 3D isosurface reconstructions of TMJs were performed to visualize bone defects on both the temporal and mandibular condyles (Microview, Parallax Innovations Inc., Ilderton, Canada).

#### Micro-magnetic resonance imaging (μMRI)

Just after lethal injection of pentobarbital, the mouth was kept in a closed position, and mice were placed in an animal cradle. To standardize the position of the condyle, all acquisitions were made with the mouth closed. The MRI exams were performed on a 7 T MRI Biospec 70/30 USR system (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany). Transmission was achieved with a quadrature volume resonator (inner diameter of 86 mm), and a 10-mm surface coil placed on the side of the head between the eye and the external auditory meatus closer to the joint was used for signal reception (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). MRI experiments were analyzed with ParaVision 6.0.1 software. A T2-weighted anatomical dataset was acquired by using a 3D-RARE sequence with a voxel size of 67 μm × 67 μm × 67 μm. The remaining parameters were as follows: matrix = 150 × 150 × 150, TE = 33 ms, TR = 2 s, N avg = 1, RARE-Factor = 14, and acquisition time = 53 min.

#### Image processing and analysis

The signal bias of T2-weighted images (T2WIs) induced by the surface coil was corrected with N4 bias correction (Advanced Normalization Tools, ANTs). A portion of the bone was segmented and then used to extract a matrix of rigid registration by using FLIRT (FMRIB Software Library, Oxford, UK). This matrix was applied to the T2WIs with bias correction. An automatic segmentation was applied to discriminate bone and liquid by using FAST (FMRIB Software Library, Oxford, UK). The volume estimation and 3D reconstructions were obtained with 3DSlicer ([www.slicer.org](http://www.slicer.org)).

#### FLS isolation and culture

FLSs were prepared from TMJs harvested from control and K/BxN mice as previously described.<sup>36</sup> Condyles were incubated in 6 mL of culture medium containing 1 mg·mL<sup>-1</sup> collagenase Type I from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, France) for 3 h at 37 °C. After centrifugation, the pellet was cultured at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in FLS medium (RPMI 1640 Gluta-MAX/Medium 199 (40% each, v/v) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, France)) containing 250 ng·mL<sup>-1</sup> amphotericin B (Fungizone, Gibco, Thermo Fisher Scientific, France), 50 U·mL<sup>-1</sup> penicillin/streptomycin, and 20% FBS (Dutscher, France). The culture medium was changed twice a week, and the cells were subcultured at 80–90% confluence in FLS medium containing 10% FBS prior to characterization at passage 3. The cells were cultured in a 24-well plate (1 × 10<sup>5</sup> cells per well). After being allowed to adhere overnight, the cells in half of the wells were treated with 1 μg·mL<sup>-1</sup> LPS (*Escherichia coli*, strain 0128: B12, Sigma-Aldrich, France) for 24 h.

#### IL-6 ELISA

IL-6 levels in the sera and supernatants from cultured FLSs were measured by using a commercially available sandwich ELISA by following the manufacturer's instructions (R&D Systems, DY406). The data are expressed as pg·mL<sup>-1</sup>. All measurements were made in duplicate.

#### RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR

Total RNA was extracted from the samples by using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher

Scientific, France). Pretreatment with DNase I (0.1 mg·mL<sup>-1</sup>) was performed to digest the genomic DNA (Thermo Fisher Scientific, France). The total RNA concentration was quantified by using a Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, France). Reverse transcription was performed by using iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad Laboratories, France) according to the manufacturer's instructions.

mRNA expression of *Il-6*, matrix metalloproteinases *Mmp1* (interstitial collagenase), *8* (neutrophil interstitial collagenase), *9* (gelatinase-B), and *13* (interstitial collagenase-3) and *metalloproteinase inhibitor 1 (Timp1)* was assessed by using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, France). *Gapdh* was used as an endogenous RNA control (housekeeping gene) for all samples. Three independent experiments were analyzed in triplicate. The primer sequences used were as follows: *Il-6*, forward 5'ATGAA CAACGATGATGCACTTG3' and reverse 5'TATCCAGTTTGGTAGCA TCCAT3'; *Mmp1*, forward 5'TGCCTAGCCTTCTTTGCTGTT3' and reverse 5'CCAGGTATTTCCAGACTGTCTCCA3'; *Mmp8*, forward 5' CCGGAATTGATTGCTTGGTA3' and reverse 5'CGCCTGAAGACAC TTCCATT3'; *Mmp9*, forward 5'CTGTCGGCTGTGGTTCAGT3' and reverse 5'AGACGACATAGACGGCATCC3'; *Mmp13*, forward 5'TGAT GAAACCTGGACAAGCA3' and reverse 5'TAGATGGGAAACATC AGGGC3'; *Timp1*, forward 5'CGCCTAAGGAACGAAATTTGCAC3' and reverse 5'CACAGCCAGCACTATAGGTCTTTG3'; *Gapdh*, forward 5'TGCTGATGCCCCATGTTCGT3' and reverse 5'CCAAAGTTGTC ATGGATGACC3'.

The expression level was calculated after normalization to the expression of the housekeeping gene.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software Inc.). Data distribution was checked, and statistical significance was evaluated by Mann–Whitney U test. All data are expressed as the mean ± SEM. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Hervé Gegout for histology and Céline Stutz for RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR. This work was funded by the INSERM.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.K.B., M.S., N.B.J. and F.B. contributed equally by conceiving and designing the experiments. S.K.B., A.M., M.S., C.P., A.D.C., F.F., X.V.B. and G.S. performed the experiments and analyzed the data. S.K.B., A.M., M.S., C.P., F.C., P.G. and F.B. wrote the paper.

#### ADDITIONAL INFORMATION

The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41368-019-0072-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

#### REFERENCES

1. Perschbacher, S. *Oral Radiology: Principles and Interpretation* (eds Pharoah, MJ & White, SC) (Mosby-Year Book Inc., 2014).
2. van Bellinghen, X. et al. Temporomandibular joint regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, E446 (2018).
3. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233–55 (2010).
4. Te Veldhuis, E. C., Te Veldhuis, A. H. & Koudstaal, M. J. Treatment management of children with juvenile idiopathic arthritis with temporomandibular joint involvement: a systematic review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **117**, 581–589.e582 (2014).
5. Keller, H. et al. Is early TMJ involvement in children with juvenile idiopathic arthritis clinically detectable? Clinical examination of the TMJ in comparison with

- contrast enhanced MRI in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* **13**, 56 (2015).
6. Chen, J. et al. Analysis of microarchitectural changes in a mouse temporomandibular joint osteoarthritis model. *Arch. Oral Biol.* **54**, 1091–8 (2009).
  7. Schminke, B. et al. A discoidin domain receptor 1 knock-out mouse as a novel model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 1081–96 (2014).
  8. Nejad, S. G., Kobezda, T., Tar, I. & Szekanecz, Z. Development of temporomandibular joint arthritis: the use of animal models. *Joint Bone Spine* **84**, 145–51 (2017).
  9. Naujokat, H. et al. Antigen-induced arthritis of the temporomandibular joint via repeated injections of bovine serum albumin in domestic pigs. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **47**, 932–9 (2019).
  10. Kouskoff, V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**, 811–22 (1996).
  11. Safi, S. et al. Comparative study on serum-induced arthritis in the temporomandibular and limb joint of mice. *Int. J. Rheum. Dis.* **22**, 636–45 (2019).
  12. Kyburz, D. & Corr, M. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* **25**, 79–90 (2003).
  13. Navallas, M. et al. MR imaging of the temporomandibular joint in juvenile idiopathic arthritis: technique and findings. *Radiographics* **37**, 595–612 (2017).
  14. Li, L., Shi, H., Xie, H. & Wang, L. MRI assessment and histopathologic evaluation of subchondral bone remodeling in temporomandibular joint osteoarthritis: a retrospective study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **126**, 355–62 (2018).
  15. Larheim, T. A., Abrahamsson, A. K., Kristensen, M. & Arvidsson, L. Z. Temporomandibular joint diagnostics using CBCT. *Dentomaxillofac. Radiol.* **44**, 20140235 (2015).
  16. Liang, X. et al. Evaluation of trabecular structure changes in osteoarthritis of the temporomandibular joint with cone beam computed tomography imaging. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **124**, 315–22 (2017).
  17. Rehan, O. M., Saleh, H. A. K., Raffat, H. A. & Abu-Taleb, N. S. Osseous changes in the temporomandibular joint in rheumatoid arthritis: a cone-beam computed tomography study. *Imaging Sci. Dent.* **48**, 1–9 (2018).
  18. Urtane, I., Jankovska, I., Al-Shwaikh, H. & Krisjane, Z. Correlation of temporomandibular joint clinical signs with cone beam computed tomography radiologic features in juvenile idiopathic arthritis patients. *Stomatologija* **20**, 82–89 (2018).
  19. Vaid, Y. N. et al. Imaging of the temporomandibular joint in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res.* **66**, 47–54 (2014).
  20. Sarrat, P. et al. RMI of dysfunctional temporomandibular joint (TMJ). Value of gradient-echo T1 sequences in the evaluation of bony structures. *J. Radiol.* **80**, 1543–54 (1999).
  21. Bessis, N., Decker, P., Assier, E., Semerano, L. & Boissier, M. C. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin. Immunopathol.* **39**, 469–86 (2017).
  22. Leonardi, R., Perrotta, R. E., Almeida, L. E., Loreto, C. & Musumeci, G. Lubricin in synovial fluid of mild and severe temporomandibular joint internal derangements. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **21**, e793–e799 (2016).
  23. Bottini, N. & Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 24–33 (2013).
  24. Monach, P. et al. The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: theory and practice. *Methods Mol. Med.* **136**, 269–82 (2007).
  25. Ahmed, N., Petersson, A., Catrina, A. I., Mustafa, H. & Alstergren, P. Tumor necrosis factor mediates temporomandibular joint bone tissue resorption in rheumatoid arthritis. *Acta Odontol. Scand.* **73**, 232–40 (2015).
  26. Dobsak, T. et al. Impaired periodontium and temporomandibular joints in tumour necrosis factor-alpha transgenic mice. *J. Clin. Periodontol.* **44**, 1226–35 (2017).
  27. Ngan, PW, Deguchi, T & Roberts, EW. *Orthodontic Treatment Of Class Iii Malocclusion* (Benthan Science Publishers, 2014).
  28. Massilla, F. M. & Sivasubramanian, S. S. A study of temporomandibular joint osteoarthritis using computed tomographic imaging. *Biomed. J.* **39**, 201–6 (2016).
  29. Detamore, M. S., Athanasiou, K. A. & Mao, J. A call to action for bioengineers and dental professionals: directives for the future of TMJ bioengineering. *Ann. Biomed. Eng.* **35**, 1301–11 (2007).
  30. Dimitroulis, G. The prevalence of osteoarthritis in cases of advanced internal derangement of the temporomandibular joint: a clinical, surgical and histological study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **34**, 345–9 (2005).
  31. Mercuri, L. G. Alloplastic temporomandibular joint replacement: rationale for the use of custom devices. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **41**, 1033–40 (2012).
  32. Liang, W. et al. Observing the development of the temporomandibular joint in embryonic and post-natal mice using various staining methods. *Exp. Ther. Med.* **11**, 481–9 (2016).
  33. Otonari-Yamamoto, M. & Imoto, K. Differences in signal intensities of temporomandibular joint (TMJ) effusion on fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images. *Oral Radiol.* **34**, 245–50 (2018).
  34. Wahaj, A., Hafeez, K. & Zafar, M. S. Association of bone marrow edema with temporomandibular joint (TMJ) osteoarthritis and internal derangements. *Cranio* **35**, 4–9 (2017).
  35. Roh, H. S., Kim, W., Kim, Y. K. & Lee, J. Y. Relationships between disk displacement, joint effusion, and degenerative changes of the TMJ in TMD patients based on MRI findings. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **40**, 283–6 (2012).
  36. Philippe, L. et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1071–9 (2013).
  37. Danks, L. et al. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1187–95 (2016).
  38. Hardy, R. S. et al. Characterisation of fibroblast-like synoviocytes from a murine model of joint inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R24 (2013).
  39. Tanaka-Watanabe, Y. et al. B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **155**, 285–94 (2009).



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020





## Implication du gène *Dicer1* dans le vieillissement et ses pathologies chez la souris

### Résumé

Malgré un gain d'espérance de vie de 30 ans au cours du siècle dernier dans les pays développés, atteindre un âge avancé reste associé au développement de pathologies chroniques et/ou invalidantes. Définir les acteurs de vieillissement est donc une priorité pour espérer freiner l'établissement de ces maladies et/ou réduire leur sévérité.

L'enzyme DICER possède des fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire mais son rôle dans le vieillissement reste encore à définir. Afin d'évaluer sa contribution, le suivi longitudinal de souris *Dicer1*<sup>d/d</sup> avec une expression réduite de la protéine a été réalisé.

Les animaux *Dicer1*<sup>d/d</sup> ont une survie réduite et un développement précoce de pathologies liées à l'âge. Le séquençage ARN du tissu adipeux révèle une profonde altération du transcriptome chez les mutants avec l'âge. Nous suggérons que cette signature transcriptomique différentielle soit à l'origine du vieillissement prématuré.

Les données établissent *Dicer1* comme un acteur clé de la balance altération/réparation conditionnant la vitesse de vieillissement et posent les animaux *dicer1*<sup>d/d</sup> comme un nouveau modèle d'étude de ce processus.

**Mots-clés :** *Dicer1*, modèle souris, vieillissement prématuré, tissu adipeux, troubles métaboliques

### Abstract

Despite a 30-year gain in life expectancy over the last century in developed countries, reaching old age remains associated with the development of chronic and/or disabling pathologies. Defining the actors of aging is therefore a priority in order to delay the establishment of these diseases and/or reduce their severity.

DICER is an enzyme with essential functions in the maintenance of cellular homeostasis but its role in aging remains to be defined. In order to address its contribution, longitudinal monitoring of *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice, with reduced expression of the protein, was carried out.

*Dicer1*<sup>d/d</sup> animals have reduced survival and early development of age-related pathologies. RNA sequencing of adipose tissue shows a profound alteration of the transcriptome in aged mutants. We suggest that this differential transcriptomic signature is responsible for the premature aging observed in *Dicer1* mutants.

My thesis work established *Dicer1* as a key player in the alteration/repair balance conditioning the rate of aging and revealed *Dicer1*<sup>d/d</sup> animals as a new mouse model for age-related studies.

**Key words:** *Dicer1*, mouse model, premature aging, adipose tissue, metabolic disorders