



HAL
open science

Régulations épigénétiques et rôles de la protéine Btk dans l'expression du TNF- α par la voie des TLRs

Laurent Frenzel

► **To cite this version:**

Laurent Frenzel. Régulations épigénétiques et rôles de la protéine Btk dans l'expression du TNF- α par la voie des TLRs. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ057 . tel-01071591

HAL Id: tel-01071591

<https://theses.hal.science/tel-01071591v1>

Submitted on 6 Oct 2014

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

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



UNIVERSITE DE STRASBOURG

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

DE

STRASBOURG

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Domaine : Immunologie

Par

Laurent FRENZEL

*Régulations épigénétiques et rôles de la protéine Btk dans l'expression
du TNF- α par la voie des TLRs*

Soutenu publiquement le : 02 septembre 2013

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur Jean Sibia
Monsieur le Professeur Olivier Hermine
Monsieur le Professeur Bertrand Arnulf
Monsieur le Professeur Philippe Georgel
Madame le Professeur Dominique Wachsmann

Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directeur de thèse honorifique

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	p 5
LISTE DES ABREVIATIONS	p 8
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU	p 13
INTRODUCTION	p 15
1. <u>Bruton Tyrosine Kinase ou Btk</u>	
1.1 Gène et protéine Btk	p 16
1.2 Régulation de l'activation de la protéine Btk	p 18
1.3 Lymphocyte B et Btk	p 19
1.3.1 <i>Btk et BCR</i>	
1.3.2 <i>Btk et BAFF-R</i>	
1.4 Btk et la voie TLR	p 25
1.4.1 <i>La voie des Toll-Like Receptors ou TLRs</i>	
1.4.2 <i>Rôle de Btk dans la voie des TLRs</i>	
1.5 Autres rôles de Btk	p 31
2. <u>Polyarthrite rhumatoïde et TNF-α</u>	
2.1 Présentation de la polyarthrite rhumatoïde	p 33
2.1.1 <i>Généralités</i>	
2.1.2 <i>Terrains</i>	
2.1.3 <i>Physiopathologie</i>	
2.2 Principaux acteurs de la polyarthrite rhumatoïde	p 37
2.2.1 <i>Les fibroblast-like synoviocytes ou FLS</i>	
2.2.2 <i>Les cellules de l'immunité innée</i>	
2.2.3 <i>Les cellules de l'immunité adaptative</i>	
2.3 Rôle prépondérant du TNF- α dans la PR	p 41
2.3.1 <i>Le TNF-α : son expression et son rôle</i>	
2.3.2 <i>Le TNF-α dans la PR</i>	

2.4	Btk, TNF- α et PR	p 46
3.	<u>Mécanismes de régulation post-transcriptionnelle par dégradation de l'ARN messager</u>	
3.1	Stabilité et dégradation de l'ARNm	p 48
3.2	Les complexes mRNP	p 50
3.2.1	<i>Généralités</i>	
3.2.2	<i>Tristétraproline et TNF-α</i>	
3.3	Les microARNs ou miARNs	p 52
3.3.1	<i>La biogénèse des miARNs</i>	
3.3.2	<i>La voie effectrice des miARNs</i>	
3.3.2.1	<i>Les protéines associées au complexe RISC</i>	
3.3.2.2	<i>L'appariement</i>	
3.2.3.3	<i>La dégradation des ARNm par les miARNs</i>	
3.2.3.4	<i>La répression de la traduction des ARNm</i>	
3.2.3.5	<i>Mode de régulation non canonique</i>	
3.3.3	<i>Rôle physiologique et pathologique des miARNs</i>	
3.3.3.1	<i>miARNs et immunité</i>	
3.3.3.2	<i>miARNs et PR</i>	
4.	<u>Autres systèmes de contrôle épigénétique : acétylation et méthylation</u>	
4.1	Méthylation de l'ADN	p 63
4.1.1	<i>Généralités</i>	
4.1.2	<i>Méthylation de l'ADN et PR</i>	
4.2	Acétylation des histones	p 65
4.2.1	<i>Généralités</i>	
4.2.2	<i>Acétylation des histones et PR</i>	
	OBJECTIFS DE TRAVAIL	p 68
	RESULTATS ET DISCUSSION	p 70
1.	Régulation de la protéine Btk par l'expression du miR-346 <i>Publication 1 : Journal of Immunology</i>	p 71

2. Régulation du TNF-α par la modulation de la TTP via l'expression de Btk et de miR-346 <i>Publication 2 : PLoS One</i>	p 84
3. La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones contrôlent l'expression du TNF-α par l'intermédiaire de Btk et de miR-346 <i>Travaux 3</i>	p 96
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	p115
BIBLIOGRAPHIE	p122
RESUME	p142

REMERCIEMENTS

Ces cinq années passées sur cette thèse de science représentent un travail long et très difficile notamment en raison de l'alternance avec ma fonction de médecin hospitalier mais très enrichissantes. Je suis particulièrement ravi d'avoir pu mener à terme ce travail qu'il m'aurait été impossible de faire sans l'aide inestimable des personnes m'ayant soutenu, directement ou indirectement.

Tout d'abord, il me paraît inconcevable de commencer ces remerciements autrement que par « **Madame Wachsmann** ». Directrice de ma thèse jusqu'à l'année dernière, vous n'avez malheureusement pas pu poursuivre cette direction pour les problèmes de santé qu'on connaît tous. Vous avez été présente et vous m'avez guidé depuis mon arrivée au laboratoire en 2007 lors de mon M2 puis pendant toute ma thèse. Surtout, vous m'avez permis de réaliser cette thèse en alternance et vous m'avez fait confiance dans le déroulement de mes travaux que je faisais essentiellement les soirs et les week-ends. Vous avez toujours pris le temps de regarder mes résultats et de me conseiller pour la suite. Vous m'avez appris à rédiger correctement un article et à organiser mes présentations orales. Pour tout ceci, je ne vous remercierai jamais assez ; cette thèse est en très grande partie grâce à vous.

Je voudrai bien entendu remercier mon directeur de thèse, le **Professeur Jean Sibilia**. Le fait que vous soyez pour la deuxième fois mon directeur de thèse suffirait à montrer toute l'estime et la reconnaissance que j'ai envers vous. Mais je voulais également vous remercier pour l'aide inestimable que j'ai pu avoir pendant mon internat mais surtout pendant toutes ces années de thèse alors que je n'étais plus à Strasbourg. Vous m'avez toujours aidé et soutenu dans ma carrière parisienne alors que vous avez de lourdes tâches administratives en tant que chef de service et Doyen de la faculté de Médecine. J'espère pouvoir avoir la chance et l'opportunité de travailler à nouveau à vos côtés tant sur le plan médical, universitaire que fondamental.

Remercier le **Professeur Olivier Hermine** en seulement quelques lignes ne va pas être chose aisée. En effet, vous m'avez accepté dans votre service en tant que chef de clinique alors que vous me connaissiez absolument pas, sauf comme un rhumatologue un peu perdu, formé par Jean Sibilia et désireux de faire de l'hématologie. Ces deux qualités inhabituelles

vous ont probablement intrigué et suscité votre curiosité. Rapidement, j'ai été intégré dans votre équipe avec laquelle j'apprécie grandement de travailler, comprenant toute la chance que j'avais d'être à vos côtés. J'ai appris à voir l'hématologie de la façon la plus intéressante qu'il soit pour ma part, comme un immunologiste et un scientifique. J'ai pu rallier mes connaissances de rhumatologue à des domaines aussi variés que la mastocytose, le virus HTLV-1, les déficits immunitaires et l'hémophilie. Et c'est surtout sur le plan de la recherche fondamentale que j'ai pu apprécier tout le génie de vos idées. Vous m'avez donné, entre autres, plusieurs ouvertures pour cette thèse qui m'ont grandement aidé.

Pour tout ceci, je vous dois beaucoup et j'espère bien pouvoir vous le rendre. En effet, j'ai la chance et l'honneur de pouvoir continuer à travailler dans votre service encore quelques années et de continuer mes travaux de recherche dans votre laboratoire.

Je remercie le **Professeur Bertrand Arnulf** car j'ai apprécié pouvoir travailler avec vous tant sur le plan humain que sur le plan clinique. J'ai appris grâce à vous à prendre en charge les pathologies liées aux immunoglobulines monoclonales et de m'y intéresser. J'ai également beaucoup apprécié votre intérêt pour la recherche fondamentale et les idées très intéressantes que vous aviez. Pour tout ceci, il me paraissait normal que je vous demande d'être jury de cette thèse, ce dont vous m'avez fait l'honneur d'accepter. J'espère avoir encore de nombreuses occasions de travailler avec vous. Je remercie au passage le Professeur Jean Paul Fermanid qui, grâce à son tact légendaire et son insistance insatiable, m'a « proposé » de travailler avec le Pr Olivier Hermine avec la suite que l'on connaît maintenant : un grand merci !

Je remercie également le **Professeur Philippe Georgel** d'avoir accepté de juger cette thèse. Je n'ai malheureusement pas eu la chance de pouvoir travailler directement avec vous alors que vous êtes le nouveau responsable du laboratoire. J'espère pouvoir réintégrer votre équipe ou travailler avec elle lors de mon retour sur Strasbourg. Par ailleurs, j'espère pouvoir finaliser avec vous cette thèse en écrivant un article sur les derniers résultats de celle-ci.

Je remercie évidemment **Ghada Alsaleh**, notre maman à tous au laboratoire. En plus de ta gentillesse à toute épreuve, tu as toujours pris le temps de m'écouter et de m'aider dans mes manipulations. Tu es également à l'origine des microARNs dans notre laboratoire et de nombreuses autres initiatives. Un grand merci à toi et j'espère avoir encore beaucoup d'occasions de travailler avec toi. Merci également à **François, Angélique** et **Yazuou** pour

leur disponibilité et leur sympathie. Merci à **Lookas** même si je n'ai pas toujours tout compris à ses explications. Merci à **Noha** avec qui j'ai commencé ce travail. Je remercie également le **Peter** pour avoir mangé si souvent avec moi au resto U. Je remercie **Etienne** qui a travaillé avec moi pendant son M2 tout en faisant bien attention à l'écart entre le marchepied et le quai...

Je remercie ma chérie, **Anne-Sophie**, qui a été très patiente pendant toute cette thèse et qui a bien voulu me croire quand je lui disais que j'allais voir mes cellules à 2 heures du matin au labo le samedi soir. Je pense que tu ne m'en as pas trop voulu en fin de compte puisque **Gaspard** est arrivé entre temps.

Je remercie mes « beaux » parents, **Lilianne et Jean-Jacques**, pour m'avoir permis de continuer mes travaux en nous louant gracieusement votre dépendance, me permettant de venir très régulièrement sur Strasbourg. Je vous remercie également d'avoir accepté mes nombreuses absences répétées les week-ends pour aller au laboratoire.

Je remercie ma maman, **Micheline**, sans qui tout ceci n'aurait été possible... ainsi que mon père, **Many**. Je remercie mes p'tites sœurs notamment **Corinne avec Michel et Guéno**.

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	acide aminé
ACR	American College of Rheumatology
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase domain
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AP-1	Activator protein-1
BAFF	B cell activating factor
BCMA	B cell maturation antigen
BCR	B Cell Receptor
BLP	Bacterial lipoprotein
BP	Binding protein
BTK	Bruton Tyrosine Kinase
CD	Cellule dendritique
CDF	Cellule dendritique folliculaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygenase
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CpG	Cytosine phosphate guanine
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
DAMPs	Damage associated molecular pattern molécules
DNMT	DNA methyltransferase
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

FAK	Focal adhesion kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FLIP	Fas-associated death domain-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory protein
FLS	Fibroblast-like synoviocyte
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HAT	Histone acetyl transferase
HDAC	Histone deacetylase
HLA	Human leukocyte antigen
Hu-RA-SCID	Human-Rheumatoid Arthritis-Severe Combined Immunodeficiency
HTLV-1	Human T Lymphotropic Virus type 1
HSP	Heat shock protein
ICAM	Intercellular adhesion molecule
Ig	Immunoglobuline
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IKK	I κ B kinase
IRAK	IL-1RI-associated protein kinase
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus kinase
JNK	Jun-N-terminal kinase
LB	Lymphocyte B
LED	Lupus erythémateux disséminé
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T

MAL	MyD88-adapter-like
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBD	Methyl-CpG-binding domain
MCP	Monocyte-chemoattractant protein
MEC	Matrice extracellulaire
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP	Matrix-metalloproteinase
MPGES	Microsomal prostaglandin E2 synthase
MTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MyD	Myeloid differentiation factor
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NO	Oxyde nitrique
NOD	Non-obese diabetes
OPG	Ostéoprotégérine
PAF	Platelet activating factor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PDGF	Platelet-derived growth factor
PG	Peptidoglycan
PI	Phosphatidylinositol
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphate
PG	Prostaglandines
PKC	Protéine kinase C

PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PNN	Polynucléaire neutrophile
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PRR	Pattern recognition receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTK	Protéine tyrosine kinase
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
Pyk	Proline-rich tyrosine kinase
RA	Rheumatoïd arthritis
RAGE	Advanced glycation endproducts receptor
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B
RANTES	Regulated upon activation normal T-cells expressed and secreted
RBP	RNA-binding protein
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription
SCID	Severe combined immunodeficient »
SDF	Stroma-derived factor
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SUMO	Small ubiquitin- like modifier
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TACI	Transmembrane activator and calcium-modulator cyclophilin ligand interactor

TCR	T cell receptor
TGF	Transforming growth factor
TICAM	TIR-containing adaptor molecule-1
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TIR	Toll-IL-1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TORC	Target of rapamycin complex
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRICHOA	Trichostatine A
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β
TTP	Tristétraproline
TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XLA	Agammaglobulinémie congénitale lié à l'X
5-AZA	5- azacytidine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du promoteur de Btk	p 17
Figure 2 : Les différents domaines de la protéine Btk	p 17
Figure 3 : Rôle des différents sites de phosphorylation de la protéine Btk	p 19
Figure 4 : Importance de Btk dans la maturation lymphocytaire B chez l'homme	p 20
Figure 5 : La protéine Lyn dans le contrôle de la voie de signalisation du BCR	p 21
Figure 6 : Rôle de Btk sur la régulation des facteurs de transcription NF- κ B et NFAT	p 22
Figure 7 : Voies de signalisation en réponse au récepteur BCR et Btk	p 23
Figure 8 : Rôle de Btk dans la voie de BAFF-R	p 25
Figure 9 : Les différents récepteurs TLRs chez l'homme	p 26
Figure 10 : Les 2 voies de signalisation MyD88 et TRIF en réponse aux TLRs	p 28
Figure 11 : Rôle de Btk dans le contrôle des voies MyD88 et TRIF	p 31
Figure 12 : Btk et la voie de signalisation du récepteur RANK	p 32
Figure 13 : Rôle du terrain environnemental et génétique dans la PR	p 35
Figure 14: Schéma représentant les 3 phases physiopathologiques de la PR	p 37
Figure 15 : Acteurs cellulaires dans la physiopathologie de la PR	p 42
Figure 16 : Rôle du TNF- α dans le contrôle de voies de signalisation intracellulaire	p 44
Figure 17 : Rôle du TNF- α dans la PR	p 45
Figure 18 : Btk et de son inhibition par le PCI-32765 dans la PR	p 46
Figure 19 : Différents mécanismes de dégradation de l'ARNm par les nucléases	p 49
Figure 20 : Complexe mRNP et stabilité de l'ARNm de l'IL-2	p 51
Figure 21 : Représentation schématique de la biogénèse des miRNA	p 54
Figure 22 : Appariement imparfait des miARNs sur l'ARNm cible	p 57

Figure 23 : Méthylation de l'ADN dans la transcription de gènes	p 64
Figure 24 : Mécanisme d'acétylation des histones	p 66
Figure 25 : Rôle de Btk dans la réponse au lenalidomide dans le lymphome	p120
Tableau 1 : miARNs et réponse immunitaire	p 61

INTRODUCTION

1. Bruton tyrosine kinase ou Btk

La découverte des mutations génétiques impliquées dans l'agammaglobulinémie liée à l'X humaine et dans le modèle murin d'immunodéficience liée à l'X ou XID (Rawlings et al., 1993 ; Thomas et al., 1993) a permis de mettre en évidence le rôle primordial de la Bruton tyrosine kinase (Btk) dans le développement et la maturation du lymphocyte B. Des études récentes ont également montré que Btk a également un rôle clé dans le contrôle du système immunitaire inné notamment via la voie des Toll like Receptor (TLR). L'importance de cette kinase est encore accentuée par son rôle dans la physiopathologie de certaines maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) et dans certaines hémopathies malignes.

1.1 Gène et protéine Btk :

Btk est une protéine tyrosine kinase non récepteur, cytoplasmique, appartenant à la famille des tyrosines kinases Tec (Jefferies and al., 2003). La famille des Tec kinases comporte, en plus de Btk, les protéines Tec, Itk, Txk et Bmx. Ces protéines sont exprimées essentiellement par les cellules hématopoïétiques et interviennent globalement dans les voies de signalisation intracellulaire soit en réponse aux récepteurs cytokiniques soit en réponses aux récepteurs lymphocytaires BCR et TCR (Berg et al, 2005). Elles interviennent également dans la présentation antigénique et dans la régulation du cytosquelette (Finckelstein et al. 2004).

Btk est exprimé par l'ensemble de cellules hématopoïétiques sauf dans les lymphocytes T et les cellules NK (Mohamed et al., 2009).

Le gène Btk est situé sur le chromosome X humain, comporte 19 exons et 37,5 kb (Sideras et al., 1994). Suite au clonage du gène Btk en 1992 (Vetrie et al., 1993), plus de 800 mutations ont été identifiées. Comme pour d'autres anomalies génétiques, il s'agit de mutations faux-sens, non-sens, sur site de splicing, par insertion ou délétion. Son promoteur, situé à environ 1000 bp en amont de du gène, est régulé par plusieurs facteurs de transcription dont notamment NF- κ B, Pu-1, Sp1/3, Spi-B, BOB.1, OBF.1 et Oct1/2 (figure 1).

Btk promoter

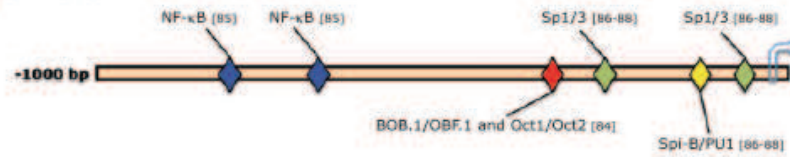


Figure 1 : Schéma du promoteur de Btk avec les sites de fixation des facteurs de transcription (Mohamed et al., 2009).

La protéine Btk comporte 659 acides aminés et se compose de plusieurs domaines fonctionnels. A partir de l'extrémité N-terminale de la protéine Btk, on retrouve successivement (figure 2) :

- un domaine PH ou Plekstrin Homology
- un domaine TH ou Tec Homology regroupant les régions BH (Btk Homology Region) et PPR (Poly Proline Region)
- un domaine SH2 ou Src Homology 2 et un domaine SH3 ou Src Homology 3
- un domaine kinase SH1 ou Src Homology 1 comportant le domaine tyrosine kinase

A partir de ces différents domaines, la protéine Btk pourra être activée par phosphorylation et interagir avec de nombreuses protéines intervenant dans différentes voies de signalisation.

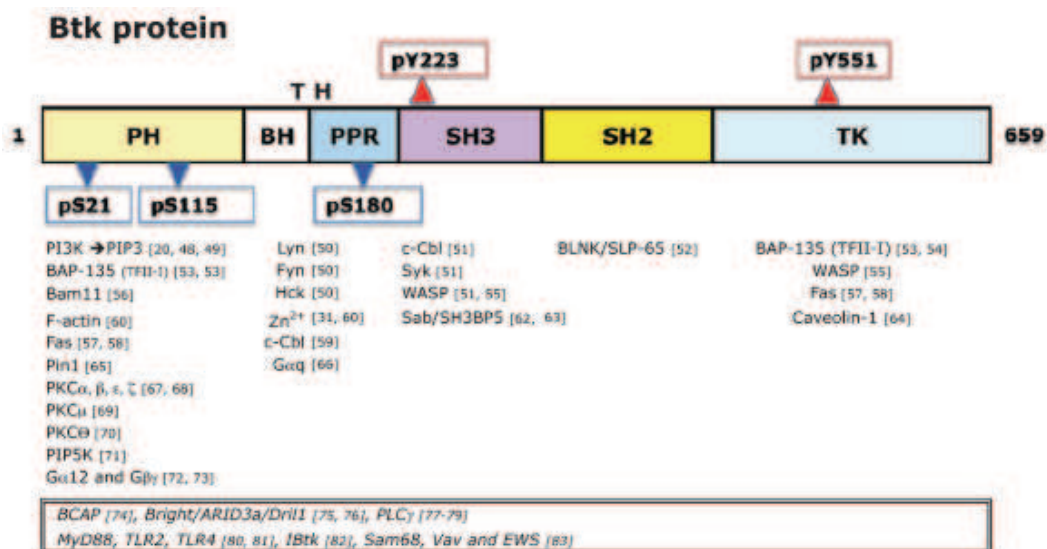


Figure 2 : Schéma représentant les différents domaines de la protéine Btk avec leurs sites de phosphorylation, représentés par les flèches rouges et bleues, ainsi que les protéines interagissant avec Btk (Mohamed et al., 2009).

1.2 Régulation de l'activation de la protéine Btk

Sous sa forme inactive non phosphorylée, la protéine Btk se localise dans le cytoplasme à proximité du noyau cellulaire. Sa stabilité nécessite la présence de Zinc se fixant au niveau du domaine TH de la protéine ; des mutations dans la région de fixation au Zinc amènent à la génération d'une protéine Btk très instable et rapidement dégradée (Hyvonen et al., 1997). Après stimulation cellulaire via la voie TLR ou BCR, la protéine Btk se déplace vers la surface cellulaire et sera phosphorylée au niveau de la région Y551 du domaine SH1/TK par une protéine de la famille des Src kinases comme Lyn. Cette phosphorylation dans le domaine catalytique de la protéine entrainera une auto phosphorylation au niveau de la région Y223 du domaine SH3 (Park et al., 1996). Ces phosphorylations permettront à la protéine Btk d'adopter une conformation tridimensionnelle favorable à l'exposition de son domaine PH et à l'interaction avec de nombreuses protéines dont par exemple la phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate ou PIP3 entrainant la phosphorylation de la phospholipase C ou PLC γ . Les mécanismes amenant à transporter la protéine Btk sont actuellement inconnus.

Par contre, des mécanismes de régulation négative de l'activation de Btk ont été rapportés dont notamment le rôle de la protéine Pin1 (Yu et al., 2006). Cette protéine Pin1 peut phosphoryler les sites S21 et S115 situés dans le domaine PH et accessoirement S180 dans la région PPR, et entrainer la dégradation de la protéine Btk (figure 3).

D'autres protéines ont également été incriminées dans la régulation négative de Btk notamment les protéines kinases SHP-1 et SHP-2 (Maeda et al., 1999). SHP-1 va déphosphoryler Btk après son interaction avec la protéine PIR-B et réguler négativement la réponse au récepteur BCR.

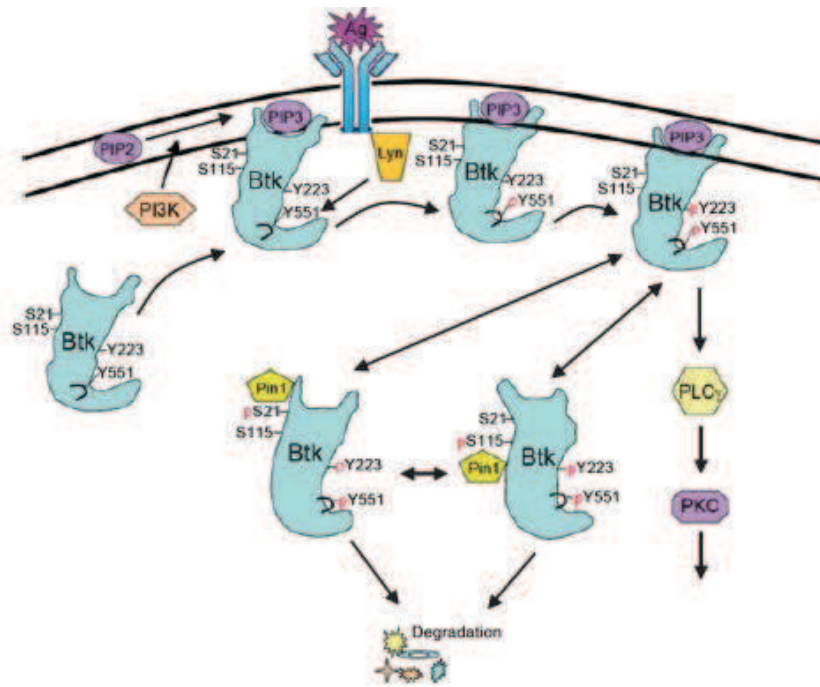


Figure 3 : Schéma représentant le rôle des différents sites de phosphorylation de la protéine Btk entraînant soit son activation via Lyn, soit sa dégradation par l'intermédiaire de Pin1 (Mohamed et al., 2009).

1.3 Lymphocyte B et Btk

Décrite en premier par Ogden Bruton en 1952, l'agammaglobulinémie congénitale (XLA) est le premier déficit immunitaire identifié. Son incidence est de l'ordre d'une naissance sur 200 000. Son mode de transmission est essentiellement lié à l'X avec plusieurs centaines de mutations décrites sur le gène Btk. Elle se caractérise par un défaut de maturation des lymphocytes B et du réarrangement des chaînes lourdes d'immunoglobuline conduisant à l'absence de production d'immunoglobuline. Son mode de révélation est précoce dans la vie, particulièrement chez le garçon pendant les deux premières années de vie mais le diagnostic peut se faire plus tardivement ; il n'y a pas de corrélation entre le génotype et le phénotype des patients XLA.

Chez ces patients XLA, le défaut de maturation des lymphocytes B se situe au stade pré-B1 de la lymphogénèse B (Nomura et al., 2000) ; ces patients possèdent une population pro-B normale mais un défaut des autres populations plus matures montrant que Btk est indispensable à la lymphogénèse B chez l'homme (figure 4).

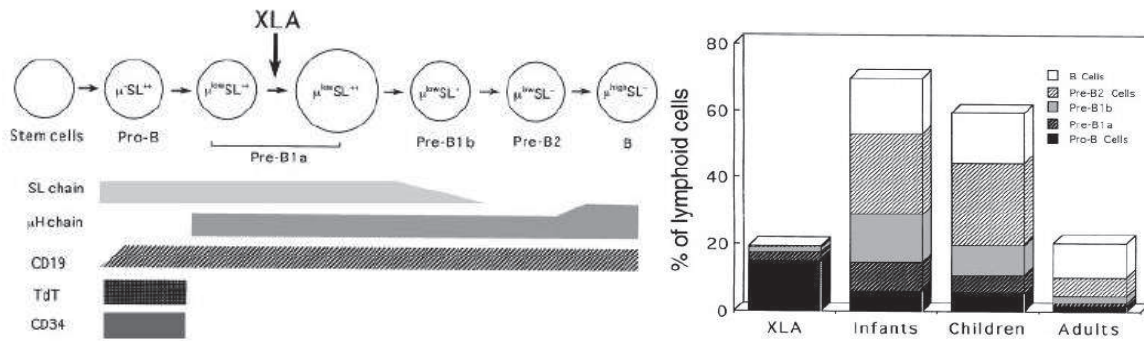


Figure 4 : Schémas montrant l'importance de Btk dans la maturation lymphocytaire B chez l'homme avec à gauche le rôle de Btk dans le passage du stade pro-B au stade pre-B1 et à droite la déplétion des populations pré-B1, pré-B2 et lymphocyte B naïfs chez les patients XLA (Nomura et al., 2000).

Ce rôle central de Btk dans la maturation lymphocytaire est moins présent dans les modèles murins ; les souris XID ayant une mutation inactivatrice de Btk possèdent une population de lymphocyte B diminuée seulement de moitié par rapport aux souris Wild-Type (WT). Ceci serait expliqué par le remplacement de la fonction de Btk par la protéine tyrosine kinase Tec alors que chez l'homme la présence de protéines Tec ne permet pas de restaurer cette fonction (Ellemeier et al., 2000).

Le mécanisme de contrôle de Btk dans ce phénomène de maturation du lymphocyte B n'est pas complètement élucidé. Deux voies de signalisation spécifique du lymphocyte B seraient impliquées : la voie du récepteur BCR et du récepteur BAFF-R

1.3.1 Btk et BCR

L'activation du récepteur du lymphocyte B ou BCR, soit par fixation antigénique soit par maturation, permettrait le recrutement à la membrane cellulaire de protéine de la famille kinase Src comme Fyn et Lyn.

La protéine Lyn a un rôle central dans la voie de signalisation du BCR (Satterthwhite et al., 2000) (figure 5) :

- elle va permettre le recrutement et l'activation de la protéine membranaire CD19 directement par phosphorylation et indirectement en inactivant CD22 levant son

inhibition sur CD19. CD19 activé va recruter la protéine PI3K qui va elle-même phosphoryler PIP2 en PIP3 qui sera reconnu par le domaine PH de Btk.

- Elle va permettre la phosphorylation de Btk sur le site Y551, puis son autophosphorylation entraînant une modification spatiale permettant à son domaine PH d'interagir notamment avec la PIP3.

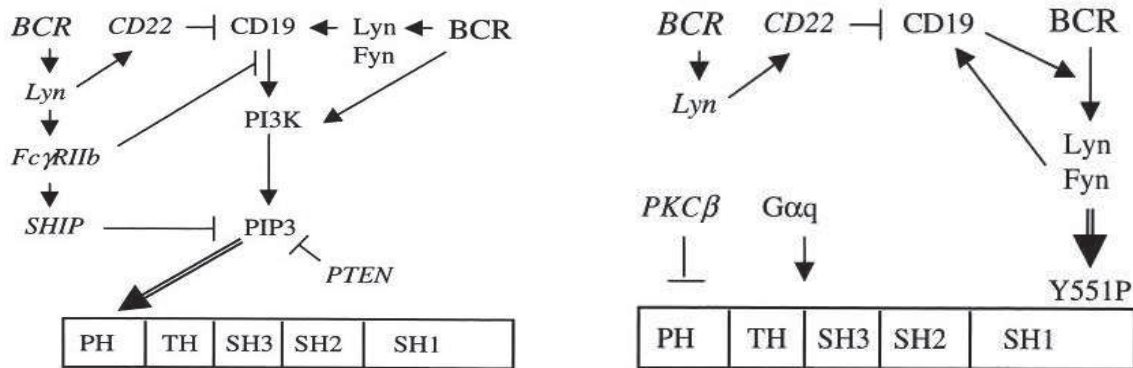


Figure 5 : Rôle de la protéine Lyn dans le contrôle de la voie de signalisation du BCR médiée par Btk (Satterthwhite et al., 2000).

La protéine Btk activée par la fixation du PIP3 sur son domaine PH va pouvoir phosphoryler la protéine lipase PLCγ recrutant la protéine kinase PKC. PLCγ est également régulée par la protéine kinase Syk qui, avec Btk, phosphoryle et active cette protéine PLCγ.

PKC va pouvoir intervenir à deux niveaux de voie de signalisation :

- en levant l'inhibition d'IκB sur NF-κB par l'intermédiaire de la famille IKK (Petro et al., 2000)
- en modifiant le flux calcique intra cellulaire entraînant l'activation de la protéine phosphatase CaN et l'activation du facteur de transcription NFAT.

L'activation de Btk va donc permettre le recrutement de deux facteurs de transcription majeurs, NF-κB et NFAT, régulant la synthèse de nombreuses protéines intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire, la maturation et la survie (figure 6). Les lymphocytes B déficientes pour la protéine Btk ont une activité NF-κB nettement diminuée, montrant bien l'importance de cette interaction Btk/NF-κB (Bajpai et al., 2000).

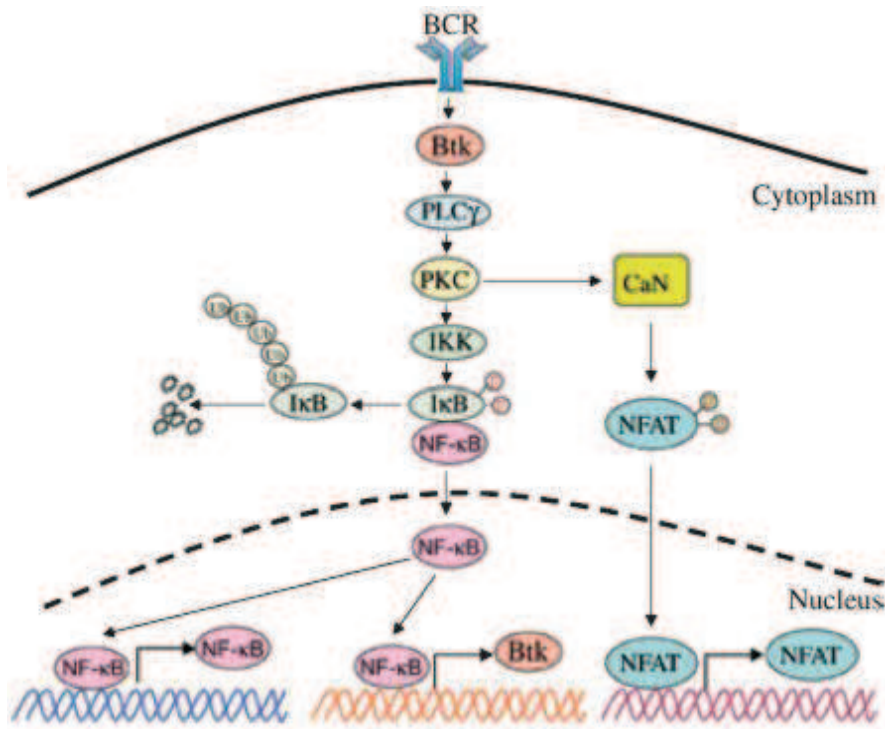


Figure 6 : Schéma montrant le rôle de Btk dans la voie de signalisation du BCR sur la régulation des facteurs de transcription NF-κB et NFAT (Mohamed et al., 2009).

Par ailleurs, le contrôle de NF-κB par Btk va également permettre l'autorégulation de Btk puisque NF-κB a des sites d'interaction sur le promoteur du gène Btk. D'autre part, il a également été démontré que Btk pouvait intervenir sur la régulation d'autres facteurs de transcription BAP-135, TFII-I, STAT5A, Bright ainsi que sur la voie des MAPK par interaction indirecte avec RasGRP3 régulant la synthèse du facteur de transcription AP-1 (Mahajan et al., 2001) (figure 7).

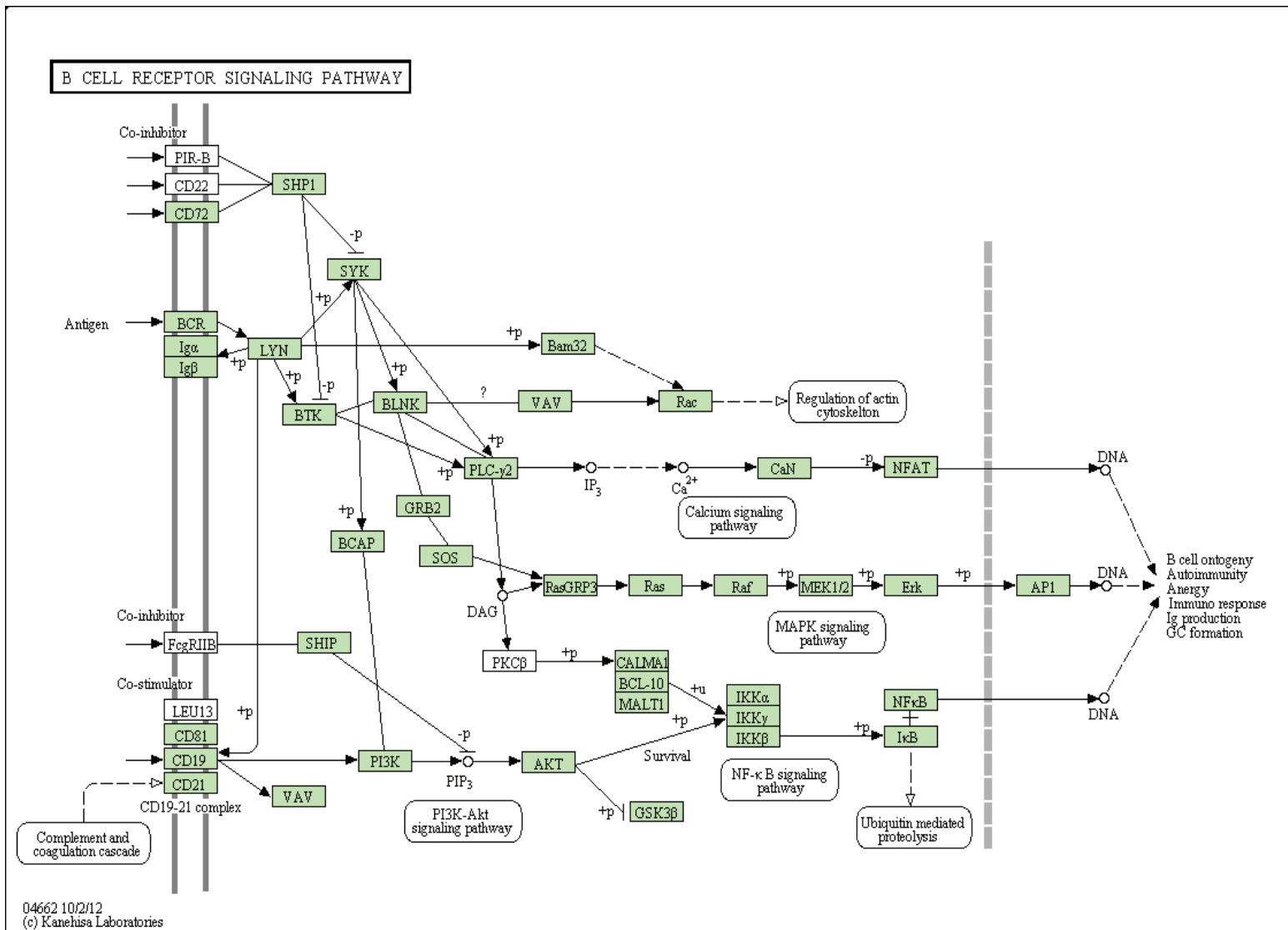


Figure 7 : Schéma représentant de manière non exhaustive l'ensemble des voies de signalisation en réponse au récepteur BCR faisant intervenir la protéine Btk (www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/197731).

Enfin, en association avec la protéine kinase Syk recrutée également par Lyn, Btk va également régulée la protéine Rac, par l'intermédiaire de BLNK, intervenant dans la régulation du cytosquelette.

1.3.2 *Btk et BAFF-R*

La prolifération et la survie des lymphocytes B dépendent également d'une autre voie de signalisation, celle du récepteur BAFF-R avec son ligand BAFF.

BAFF-R, récepteur de la famille du TNF- α , est exprimé par tous les lymphocytes B à l'exception des plasmocytes de la moelle osseuse. La modulation de son expression est peu connue. L'activation du BCR (Walmsley et al., 2003) impliquant la voie de la PI3 kinase/Akt (Henley et al., 2008) ou l'activation de TLR9 augmentent l'expression de BAFF-R rendant ainsi les LB plus sensibles à l'action de BAFF (Ng et al., 2006). L'expression de BAFF-R est diminuée au cours du lupus érythémateux disséminé ou du syndrome de Sjögren (Sellam et al., 2007). Cette diminution pourrait être due à l'internalisation du complexe BAFF-BAFF-R.

BAFF (ou BLyS) est une cytokine de classe III. Il s'agit d'une protéine de 285 acides aminés, riche en feuilletts β , présente physiologiquement sous forme de trimères. Comme les autres cytokines de la famille du TNF- α , BAFF est une protéine transmembranaire de type II pouvant être sécrétée par clivage protéolytique. En plus d'activer le récepteur BAFF-R, BAFF peut interagir avec une affinité moindre à d'autres récepteurs tels TACI et BCMA.

Btk va interagir selon 2 modalités au niveau de la voie BAFF-R/BAFF (Shinners et al., 2007) (figure 8) :

- soit par la voie classique du NF- κ B: le couple BAFF-R/BAFF va pouvoir recruter et activer Btk entraînant, de manière similaire à la voie du BCR, l'activation de NF- κ B(p50/p65).
- soit par la voie alterne de NF- κ B : BAFF-R/BAFF va pouvoir recruter la protéine NIK, phosphorylant IKK α permettant la formation du complexe p100/RelB et l'activation de NF- κ B(p52). Via la voie classique, Btk va permettre l'augmentation de l'expression de la protéine p100 et donc l'augmentation de l'activité de NF- κ B (p52)

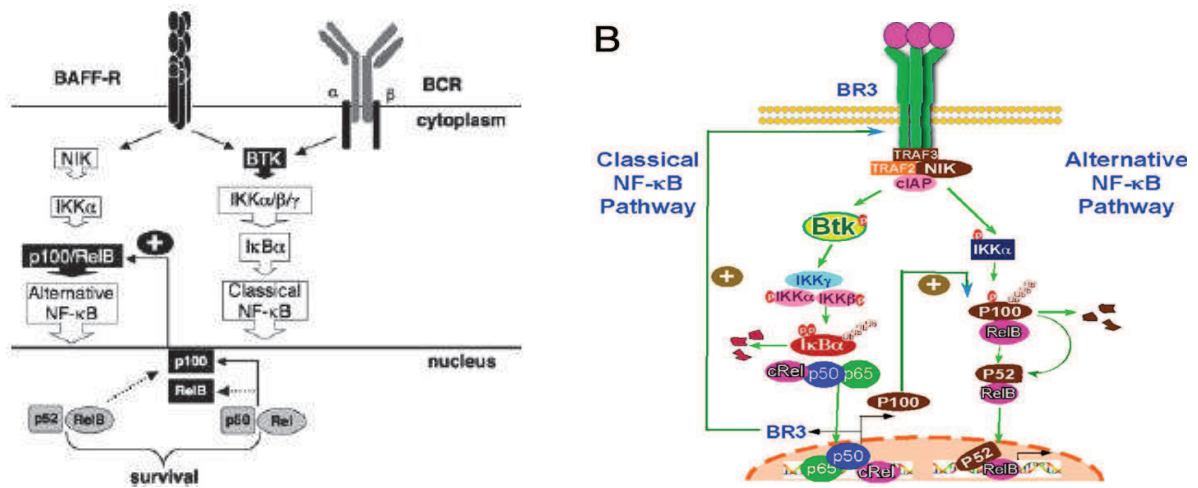


Figure 8 : Schémas représentant le rôle de Btk dans la voie de BAFF-R.

A gauche, le rôle conjoint de la voie BAFF-R et BCR sur l'activation de Btk et son rôle dans la voie classique du NF-κB (Shinners et al., 2007).

A droite, le double rôle de Btk en réponse au BAFF-R (ou BR3) dans la voie classique mais également alterne de NF-κB (Khan et al., 2009)

1.4 Btk et la voie TLR

1.4.1 La voie des Toll-like Recepteurs ou TLR

Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I comportant une partie extracellulaire riche en résidus leucine (LRR) qui permet la reconnaissance des PAMPs exogènes et des DAMPs endogènes, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire contenant le domaine TIR implique dans la transduction du signal intracellulaire (Matsushima et al., 2007).

10 TLRs fonctionnels ont été identifiés chez l'homme et 12 chez la souris. Des études de souris KO pour chacun des TLRs ont permis de montrer que chaque membre de la famille a un rôle bien distinct dans la reconnaissance des ligands. Cette reconnaissance se déroule dans différents compartiments cellulaires, comme la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes ou les endolysosomes. Chez l'homme, les TLRs sont actuellement classés en deux groupes bien distincts, cette classification étant basée sur leur localisation cellulaire.

Elle est également fonction de la nature des ligands reconnus (figure 9) :

- un premier groupe est composé de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, qui sont exprimés à la surface cellulaire et qui reconnaissent principalement des composants des parois microbiennes, comme des lipides, des lipoprotéines et des protéines, qui sont des composés majoritairement lipophiles.

- l'autre groupe est constitué de TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, exprimés exclusivement dans les vésicules intracellulaires où ils reconnaissent des acides nucléiques microbiens (Figure 9).

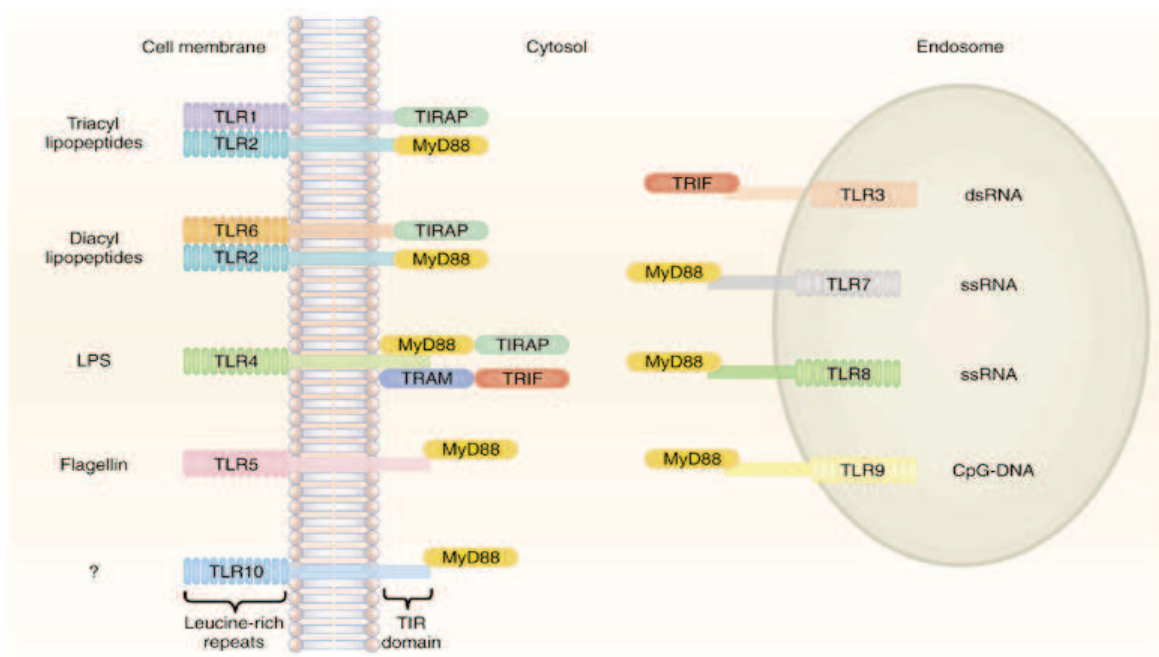


Figure 9 : Les différents récepteurs TLR chez l'homme avec leurs ligands respectifs ainsi que leur localisation cellulaire (Kanzler et al., 2007).

Deux voies principales sont activées par l'interaction des TLRs avec leurs ligands :

- la première conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et à la synthèse de cytokines inflammatoires
- la seconde a l'activation de différents facteurs IRF et à la synthèse d'interférons de type 1.

D'autres voies peuvent être également impliquées dont notamment celle des MAPK.

La liaison des TLRs à leur ligand entraîne leur dimérisation (homo: TLR4 ou hétéroTLR2/TLR6) ce qui induit un changement conformationnel des domaines TIR qui

peuvent alors interagir avec des protéines adaptatrices cytoplasmiques qui sont au nombre de 4 :

- MyD88 utilisée par tous les TLRs connus actuellement à l'exception de TLR3. Elle active la voie NF- κ B et celle des MAPKs.

- TRIF uniquement utilisée par TLR3 et TLR4 et permet l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3

- TRAM et TIRAP/MAL fonctionnent comme des « sorting adaptors » permettant le recrutement de TRIF à TLR4 et de MyD88 à TLR2 et TLR4.

Ces protéines adaptatrices seront responsables de la spécificité des réponses induites selon qu'elles seront recrutées isolément ou associées : ainsi l'activation de TLR3 et TLR4 entraîne une synthèse d'interféron de type I et la production de cytokines proinflammatoires, alors que l'activation de TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 et TLR5 (MyD88) conduit principalement à la production de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, les voies de signalisation des TLRs peuvent être classées selon qu'elles font intervenir MyD88 ou TRIF ou les deux (figure 10).

1.4.1.1. La voie MyD88 dépendante : Après interaction avec le domaine TIR des TLR activés, MyD88 va recruter IRAK4, IRAK1 et IRAK2 par son "death domain". IRAK4 est la première kinase activée, puis IRAK1 et IRAK2. La stimulation de ces kinases permet ensuite leur interaction avec TRAF6, une ligase E3 qui catalyse la synthèse d'une chaîne polyubiquitine sur un certain nombre de protéines telles TRAF6 elle-même, IRAK1 ainsi que sur TAB2 et TAB3, protéines régulatrices du complexe TAK1 et NEMO protéine du complexe IKK. La polyubiquitination de TAK1 permet son recrutement au complexe IKK, ce qui induit la phosphorylation d'IKK-s et l'activation de NF- κ B (Bhoj et al., 2009).

TAK1 intervient également par phosphorylation des protéines de la voie des MAPKs, ERK1/2, p38 et JNK permettant l'activation de différents facteurs de transcription dont AP-1.

1.4.1.2. La voie TRIF dépendante : TRIF recrute TRAF6 et active TAK1 ce qui conduit à l'activation de NF- κ B comme pour la voie MyD88.

La voie TRIF active aussi le facteur de transcription IRF3 et la transcription des interférons. TRIF recrute un complexe de signalisation impliquant TRAF3 et les IKKs non canoniques, TBK1 et IKK ϵ . Ce complexe protéique permettra la déphosphorylation d'IRF3 conduisant à sa translocation dans le noyau (Hacker et al., 2006).

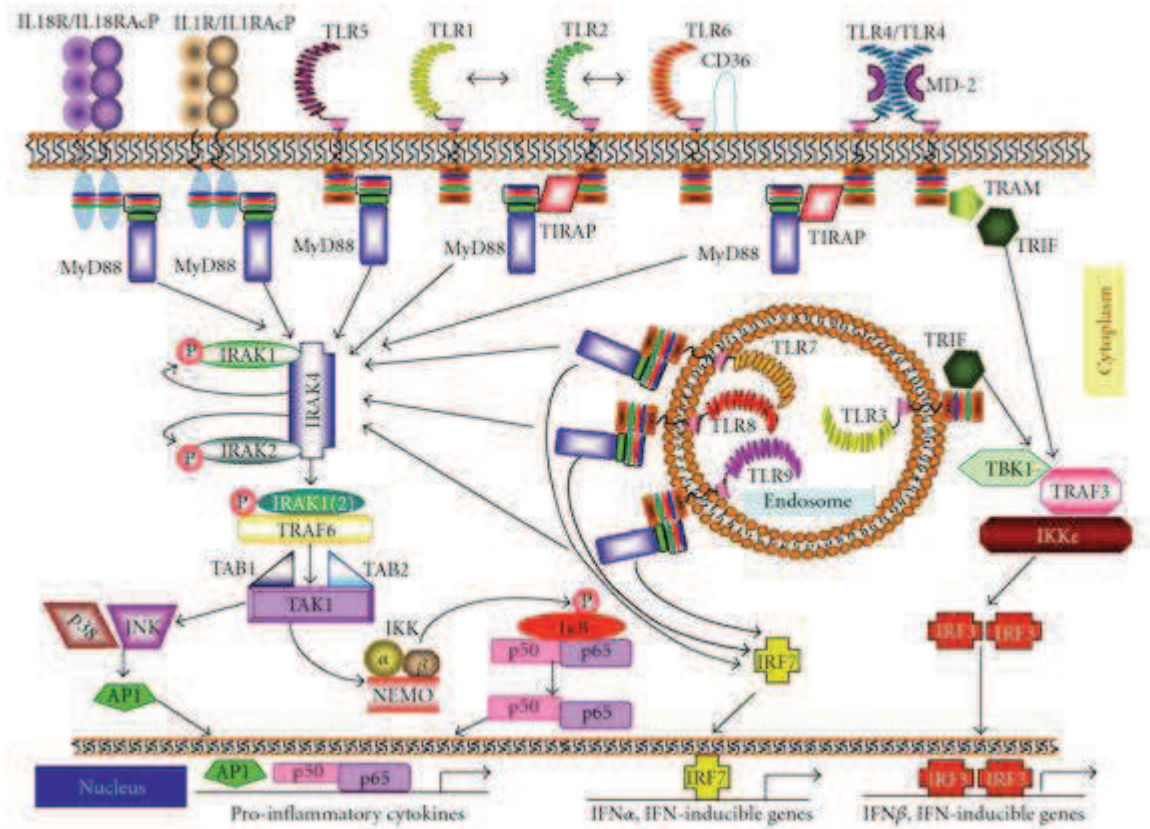


Figure 10 : Schéma représentant les 2 voies de signalisation MyD88 et TRIF en réponse à l'activation des TLRs (Loiarro et al., 2010).

D'autre part, le récepteur TLR4 constitue une exception car il s'agit du seul récepteur utilisant les 4 protéines adaptatrices à domaines TIR. TLR4 recrute initialement TIRAP à la membrane plasmique ce qui favorise le recrutement de MyD88 puis l'activation de NF-κB et des MAPKs (Kagan et al., 2006). TLR4 est ensuite internalisé dans les endosomes par endocytose où il forme un complexe de signalisation avec TRAM et TRIF initiant la voie TRIF-dépendante conduisant à l'activation d'IRF3 ainsi qu'à une activation tardive de NF-κB et des MAPKs (Kagan et al., 2008; Rowe et al., 2006; Tanimura et al., 2008).

Ainsi TLR4 active la voie MyD88 avant la voie TRIF. L'activation de ces deux voies est nécessaire à la production de cytokines par TLR4 à la différence des autres TLRs dont l'activation d'une des voies suffit à la production de cytokine.

1.4.2 : Rôle de Btk dans la voie des TLRs

La mise en évidence du rôle de Btk dans la réponse aux TLRs est de découverte récente. Compte tenu du caractère ubiquitaire des récepteurs TLR à la fois au niveau des cellules immunitaires acquises et innées, le rôle de Btk dans cette régulation ne se limite non pas seulement aux lymphocytes B mais s'étend également aux monocytes, polynucléaires et macrophages. Une étude publiée en 2003 (Horwood et al., 2003) a montré que les cellules mononuclées (monocytes et macrophages) de patients atteints de XLA avaient une expression *in vitro* de TNF- α diminuée en réponse au lipopolysaccharide (LPS), ligand de TLR4. La surexpression de Btk, après transfection d'un vecteur viral contenant la partie codante du gène de Btk dans ces cellules, permettait l'augmentation de production de TNF- α en réponse au LPS. Cette étude a également démontré que Btk permettait la stabilisation de l'ARN messager du TNF- α en empêchant sa dégradation par un mécanisme jusqu'alors inconnu.

Il a été montré initialement que Btk interagit au niveau de la voie MyD88 en réponse aux TLR ; l'inhibition de Btk dans des cellules mononuclées THP-1 est corrélée à la diminution de l'activité de NF- κ B en réponse au LPS via TLR4 (Jefferies et al., 2003). Btk permet la phosphorylation de la protéine adaptatrice Mal (ou TIRAP) expliquant le mécanisme d'action de Btk dans cette voie MyD88 (Gray et al., 2006). Mal phosphorylée pourra interagir avec MyD88, l'activer et entraîner la cascade enzymatique amenant à l'activation de NF- κ B. Cette interaction Btk/Mal joue un rôle particulièrement important dans la réponse TLR4 et TLR2 notamment dans le contrôle de production des cytokines proinflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 mais pas dans l'expression de cytokines telle que l'IL6, IL8 et IL10 (Horwood et al., 2006). Ce couple Btk/Mal aurait également un rôle dans le contrôle de la libération de réactifs hyperoxygénés et la survie cellulaire ; l'absence de Btk dans les polynucléaires neutrophiles des patients atteints de XLA permettrait à la protéine Mal d'interagir avec d'autres protéines kinases dont PI(3)K et d'augmenter la production de ROS via le complexe NADPH oxydase (Honda et al., 2012).

Par ailleurs, en plus de son rôle sur la voie MyD88 via la phosphorylation de Mal, Btk intervient également dans la voie TRIF dépendante. En effet, les macrophages déficients en Btk sécrètent significativement moins d'IFN- γ en réponse au virus de la dengue ou au poly(I :C) ligands respectifs du TLR3. Btk permet la phosphorylation d'un résidu Tyr759 sur la partie cytoplasmique du TLR3, indispensable à l'interaction de TRIF avec TBK1 ; ceci

amenant à la translocation nucléaire d'IRF3 et à la synthèse d'IFN (Lee et al., 2012). Ce mécanisme de contrôle de Btk sur TLR3 via TRIFF/TBK1 serait également nécessaire dans la réponse antivirale médiée par les cellules NK (Bao et al., 2012).

Enfin, cette interaction dans la voie des TLRs entre Btk, MyD88 et TRIFF serait amplifiée par la présence de molécule HLA de classe 2 (MCH2) et CD40. Les souris H2-, déficientes en MCH2, ont une réponse à la voie TLR3, 4 et 9 diminuée. Il a été démontré que l'association de MCH2 avec le CD 40 au niveau de l'endosome induisait la phosphorylation et l'activation de Btk et son action sur TRIFF et MyD88. En plus de leur actions respectives sur NF- κ B et IRF-3, TRIFF et MyD88 vont inhiber l'ubiquitination des MCH2 par MARCH-1, empêchant sa dégradation par le réticulum endoplasmique et contribuant à la pérennisation de cette réponse aux TLRs (Liu et al., 2011 ; Ni Gabhann et al., 2011) (Figure 11). En effet, le rôle de cette protéine MARCH-1 dans la régulation des molécules CMH2 a été initialement démontré dans les cellules dendritiques. Il s'agit d'une ligase RING-CH ubiquitin E3 qui entraîne l'ubiquitination de la chaîne β de la molécule HLA-DR, son adressage dans le réticulum endoplasmique puis sa dégradation (Gassart et al., 2008). L'activation des voies TLRs de ces cellules dendritiques en réponse à différents PAMPs bactériens entraîne une diminution de l'expression de cette protéine MARCH-1 via la voie MyD88 et l'augmentation de l'expression de HLA DR (Walseng et al., 2010).

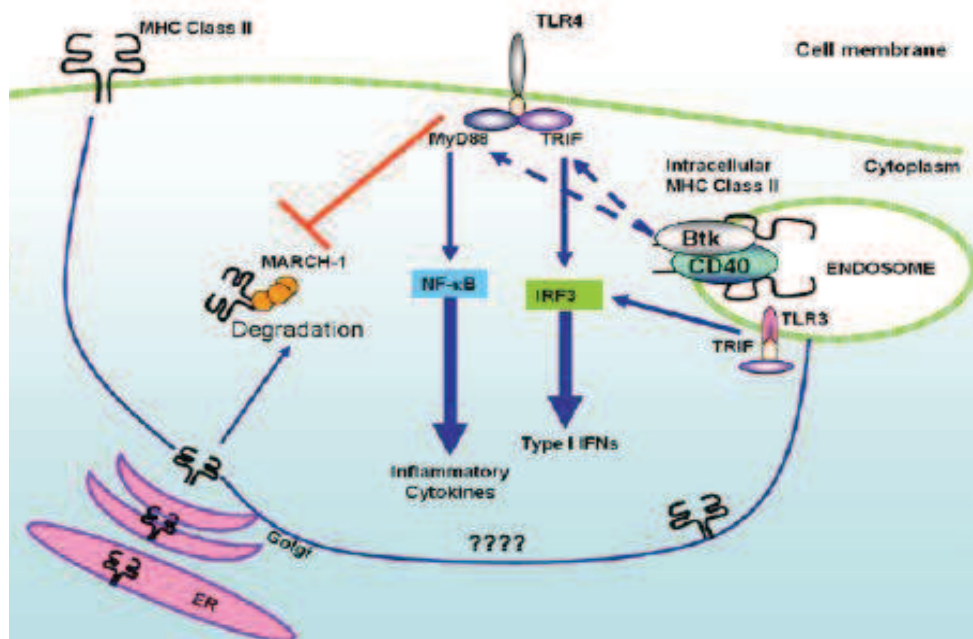


Figure 11 : Schéma représentant le rôle de la protéine Btk dans le contrôle des voies MyD88 et TRIF en réponse aux TLR3 et TLR4 ainsi que son interaction avec les molécules HLA2 et CD40 (Ni Gabhann et al., 2011).

Avec son rôle dans la réponse aux TLR2, TLR3 et TLR4, plusieurs études ont également montré l'importance de Btk dans la réponse au TLR8 (Sochorova et al., 2007 ; Doyle et al., 2007) et TLR9 (Hasan et al., 2008).

1.5 Autres rôles de Btk

En plus de son rôle central dans le contrôle des voies de signalisation du BCR et des TLRs, Btk intervient également dans d'autres systèmes de régulation.

Tout d'abord, il a été montré que Btk intervenait dans la voie de signalisation du récepteur FcγR des cellules myéloïdes dont notamment les polynucléaires neutrophiles et les macrophages : les macrophages de patients atteints d'XLA ont une expression de cytokines pro-inflammatoires diminuées en réponse aux immunoglobulines (Jongstra-Bilen et al., 2008). Dans le développement et la maturation de la lignée granuleuse, Btk interagit avec la voie de signalisation en réponse au GM-CSF (Fiedler et al., 2011).

Dans le mastocyte, Btk intervient à 2 niveaux. Il régule tout d'abord la voie du récepteur FcεRI en réponse à son ligand IgE ; la dégranulation des mastocytes de souris déficientes pour Btk est nettement diminuée en réponse aux IgE (Iyer et al., 2011).

Ceci serait lié à la diminution de l'activation du facteur de transcription NFAT par l'absence de Btk. Btk régule également la prolifération mastocytaire par interaction avec le récepteur c-Kit. Dans la mastocytose systémique, ce récepteur c-kit est activé de manière constitutionnelle et l'absence de Btk régule négativement cette voie de signalisation (Gleixner et al., 2011).

Enfin, Btk interviendrait dans la régulation de la différenciation des ostéoclastes. Une étude publiée en 2008 (Shinohara et al., 2008) a montré que l'absence de Btk entraînerait un défaut d'absorption osseuse et une ostéopétrose chez la souris déficiente pour Btk et Tec. En effet, l'activation du récepteur RANK situé à la surface cellulaire de l'ostéoclaste entraîne le recrutement et l'activation de Btk par phosphorylation permettant la synthèse de protéines de différenciation via l'activation de NFAT (figure 12).

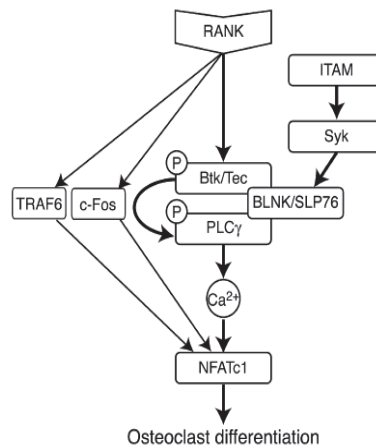


Figure 12 : Schéma montrant l'implication de Btk dans le contrôle de la différenciation ostéoclastique via la voie de signalisation du récepteur RANK (Shinohara et al., 2008).

2. Polyarthrite rhumatoïde et TNF- α

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un des modèles de maladies inflammatoires dont le rôle du TNF- α est le plus prépondérant. L'efficacité spectaculaire des agents anti-TNF- α dans le traitement des patients atteints de PR montre bien la place centrale de cette cytokine dans le processus physiopathologique de cette maladie. Compte tenu de son rôle dans le contrôle de l'expression de cytokines inflammatoires comme le TNF- α , Btk semble donc avoir une place dans ce modèle de pathologie.

2.1 Présentation de la polyarthrite rhumatoïde

2.1.1 Généralités :

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est considérée comme le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires (1% de la population mondiale). Elle se caractérise par une atteinte inflammatoire des synoviales articulaires et tendineuses, prédominante aux mains, aux pieds et aux genoux. Elle se définit comme un rhumatisme inflammatoire polyarticulaire, évoluant de façon chronique par poussées, pouvant entraîner des déformations et destructions articulaires. Elle peut être considérée comme une maladie systémique pouvant entraîner des manifestations extra-articulaires. Elle touche plus fréquemment les femmes (Sex ratio= 1:3) et débute le plus souvent entre 30 et 50 ans.

La PR peut débuter de façon insidieuse, progressive ou aigue. Les manifestations initiales sont le plus souvent des polyarthrites (au moins 4 articulation atteintes) symétriques, touchant les articulations des poignets, les doigts (métacarpophalangiennes (MCP), interphalangiennes proximales (IPP)) et des avant-pieds (métatarsophalangiennes (MTP)). L'inflammation articulaire se caractérise par un gonflement et une chaleur en regard des articulations atteintes. Elle s'accompagne d'une douleur d'horaire inflammatoire, prédominante en fin de nuit et en début de journée, accompagnée d'une raideur articulaire matinale prolongée appelée dérouillage matinal.

Au cours de l'évolution de la pathologie, qui se fait de façon progressive sur plusieurs années, le nombre d'articulations touchées augmente s'accompagnant d'une destruction du cartilage, de l'os et des structures périarticulaires (capsule, tendons). Ceci conduira aux déformations caractéristiques de la PR, très invalidantes. La maladie évolue par poussées inflammatoires, plus ou moins rapprochées selon les patients

2.1.2 *Terrains* (figure 13)

Plusieurs facteurs ont été incriminés dans l'étiopathogénie de la PR : facteurs génétiques, environnementaux, hormonaux et psychologiques contribuant à la réponse immunitaire innée et acquise.

La réaction auto-immune, qui se manifeste par la présence de facteurs rhumatoïdes et surtout d'anticorps anti-peptides citrullines (anti-CCP), précède parfois de plusieurs années l'apparition des manifestations cliniques. On parle alors de phase pré-articulaire. Les mécanismes impliqués dans cette rupture de la tolérance immune des lymphocytes B (LB) et des lymphocytes T (LT) ne sont pas identifiés. Ils résultent probablement d'anomalies de la sélection thymique ou de la tolérance périphérique.

Des facteurs environnementaux, tels les microorganismes, le stress et surtout le tabac associés à des facteurs génétiques ont été identifiés comme élément déclencheur mais également pronostic sur la gravité de la maladie. Parmi les facteurs génétiques, des loci de susceptibilité ont été identifiés. Les antigènes HLA ont été les premiers facteurs de susceptibilité décrits dans la PR comme l'association avec des allèles HLADRB1(0405) et DRB1 (0404).

D'autres loci incluant les gènes codant la protéine tyrosine phosphatase non réceptrice type 22 (PTPN22), la peptidyl arginase deiminase de type IV (PADI4), Notch4, la tenascine XB (Tamiya et al., 2005), CTLA-4, les récepteurs du fragment Fc des IgG (RFc γ), de nombreuses cytokines (TNF- α , IL-1, IL-10, IL-21) ou leurs récepteurs, ont été également associés à des degrés divers au déclenchement et à la sévérité de la maladie.

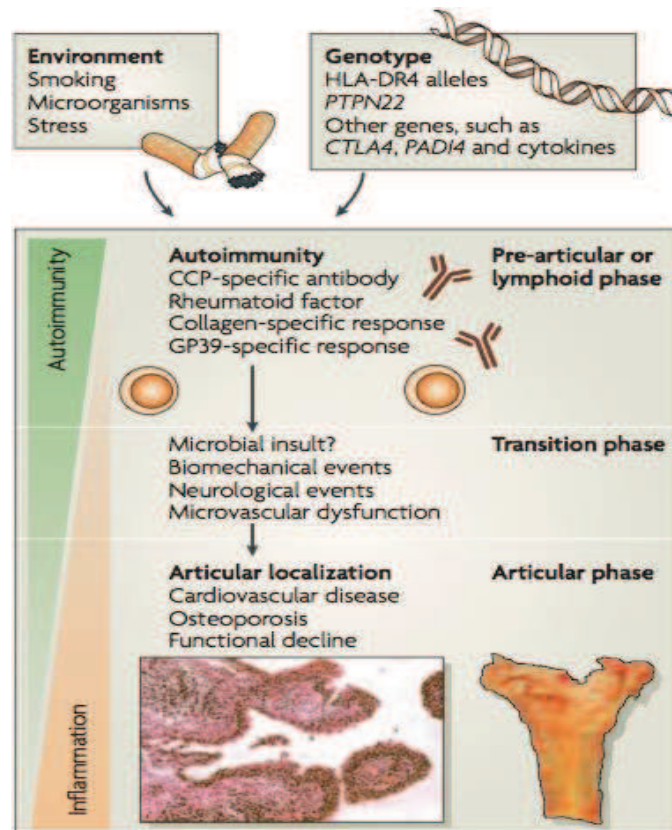


Figure 13 : Schéma représentatif du rôle du terrain environnemental et génétique dans le déclenchement des différentes phases de la PR (McInnes et al., 2007)

2.1.3 Physiopathologie

Sur ce terrain particulier, certains facteurs vont alors initier la réponse au niveau articulaire et déclencher la phase clinique de la maladie. Des facteurs microbiens pourraient jouer un rôle important. La cavité synoviale va alors être le siège d'une réaction inflammatoire excessive qui touche plus particulièrement la membrane synoviale.

La membrane synoviale est constituée de macrophages (synoviocytes de type A) et de fibroblastes (fibroblast-like synoviocyte (FLS) ou synoviocytes de type B) est habituellement pauci cellulaire avec une couche bordante (intimale) composée de 1 à 2 couches de cellules. Au cours de la PR, elle devient hyperplasique : la couche bordante s'épaissit pour comprendre 4 à 10 couches de cellules, parfois même plus de 20.

La membrane synoviale rhumatoïde est le siège d'une inflammation chronique caractérisée par une infiltration cellulaire où prédominent les macrophages, les LB et les LT. On trouve également des cellules dendritiques (CD), des mastocytes et des plasmocytes (pannus rhumatoïde). Dans la moitié des cas, les LT, les LB, les macrophages et les CD sont présents

en infiltrats diffus sans structure spécifique (Takemura et al., 2001). Dans l'autre moitié, les LT et LB infiltrés peuvent s'organiser en microstructures de deux types qui s'excluent mutuellement :

- en follicules secondaires avec un centre germinatif caractérisé par une prolifération cellulaire avec présence d'un réseau de CD folliculaires (CDF) en agrégats de LT et LB sans centre germinatif et sans CDF.

Dans les deux cas, on observe la présence de plasmocytes qui s'accumulent sous la couche bordante.

Actuellement, la pathogénie de la PR au niveau articulaire comporte 3 phases, qui ne sont pas mutuellement exclusives : la phase d'initiation, la phase chronique et la phase de destruction (Figure 14).

a) *La phase d'initiation* : dans ce contexte de prédisposition génétique, l'initiation de la PR a été longtemps considérée comme résultant d'une immunisation contre un auto-antigène spécifique qui en réalité n'a jamais été identifié. Il est probable que cette initiation dépende essentiellement d'une activation locale de la membrane synoviale par les cellules de l'immunité innée qui résident dans l'articulation telles les CD, les macrophages et les FLS (Zvaifler et al, 2006).

Cette activation pourrait être la conséquence de la présence d'agents microbiens ubiquistes responsables de bactériémies intra-articulaires. Ces germes peuvent libérer des PAMPs qui vont alors activer ces cellules de l'immunité innée via les TLRs. Par ailleurs, la réaction inflammatoire résultant de cette activation va entraîner la libération de DAMPs ou damage-associated molecular patterns et entretenir ce mécanisme.

b) *La pérennisation de la synovite rhumatoïde* : c'est la conséquence de la migration des LT et LB au niveau de la membrane synoviale entretenant cette réaction immunitaire intra articulaire (Firestein et al, 2003). Si on a longtemps attribué aux LT un rôle central dans l'étiopathologie de la phase chronique de la PR, il semble qu'aujourd'hui un rôle prépondérant puisse être attribué aux LB à l'origine de la synthèse de nombreux auto-anticorps dont certains sont spécifiques de la PR, comme les anti-peptides citrullinés. Les LB peuvent aussi agir comme des cellules présentatrices d'antigène aux LT.

c) *La phase de destruction* : différents systèmes sont impliqués dans ce phénomène dont le système RANK/RANK-ligand entraînant la libération de nombreuses métalloprotéases détruisant le cartilage et la matrice osseuse.

La phase de destruction est essentiellement médiée par les ostéoclastes et des effecteurs, tels des protéases libérés par les FLS et les macrophages, permettant l'acquisition par ces ostéoclastes d'un phénotype agressif.

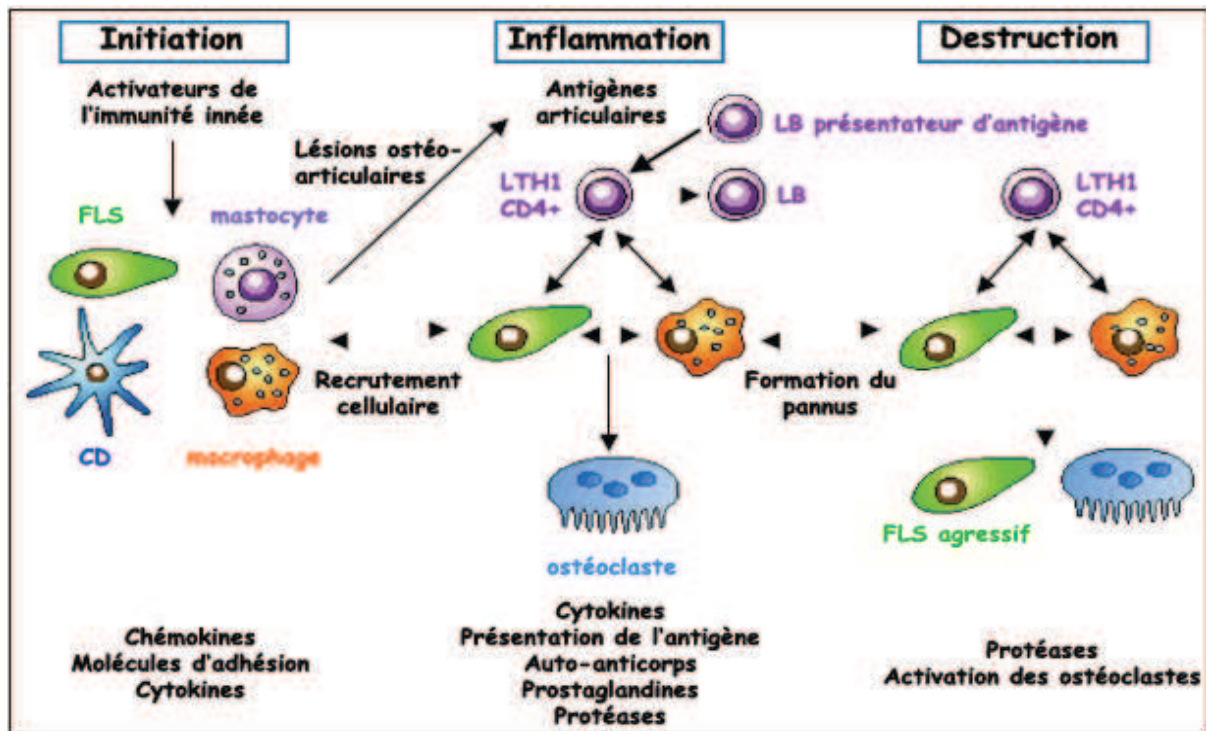


Figure 14: Schéma représentant les 3 phases physiopathologiques de la PR (Firestein et al., 2003).

2.2 Principaux acteurs cellulaires de la PR

Plusieurs cellules interviennent dans la réaction inflammatoire de la PR. Il s'agit principalement des cellules résidentes de la membrane synoviale, les FLS qui ne sont pas des acteurs classiques de la réponse inflammatoire et auto-immune. En effet, activés de façon intrinsèque ou extrinsèque par l'environnement rhumatoïde, ils jouent un rôle essentiel dans la pathogénie de la PR. D'autres cellules, dont notamment les macrophages, jouent également un rôle clé dans cette physiopathologie.

2.2.1 Les fibroblast-like synoviocytes ou FLS ou synoviocytes de type B

Ces cellules se définissent comme dérivant de précurseurs mésenchymateux qui sont ensuite renouvelés par divisions au sein de la membrane synoviale. La fonction essentielle de ces cellules est d'approvisionner la cavité synoviale en protéines nutritives et lubrifiantes tel l'acide hyaluronique.

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

Les FLS de PR possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles les distinguant des FLS de patients atteints d'arthrose et des FLS de personnes saines. Ces cellules acquièrent un phénotype agressif, résultante des interactions entre les récepteurs TLRs et les PAMPs ou les DAMPs. Les cytokines présentes au niveau synovial ainsi que les contacts cellules/cellules vont également participer à l'activation des FLS.

Les FLS sont présents aux trois phases de la maladie et plusieurs travaux ont démontré le rôle prépondérant joué par ces FLS dans les différentes phases de la maladie :

- ils sont tout d'abord responsables de l'hyperplasie synoviale ce qui est un phénomène unique dans une maladie auto-immune. En effet, dans la plupart de ces maladies, la cellule résidente est une cible qui sera détruite alors que dans la PR les FLS prolifèrent.

Ils présentent deux particularités : ils prolifèrent et meurent peu. Leur capacité de survie anormale s'explique par un défaut d'apoptose lié à une sécrétion anormale de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, FLICE-inhibitoryprotein, SUMO-1 ou sentrin) et/ou des anomalies des gènes régulateurs de l'apoptose dont PTEN et P53.

PTEN est une phosphatase capable d'inhiber la voie anti-apoptotique contrôlée par la PI(3) kinase et Akt (Waite et al., 2002). Elle n'est exprimée que dans 40% des FLS rhumatoïdes *in vitro* et n'est pas exprimée dans les FLS rhumatoïdes envahissant le cartilage dans le modèle de la souris SCID. La voie de la PI3 kinase et Akt semble jouer un rôle important dans la survie des FLS et il a été montré que Akt est fortement exprimée par les FLS rhumatoïdes, et que le TNF- α augmente l'activité kinase de Akt (Zhang et al., 2001)

Enfin l'absence ou une altération de la fonction de p53 et de son effecteur pro-apoptotique, le p53-upregulated modulator of apoptosis, PUMA ont été observées chez des patients atteints de PR (Cha et al., 2006).

- Ils produisent également des facteurs pro-angiogéniques comme l'EGF, le FGF, le PDGF, le VEGF, l'angiogénine, l'angiopoïétine-1.

- ils collaborent avec les LT et les LB notamment par la sécrétion de cytokines comme BAFF

- ils ont un rôle clé dans la destruction ostéo-articulaire car ils sont capables de se fixer sur le cartilage par l'intermédiaire de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, CD44), d'intégrines et par l'ostéopontine et de libérer de grandes quantités de métalloprotéases (MMP 1, 2, 3, 8, 9, 10, 13) et de cathepsines. Les FLS participent aussi à la différenciation et à l'activation des ostéoclastes par la voie RANK - RANK-ligand, et par la libération de PGE-2 et d'IL-6 (Tolboom et al., 2002 ; Harashima et al., 2004).

- Enfin, ils exercent, à l'instar des autres cellules innées ou adaptatives, une activité pro-inflammatoire, essentiellement par la synthèse de cytokines telles l'IL-6, l'IL-7, l'IL-15, par la sécrétion de chémokines (CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, GRO- α), de prostanoïdes et de NO (Harada et al., 1999 ; Hirth et al., 2002).

Par contre, les FLS ne sécrètent pas ou en quantité très faible du TNF- α , de l'IL-1 ou de l'IL-18 qui sont des cytokines majeures produites au cours de la PR. Des travaux antérieurs avaient permis de montrer que différents PAMPs activateur des TLR (comme le LPS) et de la voie des intégrines (comme protéine I/II d'origine streptococcique) sont capable d'induire la synthèse de l'ARNm de certaines de ces cytokines par des les FLS rhumatoïdes (Neff et al., 2001 et 2003). Cependant ces cellules sont incapables de produire de TNF- α ou d'IL-18 mature quelque soit le stimulus (Zeisel et al., 2004 et 2005). Il ne s'agit pas d'un défaut de sécrétion ni de maturation mais un phénomène d'instabilité de l'ARN messager

2.2.2 *Les cellules de l'immunité innée*

Plusieurs variétés de cellules effectrices de l'immunité innée sont présentes dans la membrane synoviale dont notamment les macrophages et les mastocytes alors que les polynucléaires neutrophiles résident principalement dans le liquide synoviale.

Les macrophages sont les principales cellules effectrices dans la membrane synoviale. Leur croissance est stimulée par la présence importante dans la membrane synoviale de facteurs de croissance granulocytaire et macrophagique comme le GM-CSF provenant directement de la moelle osseuse (Cornish et al. 2009). Par ailleurs, il a été démontré que l'efficacité des traitements dans la PR est directement corrélée à la réduction de l'infiltration macrophagique de la synoviale (Haringmann et al., 2005). Le phénotype macrophagique prédominant dans la synoviale est celui de type M1 ; en effet ces macrophages sécrètent principalement des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , IL-1, -6, -12, -15, -18 et -23 ainsi que des dérivés hyper oxygénés et nitriques comme le NO (McInnes et al., 2011). Leur activation dépend essentiellement du système des récepteurs TLRs (TLR4, 3, 2, 6 et 8) et NLR présents à leur surface ou au niveau cytoplasmique. D'autres systèmes secondaires d'activation vont également intervenir comme celui des cytokines, des interactions cellules-cellules, des particules lipoprotéiques et des protéases telles PAR-2 (protease-activated receptor2) (Liew et al., 2002).

Le mastocyte a également un rôle prépondérant dans cette physiopathologie. Des travaux chez la souris ont montré que dans un modèle d'arthrite induit par le collagène, les souris déficientes pour les mastocytes ne développent pas d'arthrite. Par la synthèse de TNF- α et d'IL-6, les mastocytes activeraient les macrophages entraînant la synthèse de nouvelles cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, la sécrétion de tryptase et de complexes tryptase-héparine par les mastocytes permettrait l'activation des FLS par l'intermédiaire des récepteurs PAR-2. Cette activation entraînerait la sécrétion de nombreux facteurs chimiotactiques recrutant des polynucléaires neutrophiles et participerait à l'inhibition de la voie de l'apoptose médiée par Fas/FasL, contribuant à l'hyperplasie synoviale. Les mastocytes seraient la principale source de production d'IL-17 et d'autres cytokines intervenant dans le phénotype TH17 des lymphocytes T. Enfin, le récepteur Fc ϵ RI présent sur les mastocytes aurait une affinité très élevée au couple IgE/Ag anti-CCP ; les patients atteints d'une PR avec Ac anti-CCP positif présenteraient des mastocytes plus actifs que ceux avec une PR sans Ac anti-CCP

2.2.3 Les cellules de l'immunité adaptative

L'efficacité de certains traitements dans la PR ciblant spécifiquement soit le lymphocyte T soit le lymphocyte B montre bien l'importance du rôle de ces cellules.

Pour le lymphocyte T, il s'agit de l'efficacité du traitement par agent agoniste du CTLA-4 (Abatacept) qui majore l'inhibition de la coopération entre cellules présentatrices d'antigène et lymphocyte T, diminuant l'activation de celui-ci. En effet, le lymphocyte T intervient à plusieurs niveaux : au niveau de la réponse TH1 en régulant l'activation macrophagique, au niveau de la réponse TH17 en synthétisant les interleukines de la famille IL-17 mais également le TNF- α , et au niveau de la réponse T régulatrice. La co-sécrétion d'IL-17 et de TNF- α permet notamment l'activation des FLS et l'inhibition des lymphocytes T régulateurs (Genovese et al., 2012).

Pour le lymphocyte B, il s'agit de l'efficacité du Rituximab, un anticorps anti-CD20 ciblant les lymphocytes B. L'activation des lymphocytes B est en partie médiée par la synthèse de d'APRIL et BLYS notamment par les FLS. Il intervient dans la synthèse des auto-anticorps, des cytokines pro-inflammatoires et dans la coopération avec les lymphocytes T en tant que cellule présentatrice d'antigène.

La complexité de la physiopathologie de la PR réside dans cette coopération entre ces différents cellulaires : le lymphocyte B, le lymphocyte T, les cellules de l'immunité innée comme le macrophage et le mastocyte, et le FLS (Figure 15).

2.3 Rôle prépondérant du TNF- α dans la PR

La production cytokinique par les cellules présentes dans la membrane synoviale joue un rôle central dans la pathogénie de la PR. Certaines d'entre elles vont voir leur profil d'expression évoluer en fonction du stade de la PR comme les interleukines 4, 13 et 15 (Raza et al, 2005). D'autres cytokines vont avoir une expression directement corrélée à l'intensité de la réponse inflammatoire, comme l'IL-6 et surtout le TNF- α . L'efficacité spectaculaire des agents bloquants le TNF- α dans le traitement de la PR montre bien la place majeure de cette cytokine.

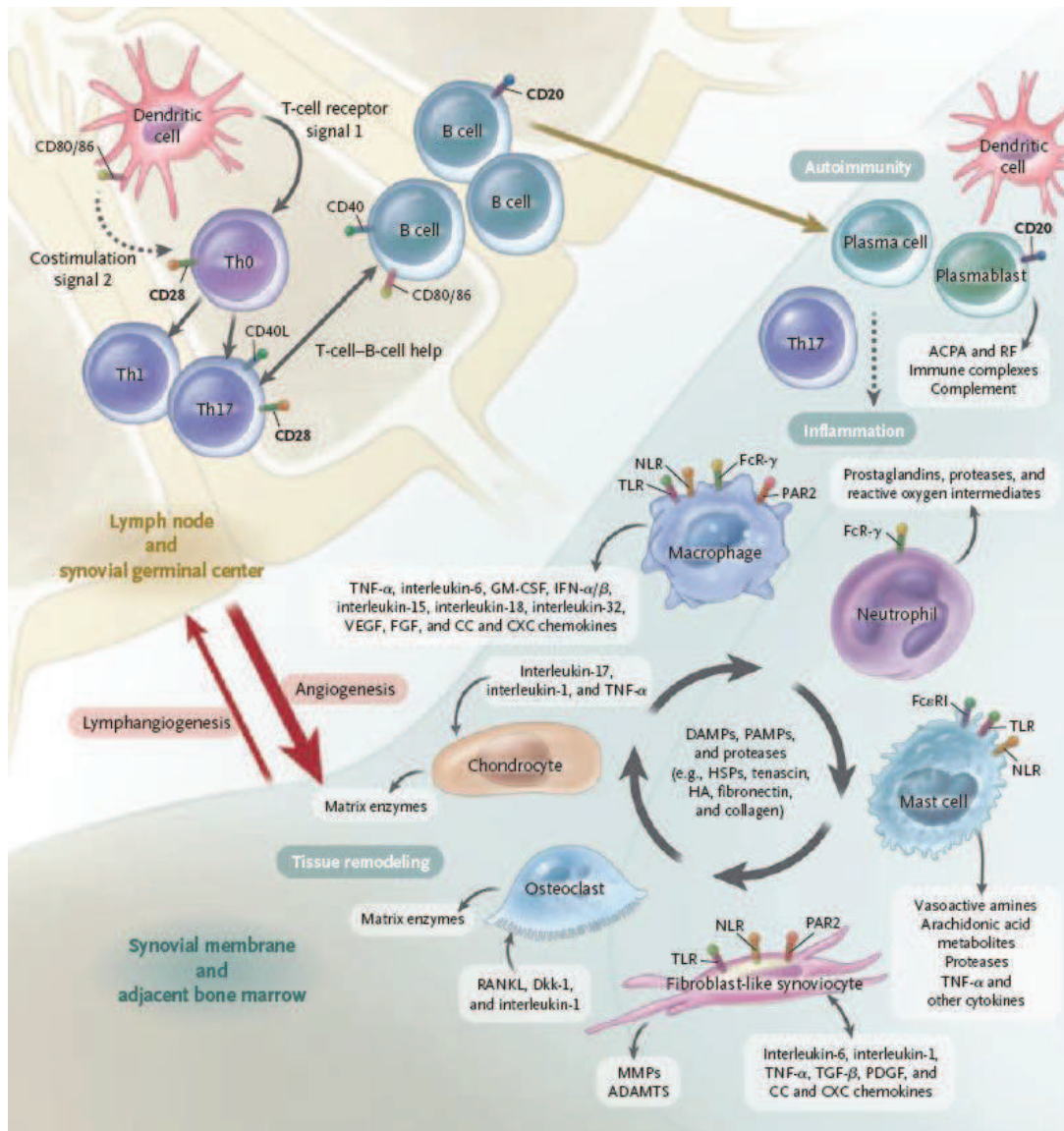


Figure 15 : Schéma représentant les différents acteurs cellulaires dans la physiopathologie de la PR ainsi que leur rôle respectif dans la pérennisation de la réponse inflammatoire (McInnes et al., 2011)

2.3.1 Le TNF- α : son expression et son rôle

Le TNF- α fait partie de la super famille du TNF comportant une vingtaine de cytokines dont les principales comportent des similitudes structurales et fonctionnelles entre elles. Il s'agit, avec le TNF- α , des lymphotoxines α et β , les ligands de CD40, de CD27, de CD30, de Fas, de 4-1BB et d'OX40 ainsi que le TNF-related apoptosis inducing ligand ou TRAIL.

Toutes ces molécules forment des homo ou hétéro trimères qui seront reconnus par leurs récepteurs spécifiques. Ils interviennent de manière plus ou moins spécifique dans l'inflammation, la prolifération et l'apoptose cellulaire (McInnes et al, 2007).

Le gène du TNF- α est situé sur le chromosome 6 au niveau de la région 6p21.3 et comporte 4 exons. Son ARNm est composé de 1669 paires de bases et possède une séquence AU rich-element ou ARE dans sa région 3'UTR.

Au niveau protéique, le TNF- α est d'abord synthétisé sous forme d'une protéine primaire transmembranaire 216 acides aminées, stable sous une forme trimérisée de 51 kD. Ce TNF- α primaire sera clivé par une métalloprotéase ADAM17 ou TACE (TNF- α Converting Enzyme) en une forme soluble de 17 kD, le TNF- α mature. Les deux formes de TNF- α , membranaires et solubles, possèdent une activité biologique.

Plusieurs niveaux de régulation de la synthèse du TNF- α ont été identifiés, que ce soit au niveau de la transcription ou au niveau extracellulaire par la production de formes solubles du récepteur. Au niveau de la régulation post-transcriptionnelle, des protéines RBP formant un complexe mRNP en 3' UTR ont été identifiés. La protéine en doigt de Zinc *TTP* ou *Tristetraprolin* (Carballo et al., 1998 ; Fairhurst et al., 2003 ; Brooks et al., 2004) semble être fortement impliquée dans la destruction de l'ARNm du TNF- α . Par ailleurs, d'autres travaux (Tili et al, 2007) ont montré l'importance de miR-125b dans la régulation du TNF- α de cellules telles les macrophages ou certaines cellules cancéreuses ; la sous-expression du miR-125b en réponse au LPS semble être corrélée à la surexpression de TNF- α dans ces cellules.

Le TNF- α pourra être reconnu et interagir avec 2 récepteurs, le TNF récepteur de type 1 (TNF-R1) et de type 2 (TNF-R2). Le TNF-R1 est exprimé de manière ubiquitaire par les cellules et peut être activé par l'intermédiaire de la forme soluble et membranaire du TNF- α . Le TNF-R2, quant à lui, n'est exprimé que par les cellules immunitaires et ne sera activé que par la forme membranaire. La fixation du trimère de TNF- α , soluble ou membranaire, sur son récepteur va permettre un changement conformationnel de celui-ci, libérant la protéine cytoplasmique inhibitrice SODD et entraînant le recrutement de la protéine activatrice TRADD.

L'interaction entre TRADD et le TNF-R par l'intermédiaire de son domaine de mort (ou death domain) pourra entraîner l'activation de trois voies de signalisation (figure 16) :

- la voie NF- κ B : TRADD va recruter les protéines RIP et TRAF2. TRAF2 va interagir avec la protéine kinase I κ k et RIP va l'activer. L'activation d'I κ k va permettre la levée d'inhibition d'I κ B α sur NF- κ B et entraîner notamment la transcription de cytokines pro-inflammatoires.
- la voie des MAPK : parmi les 3 principales cascades enzymatiques des MAPK, le TNF- α aura une action principalement sur la voie JNK et dans une moindre mesure sur la voie p38MAPK et ERK. Le complexe RIP/TRAF2 va permettre le recrutement de la protéine ASK1 et sa phosphorylation, elle-même phosphorylant la protéine MKK4 et 7, entraînant l'activation de JNK1 et 2. Ceci aura comme conséquence principalement de réguler la transcription de gènes anti-apoptotique et prolifératif.
- La voie de mort cellulaire ou apoptose : bien que le rôle du TNF- α dans le contrôle de l'apoptose soit mineur comparé à celui de TRAIL ou de Fas, l'activation du TNF-R va permettre le recrutement de la protéine FADD transformant la pro-caspase 8 en caspase 8 activée. Cette protéine va pouvoir activer la caspase 3 mais également la protéine Bid régulant l'apoptose mitochondriale.

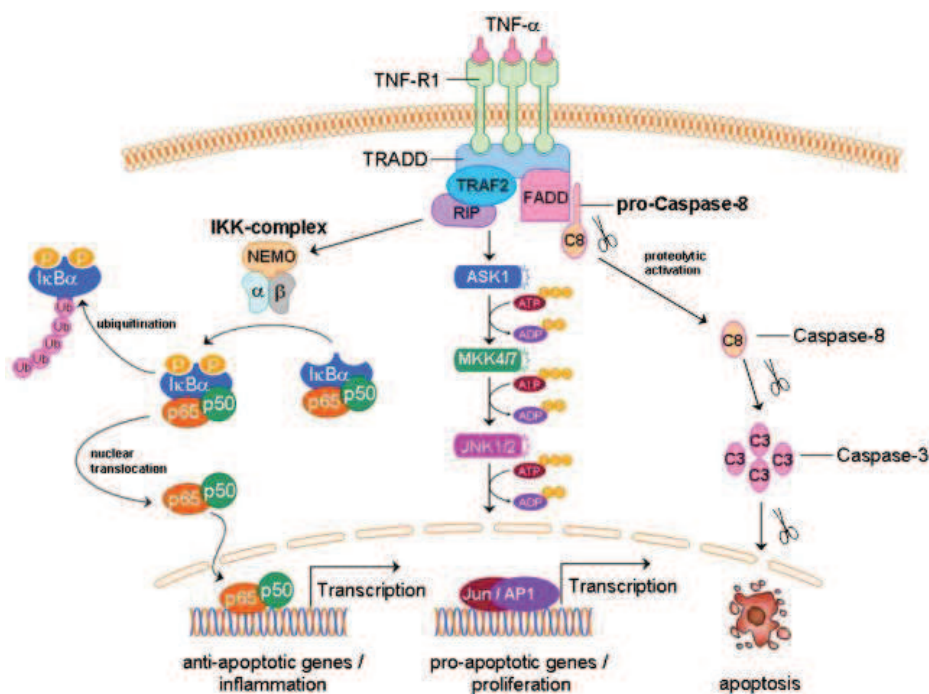


Figure 16 : Schéma représentatif du rôle du TNF- α dans le contrôle de certaines voies de signalisation intracellulaire (Liedkte et al, 2011).

2.3.2 Le TNF- α dans la PR

Le TNF- α a une place primordiale dans la pathogénie de la PR (Feldmann et al, 1996) (Figure 17). En effet, dans la majorité des biopsies synoviales faites chez les patients atteints de PR, le TNF- α est présent en quantité importante. D'autre part, les souris déficientes pour le TNF- α ne développent pas d'arthrite érosive dans les modèles d'arthrite induit au collagène alors que la surexpression de TNF- α chez ces mêmes souris induit une arthrite érosive très précoce (Keffer et al., 1991).

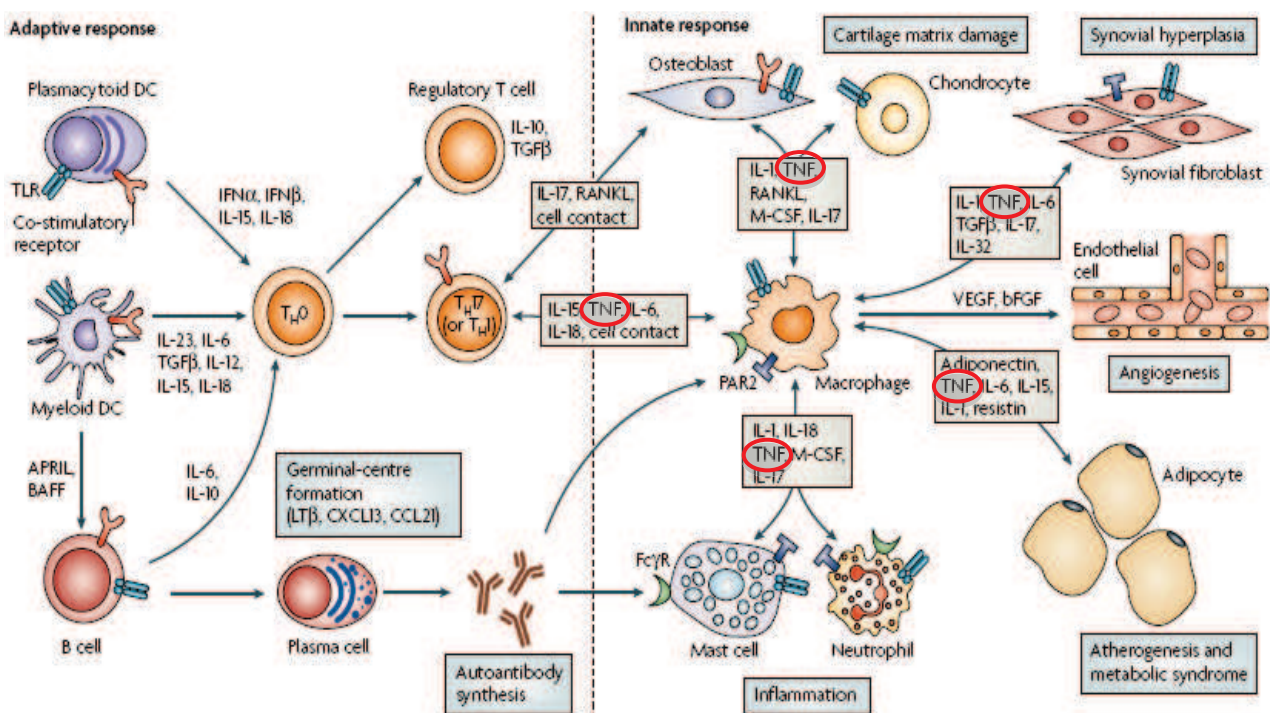


Figure 17 : Schéma physiopathologique représentant le rôle des cytokines dans la PR et notamment la place centrale du TNF- α (McInnes et al, 2007)

Chez les patients traités par anti-TNF- α , on observe une diminution importante de l'IL-6 et d'autres protéines inflammatoires, une inhibition du recrutement des leucocytes, une diminution de l'activation des cellules endothéliales et la restauration de l'activité des lymphocytes T régulateurs (Ehrenstein et al., 2004).

2.4 *Btk*, *TNF- α* et PR

Compte tenu du rôle majeur de Btk dans les voies de signalisation des principales cellules impliquées dans la PR telles que le lymphocyte B, le mastocyte, le PMN et le macrophage, son importance dans ce processus physiopathologique paraît évident. Effet, plusieurs études ont montré que l'inhibition de Btk permettait une diminution de l'expression de protéines inflammatoires dans des modèles murins d'arthrite. Di Paolo et al. (2011) ont utilisé un inhibiteur spécifique et réversible de Btk, le CGI1746, dans un modèle murin d'arthrite induit par le collagène. Il a été montré une inhibition de prolifération des lymphocytes B avec une diminution de production d'auto anticorps ainsi que la diminution de synthèse de cytokines comme le $TNF-\alpha$, l'IL-1 et l'IL-6 dans les macrophages par abolition de la réponse au récepteur $Fc\gamma R$. Chang B. et al. (2011) ont confirmé ces résultats avec un autre inhibiteur spécifique mais irréversible, le PCI-32765, dans le même modèle murin. Ils ont montré que l'efficacité de cet inhibiteur reposait d'avantage sur son rôle d'inhibition de Btk dans les macrophages et les mastocytes que sur son rôle au niveau du lymphocyte B (Figure 18).

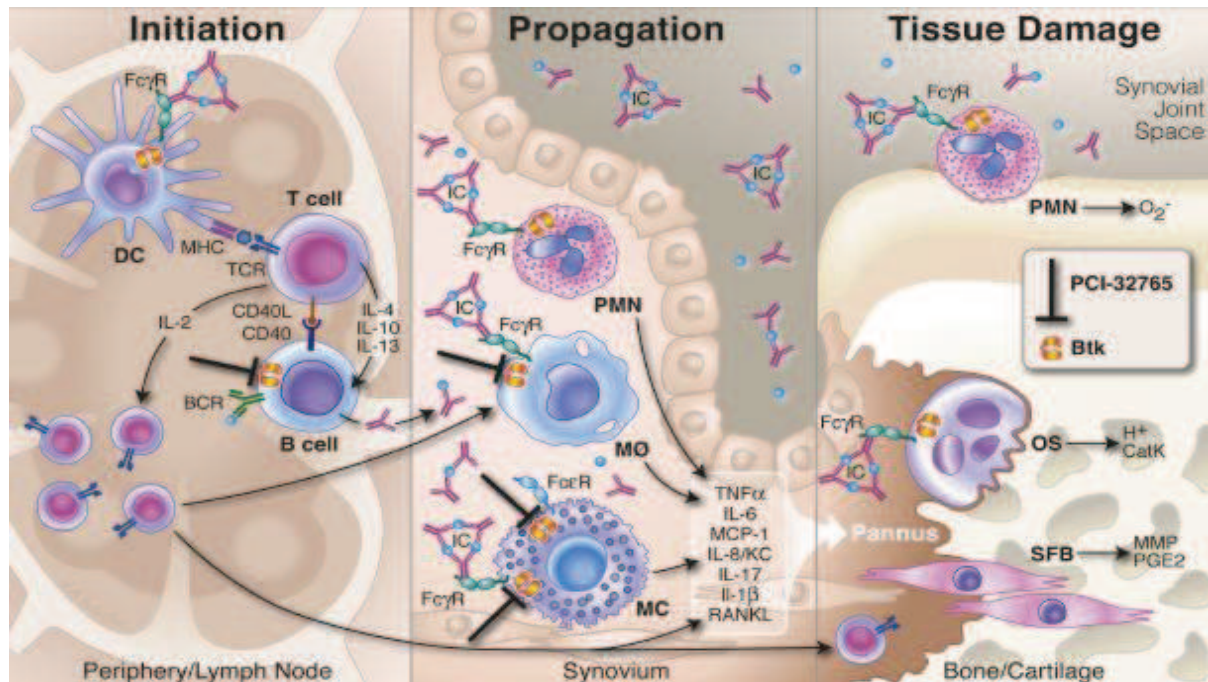


Figure 18 : Schéma montrant l'importance de Btk et de son inhibition par le PCI-32765 dans les processus physiopathologiques de la PR (Chang B. et al., 2011).

Cependant, le rôle de Btk dans le contrôle de la réponse inflammatoire de la PR via la voie des TLRs est encore inconnu. Horwood et al. (2003 et 2006) ont montré que Btk contrôle la production de TNF- α dans les macrophages par l'intermédiaire de Mal en réponse au TLR4 et au LPS. Par contre, ce contrôle ne s'expliquerait pas seulement par la modulation de l'expression de NF- κ B. Btk interviendrait également au niveau de la stabilité de l'ARNm du TNF- α par un mécanisme jusqu'alors inconnu. Nous nous sommes donc intéressés aux différents mécanismes de régulation post-transcriptionnelle pouvant intervenir dans ce contrôle dont notamment les microRNAs et les protéines RBP.

3. Mécanismes de régulation post-transcriptionnelle par dégradation de l'ARN messager

La dégradation d'un ARNm est un mécanisme qui permet à toute cellule d'exercer un contrôle au niveau post-transcriptionnel (Mata et al., 2005). Médiée par la présence de nucléases, la régulation de cette dégradation va faire intervenir certains complexes comportant soit des protéines, soit des ARN non codants. La stabilité des ARNm dépendra de ces complexes. Les micro-RNA ainsi que les protéines RBP jouent un rôle particulièrement important dans ce phénomène.

3.1 Stabilité et dégradation de l'ARNm :

Un ARNm possède des structures qui régulent sa stabilité notamment la coiffe en 5' et la queue poly (A) en 3'. Ces deux éléments protègent les transcrits des exonucléases et initient la traduction en interagissant avec les protéines eIF4E et poly (A)-binding protein (PABP). La dégradation d'un ARNm nécessite l'élimination de l'un de ces deux déterminants stabilisants afin de rendre possible une attaque exonucléolytique. Chez les eucaryotes, la dégradation est essentiellement initiée par élimination de la queue poly (A) en 3'. L'extrémité 3' non protégée est ensuite fragmentée par un complexe d'exonucléases ou exosome. Le clivage de la queue poly (A) peut aussi être suivi d'un enlèvement de la coiffe («decapping») qui permet dès lors une dégradation de 5' en 3' de l'ARNm par l'exoribonucléase XRN1. Pour certains ARNm, la dégradation est initiée par une élimination de la coiffe qui est indépendante de la désadénylation, tandis que pour d'autres ARNm le clivage est assuré par des endonucléases (PMR1, IRE1 par exemple). Ce clivage est suivi de l'élimination des fragments par des exonucléases. Ceci constitue probablement la voie de dégradation la plus efficace. (Garneau et al., 2007) (figure19).

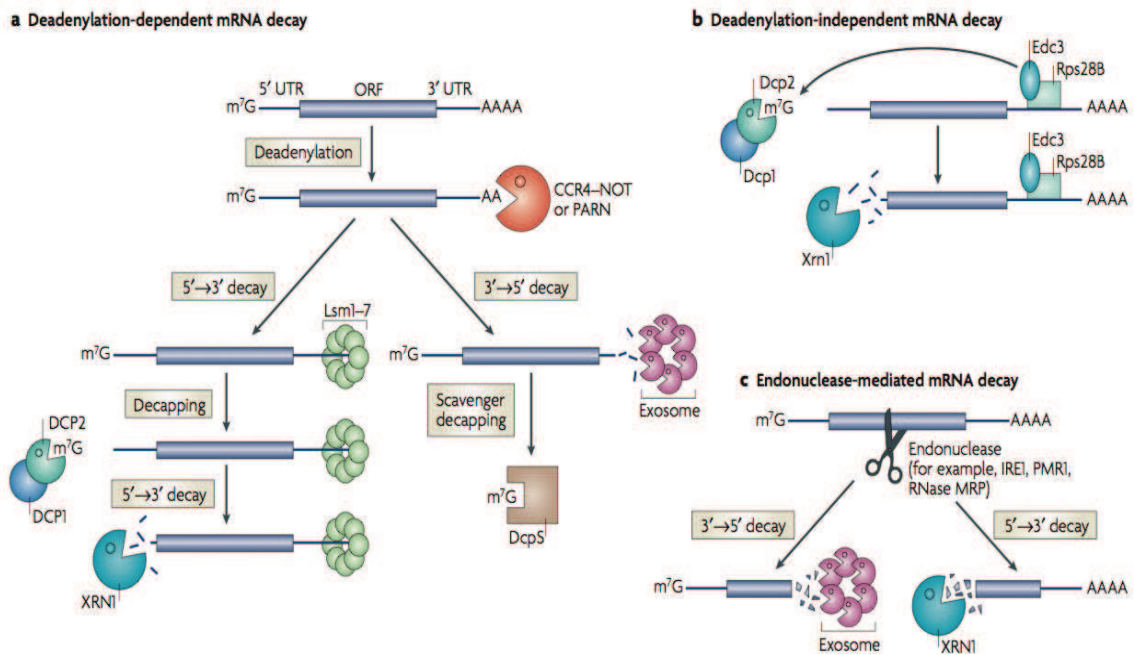


Figure 19 : Schéma représentant les différents mécanismes de dégradation de l'ARNm par les nucléases (Garneau et al, 2007).

Il existe des facteurs stabilisants ou déstabilisants l'ARNm :

- les mRNP (messenger ribonucleoprotein), qui sont des complexes constitués d'ARNm et de protéines RBP (RNA-binding proteins), qui sont étroitement liés (Jing et al., 2005).
- les petits ARN dits régulateurs (« small regulatory RNA ») comprenant les siRNA (small interfering RNA), les miARNs (microARN), les piRNA (Piwi-interacting RNA), les rasiRNA (repeat-associated siRNA) (Collins et al., 2006).

Des études par microarray ont révélé que 40 à 50% des modifications de l'expression de gènes transcrits suite à des stimuli cellulaires, seraient dus à des variations de la stabilité des ARNm correspondants.

3.2 Les complexes mRNP

3.2.1 **Généralités :**

La modulation de la stabilité des ARNm est généralement induite par des altérations de la composition des mRNP qui soit favorisent soit défavorisent la dégradation de l'ARNm concerné.

Les structures reconnues par les protéines RBP et qui jouent un rôle dans la stabilité d'un ARNm, sont localisées essentiellement dans la région 3'UTR, plus rarement dans les régions 5'UTR et codantes (Garneau et al., 2007). Parmi elles, les «AU-rich elements» (ARE) de la région 3'UTR, interagissent avec des protéines ARE binding. Ceci permet de réguler le transport, le taux de dégradation et l'efficacité de traduction d'un grand nombre d'ARNm à demi-vie limitée comme ceux des cytokines, des proto-oncogènes ou encore des facteurs de transcription. Ce sont les séquences les plus importantes agissant en cis sur la stabilité de l'ARNm. Plusieurs classes de séquences ARE sont connues : bien que parmi elles, il n'y ait pas deux séquences identiques, on considère que le pentamère AUUUA, plus ou moins souvent répété, est la base commune entre les différentes classes. Cependant, les régions flanquantes des ARE influencent grandement l'effet que peuvent avoir ces derniers. Ainsi dans le cas de l'ARNm du TNF- α , l'efficacité de la séquence ARE dans la région 3'UTR de son ARNm peut être majorée par la présence d'un élément constitutif de dégradation CDE (constitutive decay element) placé en aval (Stoecklin et al., 2003). De même, des séquences adjacentes riches en UG modifient les fonctions des séquences ARE.

De nombreuses protéines se liant aux séquences ARE ont été identifiées : le « AU-rich binding factor-1 » (AUF1), la tristétraproline (TTP), la « KH splicing regulatory protein » (KSRP) ou encore la « RNA helicase associated with AU-rich element » (RHAU). Leur mode de fonctionnement n'a été déterminé que récemment: elles permettent le recrutement de molécules impliquées dans la dégradation de l'ARNm. Dans certains cas, la séquence ARE interagit directement avec l'exosome. Dans d'autres cas, AUF1, KSRP, RHAU et TTP peuvent interagir directement ou indirectement avec des éléments clés des différentes voies de dégradation. C'est ainsi que AUF1 interagit avec l'exosome tandis que KSRP et RHAU se lient à la « poly (A)-specific ribonuclease » (PARN) et à l'exosome, ce qui entraîne une dégradation accrue de l'ARNm cible.

Les séquences ARE pouvant être aussi bien stabilisantes que déstabilisantes, le mécanisme d'action des protéines stabilisatrices qui se lient à l'ARNm n'est pas clairement défini. Elles pourraient tout simplement dévier l'ARNm des sites de dégradation ou bien entrer en compétition avec les facteurs déstabilisants. Elles pourraient aussi interagir directement ou indirectement avec la machinerie de dégradation pour l'empêcher de remplir son rôle. Le facteur stabilisant HuR par exemple, entre en compétition avec AUF1, KSRP et TTP (Wilkie et al., 2003). Le rôle de ces protéines RBP dans la synthèse de l'IL-2 par le lymphocyte T montre bien cette dualité entre stabilisation et dégradation : en fonction du type de stimulation (TCR +/- CD28), il y aura un recrutement de protéines soit stabilisatrice sur l'ARNm d'IL-2 telles TTP, AUF-1, soit déstabilisatrices telles YB-1 ou Nucleolin (Seko et al., 2006) (Figure 20).

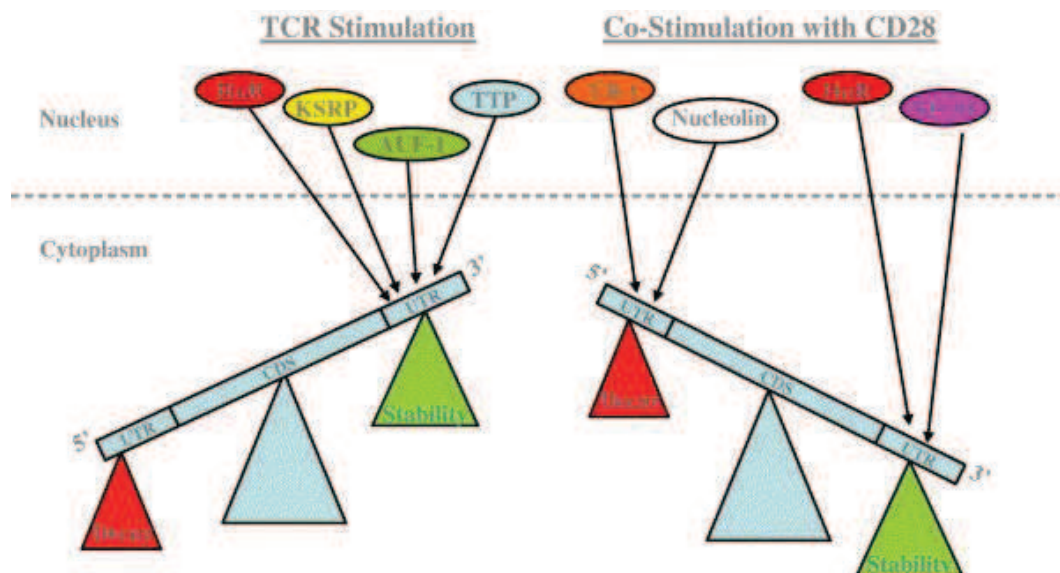


Figure 20 : Schéma montrant l'exemple de l'action des complexes mRNP sur la stabilité de l'ARNm de l'IL-2 en fonction du stimulus (Seko et al., 2006).

3.2.2 Tristétraproline et TNF- α

La tristétraproline est une des protéines RBP les plus connues. Elle appartient à la famille des protéines à doigt de Zinc CCCH dont il existe 3 membres en plus de la TTP, ZFP36L1 et ZFP36L2 (Cao et al., 2004).

Ces protéines ont la particularité d'avoir en commun 2 domaines en doigt de Zinc disposés en tandem séparés par 18 acides nucléotides, d'être présent à la fois au niveau cytoplasmique et nucléaire, et d'être capable de se fixer au domaine ARE des ARNm.

La TTP joue un rôle important dans la régulation de l'ARNm du TNF- α . Les souris déficientes pour la TTP développent un tableau associant auto immunité (anticorps anti nucléaires et anti-DNA natifs), arthrites érosives, atteintes glomérulaires et cachexie (Taylor et al., 1996) avec une concentration en TNF- α plasmatique majorée. Le traitement de ces souris déficientes pour TTP par des anticorps anti-TNF- α permet de leur rétablir un phénotype normal. Lai et al. (1999) ont montré l'interaction directe de la TTP avec la région ARE de l'ARNm du TNF- α , entraînant la déadenylation et la dégradation de cet ARNm. Ceci est particulièrement démontré dans les macrophages en réponse au LPS : les souris déficientes pour la TTP développent très rapidement un choc septique en réponse à de faible dose de LPS avec une synthèse excessive de TNF- α (Qiu et al., 2012). Par ailleurs, il s'avère que la TTP est présente en faible quantité dans les macrophages non stimulés. Par contre, après stimulation par le LPS, la TTP est très stable, contrastant avec la labilité des ARNm, et sa synthèse permet une régulation fine de l'expression du TNF- α . En effet, la quantité de protéine TTP est corrélée de manière inverse à la quantité de TNF- α après 2 h d'activation par le LPS dans des cellules THP-1 (Fairhurst et al., 2003).

La régulation de l'expression de la TTP est moins connue. Plusieurs hypothèses ont été proposées : l'autorégulation par la TTP elle-même de certains facteurs de transcription, la voie du récepteur au TNF- α , ou d'autres mécanismes non élucidés (Brooks et al., 2004).

3.3 Les microARNs ou miARNs

3.3.1 **La biogénèse des miARNs**

Les miARNs sont présents chez les eucaryotes de type animal et végétal. Ils sont codés par un grand nombre de gènes. Il s'agit de petits ARNs de 20 à 24 nucléotides régulant l'expression de gènes de façon post-transcriptionnelle. Actuellement, on a identifié près de 1200 miARNs chez l'homme et plus de 1000 chez la souris. 3 % du génome correspondrait à des séquences attribuées aux miARNs selon les modèles informatiques (Berezikov et al., 2005).

Un ARNm peut être régulé par plusieurs miARNs et un miARN peut théoriquement cibler une centaine de messagers. Ainsi 30 à 90% du génome pourraient être régulés par des miARNs directement ou indirectement (Engels et al., 2006).

Les miARNs sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II avec les mêmes mécanismes de coiffe et de polyadénylation que ceux d'un ARNm classique (Han et al., 2006). Certains de ces miARNs sont produits de manière individuelle mais la majorité est issue d'unités de transcription codant pour plusieurs miRNA (Bartel et al, 2004). Plus de la moitié des gènes codant pour les miARN sont localisés dans des régions dépourvues de gènes (régions intergéniques) et sont sous le contrôle d'un promoteur propre. Plus rarement, dans environ 40 % des cas, les miARN sont situés au niveau de régions introniques et leur expression est alors liée à la maturation de l'ARNm du gène correspondant. Enfin, dans quelques cas, les miARN peuvent être transcrits à partir d'un transcrit primaire polycistronique.

Le transcrit primaire ou pri-miRNA borde la séquence du miARN en 5' et en 3'. Un pri-miARN classique comporte une tige boucle d'une séquence double brin d'environ 33 paires de base imparfaitement appariées, flanquées de segments d'ARN simple brin. Un seul pri-miARN peut contenir jusqu'à 6 précurseurs de miARNs.

Deux étapes de maturation permettent la genèse du miARN mature (Figure 21):

- génération d'un pré-miRNA par excision de la tige boucle dans le noyau. Pour la plupart des miARNs, il s'agit d'une RNase de type III nucléaire, appelée Drosha chez l'animal, qui permet la génération de ce pré-miRNA. Drosha interagit avec une protéine à domaine de liaison à l'ARN, appelée DGCR8. Ce complexe interagit directement avec la tige boucle du pri-miRNA et les fragments simple brin bordant (Han et al., 2006). Les séquences bordant la tige boucle sont nécessaires car le clivage dépend de la distance de la jonction tige boucle-ARN simple brin, soit un tour d'hélice d'ARN de 11 paires de bases, qui représente la distance minimale nécessaire à l'activité catalytique d'une RNase III (Denli et al., 2004).

Il ne s'agit pas du seul mécanisme connu de production de pré-miRNAs. Le mécanisme d'épissage des pri-miARNs peut amener à libérer des introns semblables aux structures des pré-miARNs (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Il s'agit de structures appelées mirtrons qui vont alors intégrer la biogenèse des miARNs, indépendamment du complexe Drosha et DGCR8 (Ruby et al., 2007).

- génération de duplex de miARNs matures de 22 nucléotides par l'excision de la boucle terminale du pré-miARN. Cette étape nécessite tout d'abord l'exportation hors du noyau du pré-miARN en tête d'épingle (hairpin) par l'Exportine 5 et son cofacteur protéique RAN-GTP. Dans le cytoplasme, ce pré-miARN sera alors clivé par un complexe associant la protéine Dicer et TRBP ou Tar Binding Protein. Ces protéines TRBP et Dicer appartiennent à la famille des DRBP pour dsRNA binding protein.

Ce complexe enzymatique cytoplasmique « Dicer-TRBP » va éliminer la structure en boucle et sépare les deux brins complémentaires de la partie tige. Le complexe Dicer-TRBP fixerait ensuite un des deux brins seulement, brin qui sera associé au complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui comprend notamment des protéines de la famille Argonaute (AGO 1-4) pour former le complexe miRISC. C'est le brin mature qui est préférentiellement maintenu dans le complexe et va réguler négativement ses ARNm cibles (Daniels et al., 2009).

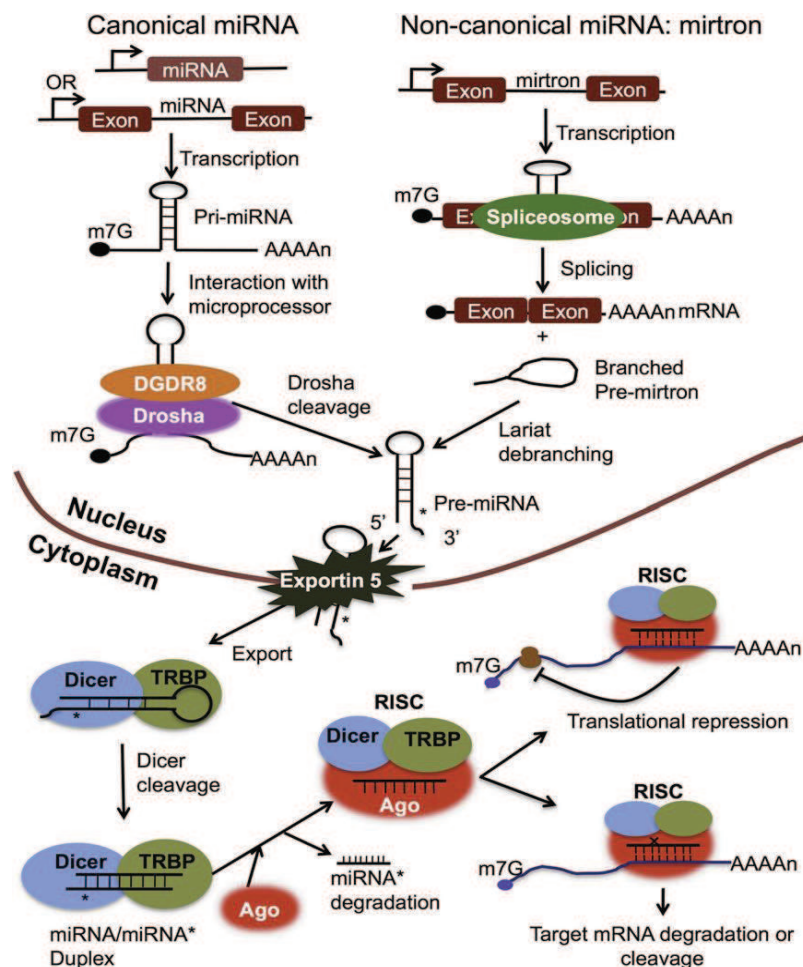


Figure 21 : Représentation schématique de la biogénèse des miRNA chez l'animal (Dai et al., 2011)

Le contrôle de la maturation de ces miARNs permet de moduler leur concentration. En effet, certaines cibles peuvent moduler la production des miARNs. Par exemple, chez la drosophile, l'expression de miR-7 qui réprime la traduction du facteur de transcription Yan, est également régulée par l'ETS (External Transcribed Sequence) de Yan (Li et al., 2005). Ceci montre qu'il existe une double boucle de régulation négative entre miR-7 et Yan. Le miARN let-7 est un exemple de cette double régulation négative : chez *C. Elegans*, l'expression de la protéine Lin28 est réprimée par let-7 (Seggerson et al., 2002) mais Lin28 a également la propriété de s'associer avec les ARN pri-let-7 et pré-let-7 et inhiber le clivage des précurseurs de let-7 par Drosha et Dicer (Heo et al., 2008).

3.3.2. *La voie effectrice des miARNs*

Les miARN régulent l'expression des ARNm selon deux mécanismes (Valencia-Sanchez et al., 2006) en fonction de leur degré de complémentarité avec l'ARNm cible. Plus le degré de complémentarité entre le miARN et l'ARNm cible est élevé, plus l'énergie de liaison est importante et permet au complexe miARN-RISC de recruter des ribonucléases qui cliveront l'ARNm. Si le degré de complémentarité est faible, le complexe miARN-RISC agira par répression traductionnelle soit en empêchant la fixation sur les ribosomes soit en inhibant la phase de post-initiation traductionnelle. La régulation des protéines du complexe RISC dont Ago, la région de fixation du miARN sur l'ARNm et l'importance de la région d'ancrage sont des éléments importants quant à ce mécanisme d'action.

3.3.2.1 *Les protéines associées au complexe RISC*

Un duplex de miARNs mature possède une demi-vie assez courte car il est rapidement dissocié par sa liaison avec les protéines Ago. La famille des protéines Argonaute peut être séparée en trois sous-groupes :

- les Piwi fixant les piARNs,
- les Ago qui fixent les miARNs et les siARNs,
- le troisième groupe n'a été décrit pour l'instant que chez les Nématodes

Si certaines espèces comme *Schyzosaccharomyces pombe* n'expriment qu'une seule protéine Ago, d'autres en expriment plusieurs : la drosophile code 5 protéines Ago, 10 pour *Arabidopsis thaliana*, 8 chez l'homme et 27 chez *C. Elegans*. Chez l'homme, 5 des 8 protéines Ago s'associent avec des siARNs et des miARNs (Meister et al., 2004; Tomari et al., 2005).

Les protéines Ago comportent 4 domaines : un domaine PAZ, un domaine PIWI et les domaines Mid et N. L'extrémité 3' de l'ARN du brin guide se fixe au niveau du domaine PAZ et l'extrémité en 5' se fixe au domaine Mid. Le reste du brin ARN est lié grâce à des charges positives portées par les deux autres domaines d'Ago, N et PIWI. Cette dernière va adopter une forme analogue à la RNase-H, capable dans certaines conditions de cliver le messager cible (Parker et al., 2004). Cette étape est un des mécanismes du silencing par déstabilisation de la cible. Cependant toutes les protéines Ago n'ont cette activité catalytique. Elle a été démontrée pour une seule protéine Ago humaine, HsAgo2 (Liu et al., 2004). D'autre part, l'expression des protéines Ago peut varier : hsAgo2 est particulièrement exprimée chez l'homme alors que hsAgo4 est à peine détectable (Sasaki et al., 2003). Ces différences de régulation et de fonction des protéines Ago n'ont pas encore été clairement définies.

Les protéines Ago jouent un rôle important dans la formation des complexes RISC. Les miARNs double brin produits par Dicer entrent dans le complexe RISC, ce qui nécessite la dissociation du duplex et le recrutement d'un seul des 2 brins en association avec la protéine Ago effectrice. Le brin recruté, appelé guide, permet la reconnaissance de la cible par appariement Watson-Crick, tandis que l'autre brin est écarté. Comme pour les siARNs, l'association d'un miARN avec Ago est sélective : un brin est sélectionné tandis que l'autre est en général perdu. Cette sélection est basée sur la stabilité thermodynamique relative de chacune des extrémités du duplex. Le brin retenu est celui qui est le moins solidement apparié en 5' (Kim et al., 2005). Cependant, cette règle n'est pas absolue et le deuxième brin, appelé star, peut être également recruté dans certaines conditions (Okamura et al., 2007).

Chez les mammifères, le complexe Dicer/Ago/miARN s'associe à d'autres protéines comme Gemin3, Gemin4, Mov10 et Imp8. Elles peuvent s'associer à Ago2 et participer à l'appariement miARN et ARNm (Weinmann et al., 2009). La protéine GW182 peut également s'associer à Ago2 et il a été montré que l'interaction GW182/Ago2 peut être assimilée au complexe RISC.

3.3.2.2 L'appariement

Ce sont ces miARNs qui vont permettre la reconnaissance et la répression d'ARNm cibles de manière séquence-spécifique au sein du complexe miRISC. Chaque miARN peut reconnaître de nombreux ARNm différents. Il existe des banques de miARN (Welcome Trust Sanger Institute) établissant le score de spécificité de chaque miARN pour un ARNm cible, score qui est établi en fonction du nombre de nucléotides complémentaires et de l'énergie de liaison entre l'ARNm cible et le miARN.

Les sites de fixation dans les ARNm de mammifères sont en général situés dans les séquences 3'UTR et souvent présents en plusieurs copies. Il existe également des sites de fixation de miARNs en 5'UTR conduisant à la répression des cibles (Lytle et al., 2007). Par ailleurs, plusieurs études récentes ont décrit une répression de l'expression par des miARNs se fixant dans la région codante. Ceci pose le problème dans les algorithmes de prédiction, qui se basent majoritairement sur des sites situés en 3'UTR des ARNm (e.g., TargetScan, PicTar, miRBase, etc.). Des analyses par séquençage de masse du transcriptome ont révélé que les séquences codantes pouvaient contenir de nombreux sites de fixation : 25% des associations Ago/ARNm se feraient dans des régions codantes.

Chez les mammifères, les miARNs présentent en général un appariement imparfait avec leurs cibles à l'inverse de ce qui est observé chez les végétaux. Ils sont présents sous forme de plusieurs copies afin de pouvoir être efficaces. Seuls quelques nucléotides du miARN seront complémentaires aux nucléotides de l'ARNm, les autres formeront un pont ou bulge (Filipowicz et al., 2008) (figure 22).

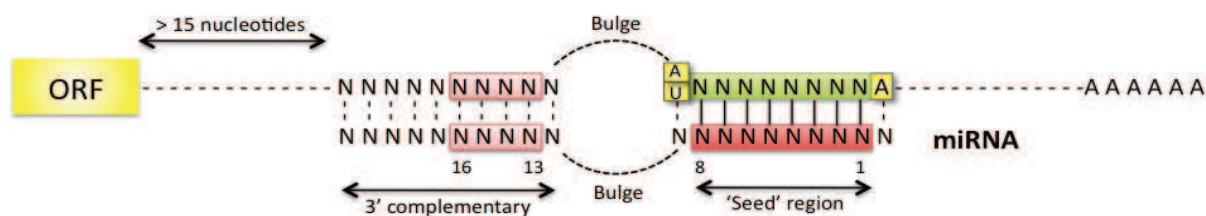


Figure 22: Schéma représentant l'appariement imparfait des miARNs sur l'ARNm cible chez les mammifères avec l'importance de la région d'ancrage « Seed » et la formation du pont ou « Bulge » (Filipowicz et al., 2008).

La séquence d'ancrage ou « seed » est indispensable à la fixation du miARN. Il constitue l'un des critères de sélection des algorithmes de prédiction. Il s'agit d'un appariement du miARN sur 2 à 8 nucléotides, pouvant tolérer des appariements non canoniques, tels les « wobble pairing » qui consiste en un appariement uracile/guanine.

3.2.3.3 *La dégradation des ARNm par les miARNs*

Cette dégradation nécessite l'élimination de la coiffe poly(A) située en 3' de l'ARNm ce qui permettra l'action d'exonucléases et l'élimination complète de l'ARNm.

Ce mécanisme de déstabilisation nécessite la présence des protéines Ago, GW182, et la machinerie cellulaire de décoiffage et de déadenylation (Behm-Ansmant et al., 2006). Cette déadenylation miARN-dépendante peut être observée *in vitro* sans engager les mécanismes de la traduction (Wakiyama et al., 2007), ce qui suggère que la dégradation et la répression de la traduction sont deux mécanismes indépendants de la régulation de certaines cibles.

Le fait que certaines cibles soient dégradées et d'autres ne serait pas exclusivement lié au degré d'appariement. Le nombre, le type et les positionnements des mismatch dans les duplex miARNs/ARNm jouent un rôle majeur dans le déclenchement de cette dégradation. Cependant, le recrutement par certains miARNs des complexes de déadénylases PAN2-PAN3 et CCR4-CAF1-NOT par une interaction directe avec GW182, contribuerait également à cette dégradation des ARNm (Braun et al., 2011).

3.2.3.4 *La répression de la traduction des ARNm*

Actuellement, il n'existe pas d'arguments permettant d'affirmer que la répression de la traduction se fait lors de l'initiation de la traduction de la protéine ou après l'initiation.

L'initiation démarre lors de la reconnaissance de la coiffe fixée sur la 7-methyl-guanosine en 5' par eIF4E, une sous-unité du complexe d'initiation eIF4F. Ce complexe comporte aussi eIF4A et eIF4G. L'interaction entre eIF4G et eIF3 va permettre le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. Le complexe de pré-initiation 40S interagit avec la sous-unité 60S au niveau du codon AUG pour initier l'élongation. EIF4G interagit également avec les protéines PABP-1 (ou poly-A binding protein 1) fixées en 3' des ARNm.

La capacité d'eIF4G à interagir avec eIF4E et PABP-1 va permettre la circularisation de l'ARNm, ce qui accroît considérablement l'efficacité de traduction de la protéine.

Ces complexes ARNm réprimés par les miARN seront alors stockés dans des compartiments cytoplasmiques appelés P-Body et seront progressivement éliminés.

■ ***Inhibition de l'initiation de la traduction :***

Certaines études montrent que l'inhibition de la traduction pourrait se faire au niveau de l'initiation, avec plusieurs modèles mécanistiques.

Tout d'abord, comme eIF4E se fixe à la base méthyle de la coiffe par des liaisons "stacking" entre deux résidus tryptophane, il existerait une compétition entre miRISC et eIF4E pour l'interaction avec la coiffe en 5' du fait de l'analogie entre le domaine Mid de la protéine Ago2 et eIF4E (Mathonnet et al., 2007). La protéine GW182 interviendrait également par compétition avec eIF4E (Eulalio et al., 2008).

D'autres études proposent l'hypothèse d'une stimulation de la déadenylation de la queue des ARNm. Du fait de cette déadenylation, PABP-1 ne permettent plus la circularisation de l'ARNm (Wakiyama et al., 2007; Wu et al., 2006).

Enfin, miRISC pourrait également intervenir en bloquant l'interaction entre la sous-unité ribosomale 60S et le complexe de pré-initiation 40S. La protéine Ago2 interagit avec eIF6 qui est impliquée dans la biogenèse et la maturation des sous-unités 60S ribosomiques en prévenant l'association des sous-unités 60S immatures au complexe 40S. Les cellules déficientes pour eIF6 n'ont plus de régulation de traduction pour les miARNs.

■ **Inhibition de l'élongation**

Petersen et al. (2006) ont proposé un modèle de répression par le complexe miRISC, suggérant que les miARNs induisent une dissociation prématurée des ARNm des ribosomes. Le blocage rapide de l'initiation de la traduction par l'hippuristanol conduit à une dissociation rapide des ribosomes de façon miRNA-dépendante.

3.2.3.5 *Mode de régulation non canonique*

Certains miARNs ont un rôle activateur dépendant de leur positionnement sur l'ARNm cible. Ainsi, l'interaction de miR-10a avec les séquences 5'UTR des ARNm de certaines sous unités ribosomiques conduit à l'activation de leur expression, tandis que sa fixation en 3'UTR conduit à la répression. Plusieurs autres miARNs régulent leurs cibles par ce même mécanisme : la fixation de miR-122 sur la région 5'UTR des ARNm du virus de l'hépatite C augmente leur expression alors qu'il joue un rôle inhibiteur en se liant à leur région 3'UTR. A l'inverse, mir-34a inhibe AXIN2 en se fixant en 5'UTR ou en 3'UTR. De même miR-365-3 active la traduction de l'ARNm du TNF- α en se fixant en 3'UTR et en recrutant la protéine FXR1 (Vasudevan et al., 2007).

3.3.3 *Rôle physiologique et pathologique des miARNs*

Pour de nombreuses espèces, les miARN jouent un rôle clé dans des processus biologiques fondamentaux comme l'apoptose, le métabolisme lipidique, le développement neurologique ou la différenciation musculaire et cardiaque (tableau 1). Des travaux récents ont montré que les miARN étaient également impliqués de manière déterminante dans l'hématopoïèse. Ainsi la délétion conditionnelle de Dicer dans les cellules souches hématopoïétiques, les rend incapables de reconstituer une hématopoïèse (Muljo et al., 2005). L'absence d'AGO2 inhibe la différenciation des LB et des érythrocytes (O'Carroll et al., 2007).

3.3.3.1 *miARNs et immunité*

Les miARN jouent également un rôle important dans la réponse immunitaire: différenciation des cellules immunitaires, développement de la réponse à l'infection et physiopathologie des maladies auto-immunes. Les cibles des miARN sont alors en général des facteurs de transcription, des cofacteurs ou des molécules modifiant la chromatine (tableau). Bien que de nombreuses cytokines ou leurs récepteurs présentent des séquences correspondantes à des miARN et/ou des séquences ARE, elles sont rarement la cible directe de miARN. Ce sont plutôt les molécules impliquées dans la signalisation en aval qui pourraient être touchées.

Plus d'une cinquantaine de miARNs pourraient cibler les gènes de la voie JAK/STAT incluant les régulateurs négatifs SOCS et PIAS (Arsivatham et al., 2009). En ce qui concerne le TGF- β , il a été montré que son activité est contrôlée par des miARN alors que son ARNm ne présente aucune séquence cible. Le contrôle s'effectuerait plutôt au niveau des protéines SMAD: 24 composants de la voie du TGF- β présentent des sites 3'-UTR fixant 64 miARN différents (Arsivatham et al. 2009).

miARN	Fonctions	Gènes cibles	Références
hsa-miR-146a	Réponse aux infections bactériennes	TRAF6 et IRAK1	Taganov et coll., 2006
hsa-miR-132	Réponse aux infections bactériennes	ND	Taganov et coll., 2006
hsa-miR-155	Réponse aux infections bactériennes et virales. Formation centres germinatifs	PU.1, c-Maf	Taganov et coll., 2006 Tili et coll., 2007
hsa-miR-125b	Diminué durant la réponse inflammatoire. Permet la production de TNF- α .	TNF- α	Tili et coll., 2007
hsa-let-7i	Régule la réponse immunitaire innée	TLR4	Chen et coll., 2007
hsa-miR-181a	Régule le développement des LT et LB, module la signalisation par TCR.	ND	Zhou et coll., 2007 Li et coll., 2007
hsa-miR-150	Différenciation des LB	ND	Xiao et coll., 2007
hsa-miR-223	Régule la granulopoïèse	ND	Fukao et coll., 2007
hsa-miR-32	Impliqué dans la réponse antivirale contre PFV1 en sous-exprimant les ARNm de PFV1.	ARNm de PFV1	Lecellier et coll., 2005
hsa-miR-122	Requis pour la réplication de HCV, diminué en réponse à l'IFN- β	ND	Pedersen et coll., 2007 Jopling et coll., 2005
kshv-miR-K12-11	Orthologue de hsa-miR-155	Cibles endogènes de hsa-miR-155	Skalsky et coll., 2007
hcmv-miR-UL112	Inhibe la mort cellulaire des cellules infectées par HCMV médiée par les cellules NK	MICB	Stern-Ginossar et coll., 2007
ebv-miR-BART2	Cible l'ADN polymérase EBV BALF5 afin de réguler l'expression de gènes viraux.	BALF5	Pfeffer et coll., 2004

Tableau 1 : Liste non exhaustive de miARNs ayant un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire (selon Pauley et al., 2008)

3.3.3.2 miARNs et PR

Le rôle de ces miRNA dans les mécanismes physiopathologiques de la PR commence à être connu. En effet, plusieurs études récentes ont montré l'impact de certains de ces miARNs dans la PR. L'équipe de Stanczyk et al. (2008) ont montré que les synoviocytes rhumatoïdes expriment constitutivement miR-155 et 146a comparés à des FLS d'arthrose et que l'expression de miR-155 est augmentée par le TNF- α , l'IL-1 β , le LPS, le BLP et le poly I:C. La surexpression de miR-155 induit une inhibition de la production des métalloprotéases MMP-1 et 3.

De manière inverse, l'inhibition du miR-155 dans un modèle murin d'arthrite induit par le collagène aurait un effet anti inflammatoire notamment par l'inhibition d'expression d'IL-17. L'expression de miR-146a aurait également une fonction anti-inflammatoire : présent dans les membranes synoviales, sa surexpression permettrait d'inhiber la destruction osseuse dans des modèles murin d'arthrite induit par le collagène (Nakasa et al., 2008). L'équipe de Zhu et al. (2012) ont également montré que l'expression de miR-23b permettait la diminution de synthèse d'IL-17 en ciblant les protéines TAB-1, TAB-2 et I κ B- α . La transfection d'un lentivirus contenant une séquence nucléotidique permettant d'inhiber le miR-223 permettait de diminuer les signes inflammatoires des souris avec une arthrite induit par le collagène (Li et al., 2012). De manière plus ciblée, notre équipe a montré que les miR-19a/b contrôlent l'expression de l'IL-6 et de MMP3 en inhibant la synthèse du TLR2 par interaction directe sur son ARNm (Philippe et al., 2012).

Des études ont également démontré le rôle de certain miARNs dans l'expression du TNF- α . Tili et al. (2007) avaient montré que l'expression des miR-125b et 155 était modulé en réponse au TNF- α et au LPS dans les macrophages. MiR-125b régule négativement l'expression du TNF- α par action direct sur son ARNm alors que miR-155 permet la stabilisation de l'ARNm par un mécanisme inconnu (Rajaram et al., 2011).

Par contre, aucune étude à l'heure actuelle n'a montré de lien entre les miARNs et la protéine Btk.

4. Autres systèmes de contrôle épigénétique : acétylation et méthylation

Le contrôle de l'expression des ARNm par les miARNs, la méthylation de l'ADN et la modification des histones constituent ce qu'on appelle l'épigénétisme : il s'agit de l'ensemble des modifications transmissibles d'une génération à l'autre et réversibles de l'expression génique sans altération des séquences nucléotidiques. L'importance de la méthylation de l'ADN et de la modification des histones a été largement démontrée notamment en cancérologie avec le développement de thérapies ciblant ces mécanismes. Leur rôle dans les maladies inflammatoires comme la PR restent à être déterminé.

4.1 Méthylation de l'ADN

4.1.1 Généralités :

La méthylation de l'ADN est un processus biochimique important notamment dans le développement cellulaire. Il se caractérise par l'ajout d'un groupement méthyle CH₃ en position 5 d'une base cytosine et principalement au niveau de motifs appelés « îlots CpG ». Ces îlots CpG sont essentiellement localisés au niveau des régions promotrices de gènes ou à proximité de site d'initiation de la transcription. Le degré de méthylation de l'ADN est directement corrélé à l'inhibition de l'expression génique et à la répression de la chromatine par deux mécanismes :

- les groupements méthyles empêchent la fixation sur les promoteurs de certains facteurs de transcription
- le recrutement de protéines inhibitrices de la transcription par une famille de protéine appelée MBD interagissant avec les îlots CpG méthylés (Hendrich et al., 1999). En plus de cette inhibition de transcription, ces protéines MBD vont pouvoir recruter des histones deacetylase et participer la compaction de la chromatine.

Cette méthylation est possible par la présence d'enzymes appelés DNA méthyltransférase ou DNMT. Ces méthylases sont regroupés en 2 classes : les méthylases de maintenance comme

DNMT1 et les méthylases de novo comme DNMT3a et b permettant la méthylation de site exempts de toute méthylation.

En cancérologie, plusieurs études ont montré que l'évolution tumorale était liée au degré d'hypométhylation ; plus la cellule tumorale est agressive, plus le degré de méthylation serait bas (Esteller et al., 2007) (Figure 23). Paradoxalement, dans certaines pathologies comme les syndromes myélodysplasiques ou la leucémie aigue myéloïde, l'utilisation d'un inhibiteur des DNMT, la 5-azacitidine, permet d'améliorer l'évolution de ces pathologies. Deux hypothèses seraient proposées quand à l'action de cette molécule : la majoration de l'hypométhylation permettrait la transcription de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques ou par un effet toxique direct de la molécule par incorporation dans le génome tel un agent intercalant (Lyons et al., 2009).

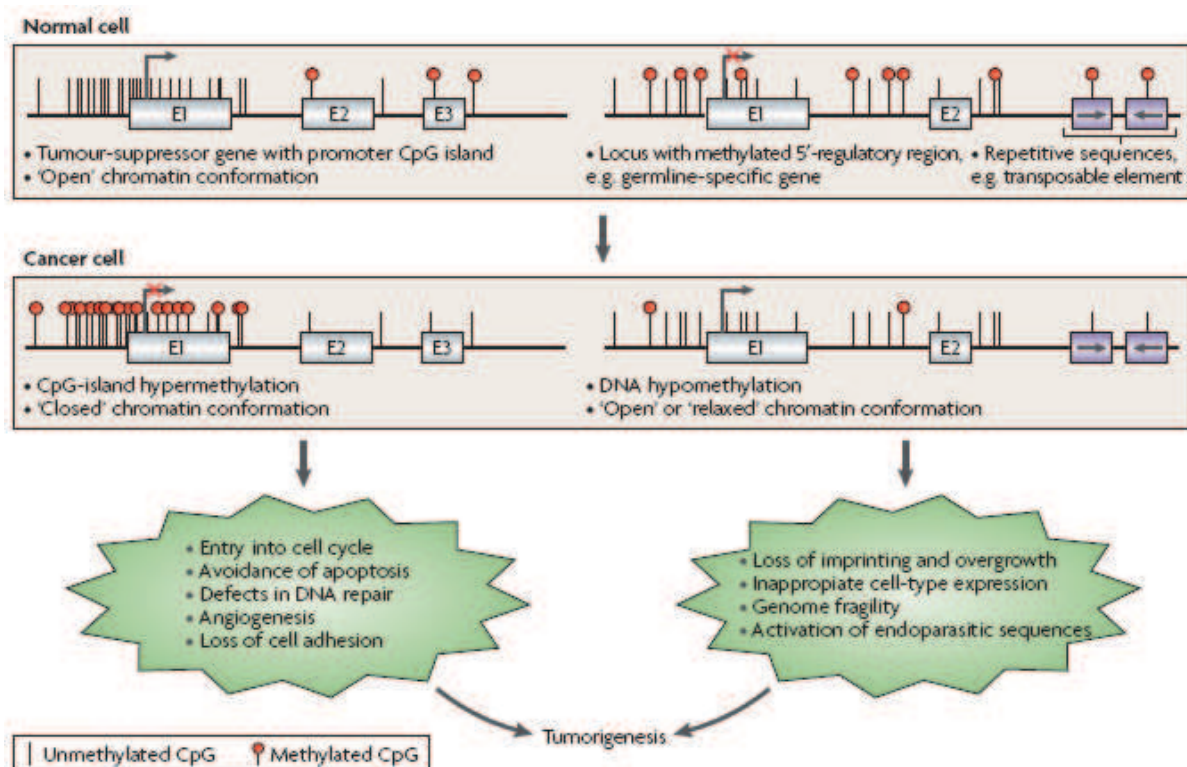


Figure 23 : Schéma représentant l'importance de la méthylation de l'ADN dans la transcription de gènes et les différences de méthylation entre une cellule normale (haut) et une cellule tumorale (bas) (Esteller et al., 2007).

4.1.2 Méthylation et PR

Les FLS de patients atteints de PR présenteraient un niveau de méthylation plus bas que les FLS de patients atteints d'arthrose (Karouzakis et al., 2009). Cette hypométhylation serait en partie liée à la diminution de l'expression de DNMT1. Le traitement de ces FLS d'arthrose par la 5-azacitidine entraîne la modification de leur profil vers un profil rhumatoïdes plus agressifs par la surexpression d'un certain nombre gènes codant des cytokines, des MMP, des kinases et des facteurs de transcription qui jouent un rôle majeur dans la PR. Nakano et al. (2012) ont confirmé ces travaux en montrant qu'il existe plusieurs gènes hypométhylés, impliqués dans la prolifération, l'adhésion et l'inflammation comme le TNF- α . Cette hypométhylation est corrélée à l'augmentation de l'expression de ces gènes.

L'expression d'IL-6 dans les macrophages en réponse au LPS est médiée par le degré de méthylation ; la présence d'un seul motif CpG non méthylé dans le promoteur de l'IL-6 permet une augmentation significative de son expression (Nile et al. 2008).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré le rôle de ce mécanisme de méthylation sur la synthèse de certains miARNs. Stancsyk et al. (2011) ont montré que l'utilisation de 5-azacitidine dans des FLS rhumatoïdes permettait l'augmentation de l'expression du miR-203 ; ce miARN étant impliqué dans le contrôle positif de l'expression de l'IL-6 et MMP1 et sa surexpression était corrélée à l'augmentation de synthèse d'IL-6 et MMP1 en réponse au LPS. De même, il a été démontré que miR-34a* était sous exprimé dans les FLS rhumatoïdes par hyperméthylation expliquant en partie la résistance de ces FLS à l'apoptose. L'utilisation de 5-azacitidine permettait l'augmentation du miR-34a* et favorisait l'apoptose en régulant directement la protéine XIAP (Niederer et al., 2012).

4.2 Acétylation des histones

4.2.1 Généralités

L'acétylation des histones H3 et H4 est corrélée à l'activation de la transcription des gènes car elle diminue l'interaction entre les histones chargées positivement et l'ADN chargé négativement. La chromatine adopte alors une structure plus relâchée qui facilite l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription.

Cet état d'acétylation dépend de l'équilibre entre (figure 24) :

- les histone acétyl transférases ou HATs regroupées en 3 familles (GNAT/PCAF, MYST, P300/CBP)

- les histone déacétylases ou HDACs qui interviennent essentiellement dans la répression transcriptionnelle. Il en existe 4 familles: la classe 1 avec les HDACs 1, 2, 3 et 8 de localisation presque exclusivement nucléaire, la classe 2 avec les HDACs 4, 5, 6, 7, 9 et 10 de localisation nucléaire et cytoplasmique, la classe 3 avec les Sirtuines (1 à 7) et la classe 4 avec HDAC 11. Ces différentes familles diffèrent par leur structure, leur fonction, leur localisation subcellulaire et leur profil d'expression (Haberland et al., 2009).

L'efficacité des inhibiteurs des HDACs a largement été démontrée notamment dans certaines pathologies hématologiques comme le lymphome T cutané (Olsen et al., 2007). Leur intérêt est également connu en neurologie dans le traitement de l'épilepsie comme l'acide valproïque. Enfin, ils sont également étudiés dans le contrôle de l'expression des rétrovirus tels les virus HIV ou HTLV-1 ; l'inhibition des HDACs permet d'augmenter la réplication virale et rendre les cellules infectées plus sensibles aux antirétroviraux (Archin et al., 2012 ; Nishioka et al., 2008).

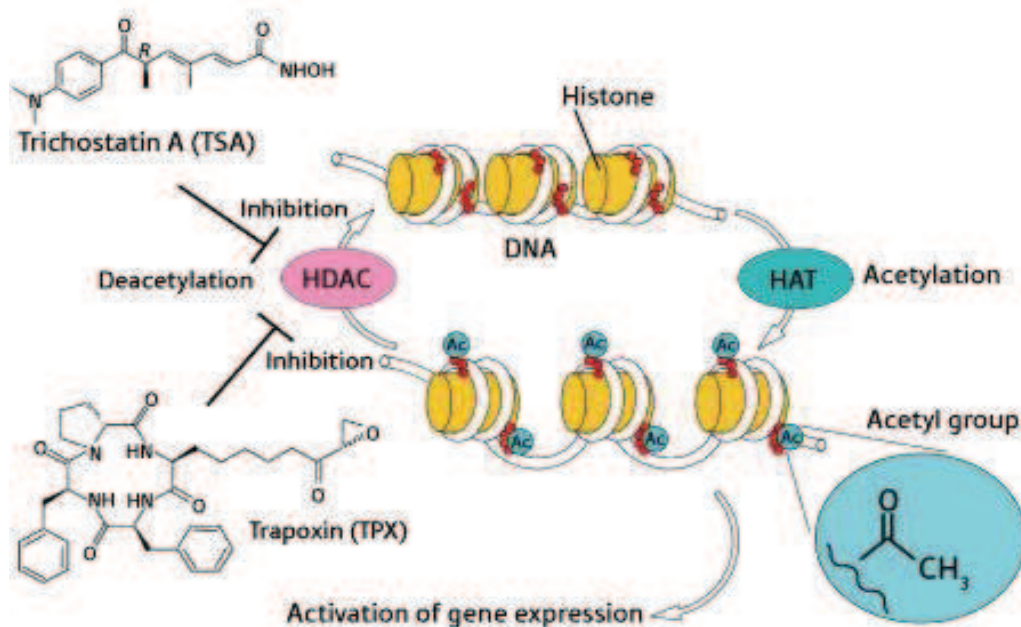


Figure 24 : Schéma représentatif du mécanisme d'acétylation des histones contrôlé par les enzymes HAT et HDAC (Haberland et al., 2009)

L'acétylation des histones permettrait également de réguler l'expression des miARNs et inversement. Plusieurs études notamment en cancérologie ont montré l'intérêt de cette régulation, comme le rôle des HDACs dans l'expression des miR-15a, -16 et 29b dans la leucémie lymphoïde chronique (Sampath et al., 2012). Un autre exemple étant le rôle du gène de suppresseur de tumeur BRCA-1 qui contrôle l'expression du miR-155 via l'activité des HDACs (Chang et al., 2011). Inversement, il a été montré que le miR-155 contrôle l'expression d'HDAC4 et régule l'expression de la protéine anti apoptotique BCL6 (Sandhu et al., 2012)

4.2.2 Acétylation des histones et PR

Comme pour la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones jouerait un rôle dans les mécanismes physiopathologiques de la PR

Comparativement aux FLS d'arthrose, les FLS rhumatoïdes n'ont pas une augmentation de l'acétylation significative (Huber et al., 2007). Par contre l'utilisation d'un inhibiteur d'HDAC, la Trichostatine A, permet de diminuer l'inflammation synoviale (Nishida et al., 2004). Des travaux similaires ont été proposés dans les macrophages de tissu synovial de patients avec une PR ; l'utilisation d'inhibiteurs des HDACs permet la diminution de l'expression de cytokines inflammatoire comme le TNF- α en réponse au LPS (Grabiec et al., 2010 ; Sato et al., 2006).

OBJECTIFS DE TRAVAIL

OBJECTIFS

Le rôle de la protéine Btk dans le contrôle de l'inflammation est actuellement reconnu et a été démontré dans plusieurs modèles cellulaires. Par contre, le mécanisme de régulation de certaines cytokines comme le TNF- α par la protéine Btk n'est pas clairement établi. De même, il n'y a pas d'étude à l'heure actuelle permettant d'établir un lien entre contrôles épigénétiques et expression de Btk.

En se basant sur la thématique de notre laboratoire et des publications antérieures, nous avons proposés d'utiliser le modèle d'inflammation de la polyarthrite rhumatoïde et plus particulièrement la réponse immunitaire innée via la voie des TLRs. Nous avons montré que les FLS, en réponse au LPS, ne sécrétaient pas de d'IL-18 et notamment pas de TNF- α , cytokine majeure dans le processus pathologique de la PR (Zeisel et al., 2004). Cependant, il ne s'agissait pas d'un défaut de transcription mais plutôt un mécanisme d'instabilité de l'ARNm de ces 2 cytokines. Par ailleurs, il avait déjà été montré que les FLS n'exprimaient pas la protéine Btk à la différence par exemple des macrophages (Seeman et al., 2007).

En partant des résultats de ces travaux, nous avons utilisé le FLS comme un modèle anti-TNF- α et essayé de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression du TNF- α et de Btk. Par extrapolation, nous avons proposé d'utiliser cette régulation propre aux FLS comme « anti-TNF- α » dans un modèle de macrophages, les cellules THP-1 sécrétant du TNF- α en réponse au LPS.

De ce fait, plusieurs aspects de cette régulation ont été abordés :

- compte tenu de cette notion d'instabilité de l'ARNm, mon premier objectif a été d'étudier le rôle potentiel des miARNs et des protéines RBPs dans ce mécanisme.
- mon deuxième objectif a été de démontrer le mécanisme de contrôle de Btk dans la régulation du TNF- α .
- mon troisième objectif a été d'étudier le rôle des mécanismes d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN dans le contrôle de l'expression de Btk et de la régulation du TNF- α .

RESULTATS

TRAVAUX 1

« La synthèse de la protéine Btk est modulée par l'expression de miR-346 permettant la régulation post-transcriptionnelle de cytokines pro-inflammatoires par le synoviocyte fibroblastique en réponse aux TLRs »

La dégradation d'un ARNm est un mécanisme qui permet à toute cellule d'exercer un contrôle au niveau post-transcriptionnel. Des travaux récents ont montré que les miARNs jouent un rôle régulateur important dans le contrôle de la réponse inflammatoire induite par les TLRs. Au cours de la PR, les FLS activés contribuent à la réaction inflammatoire et destructrice en libérant des cytokines proinflammatoires (IL-6, IL-8) et des enzymes (métalloprotéases). Les FLS ne sécrètent cependant pas de TNF- α , ni d'IL-18, cytokines qui jouent un rôle important dans la physiopathologie de la PR. L'objectif de nos premiers travaux a été de déterminer si l'absence d'IL-18 et de TNF- α , au niveau protéique, malgré la synthèse de leur ARNm dans les FLS, pouvait être expliquée par la présence de miARN spécifiques, conduisant à la dégradation de l'ARNm de l'IL-18 et du TNF- α .

Nous avons montré par la réalisation d'un miRNome que le miR-346 était le plus exprimé en réponse au LPS dans les FLS activés via le TLR4. Nous avons démontré que l'inhibition de ce miR-346 permettait la synthèse d'IL-18 par le FLS activés par le LPS et que cette régulation du miR-346 sur l'IL-18 dépendait de l'expression de la protéine Btk ; l'inhibition du miR-346 entraîne l'expression protéique de Btk dans des FLS n'exprimant pas de manière constitutionnelle cette protéine.

Ce phénomène est apparemment « paradoxal » dans la PR car il limite la réponse pro-inflammatoire des FLS, mais c'est un système de régulation important qu'il faut essayer de comprendre car il pourrait permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Docteur Sébastien PFEFFER (CNRS UPR 9002, Strasbourg, France)

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Immunology (2009)

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

This information is current as
of January 3, 2013.

Bruton's Tyrosine Kinase Is Involved in miR-346-Related Regulation of IL-18 Release by Lipopolysaccharide-Activated Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes

Ghada Alsaleh, Guillaume Suffert, Noha Semaan, Tom
Juncker, Laurent Frenzel, Jacques-Eric Gottenberg, Jean
Sibilia, Sébastien Pfeffer and Dominique Wachsmann

J Immunol 2009; 182:5088-5097; ;
doi: 10.4049/jimmunol.0801613
<http://www.jimmunol.org/content/182/8/5088>

-
- References** This article cites 42 articles, 12 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/182/8/5088.full#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2009 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Bruton's Tyrosine Kinase Is Involved in miR-346-Related Regulation of IL-18 Release by Lipopolysaccharide-Activated Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes¹

Ghada Alsaleh,* Guillaume Suffert,^{2,3†} Noha Semaan,*² Tom Juncker,* Laurent Frenzel,* Jacques-Eric Gottenberg,* Jean Sibilia,* Sébastien Pfeffer,^{3,4†} and Dominique Wachsmann^{4*}

MicroRNAs (miRNAs) have emerged as key players in the regulation of expression of target mRNAs expression. They have been associated with diverse biological processes, and recent studies have demonstrated that miRNAs play a role in inflammatory responses. We reported previously that LPS-activated fibroblast-like synoviocytes (FLS) isolated from rheumatoid arthritis (RA) patients express IL-18 mRNA but they do not release IL-18. Based on the observation that this inhibition was due to a rapid degradation of IL-18 mRNA, our group has conducted a study to identify miRNAs that could play a role in the "antiinflammatory" response of LPS-activated RA FLS. LPS challenge modulated the expression of 63 miRNAs as assessed by microarray analysis. Fifteen miRNAs were up-regulated, including miR-346, for which overexpression upon LPS treatment was validated by quantitative RT-PCR. We then transfected FLS with an antisense oligonucleotide targeting miR-346 and found that, in these conditions, IL-18 release could be measured upon LPS activation of FLS. Moreover, we also demonstrated that miR-346 indirectly regulated IL-18 release by indirectly inhibiting LPS-induced Bruton's tyrosine kinase expression in LPS-activated RA FLS. These findings suggest that miRNAs function as regulators that help to fine-tune the inflammatory response in RA. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 5088–5097.

In rheumatoid arthritis (RA),⁵ stimulation of innate immune cells, and especially organ-specific resident cells such as fibroblast-like synoviocytes (FLS), seems to be the primary fundamental event leading to the inflammatory response and to the development of organ-specific autoimmunity (1, 2).

Activation of FLS may be linked either to the cytokine environment, to cell-to-cell contacts, or to interactions between pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and pattern recogni-

tion receptors (PRRs) (3). FLS exert a proinflammatory activity, essentially by synthesizing cytokines, chemokines, prostanoids, and NO (4, 5). However, they also produce proangiogenic factors that help with the appearance of neovessels, thereby allowing the intrasynovial recruitment and migration of immune cells with the help of release of chemokines. FLS have a key role in osteoarticular destruction and take also part in the differentiation and activation of osteoclasts by the receptor activator of NF- κ B (RANK)-RANK ligand pathway through the release of prostaglandin E₂ and IL-6 (6).

Conversely, FLS secrete little or no TNF- α and neither IL-1 nor IL-18, which are major cytokines implicated in the inflammatory response in RA. This "antiinflammatory" activity, which is specific to FLS, suggests the existence in these organ-specific resident cells of selective and complex mechanisms of regulation. We previously reported that LPS and protein VII, a ligand of integrin $\alpha_5\beta_1$, induced IL-18 mRNA expression in both THP-1 monocytic cell line and in RA FLS, but in contrast to THP-1 cells, FLS did not release mature IL-18. Furthermore, our studies revealed that the lack of IL-18 release by RA FLS was due to a defect of translation of IL-18 mRNA into pro-IL-18 because of a rapid degradation of the IL-18 mRNA (7).

MicroRNAs (miRNAs) are an evolutionarily conserved class of endogenous small noncoding RNAs. Since their discovery, miRNAs have emerged as key players in the regulation of translation and degradation of target mRNAs (8–11). They provide an additional posttranscriptional mechanism by which protein expression can be regulated (12–14). The expression of ~10,000 genes, or 30% of the human genome, could potentially be regulated by miRNAs (15, 16). In mammals, miRNAs have been associated with diverse biological processes such as cell differentiation, cancer, regulation of insulin secretion, and viral infection (17, 18). Cells of the immune system must employ a multilayered control system to keep innate immunity and inflammation in check, and

*Laboratoire Physiopathologie des Arthrites, EA3432, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Unité de Formation et de Recherche Sciences Pharmaceutiques, Illkirch, France and Département de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg Haute-pierre, France; and †Unité Propre de Recherche-Centre National de la Recherche Scientifique 2357, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg, France

Received for publication May 20, 2008. Accepted for publication February 10, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹D.W.'s work was supported by grants from Bristol Myers Squibb, Roche, Pfizer, the Curtin Foundation, and the Caisse d'Assurance Maladie des Professions Libérales-Provinces. S.P.'s work is supported by the Agence Nationale de la Recherche and the Ligue contre le Cancer.

²G.S. and N.S. contributed equally to this work.

³Current address: Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Centre National de la Recherche Scientifique, 15 rue René Descartes, Strasbourg, France.

⁴Address correspondence and reprint requests to Dr. Sébastien Pfeffer, Architecture et Réactivité de l'ARN, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire-Centre National de la Recherche Scientifique, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France. E-mail address: spfeffer@unistra.fr and Dr. Dominique Wachsmann, EA3432, Unité de Formation et de Recherche Sciences Pharmaceutiques, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France. E-mail address: dominique.wachsmann@pharma.u-strasbg.fr

⁵Abbreviations used in this paper: RA, rheumatoid arthritis; Btk, Bruton's tyrosine kinase; FLS, fibroblast-like synoviocytes; LFM, leflunomide metabolite analog; miRNA, microRNA; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PRR, pattern recognition receptor; UTR, untranslated region.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

recently a role for miRNAs has been proposed in the regulation of the inflammatory response in monocytes/macrophages (19). Taganov et al. (20), by using microarray studies, found an increased expression of three miRNAs (miR-132, miR-146, and miR-155) in response to LPS in THP-1 cells. They identified IL-1R-associated kinase 1 (IRAK1) and TNFR-associated factor 6 (TRAF6) as the key targets of miR-146 and proposed a model by which this miRNA regulates TLR signaling in response to various PAMPs. Tili et al. (21) later demonstrated that miR-155 plays an important role in innate immunity and is involved in the negative regulation of immune cells in response to LPS.

Based on these observations, our group has conducted a study to identify miRNAs that could play a role in the antiinflammatory response of LPS-activated RA FLS. To monitor the expression profile of miRNAs in RA FLS activated with LPS, we employed a microarray approach that detects 409 miRNAs of human origin. Fifteen miRNAs were overexpressed >2-fold in LPS-activated FLS, and among them we identified one miRNA, miR-346, that had partial sequence complementarity within the 3' untranslated region (3'-UTR) region of the IL-18 mRNA. The up-regulation of miR-346 expression was validated by quantitative RT-PCR analysis. We then used antisense oligonucleotide molecules to block miR-346 activity; transfection of the inhibitor targeting miR-346 reestablished IL-18 release by LPS-activated FLS. Moreover, we also showed that transient transfection of miR-346 in THP-1 cells inhibited IL-18 secretion by these cells in response to LPS. Using a luciferase assay, we showed that miR-346 does not directly target IL-18 mRNA. In our search for another target that could explain the effect of miR-346 on IL-18, we also demonstrated that miR-346 inhibited indirectly Bruton's tyrosine kinase (Btk) expression at the transcriptional level in LPS-activated RA FLS and that indirect inhibition of Btk expression negatively regulated IL-18 release. These results suggest an important role of miR-346 in the control of IL-18 synthesis by LPS-activated FLS and indicate that its expression may be critical to prevent an excessive inflammatory response.

Materials and Methods

Reagents

Cell culture media (RPMI 1640, M199, and DMEM), FCS, L-glutamine, penicillin, streptomycin, amphotericin B, and TRIzol reagent were from Invitrogen. LPS from *Salmonella abortus equi* and type XI collagenase, leflunomide metabolite analog (LFM-A13), and anti- β -actin mouse IgG mAbs were obtained from Sigma-Aldrich. The LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I was from Roche Applied Science. The miScript system was obtained from Qiagen. Clear-MiR miRNA inhibitors were from Eurogentec. MIRIDIAN miR-346 mimic and MIRIDIAN miRNA mimic negative control were supplied by Dharmacon/Perbio Science. Human dermal fibroblast Nucleofector kit and cell line Nucleofector kit V were from Amaxa. The enzyme immunoassay kits for human IL-18 detection was from MBL and for human IL-6 detection was from R&D Systems. Throughout this study, buffers were prepared with apyrogenic water obtained from Braun Medical. Anti-Btk mouse IgG mAbs were from BD Transduction Laboratories.

Cell culture

Human FLS were isolated from synovial tissues from four different RA patients at the time of knee joint arthroscopic synovectomy as described previously after informed consent was obtained from patients (22). The diagnosis was confirmed to the revised criteria of the American College of Rheumatology (23). FLS cultures were done as previously described (24). Experiments were performed between the third and the ninth passage. During that time, cultures were constituted of a homogeneous population of fibroblastic cells, negative for CD16 as determined by FACS analysis. Cell number and cell viability were checked by the MTT test as described elsewhere (25). THP-1 cells (no. 88081201; European Collection of Cell Cultures) were cultured as described previously (26). HEK293 cells were purchased from the American Type Culture Collection and maintained in

DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 μ M L-glutamine, 40 U/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin.

Stimulation of cells for total RNA extraction

For miRNA studies, FLS and THP-1 cells (10^6 cells) were stimulated with 2 ml of medium alone or medium containing LPS (1 μ g/ml). After a 3- or 6-h incubation period, total RNA was extracted using TRIzol according to the manufacturer's instructions. For IL-18 studies, cells were stimulated as previously described (6), and total RNA was extracted using TRIzol according to the manufacturer's instructions.

MiRNA microarray analysis

MiRNA microarray analyses were performed by Eurogentec using the MiRanalyser microarray, which contains 409 calibrated human miRNA oligonucleotides from the Sanger miRBase that were HPLC purified and spotted in duplicate into two separate fields on 25 \times 75-mm high-quality glass slides. The microarray data were submitted to the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) database (www.ebi.ac.uk/) with the accession no. E-MEXP-1970.

Luciferase reporter constructs

To generate luciferase reporter plasmids, psiCHECK-2 (Promega) was modified by inserting the Gateway cassette C.1 (Invitrogen) at the 3' end of the firefly luciferase gene (*f-luc*) into the *Xba*I site of psiCHECK-2. The 3'-UTR sequence of IL-18 was amplified from HEK293 cell genomic DNA and after addition of attB1 and attB2 sequences, the resulting PCR products were cloned into pDONR/Zeo and then recombined in the modified psiCHECK-2 vector using Gateway technology (Invitrogen). A similar construct was generated for the 3'-UTR sequence of Btk.

The primer sequences were (sense and antisense primers are indicated in respective order, and the anchor sequence used for the nested PCR is underlined): IL-18, 5'-AGAAAGCTGGGTCACATTATGAATTTTTTA TTTGTTA, 5'-AAAAAGCAGGCTCTATAAAAATTTTCATGCCGGGC; attB1/2, 5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT, 5'-ACCACCTTGT ACAAGAAAGCTGGGT; Btk, 5'-AAAAAGCAGGCTGTCTGGATGA AGAATCCTG, 5'-AGAAAGCTGGGTCCTCCCTCCATCTTTTATG.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA isolated from FLS was reverse transcribed using the FirstStrand cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Real-time quantitative RT-PCR was performed in a total volume of 20 μ l using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I and gene specific primers: IL-18, 5'-ATCAGGATCCTTTGGCAAGCTTGAATCTAA ATTATC-3' and 5'-ATAGGTCGACTTCGTTTTGAACAGTGAACATTAT AG-3'; GAPDH, 5'-GGTGAAGTCCGAGTCAACCGGA-3' and 5'-GAGG GATCTCGCTCGCTCCTGGAAGA-3'; Btk, 5'-GAAGCTGGTGCAAGTTG TATG-3' and 5'-TATACCCTCTCTGATGCCAG-3'.

After an initial denaturing at 96°C for 10 min, the temperatures used were: 95°C for 10 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 25 s for IL-18; 95°C for 15 s, 57°C for 10 s, and 72°C for 10 s for GAPDH; and 95°C for 10 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 25 s for Btk using the LightCycler instrument (Roche Applied Science). Amplification products were detected as an increased fluorescent signal of SYBR Green during the amplification cycles. Results were obtained using SDS Software (PerkinElmer) and evaluated using Microsoft Excel. Melting curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products.

Quantitative RT-PCR analyses for miRNAs were performed using the miScript system and the primers (Qiagen), and RNA concentrations were determined with a NanoDrop instrument (NanoDrop Technologies). One microgram of RNA per sample was used for the assays. Reverse transcriptase reactions and real-time quantitative PCR were performed according to the manufacturer's protocols. A U6 endogenous control was used for normalization. All reactions were run in triplicate in a LightCycler Instrument (Roche Applied Science). Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle (*C_t*) method.

Northern blot analysis

Twenty micrograms of RNA per sample was resolved on a 15% urea-PAGE gel and transferred to a nylon membrane (Hybond NX; Amersham Biosciences). After UV cross-linking, the membrane was prehybridized in PerfectHyb Plus buffer (Sigma-Aldrich) at 42°C for 60 min and then hybridized with ³²P-labeled probes at 42°C overnight. After being washed, the membrane was exposed on a phosphorimager plate and the signal was quantified after scanning the plate on a Fuji FLA7000 phosphorimager. The membrane was stripped and rehybridized twice.

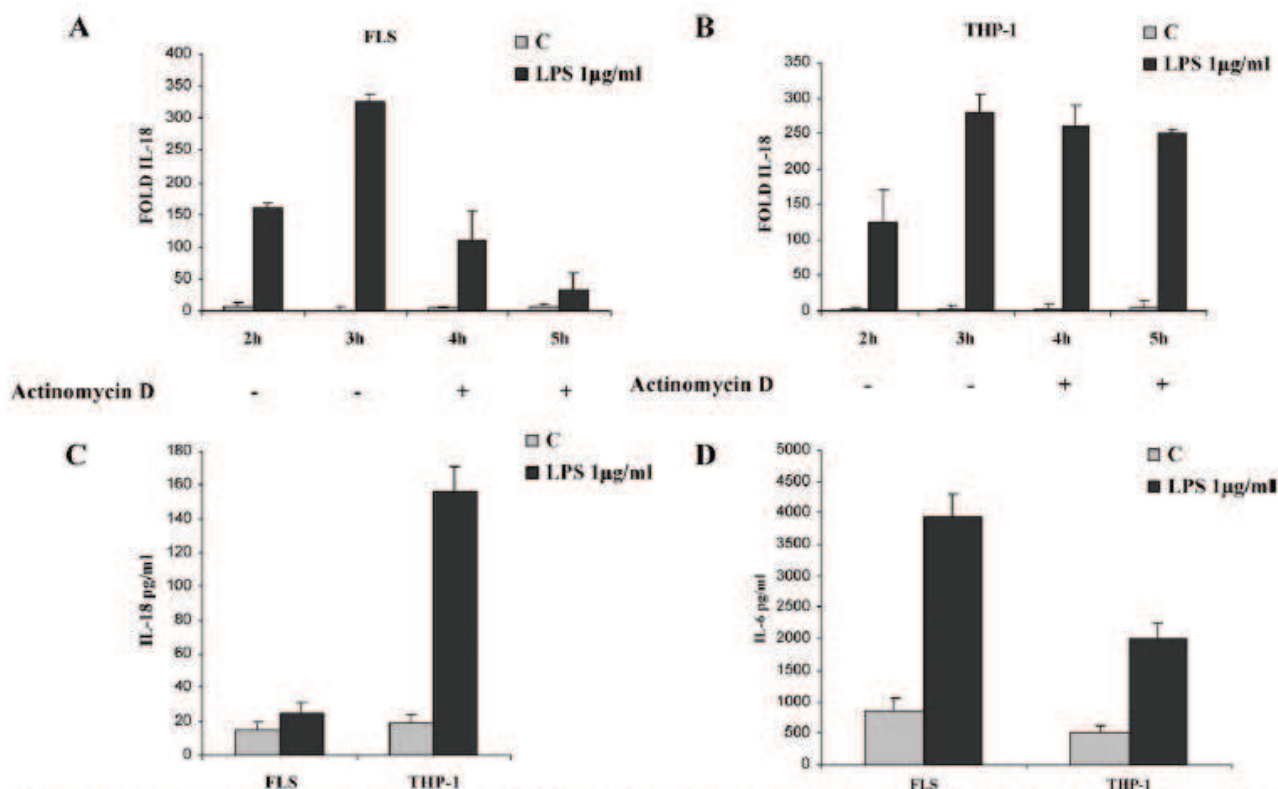


FIGURE 1. Effect of LPS on IL-18 mRNA expression and release by RA FLS and THP-1 cells. *A* and *B*, IL-18 mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR in RA FLS (*A*) and THP-1 cells (*B*) activated with LPS (1 μ g/ml) for 2 and 3 h, or incubated for another 1–2 h with actinomycin D. Results were normalized to GAPDH and expressed as the fold change compared with samples from cells incubated in medium (*C*). *C*, IL-18 release by activated RA FLS and THP-1 cells was determined by ELISA in culture supernatants, harvested 24 h after stimulation with LPS (1 μ g/ml) or medium (*C*). *D*, IL-6 release was determined by ELISA in culture supernatants harvested 24 h after stimulation with LPS (1 μ g/ml) or medium (*C*). Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments.

Transfections and luciferase assay

The Clear-MiR anti-miR-346 used in our study was designed to inhibit efficiently the activity of miR-346. It consists of a sequence of 21 nucleotides complementary to the miRNA and was supplied by Eurogentec. The miR-346 mimic was supplied by Dharmatech.

Transient transfection of FLS with Clear-MiR miRNA inhibitor (200 nM) and reporter constructs (200 ng/ml) was performed using the human dermal fibroblast Nucleofector kit from Amata as previously described (27). Transient transfection of THP-1 cells with miR-346 mimic (200 nM) was performed using the cell line Nucleofector kit V from Amata. FLS and THP-1 cells were then plated in 24-well plates (2×10^5 cells/well and 10^6 cells/well, respectively). All assays were performed 24 h after transfection. Controls were conducted with the Clear-MiR negative control or with the mimic miRNA negative control. Transfection efficiency was evaluated with the pmaxGFP vector.

Transfection of HEK293 cells plated in 24-well plates (2×10^5 cells/well) with reporter constructs and miR-346 mimic (200 nM) was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 48 h cells were washed and lysed with passive lysis buffer (Promega), and *f-luc* and *Renilla luciferase (r-luc)* activities were determined using the dual-luciferase reporter assay system (Promega) and a luminometer (Glo-Max; Promega). The relative reporter activity was obtained by normalization to *r-luc* activity.

Cell numbers and cell viability were assessed using the MTT test. IL-18 release was measured in culture supernatants by a heterologous two-site sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions.

Western blot

Cells (10^6 ; FLS and THP1) were incubated for various times (24 h) with LPS (1 μ g/ml). Controls were performed with cells maintained in medium with 5% heat-inactivated FCS for 6 h. After stimulation, cells were centrifuged and the pellets were suspended for 20 min on ice in 300 μ l of ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 130 mM

NaCl, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, and protease inhibitors). Lysates were centrifuged for 10 min at $14,000 \times g$ at 4°C, and supernatants were subjected to SDS-PAGE and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked using 1% BSA in TBS (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl) for 1 h at 25°C. The blots were incubated with anti-Btk mouse IgG mAbs (BD Transduction Laboratories) for 2 h at 25°C followed by incubation with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG mAbs (1 h at 25°C) and detected by ECL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate; Pierce) according to the manufacturer's instructions. To confirm the presence of equal amounts of proteins, bound Abs were removed from the membrane by incubation in 62.5 mM Tris (pH 6.7), 100 mM 2-ME, and 2% SDS for 30 min at 50°C and reprobed again with anti- β -actin (clone AC-74; Sigma-Aldrich) mouse mAbs.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t* test. Values were compared between different groups in the experiment. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

LPS induced synthesis of IL-18 mRNA in RA FLS

In this study, we first verified the capacity of LPS from *S. abortus equi* to stimulate IL-18 mRNA expression in RA FLS. Quantitative RT-PCR was performed with RNA isolated from control and activated FLS. Stimulation with LPS at a concentration of 1 μ g/ml resulted in an increasing amount of IL-18 transcript, which was detectable within 2 h and increased up to 3 h (the mean increases were 150-fold for 2 h and 300-fold for 3 h) (Fig. 1A). No constitutive expression of IL-18 mRNA was detectable in control cells. We verified also that this cytokine was not released in activated

cell supernatants: although LPS activation induced IL-6 secretion, activated FLS did not release any detectable amount of mature IL-18 in cell culture supernatants (Fig. 1, C and D). THP-1 cells were used as a control: upon LPS treatment, the level of IL-18 transcript was strongly up-regulated, which resulted in a high accumulation of IL-18 in the supernatant (Fig. 1, B–D). Moreover, using actinomycin D (cells were incubated with LPS for 3 h and then for another 1 and 2 h with actinomycin D at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), we observed a rapid decay of IL-18 mRNA (330-fold to 45-fold) in FLS cells but not in LPS-activated THP-1 cells (300-fold to 275-fold), which confirms the IL-18 mRNA instability in LPS-activated RA FLS (Fig. 1, A and B).

LPS induced synthesis of miRNAs targeting IL-18 mRNA in RA FLS

To examine the potential involvement of miRNAs in the regulation of IL-18 mRNA instability, we used two strategies. We first used a bioinformatic approach to identify potential miRNAs targeting IL-18 mRNA. An online search of the miRBase Target database (microrna.sanger.ac.uk/) demonstrated that 49 miRNAs have been predicted to potentially target the 3'-UTR region of the human IL-18 mRNA. In this approach, each miRNA is given a score, reflecting the local complementarity between miRNA seed sequences and the 3'-UTR region of the IL-18 mRNA. For this study, we focused on miRNA miR-197, as it showed the best score among all candidate miRNAs targeting IL-18 mRNA and it was predicted to form a thermodynamically stable complex with the considered mRNA (free energy = -25.35 kcal/mol).

We stimulated RA FLS with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or medium and measured miR-197 levels by quantitative RT-PCR. We found that LPS did not induce miR-197 expression in RA FLS after 6 h of stimulation as compared with unstimulated control RA FLS (Fig. 2A).

In parallel, we analyzed the global expression profile of miRNAs using a microarray-based approach after exposure of RA FLS to LPS to identify LPS-induced miRNAs. FLS were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or medium for 6 h and the extracted RNAs were compared using a DNA microarray containing 409 oligonucleotide probes complementary to miRNAs of human origin. Fourteen miRNAs predicted to be able to target IL-18 mRNA were present on the array.

After LPS challenge, this initial screening identified 63 miRNAs, the expression levels of which were increased or attenuated in response to LPS. Data are presented on a scatter plot showing \log_{10} -transformed signal intensities for each probe on both channels for the Cy3-labeled media controls and Cy5-labeled samples stimulated with LPS (Fig. 2B).

Among the miRNAs showing an up-regulation following LPS treatment, 15 were up-regulated >2-fold. Within these 15 up-regulated miRNAs, 1 miRNA potentially targeting IL-18 mRNA showed a strong expression level in LPS-treated cells compared with control cells: miR-346 (>7-fold). The expression of miR-197, which was included in the array, was not modified after activation with LPS, confirming preceding results.

After LPS challenge, the array revealed also a strong up-regulation in the expression of miR-30d, miR-10a, and miR-125b. Interestingly, these miRNAs are predicted to target the 3'-UTR of IL-1 β and TNF- α . The expression of 42 miRNAs was down-regulated, especially miR-633, miR-320, and let-7a (<0.5). The main results are presented in Table I.

To confirm the validity of miR-346 induction as assessed by the microarray analysis, quantitative RT-PCR was performed using primers that recognized their respective mature forms. Consistent with the microarray findings, miR-346 was strongly induced by

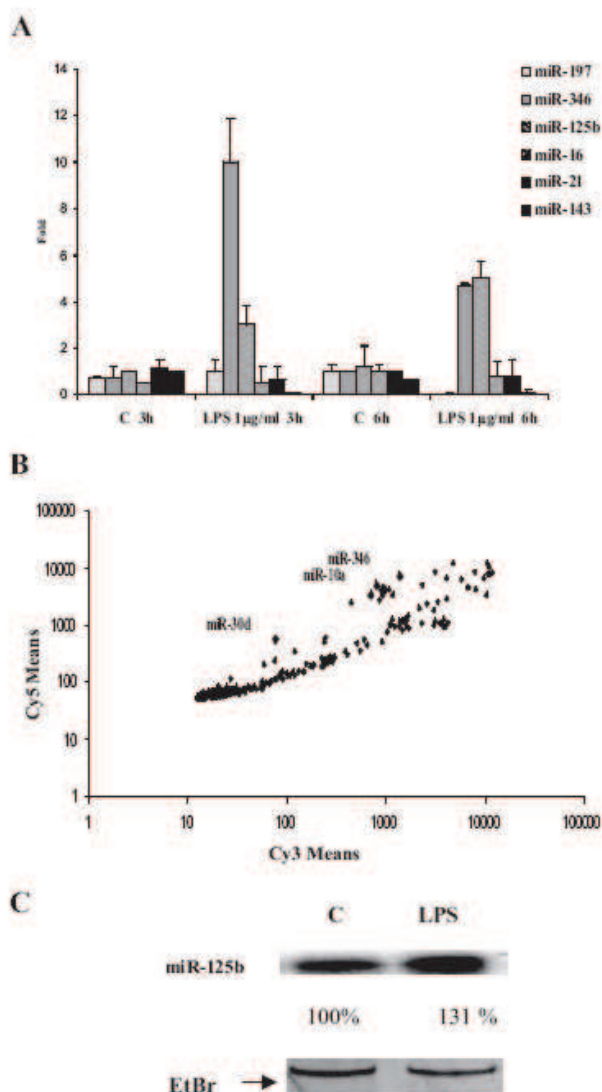


FIGURE 2. Microarray and quantitative RT-PCR analysis of miRNA expression in LPS-activated RA FLS. **A**, MiR-346, miR-125b, miR-197, miR-16, miR-21, and miR-143 levels were determined by quantitative RT-PCR in RA FLS stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 and 6 h. U6 small nuclear RNA was used as endogenous control for data normalization. The control (C) corresponded to untreated cells. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments. **B**, RA FLS were stimulated with medium or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 h. RNA was extracted and used in a microarray assay to determine the expression levels of 409 human miRNAs. Data are presented on a scatter plot showing \log_{10} -transformed signal intensities for each probe on both the channel for the Cy3-labeled control and the Cy5-labeled 6-h LPS-treated samples and represent the mean values. Each dot represents one miRNA probe. Main results are summarized in Table I. **C**, Northern blot analysis of miR-125b expression was performed under the same conditions with locked nucleic acid-modified oligodeoxynucleotides complementary to the indicated miRNAs. RNA was used as a loading control. The results are representative of three different experiments.

LPS (the mean increases were 11-fold for 3 h and 5-fold for 6 h) (Fig. 2A); however, we were unable to confirm this result by Northern blot analysis (data not shown). MiR-125b was detected in activated cells either by Northern blot analysis or quantitative RT-PCR and the observed changes were confirmed by either means (Fig. 2, A and C). The validity of the results was also confirmed by

Table I. *MiRNA differentially expressed between nonactivated RA FLS and LPS-activated RA FLS**

Name	Intensity Ratio of Cy5/Cy3
hsa-miR-346	7.01
hsa-miR-10a	6.38
hsa-miR-10b	4.94
hsa-miR-30d	5.99
hsa-miR-30c-2, hsa-miR-30c-1	3.41
hsa-miR-487b	3.33
hsa-miR-596	3.07
hsa-miR-100	2.88
hsa-miR-30b	2.84
hsa-miR-125b	2.70
hsa-miR-508	2.67
hsa-miR-585	2.44
hsa-miR-563	2.36
hsa-miR-411	2.12
hsa-miR-155	1.7
hsa-let-7a	0.34
hsa-miR-320	0.32
hsa-miR-633	0.48

*Data are presented on intensity ratio of the Cy3-labeled media controls and Cy5-labeled samples stimulated with LPS.

quantitative RT-PCR using miR-16, miR-21, and miR-143, the expression of which was not modified by LPS in the array (Fig. 2A).

IL-18 synthesis is repressed posttranscriptionally by miR-346 in LPS-activated RA FLS

To study the functional consequence of miR-346 induction on IL-18-release by LPS-activated RA FLS, we performed miRNA inhibition experiments. We used an antisense oligonucleotide complementary to miR-346 to block its activity, and the Clear-MiR was used as a negative control. Oligonucleotides were transfected in FLS at a concentration of 200 nM. A plasmid encoding GFP was cotransfected to evaluate transfection efficiency.

Transfection of miR-346 antisense molecules impaired endogenous miRNA expression by a factor of 2 as compared with miR-346 expression in activated cells transfected with an anti-miR control as assessed by quantitative RT-PCR analysis (Fig. 3A).

We also performed experiments demonstrating the fate of the IL-18 mRNA in RA FLS transfected with miR-346 antisense molecules or anti-miRNA control and incubated with LPS for 3 h and then for another 2 h with actinomycin D. As compared with the control, we observed a stabilization of IL-18 mRNA (Fig. 3B).

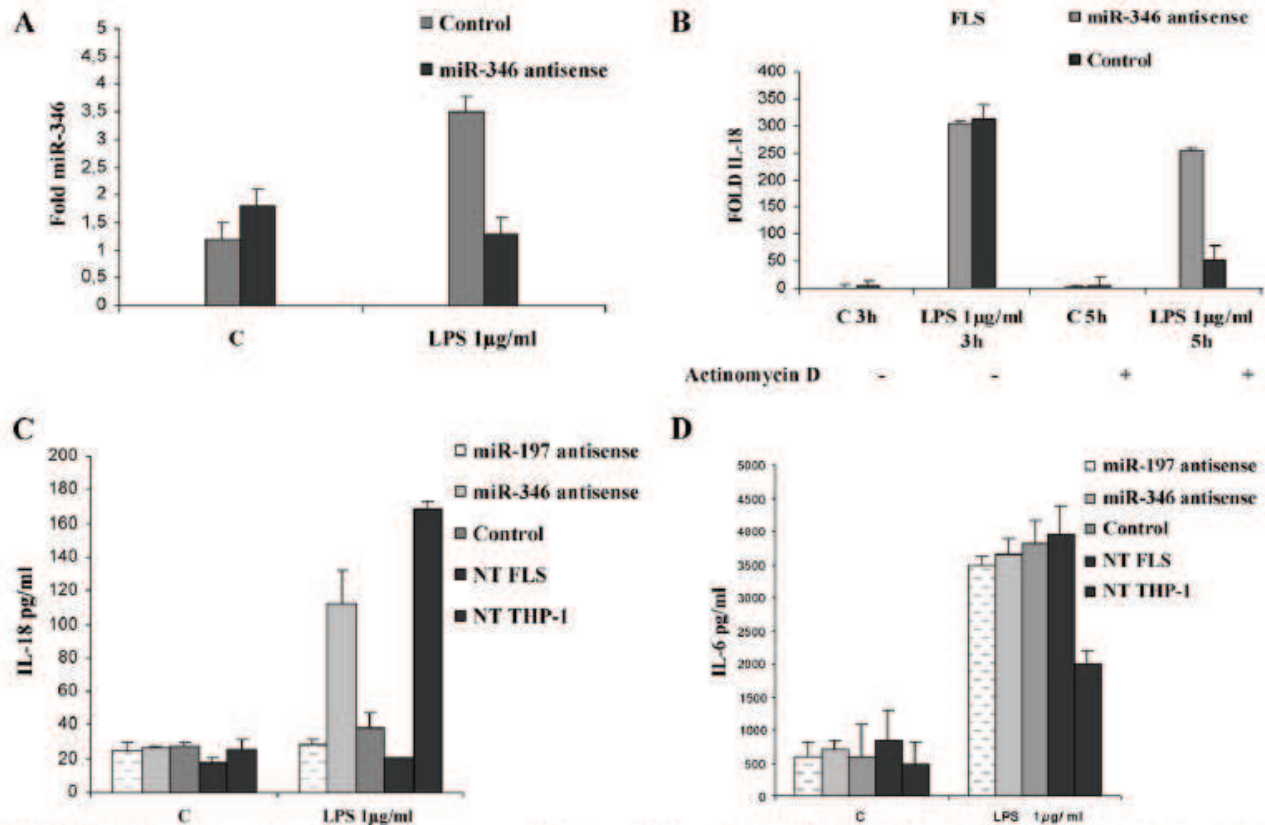


FIGURE 3. Effect of transfection of miRNA antisense molecules on IL-18 synthesis by RA FLS. **A**, RA FLS were transfected with miR-346 antisense molecules or with the Clear-MiR negative control (Control). LPS (1 µg/ml) activation of transfected RA FLS was performed 24 h posttransfection for 6 h. MiR-346 expression was determined by quantitative RT-PCR. U6 small nuclear RNA was used as endogenous control for data normalization. **B**, IL-18 mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR in RA FLS transfected with miR-346 antisense molecules or with the Clear-MiR negative control (Control). LPS (1 µg/ml) activation of transfected cells was performed 24 h posttransfection for 3 h, and cells were then incubated for another 2 h with actinomycin D. Results were normalized to GAPDH and expressed as the fold change compared with samples from cells incubated in medium (C). **C** and **D**, RA FLS were transfected with miR-346, miR-197 antisense molecules, or with the Clear-MiR negative control (Control). LPS (1 µg/ml) activation of transfected RA FLS was performed 24 h posttransfection. Nontransfected RA FLS and THP-1 cells were used as negative and positive controls (NT). IL-18 and IL-6 release was determined by ELISA in culture supernatants harvested 24 h after stimulation with LPS (1 µg/ml) or medium (C). Data are expressed as the mean of triplicate samples ± SD and are representative of three independent experiments.

We next tested whether alteration of miR-346 cellular levels affected IL-18 protein release by LPS-stimulated FLS. We transfected cells with antisense molecules for 24 h and then measured IL-18 release by FLS stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 h at 37°C . Supernatants were tested for IL-18 secretion levels by ELISA measurements. As illustrated in Fig. 3C, treatment with LPS significantly induced IL-18 release by activated RA FLS transfected with antisense oligonucleotides targeting miR-346 (120 vs 25 pg/ml) as compared with activated FLS transfected with control oligonucleotides or with oligonucleotides targeting another miRNA (miR-197). A similar increase in IL-18 secretion was obtained in nontransfected LPS-activated THP-1 cells used as positive control. No IL-18 release was observed in nontransfected but LPS-activated RA FLS (Fig. 3C). The effect of transfection on cell viability was also determined by the MTT test, with no significant difference being observed for cells transfected with targeting and nontargeting antisense oligonucleotides (data not shown).

The transfection of antisense oligonucleotides did not impair FLS activation since nontransfected FLS as well as FLS transfected with targeting and nontargeting miRNA inhibitors produced IL-6 after 24 h of activation with LPS (Fig. 3D).

Taken together, these data demonstrate that miR-346 is implicated in the negative regulation of IL-18 synthesis in LPS-activated FLS.

miR-346 repressed IL-18 synthesis in LPS-activated THP-1 cells

We next tested by transient transfection whether the presence of miR-346 affected IL-18 mRNA expression and IL-18 release in LPS-activated THP-1 cells. THP-1 cells did not express miR-346 when activated with LPS for 3 and 6 h as assessed by quantitative RT-PCR (Fig. 4A). We transfected THP-1 cells with miR-346 mimic for 24 h and incubated cells with LPS for 3 h and then for another 2 h with actinomycin D. As compared with the control, we observed that transfection of miR-346 mimic in THP-1 cells induces a degradation of IL-18 mRNA (Fig. 4B). We also measured IL-18 release by transfected cells stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 h at 37°C . As illustrated in Fig. 4C, cells transfected with miR-346 mimic showed a significant decrease of IL-18 release as compared with IL-18 secretion by activated cells transfected with the miRNA mimic negative control or nontransfected LPS-activated THP1 cells used as positive control. Collectively, these results confirm that miR-346 plays a role in the control of IL-18 release in a cell type-independent manner.

miR-346 did not directly regulate the expression of IL-18

Computer analysis predicted that miR-346 might directly target the 3'-UTR of human IL-18 transcript (Fig. 5A), suggesting that this miRNA could play a direct role in IL-18 posttranscriptional regulation. To test the hypothesis of a direct regulation by miR-346, we cotransfected HEK293 cells with a luciferase reporter fused to IL-18 3'-UTR along with miR-346 mimic. FLS were also transfected with the same construct and then activated with LPS. Transfections in both kinds of cells did not result in a measurable change in luciferase activity (Fig. 5, B and C). These results indicate that miR-346 does not repress directly the expression of IL-18.

miR-346 repressed Btk expression in LPS-activated RA FLS

Btk is a nonreceptor tyrosine kinase belonging to the Tec family of protein tyrosine kinases, and recent studies have shown that Btk is involved in the stabilization of various cytokine mRNAs such as TNF- α (28–30). FLS express Etk, which is implicated in IL-6 and IL-8 release by activated FLS, but they fail to express constitutively or after LPS activation either Btk mRNA or the mature protein. Surprisingly, we found by quantitative RT-PCR that trans-

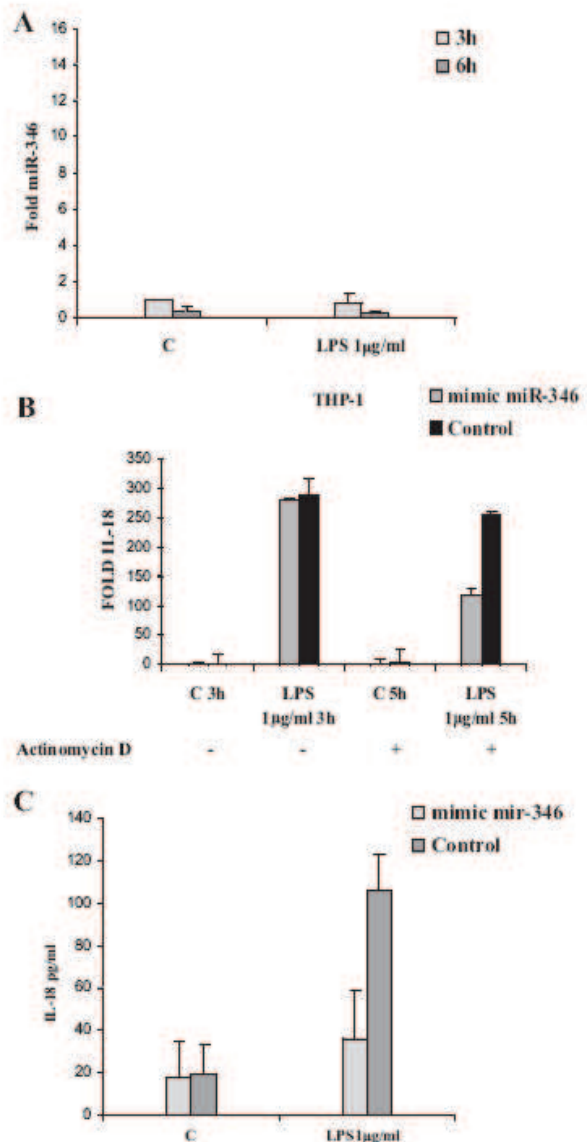


FIGURE 4. Effect of transfection of miR-346 mimic on IL-18 synthesis by THP-1 cells. **A**, MiR-346 expression was analyzed in THP-1 cells activated for 3 and 6 h with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) by quantitative RT-PCR. U6 small nuclear RNA was used as endogenous control for data normalization. **B**, IL-18 mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR in THP-1 cells transfected with miR-346 mimic or with the miRNA mimic negative control (Control). Cells were activated with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) 24 h posttransfection for 3 h and incubated for another 2 h with actinomycin D. Results were normalized to GAPDH and expressed as the fold change compared with samples from cells incubated in medium (C). **C**, THP-1 cells were transfected with miR-346 mimic or with the miRNA mimic negative control (Control) and activated with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) 24 h posttransfection. IL-18 release was determined by ELISA in culture supernatants harvested 24 h after stimulation with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) or medium (C). Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments.

fection of FLS with the antisense oligonucleotides targeting miR-346 led to the induction of Btk mRNA expression after activation with LPS compared with activated cells transfected with the negative control (Fig. 6A). These results point to a putative effect at the transcriptional level. We also measured Btk expression by Western

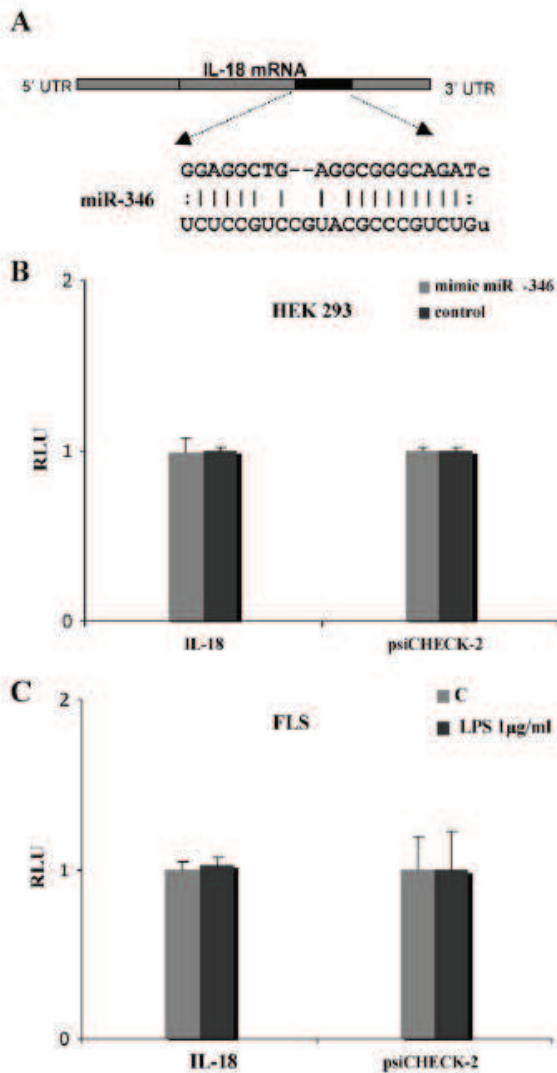


FIGURE 5. MiR-346 does not regulate the expression of IL-18 directly. *A*, Sequence alignment of miR-346 and its target sites in the 3'-UTR of IL-18 mRNA. *B* and *C*, Targeting of miR-346 to the 3'-UTR of IL-18 mRNA. A reporter construct with the potential binding site for miR-346 in the 3'-UTR of IL-18 was generated. HEK293 cells were transiently cotransfected with the reporter construct and either miR-346 mimic or miRNA mimic negative control (Control) (*B*); RA FLS were transfected with the reporter construct and activated with LPS (1 µg/ml) (*C*). Luciferase activities were measured for 48 h and normalized to the control psiCHECK-2 luciferase level. Bars represent the mean ± SD from three independent experiments.

blotting analysis of FLS stimulated with LPS for 24 h at 37°C. As shown in Fig. 6*B*, inhibition of miR-346 led also to a strong expression of the protein. Thus, these data collectively indicate that miR-346 inhibits Btk expression in LPS-activated RA FLS.

We also found that in THP-1 cells transfected with miR-346 mimic, Btk expression was down-regulated (Fig. 6*B*) and that miR-346 did not repress Btk expression directly, as transfection of HEK293 cells with a luciferase reporter fused to Btk 3'-UTR along with miR-346 mimic did not result in a measurable change in luciferase activity (Fig. 6*C*).

Btk regulates IL-18 release in LPS-activated RA FLS

We therefore hypothesized that miR-346 inhibits Btk expression in RA FLS, which could result in the subsequent inhibition of IL-18.

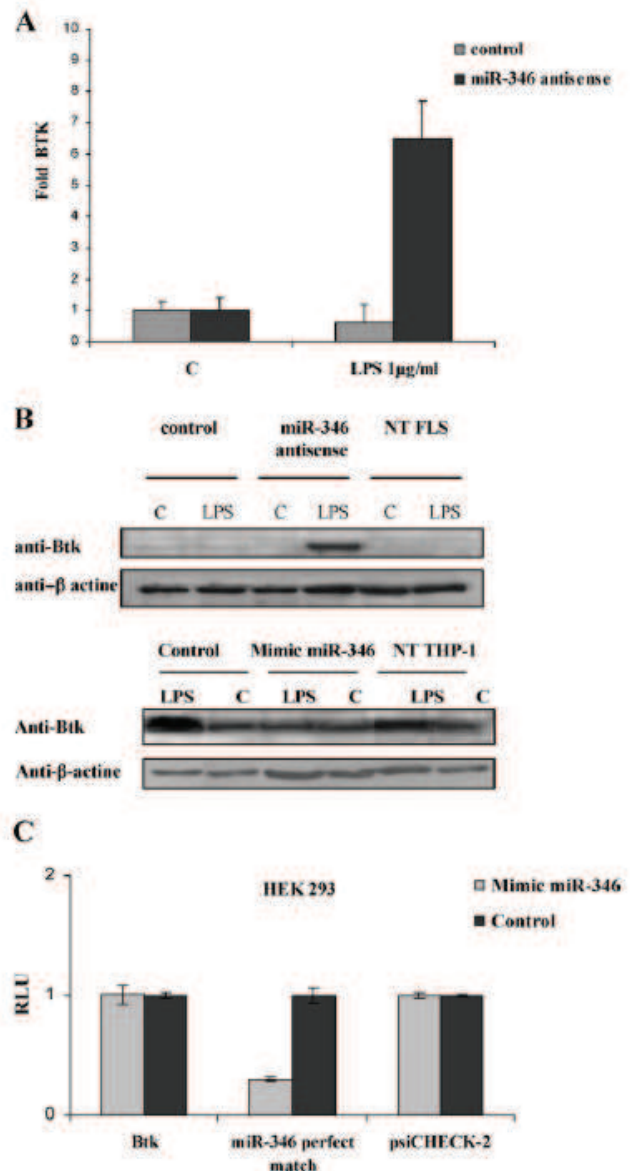


FIGURE 6. MiR-346 regulates the expression of Btk in activated RA FLS and THP-1 cells. *A*, Btk mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR in RA FLS transfected with miR-346 antisense molecules or with the Clear-MiR negative control (Control). LPS (1 µg/ml) activation of transfected cells was performed 24 h posttransfection for 6 h. Results were normalized to GAPDH and expressed as the fold change compared with samples from cells incubated in medium (C). *B*, Btk expression was determined by Western blotting with anti-Btk mouse mAbs in FLS transfected with miR-346 antisense molecules or with the Clear-MiR negative control or in nontransfected FLS. Twenty-four hours posttransfection, FLS were either incubated in 5% FCS medium (C) or activated with LPS for 24 h. Similar experiments were performed with THP-1 cells transfected with the miR-346 mimic or the miRNA mimic negative control. For protein loading control, membranes were reprobbed with anti-β-actin mouse mAbs. The results shown are representative of three separate experiments. *C*, MiR-346 does not regulate the expression of Btk directly. A reporter construct with the 3'-UTR of Btk or with the miR-346 perfect match were generated. HEK293 cells were transiently cotransfected with the reporter constructs and with either miR-346 mimic or miRNA mimic negative control (Control). Luciferase activities were measured for 48 h and normalized to the control psiCHECK-2 luciferase level. Bars represent the mean ± SD from three independent experiments.

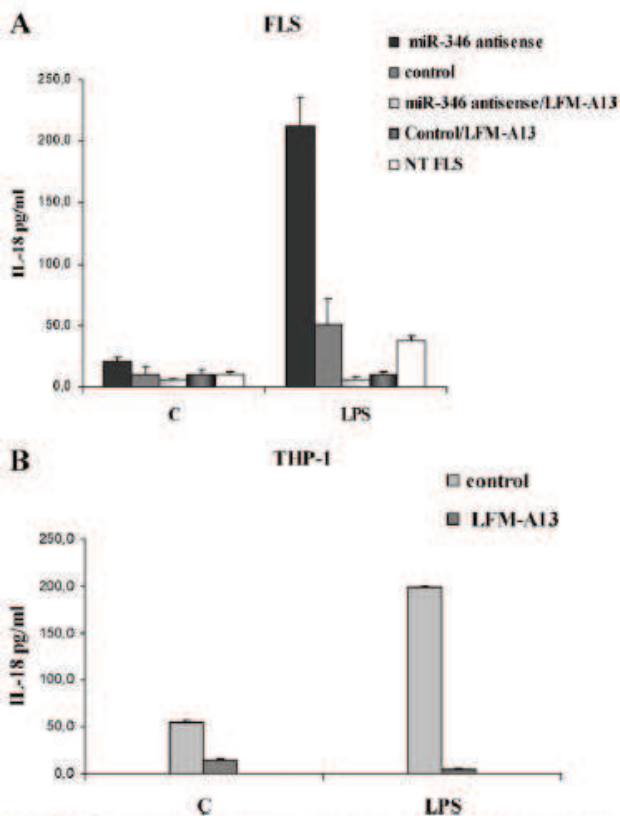


FIGURE 7. Btk regulates IL-18 expression. *A*, RA FLS were transfected with miR-346 antisense molecules or with the Clear-MiR negative control (Control) for 24 h. IL-18 release by FLS preincubated with LFM-A13 and then stimulated with LPS for 24 h was evaluated by ELISA. Nontransfected RA FLS were used as negative controls (NT). *B*, THP-1 cells were pretreated with LFM-A13 for 1 h before activation with LPS (1 μ g/ml) for 24 h.

We transfected FLS with antisense molecules targeting miR-346 for 24 h and then examined IL-18 release by FLS pretreated with LFM-A13, a Btk inhibitor, before LPS stimulation. In this case, IL-18 production induced by LPS was impaired in cells treated with LFM-A13 when compared with cells not treated with the inhibitor (Fig. 7*A*). Similarly, in THP-1 cells activated by LPS in the presence of LFM-A13, IL-18 release was strongly inhibited (Fig. 7*B*). These results demonstrate that IL-18 release is Btk-dependent. Taken together, our data indicate an important role for miR-346 and Btk in the regulation of IL-18 release by RA FLS.

Discussion

The key findings in this study are that LPS induces the expression of miR-346 in PRR-activated synoviocytes from RA patients and that this miRNA negatively regulates the IL-18 response of FLS by inhibiting the transcription of the Btk gene. One important observation obtained from previous results was that PRRs-activated FLS, in contrast to other resident cells from the synovial membrane such as macrophages, have a more restricted cytokine profile: they up-regulate, for example, IL-18 mRNA, but release of this cytokine is impaired via translational suppression, and similar results were obtained with TNF- α and IL-1 (data not shown). IL-18 is normally produced from macrophage-like cells, but some epithelial cells such as gastric epithelial cells release this cytokine in response to *Helicobacter pylori* infection (31). These data suggest that IL-18 protein expression is tightly regulated depending of

the origin of the cell. This study was designed to test the possibility that PAMPs might induce cellular miRNAs that target IL-18 transcripts in FLS and inhibit its release.

An initial microarray screen identified 63 miRNAs, the expression of which was increased or attenuated in FLS in response to LPS. This approach revealed a promising result insofar as one miRNA predicted to target IL-18 transcript was considerably up-regulated: miR-346. This was suggested by an online search of the miRBase Target database maintained by the Sanger Institute, which predicts potential target sequences of miRNAs. The change in expression of miR-346 was then validated by quantitative RT-PCR but not by Northern blot. In fact, some mature miRNAs are produced at low levels and are not detected by Northern blot, but they are still functional, suggesting that high levels of mature miRNAs are not necessary for their efficient inhibition (32). A small variation in one component that is upstream of a transduction cascade can have strong effects in the end.

When comparing our microarray data with previous studies from others, we found similarities as well as differences. Recently, Taganov et al. analyzed miRNA expression in a monocytic cell line treated with LPS (20). They found that miR-146a, miR-155, and miR-132 were endotoxin-responsive genes. Similar results were obtained by Stanczyk et al. (33) in RA FLS activated with either TNF- α or TLR ligands such as LPS, bacterial lipopeptide, and poly(I:C). They also observed an up-regulation of miR-146a and miR-155. Similarly, we also found that miR-155 is up-regulated in response to LPS, but more faintly than miR-346. These results confirm the important role of miR-155 in innate immune response (34). However, the arrays of Stanczyk et al. (33) never revealed the up-regulation of miR-346, which was one of the most overexpressed miRNAs in RA FLS activated with LPS. A simple possible explanation for this discrepancy could be that their screen did not include the oligonucleotide probe for miR-346: only 200 sequences complementary to mammalian miRNAs were tested in the Taganov et al. (20) studies. It is also possible that miR-346 was not detected in cells treated for 8 h with LPS. In fact, quantitative RT-PCR analysis indicated that miR-346 reached its highest level by 3 h and was still present but at reduced levels by 6 h. To assess the reproducibility of the data, the array was performed twice with FLS isolated from different patients, and we found in every instance that miR-346 was overexpressed. Of note, we could not detect miR-146a/b in LPS-activated RA FLS, but it was demonstrated that this miRNA family, which is implicated in TLR signaling and in endotoxin tolerance, has a rather complicated mode of regulation of expression (35). Weber et al. (36) also reported the up-regulation of miR-346, as well as miR-197, in follicular thyroid carcinoma compared with follicular adenoma. They linked the up-regulation of these two miRNAs to cellular proliferation. We did not observe a significant effect of miR-346 on cell viability as assessed by MTT assay.

IL-18 is present in significantly elevated levels in the synovium of RA patients and is mainly produced by macrophages and dendritic cells. Its expression was demonstrated to correlate with the inflammatory phase of the disease. Studies with RA synovial cell culture have shown increased production of NO as well as TNF- α , IFN- γ , and IL-6 after stimulation with IL-18. This suggests that IL-18 is a pre-TNF- α cytokine (37–39). The expression of the IL-18 gene is regulated at different levels, such as control of promoter activity, degradation of mRNA, and posttranslational regulation through processing of the inactive precursor pro-IL-18 to an active form via activation of caspase 1 (40). Two different promoters are controlling the expression of IL-18, one constitutively active and one inducible by LPS. Additionally, IL-18 mRNA does not contain an AU-rich element within the 3'-UTR region, which

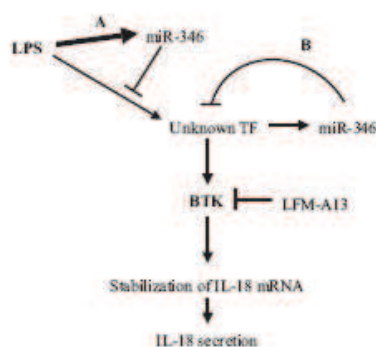


FIGURE 8. Model of action for miR-346 and Btk in IL-18 secretion regulation. See text for details. TF indicates transcription factor.

is a motif known to promote rapid mRNA degradation, and this implies that IL-18 mRNA may have a longer half-life than ARE-containing transcripts (41, 42). However, we demonstrated that IL-18 mRNA is very unstable in LPS-activated RA FLS and that this instability negatively regulates IL-18 release (6).

It was thus important to investigate whether the expression levels of miR-346 could modulate IL-18 expression. RA FLS were transfected with the antisense miR-346 inhibitor. For the first time, we demonstrated that inhibition of endogenously expressed miR-346 by an anti-miR-346 oligoribonucleotide markedly increased IL-18 expression. Further evidence of miR-346 inhibitory effect on IL-18 release was obtained by transient transfection of miR-346 mimic in LPS-activated THP-1 cells. Taken together, these data clearly suggest that one of the functions of miR-346 is to turn off IL-18 expression in response to LPS.

We also demonstrated, using luciferase reporter constructs containing the 3'-UTR of the human IL-18 gene, that miR-346 does not directly regulate the expression of IL-18. A general principle regarding miRNAs is that each miRNA can potentially regulate a wide spectrum of protein-coding genes. This suggests that miRNA can be involved in the regulation of multiple independent physiological processes. Thus, it was tempting to speculate that miR-346 may use different mechanisms to down-regulate at a posttranscriptional level the expression of IL-18. Several reports have established that Btk is implicated in TLR signaling and regulates TNF- α synthesis by stabilizing its mRNA, without having any effect on IL-6 or IL-12 release (28). FLS do not express either Btk mRNA or the mature protein but Itk, another Tec kinase, which was demonstrated to be implicated in IL-6 and IL-8 release in response to integrin $\alpha_5\beta_1$ and TLR4 stimulation (27). Results obtained here demonstrated that transient transfection of miR-346 antisense induced a strong expression of Btk in FLS and reestablished IL-18 release. Moreover, inhibition of induced Btk by LFM-A13 led to the impairment of IL-18 secretion by RA FLS. These data demonstrated the implication of miR-346 in Btk expression that results in IL-18 release.

Interestingly, as in THP-1 cells transfection of miR-346 mimic diminished protein expression, we investigated whether miR-346 was capable of a direct inhibition of Btk by using a luciferase reporter assay. A direct inhibition was not observed. Thus, as previously demonstrated with FLS, miR-346 inhibits IL-18 secretion by an indirect mechanism involving the regulation of Btk. The interaction between miR-346 and Btk must involve other yet-undefined factors acting probably at the transcriptional level.

We propose a model in which LPS would induce expression of both Btk and miR-346 through two distinct transcription factors (Fig. 8A) or through a common transcription factor (Fig. 8B). The

induced Btk would then act on stabilizing IL-18 mRNA, which would ultimately result in its secretion. Blocking Btk either chemically (with the inhibitor LFM-A13) or by overexpressing miR-346 (in THP-1 cells) would therefore result in the inhibition of IL-18 secretion. The action of miR-346 could be upstream of the transcription factor inducing Btk expression (Fig. 8A) or, alternatively, miR-346 could regulate its own transcription factor in a feedback loop manner (Fig. 8B). The latter model would explain why miR-346 is only transiently detected after LPS challenge of FLS cells and seems to gradually disappear.

In conclusion, our findings provide evidence that miRNAs, which are induced by bacterial ligands, can act as potential negative regulators of inflammation and may be novel targets for immunomodulating inflammatory responses in humans. These data also demonstrated that cytokine secretion by resident cells of target organs of autoimmunity can be negatively regulated at the post-transcriptional level by miRNAs. Understanding these complex controls has important implications for the development of future therapeutic applications.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Firestein, G. S. 2003. Evolving concept of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356–361.
- Muller-Ladner, U., C. Ospelt, S. Gay, O. Distler, and T. Pap. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* 9: 223–230.
- Al-Okla, S., C. Chatenay-Rivauday, J. P. Klein, and D. Wachsmann. 1999. Involvement of $\alpha_5\beta_1$ integrins in interleukin 8 production induced by oral viridans streptococcal protein VIII in cultured endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 1: 1157–1168.
- Filer, A., K. Raza, M. Salmon, and C. D. Buckley. 2008. The role of chemokines in leucocyte-stromal interactions in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci.* 13: 2674–2685.
- Pierer, M., J. Rethage, R. Seibl, R. Lauener, F. Brentano, U. Wagner, H. Hantzel, B. A. Michel, R. E. Gay, S. Gay, and D. Kyburz. 2004. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J. Immunol.* 172: 1256–1265.
- Müller-Ladner, U., J. Kriegsmann, B. N. Franklin, S. Matsumoto, T. Geiler, R. E. Gay, and S. Gay. 1996. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am. J. Pathol.* 149: 1607–1615.
- Zeisel, M. B., L. N. Neff, J. Randle, J. P. Klein, J. Sibilia, and D. Wachsmann. 2005. Impaired release of IL-18 from fibroblast-like synoviocytes activated with protein VII, a pathogen-associated molecular pattern from oral streptococci, results from defective translation of IL-18 mRNA in pro-IL-18. *Cell. Microbiol.* 174: 7393–7397.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116: 281–297.
- Griffith-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A. J. Enright. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34: D140–D144.
- Chen, K., and N. Rajewsky. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 8: 93–103.
- Gameau, N. L., J. Wilus, and C. J. Wilusz. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 113–126.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9: 102–114.
- Eun, J. L., B. Myungwon, G. Yuny, D. J. Brackett, G. J. Nuovo, and D. Thomas. 2008. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 14: 3–42.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, and W. Filipowicz. 2007. Repression of protein synthesis by miRNA: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 17: 118–126.
- Rajewsky, N. 2006. MicroRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* 38: 8–13.
- Lewis, B. P., C. Burge, and D. P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15–20.
- Farazi, T. A., S. A. Juranek, and T. Tuschl. 2008. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* 135: 1201–1214.
- Liang, Y., D. Ridzon, L. Wong, and C. Chen. 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8: 166.
- Sonkoly, E., M. Sthable, and A. Pivarski. 2008. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin. Cancer Biol.* 18: 131–140.

20. Taganov, K. D., M. P. Boldin, K. J. Chang, and D. Baltimore. 2006. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 12481–12486.
21. Tili, E., J. J. Michaille, A. Cimino, S. Costinean, C. D. Dumitru, B. Adair, M. Fabbri, H. Alder, C. G. Liu, G. A. Calin, and C. M. Croce. 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* 179: 5082–5089.
22. Dechanet, J., J. L. Taupin, P. Chomarat, M. C. Rissoan, J. F. Moreau, J. Banchereau, and P. Miossec. 1994. Interleukin-4 but not interleukin-10 inhibits the production of leukemia inhibitory factor by rheumatoid synovium and synovio-cytes. *Eur. J. Immunol.* 24: 3222–3228.
23. Amett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. Macshane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31: 315–324.
24. Neff, L., M. Zeisel, J. Sibilía, M. Scholler-Guinard, J. P. Klein, and D. Wachsmann. 2001. NF- κ B and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synovio-cytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci. *Cell. Microbiol.* 3: 703–712.
25. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.
26. Chatenay-Rivauday, C., I. Yamodo, M. Sciotti, J. A. Ogier, and J. P. Klein. 1998. The A and the extended V N-terminal domains of streptococcal protein I/III mediate the production of TNF- α in the monocyte cell line THP-1. *Mol. Microbiol.* 29: 39–48.
27. Semaan, N., G. Alsaleh, J. E. Gottenberg, D. Wachsmann, and J. Sibilía. 2008. Erk/BMX, a Btk family tyrosine kinase, and Mal contribute to the cross-talk between MyD88 and FAK pathways. *J. Immunol.* 180: 3485–3491.
28. Horwood, N. J., T. H. Page, J. P. Mcdaid, C. D. Palmer, J. Campbell, T. Mahon, F. M. Brennan, D. Webster, and B. M. Foxwell. 2006. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6 production. *J. Immunol.* 176: 3635–3641.
29. Doyle, S. L., C. A. Jefferies, C. Feighery, and L. A. J. O'Neill. 2007. Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 282: 36953–36960.
30. Lee, K. G., S. Xu, E. T. Wong, V. Tergaonkar, and K. P. Lam. 2007. Bruton's tyrosine kinase separately regulates NF- κ B p65RelA activation and cytokine inter-leukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B cells. *J. Biol. Chem.* 283: 11189–11198.
31. Yamauchi, K., I. J. Choi, H. Lu, H. Ogiwara, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka. 2008. Regulation of IL-18 in *Helicobacter pylori* infection. *J. Immunol.* 180: 1207–1216.
32. Obernosterer, G., P. J. F. Leuschner, M. Alenius, and J. Martinez. 2006. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* 12: 1161–1167.
33. Stanczyk, J., D. M. L. Pedrioli, F. Brentano, O. Sanchez-Pemate, C. Kolling, R. E. Gay, M. Detmar, S. Gay, and D. Kyburz. 2008. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 1001–1009.
34. O'Connell, M. R., K. D. Taganov, M. P. Boldin, G. Cheng, and D. Baltimore. 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1604–1609.
35. Taganov, K. D., M. P. Boldin, and D. Baltimore. 2007. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26: 133–137.
36. Weber, F., R. E. Teresi, C. E. Broelsch, A. Frilling, and C. Eng. 2006. A limited set of human microRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 3584–3591.
37. Gracie, J. A., R. J. Forsey, W. L. Chan, A. Gilmour, B. P. Leung, M. R. Greer, K. Kennedy, R. Carter, X. Q. Wei, D. Xu, et al. 1999. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 104: 1393–1401.
38. Lotito, A. P. N., C. A. A. Silva, and S. B. V. Mello. 2007. Interleukin-18 in chronic joint diseases. *Autoimmun. Rev.* 6: 253–256.
39. Cho, M. L., Y. O. Jung, Y. M. Moon, S. Y. Min, C. H. Yoon, S. H. Lee, S. H. Park, C. S. Cho, D. M. Jue, and H. Y. Kim. 2005. Interleukin-18 induces the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rheumatoid arthritis synovial fibroblast via AP-1-dependent pathways. *Immunol. Lett.* 103: 159–166.
40. Mariathasan, S., and D. M. Monack. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 31–40.
41. Bufler, P., F. Gamboni-Robertson, T. Azam, S. H. Kim, and C. A. Dinarello. 2004. Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. *J. Biochem.* 381: 503–510.
42. Jing, Q., S. Huang, S. Guth, T. Zarubin, A. Motoyama, J. Chen, F. Di Padova, S. C. Lin, H. Gram, and J. Han. 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120: 623–634.

TRAVAUX 2

« La protéine Btk régule l'expression du TNF- α via TLR4 dans la polyarthrite rhumatoïde par l'intermédiaire de la protéine Tristetraprolin ou TTP et l'inhibition de Btk par le miR-346 permet d'avoir une activité anti-TNF- α »

Nous avons démontré dans l'étude précédente que miR-346 régulait négativement l'expression de la protéine Btk dans les FLS en réponse au LPS. Par ailleurs, des travaux antérieurs avaient montré que la protéine Btk interviendrait sur la stabilité de l'ARNm du TNF- α en réponse au LPS dans les macrophages par un mécanisme jusqu'alors inconnu. Nous nous sommes proposé d'étudier le mécanisme de régulation de Btk sur l'expression du TNF- α dans la polyarthrite rhumatoïde par les FLS et par les cellules mononuclées THP-1.

La régulation post-transcriptionnelle du TNF- α dépend de plusieurs mécanismes dont celui des protéines RBP avec, parmi elles, la protéine TTP. Nous avons montré que l'absence de synthèse de TNF- α par instabilité de son ARNm dans les FLS en réponse au LPS dépendait de la présence de la TTP. Nous avons montré que la TTP était négativement régulée par la protéine Btk ; l'inhibition de l'expression de cette protéine Btk soit par le miR-346 soit par le LFMA-13, un inhibiteur spécifique, entraînait une augmentation de l'expression de la TTP et la diminution de celle du TNF- α .

Nous avons utilisé ce modèle physiologique anti-TNF- α des FLS dans les cellules mononuclées THP-1 sécrétant du TNF- α en réponse au LPS. Nous avons montré que la transfection d'un analogue du miR-346 permettait une diminution significative de la synthèse de TNF- α en réponse au LPS, via l'inhibition de Btk.

L'utilisation de ce miR-346 en thérapeutique pourrait s'avérer être un anti-inflammatoire efficace dans la polyarthrite rhumatoïde, pathologie fortement liée au TNF- α . Nous avons proposé et débuté des travaux sur des modèles murins de polyarthrite rhumatoïde avec administration de ce miR-346.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans PLOS One (2011) :

Semaan N*, Frenzel L*, Alsaleh G, Suffert G, Gottenberg JE, Sibilja J, Pfeffer S, Wachsmann D. miR-346 controls release of TNF- α protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization. **PLoS One**. 2011;6(5):e19827. doi:10.1371 / journal.pone.0019827. Epub 2011 May 17.

* These authors contributed equally to this work.

miR-346 Controls Release of TNF- α Protein and Stability of Its mRNA in Rheumatoid Arthritis via Tristetraprolin Stabilization

Noha Semaan^{1,2}, Laurent Frenzel^{1,2}, Ghada Alsaleh¹, Guillaume Suffert², Jacques-Eric Gottenberg¹, Jean Sibia¹, Sebastien Pfeffer^{2*}, Dominique Wachsmann^{1*}

1 Laboratoire Physiopathologie des Arthrites, EA4438, Université de Strasbourg, UFR Sciences Pharmaceutiques, Illkirch, France and **2** Département de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg Haute-pierre, France, **2** Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, Strasbourg, France

Abstract

TNF- α is a major cytokine implicated in rheumatoid arthritis. Its expression is regulated both at the transcriptional and posttranscriptional levels and recent data demonstrated that miRNAs are implicated in TNF- α response in macrophages. LPS-activated FLS isolated from RA patients express TNF- α mRNA but not the mature protein. This prompted us to look for miRNAs which could be implicated in this anti-inflammatory effect. Using a microarray, we found two miRNAs, miR-125b and miR-939 predicted to target the 3'-UTR of TNF- α mRNA, to be up-regulated in RA FLS in response to LPS, but their repression did not restore mature TNF- α expression in FLS. We showed previously that miR-346, which is upregulated in LPS-activated FLS, inhibited Btk expression that stabilized TNF- α mRNA. Blocking miR-346 reestablished TNF- α expression in activated FLS. Interestingly, transfection of miR-346 in LPS-activated THP-1 cells inhibited TNF- α secretion. We also demonstrated that TTP, a RNA binding protein which inhibited TNF- α synthesis, is overexpressed in activated FLS and that inhibition of miR-346 decreases its expression. Conversely, transfection of miR-346 in LPS-activated THP-1 cells increased TTP mRNA expression and inhibited TNF- α release. These results indicate that miR-346 controls TNF- α synthesis by regulating TTP expression.

Citation: Semaan N, Frenzel L, Alsaleh G, Suffert G, Gottenberg J-E, et al. (2011) miR-346 Controls Release of TNF- α Protein and Stability of Its mRNA in Rheumatoid Arthritis via Tristetraprolin Stabilization. PLoS ONE 6(5): e19827. doi:10.1371/journal.pone.0019827

Editor: Joseph El Khoury, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, United States of America

Received: January 3, 2011; **Accepted:** April 5, 2011; **Published:** May 17, 2011

Copyright: © 2011 Semaan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by an ATIP starting grant from CNRS to Sébastien Pfeffer and by grants from Bristol Myers Squibb, Roche, Pfizer, Courtin Foundation and CAMPLP to Dominique Wachsmann. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Pr. Dominique Wachsmann's work is supported by grants from Bristol Myers Squibb, Roche, Pfizer, Courtin Foundation and CAMPLP. Dr. Pfeffer's work is supported by ANR and the Ligue contre le Cancer. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: s.pfeffer@ibmc-cnrs.unistra.fr (SP); dominique.wachsmann@pharma.u-strasbg.fr (DW)

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

One of the key players in rheumatoid arthritis (RA) is TNF- α and therapies targeting this cytokine have already proved beneficial [1]. In RA, TNF- α is produced by many cell types, mainly by macrophages and dendritic cells in response to interactions between pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pattern-recognition receptors (PRRs) or to the cytokine environment [2].

The resident cells of the joint space, the fibroblast-like synoviocytes (FLS), play a crucial role in RA [3,4,5]. They are implicated in the inflammatory response essentially by synthesizing cytokines, chemokines, prostanoids, nitric oxide (NO), and pro-angiogenic factors. FLS play a key role in osteoarticular destruction and take also part in the differentiation and activation of osteoclasts by the RANK-RANK ligand pathway, and through the release of PGE-2 and IL-6 [6,7,8]. However RA FLS secrete no TNF- α , a major cytokine implicated in RA [9], but intriguingly they express TNF- α mRNA in response to LPS. This was also

observed with osteoarthritis (OA) and trauma FLS (unpublished data). It was therefore of interest to identify the molecular basis of this anti-inflammatory mechanism. Post-transcriptional regulation of TNF- α expression depends on AU-rich elements (ARE) located in the 3'-untranslated region (UTR) of TNF- α mRNA. RNA binding proteins such as tristetraprolin (TTP), T-cell intracellular antigen (TIA-1) and T-cell intracellular antigen-related protein (TIAR) can bind to ARE of TNF- α mRNA inducing mRNA lability or inhibition of translation [10,11]. Mice lacking TTP develop a systemic inflammatory syndrome characterized by cachexia, dermatitis, erosive arthritis and myeloid hyperplasia [12]. Besides the direct destabilization of mRNA by regulatory proteins, another mode of regulation involves miRNAs [13]. miRNAs are an evolutionarily conserved class of endogenous small non-coding RNAs. They are processed from long primary transcripts by the ribonuclease Drosha in association with DGCR8. After being transported into the cytoplasm, the pre-miRNA is further processed by Dicer and its cofactor TRBP. One strand is then assembled in the RISC complex which always contains a member of the Argonaute family. The miRNA then

guides the RISC complex to its target 3'-UTR leading to a decrease of mRNA stability or inhibition of translation [14,15]. Regulation of miRNAs expression is controlled at the level of transcription, processing and subcellular localization and several recent studies have indicated that these processes can be influenced by factors such as inflammation [16,17]. Since their discovery, miRNAs have been implicated in a wide array of cellular and developmental processes and emerging data have identified an important contribution of miRNAs to the development and control of the inflammatory response [18–21]. For example, Tili et al. [22] demonstrated that up-regulation of miR-155 in LPS-activated macrophages resulted in an enhanced translation of TNF- α mRNA. Mice overexpressing miR-155 produce more TNF- α when challenged with LPS. By contrast, they found miR-125 to be implicated in the posttranscriptional repression of TNF- α mRNA, hence the need for its down-regulation for TNF- α production. A negative correlation between miR-146a expression and TNF- α release was also demonstrated in THP-1 cells [23,24]. These data indicate that miRNAs can exert both negative as well as positive effects in inflammatory pathways and this prompted us to look for miRNAs which could be implicated in the anti-inflammatory effect of LPS in RA FLS. We found two miRNAs, miR-125b and miR-939, which were predicted to target the 3'-UTR of TNF- α mRNA, to be up-regulated in RA FLS in response to LPS, but their repression did not restore either intracellular expression of TNF- α or its release

by LPS-activated FLS. We further demonstrated that inhibition of miR-346, a negative regulator of Bruton's tyrosine kinase (Btk) expression, reestablished mature TNF- α expression in LPS-activated FLS by blocking TTP expression. In parallel, over-expression of miR-346 in LPS-activated THP-1 cells increased the expression of TTP which resulted in inhibition of TNF- α synthesis. These results indicate that miR-346 controls TNF- α synthesis by regulating TTP expression and can therefore act as a negative regulator of inflammation.

Results

LPS does not induce TNF- α production by RA FLS

We first confirmed that TNF- α was not released by FLS in response to LPS. FLS (5×10^5 cells) were activated with LPS from *Salmonella abortus equi* (1 μ g/ml) for 3 h, 6 h and 24 h and activated-cells supernatants were analyzed by ELISA. Although LPS stimulation induced IL-6 secretion (Figure 1A), activated FLS did not release any detectable amount of mature TNF- α in cell culture supernatants (Figure 1B). THP-1 cells were used as a positive control: upon LPS treatment, a high accumulation of TNF- α was found in cell culture supernatants with values reaching 2400 pg/ml (6 h) representing a five-fold increase compared to control (C) (Figure 1C). Finally, we demonstrated by western blotting that non-activated or LPS-activated FLS did not express the mature protein (Figure 1D).

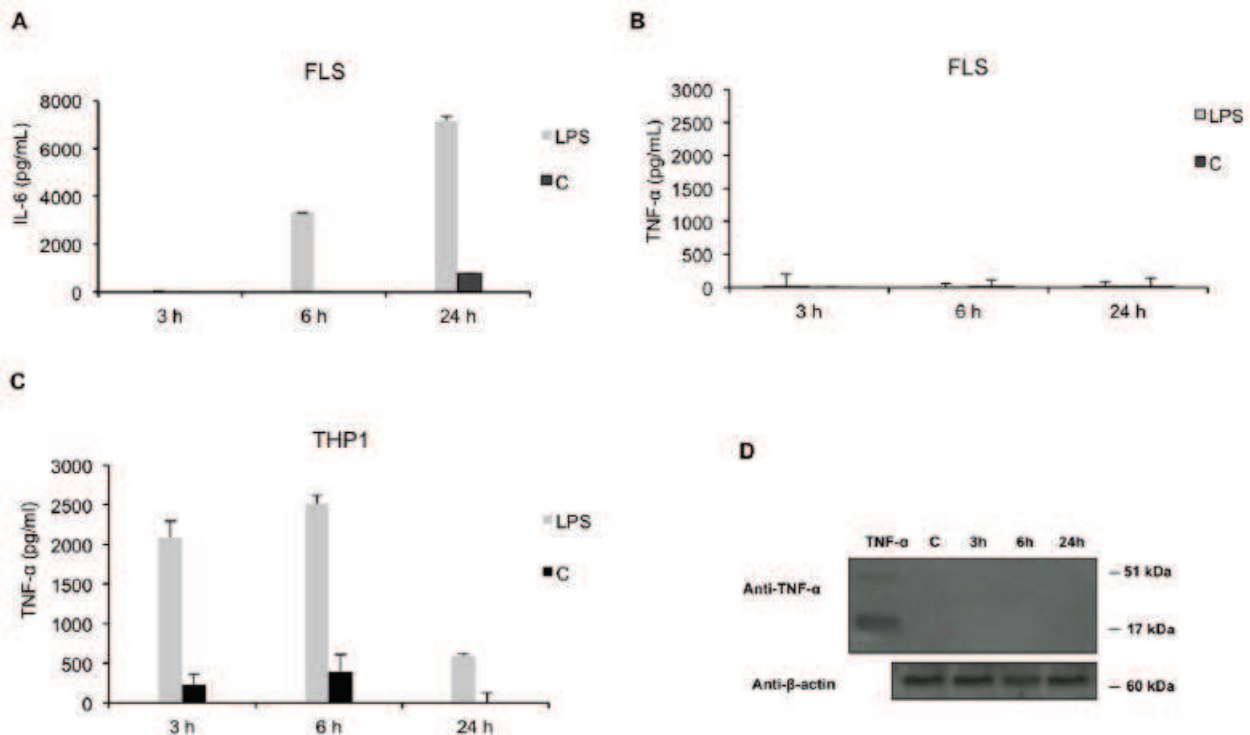


Figure 1. Effect of LPS on TNF- α release by RA FLS and THP-1 cells. A. IL-6 release was determined by ELISA in culture supernatants harvested 3 h, 6 h and 24 h after stimulation with LPS (1 μ g/ml) or medium (C). B, C. TNF- α release by RA FLS and THP-1 cells was determined by ELISA in culture supernatants harvested 3 h, 6 h and 24 h after stimulation with LPS or medium (C). Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD and are representative of three independent experiments. D. TNF- α expression was determined by western-blotting with anti-TNF- α antibodies in RA FLS, 3 h, 6 h and 24 h after stimulation with LPS or medium (C). Recombinant TNF- α was used as control. For protein loading control, membranes were reprobbed with anti- β -actin antibodies. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD of three independent experiments for each patient. doi:10.1371/journal.pone.0019827.g001

LPS induced synthesis of TNF- α mRNA in RA FLS

We then examined the effect of LPS treatment on TNF- α mRNA accumulation in FLS. RT-PCR was performed with RNA isolated from FLS either non-activated or activated with 1 μ g/ml LPS for 2 h, 4 h and 6 h. No constitutive expression of TNF- α mRNA was detectable in control cells, whereas LPS treatment of FLS resulted in a detectable accumulation of TNF- α mRNA within 2 h (Figure 2A). Expression of TNF- α mRNA in FLS was similar to that in THP-1 cells, where TNF- α is normally expressed after LPS treatment (Figure 2B). To investigate the mechanisms responsible for the lack of TNF- α protein synthesis in LPS-activated FLS, cells were incubated with LPS for 3 h and then for another 1 to 4 h with 5 μ g/ml actinomycin D. After 1 h of actinomycin D treatment, TNF- α mRNA became undetectable in LPS-activated FLS (Figure 2C) but not in LPS-activated THP-1 cells, where the mRNA accumulation decreased but was still detectable after 1 and 2 h of actinomycin D treatment (Figure 2D). These results indicate that *de novo* synthesized TNF- α mRNA is unstable in LPS-activated FLS.

TNF- α synthesis is not repressed by miR-125b and miR-939 in LPS-activated RA FLS

Using a DNA microarray, we identified two upregulated miRNAs in LPS-treated cells compared to control cells: miR-125b (2.3 fold) and miR-939 (6.1 fold). We confirmed the induction of miR-125b and miR-939 expression by quantitative RT-PCR analysis. The mean increase was 2 and 7 times for miR-125b and miR-939 respectively, after 6 h of LPS-activation (Figure 3A). Similar experiments were performed in THP-1 cells as control, and no changes in the expression of these miRNAs were observed. Since these two miRNAs were predicted to target TNF- α mRNA, we studied the functional consequence of their inhibition by antisense oligonucleotides on TNF- α release by LPS-

activated RA FLS. As shown in Figure 3B, transfection of miR-125b and miR-939 antisense molecules impaired endogenous miRNAs expression as compared to miR-125b and miR-939 expression in activated cells transfected with a control antisense oligonucleotide. We next tested whether inhibition of miR-125b and miR-939 affected TNF- α protein release in LPS-activated FLS. We transfected FLS for 24 h with antisense oligonucleotides and then measured TNF- α release by LPS-stimulated FLS. As illustrated in Figure 3C, treatment with LPS did not restore TNF- α release by activated RA FLS transfected with antisense oligonucleotides targeting miR-125b, miR-939 or with a combination of these two inhibitors (Figure 3C). No significant effect of antisense oligonucleotides transfection on cell viability was observed, as determined by MTT assay (data not shown). In addition, the transfection of antisense oligonucleotides did not impair FLS activation since FLS transfected with targeting and non-targeting miRNA inhibitors still produced IL-6 after 6 h of activation with LPS (Figure 3D).

Finally, transfection of antisense oligonucleotides did not restore intracellular or membrane bound TNF- α (Figure 3E). Taken together these data demonstrate that miR-125b and miR-939 are not implicated in the down-regulation of TNF- α synthesis in LPS-activated FLS.

Inhibition of miR-346 stabilizes TNF- α mRNA but does not induce TNF- α release from LPS-activated RA FLS

We previously showed that miR-346 which is overexpressed in LPS-activated FLS, inhibited Btk expression [25]. As Btk is implicated in TNF- α mRNA stabilization, we therefore hypothesized that the inhibition of Btk expression in RA FLS by miR-346 could result in the subsequent instability of TNF- α mRNA and therefore lack of TNF- α release.

We first confirmed that miR-346 is overexpressed in FLS but not in THP-1 cells in response to LPS (Figure 4). We then

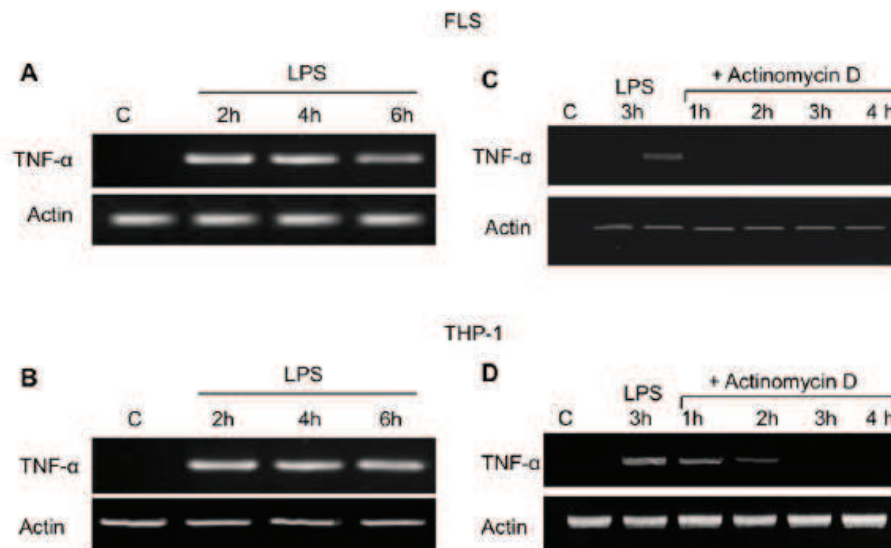


Figure 2. Effect of LPS on TNF- α mRNA expression in RA FLS and THP-1 cells. A, B. TNF- α mRNA expression was determined by RT-PCR in RA FLS (A) and THP-1 cells (B) stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 2 h, 4 h and 6 h. Control cells were incubated for 4 h with medium (C). C, D. RA FLS and THP-1 cells were stimulated for 3 h with LPS and then incubated for another 1, 2, 3 and 4 h with actinomycin D (5 μ g/ml). Control cells were incubated for 3 h with medium. TNF- α mRNA expression was determined by RT-PCR. The results are representative of three different experiments for each patient.

doi:10.1371/journal.pone.0019827.g002

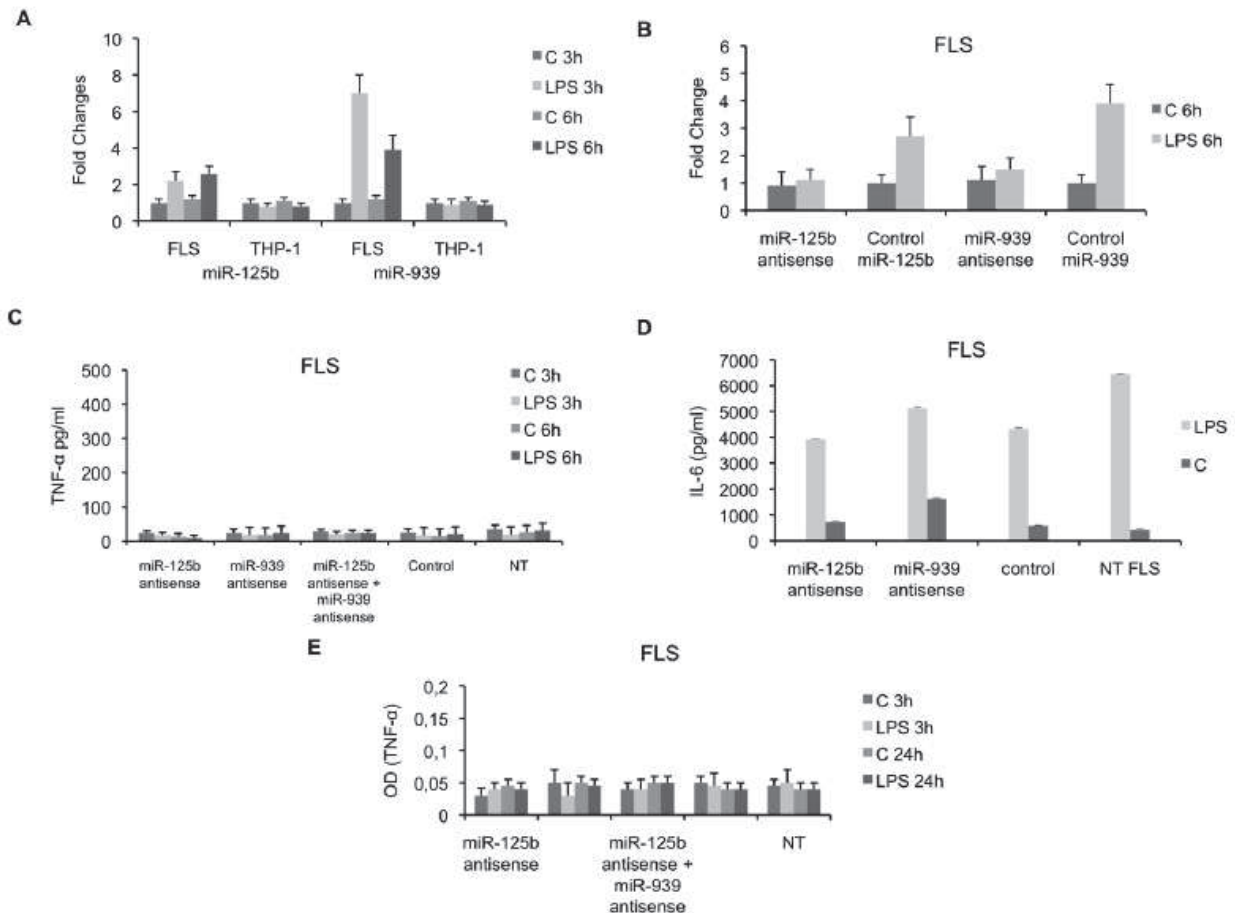


Figure 3. Effect of transfection of miRNA antisense molecules on TNF- α synthesis by RA FLS. **A, B.** MiR-125b and miR-939 levels were determined by quantitative RT-PCR in RA FLS and THP-1 cells stimulated with LPS for 3 h and 6 h. RNAU6 was used as endogenous control for data normalization. The control (C) corresponded to untreated cells. RA FLS were transfected with either miR-125b or miR-939 antisense molecules or in combination or with the Clear-miRTM negative control (control). LPS or medium (C) activation of transfected cells was performed 24 h post-transfection, for 3 h and 6 h. Non transfected RA FLS were used as negative controls (NT). **C, D.** TNF- α and IL-6 release were determined by ELISA in culture supernatants harvested 6 h after stimulation with LPS or medium (C). **E.** Intracellular TNF- α expression was determined in transfected FLS and activated with LPS for 24 h. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD of three independent experiments for each patient. doi:10.1371/journal.pone.0019827.g003

monitored the fate of the TNF- α mRNA in RA FLS transfected with miR-346 antisense oligonucleotides or control antisense oligonucleotides and treated first with LPS for 3 h and then with actinomycin D for another 1, 2, 3 and 4 h. As opposed to the control, we observed a stabilization of TNF- α mRNA after actinomycin D treatment in LPS-activated FLS transfected with miR-346 antisense molecules (Figure 5A). These results indicate that miR-346 plays a role in the control of the stability of TNF- α mRNA. Moreover, we found, using intracellular Elisa, that transfection of FLS with antisense oligonucleotides targeting miR-346, led to the accumulation of intracellular TNF- α after activation with LPS for 6 h. No effect was observed in cells that were not transfected or transfected with a control oligonucleotide (Figure 5B). This result was confirmed by western blotting analysis using anti-TNF- α antibodies (Figure 5C). Nevertheless, treatment with LPS surprisingly did not restore TNF- α release (Figure 5D) or TNF- α membrane expression (data not shown) in activated RA FLS transfected with antisense oligonucleotides targeting miR-346.

miR-346 and Btk regulate TNF- α release in LPS-activated THP-1 cells

We next tested whether miR-346, which inhibits Btk expression in THP-1 cells [25], could impair TNF- α release from THP-1 cells and act as an anti-inflammatory agent in these cells. We thus examined TNF- α release by THP-1 cells stimulated with LPS and pretreated with Leflunomide metabolite analog (LFM-A13), a known inhibitor of Btk. In these conditions, LPS-induced TNF- α production was strongly inhibited when compared with cells not treated with the inhibitor (Figure 6A). These results demonstrate that TNF- α release is Btk-dependent in THP-1 cells.

We next tested whether the transient expression of miR-346 affected TNF- α release in LPS-activated THP-1 cells. We transfected THP-1 cells with miR-346 mimic and, 24 h later, measured TNF- α release after 3 and 6 h of LPS stimulation. As illustrated in Figure 6B, cells transfected with miR-346 mimic showed a significant decrease of TNF- α release compared to cells transfected with the control miRNA mimic. Altogether, these

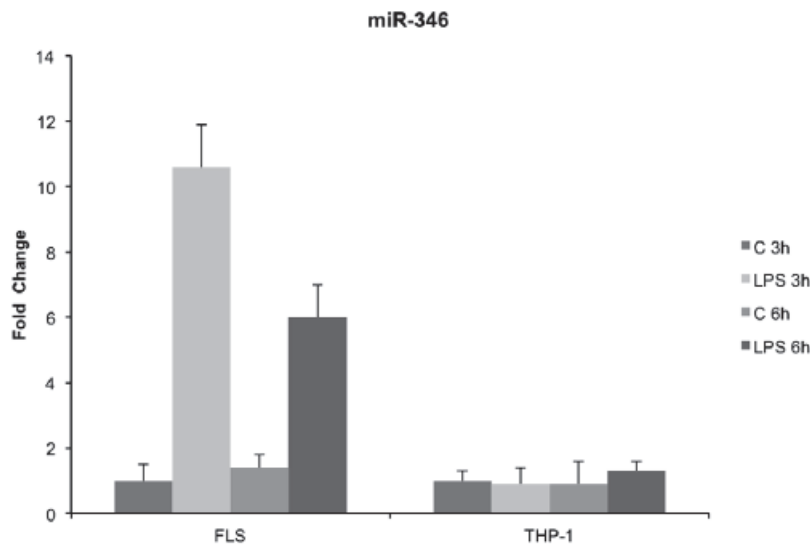


Figure 4. Quantitative RT-PCR analysis of miR-346 expression in LPS-activated RA FLS and THP-1 cells. miR-346 level was determined by quantitative RT-PCR in RA FLS and THP-1 cells stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 3 h and 6 h. U6 small nuclear RNA (RNAU6) was used as endogenous control for data normalization. The control (C) corresponded to untreated cells. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD of three independent experiments for each patient. doi:10.1371/journal.pone.0019827.g004

results confirm that miR-346 participates in the control of TNF- α release in both FLS and THP-1 cells.

Btk regulates TNF- α synthesis and release in LPS-activated FLS and THP-1 cells by controlling TTP expression

Given the prominent role played by TTP in mRNA decay, we looked into the involvement of Btk on the control of TTP expression. To that end, we transfected THP-1 cells with miR-346 mimic for 24 h and measured TTP mRNA expression after stimulation with LPS for 2 and 4 h. As illustrated in Figure 7A, cells transfected with miR-346 mimic showed a significant increase in TTP expression compared to cells transfected with the control miRNA mimic. We also examined TTP mRNA expression by THP-1 cells pretreated with LFM-A13 before LPS stimulation. In this condition, TTP production by LPS-treated cells was also strongly upregulated compared with non-treated cells (Figure 7B).

We next tested whether inhibition of miR-346 affected TTP expression in LPS-activated RA FLS. We transfected miR-346 specific or control antisense oligonucleotides in RA FLS and treated the cells 48 h later with LPS for 2 and 4 h. We observed a decrease of TTP mRNA expression in the presence of miR-346 antisense oligonucleotides but not with control oligonucleotides (Figure 7C).

To further confirm that miR-346 regulated TNF- α synthesis by controlling TTP expression, we co-transfected THP-1 cells with miR-346 mimic and a siRNA targeting TTP for 48 h and measured TNF- α mRNA expression and cytokine release by transfected cells stimulated with LPS. As illustrated in Figure 7 (D, E), treatment of THP-1 cells with a siRNA targeting TTP stabilized TNF- α mRNA and restored TNF- α release by cells co-transfected with miR-346 mimic as compared to cells transfected with miR-346 mimic alone.

Taken together, these results demonstrate that miR-346 and Btk are implicated in the regulation of LPS-induced TTP expression, which in turn controls TNF- α mRNA stability and TNF- α release.

Discussion

As opposed to other cells from the synovial membrane, PRRs-activated FLS fail to release TNF- α . This study was aimed at identifying miRNAs that might be involved in the control of TNF- α release. Our results establish that miR-346 can act as a negative regulator of TNF- α release in RA FLS in response to LPS, by inhibiting transcription of the Btk gene. Moreover, since transfection of miR-346 in macrophages also inhibits TNF- α release induced by LPS, these data are a strong indication that miR-346 plays a global role in the control of the inflammatory response.

In an initial attempt to identify miRNAs involved in the control of TNF- α release, we performed a miRNAs microarray analysis of LPS-activated FLS. miR-125b and miR-939 were strongly induced after LPS treatment, and both were predicted to target TNF- α . This finding correlated well with results from Tili et al. [22], who showed that LPS activation of mouse Raw 264.7 macrophages down regulated miR-125b, which allowed TNF- α synthesis by activated macrophages. This result was also in agreement with the fact that overexpression of miR-125b leads to a significant inhibition of the ERK 1/2 pathway without affecting ERK 1/2 levels consistent with the idea that this miRNA acts upstream of ERK [26]. However, inhibition of both miRNAs with antisense nucleotides was not able to restore either TNF- α intracellular expression or release by LPS-activated FLS. Our results suggest that the inhibition of these miRNAs is not sufficient to override the negative regulatory effect induced by LPS signaling on TNF- α release in FLS. Another non-exclusive possibility would be that they may act in FLS in cooperation with other factors.

Previous studies from our laboratory [25], showed that LPS also induces the expression of miR-346 in LPS-activated RA FLS and that this miRNA regulates negatively IL-18 release by inhibiting Btk expression. Btk is involved in the stabilization of various cytokines mRNAs, including the TNF- α mRNA [27]. Moreover TLR2-mediated stimulation of XLA mononuclear cells resulted in impaired production of TNF- α and IL-1 β while IL-6, IL-8 and IL-

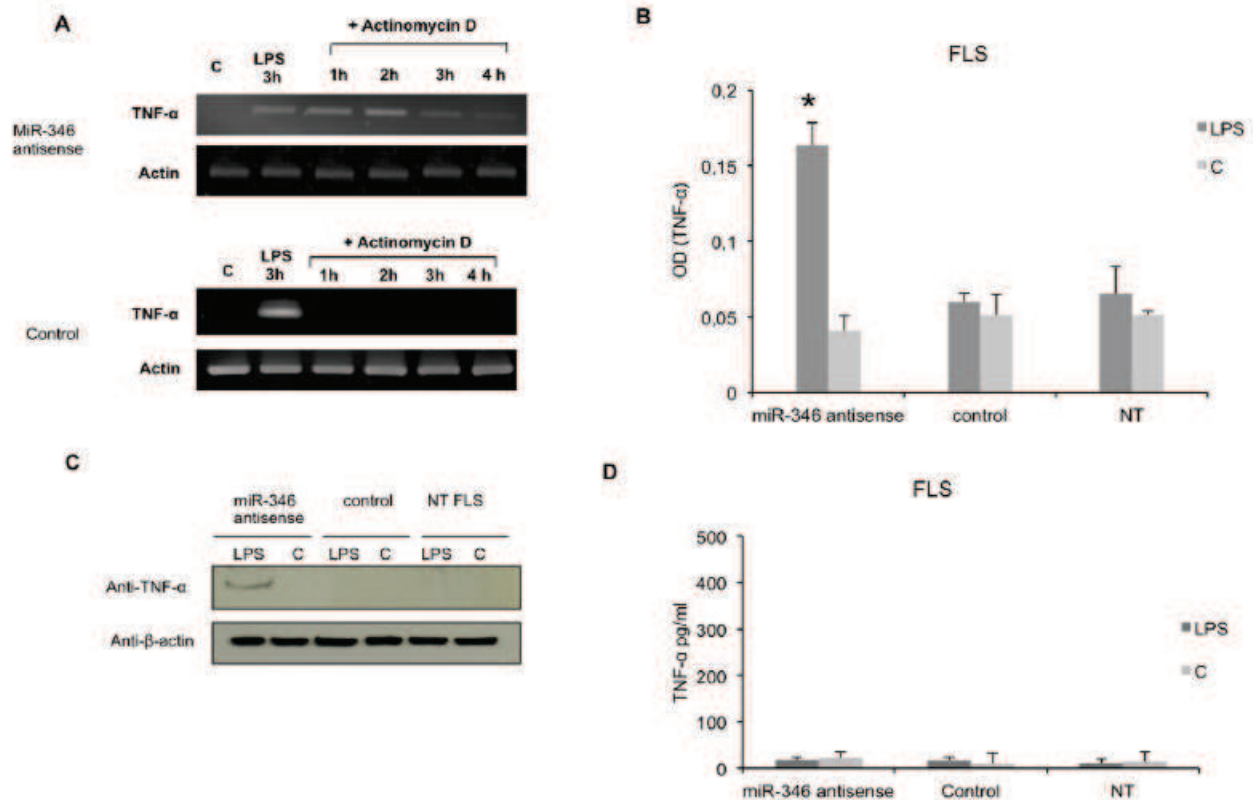


Figure 5. Effect of transfection of miR-346 antagonims on TNF- α mRNA stability and release in RA FLS. A. FLS were transfected with miR-346 antisense molecules or with the Clear-miR™ negative control (control), activated with LPS 24 h post-transfection for 3 h and incubated for another 1, 2, 3 and 4 h with actinomycin D. Control cells were incubated for 3 h with medium (C). NT: non transfected cells. B, C. TNF- α expression was detected using cellular ELISA or western blotting with anti-TNF- α antibodies, in FLS transfected with miR-346 antisense molecules or with the Clear-miR™ negative control (control) or in non transfected FLS (NT). 24 h post-transfection, FLS were either incubated in medium (C) or activated with LPS for 6 h. The results are representative of three different experiments for each patient. D. TNF- α release was determined by ELISA in culture supernatants after stimulation with LPS or medium (C). Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD of three independent experiments for each patient. $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0019827.g005

10 remained unaffected through a pathway involving the p38 MAPK [28]. Similar results were observed with dendritic cells from the same patients; stimulation with TLR2, TLR4, TLR7/8 and TLR3 ligands results in lower release of TNF- α IL-6 and IL-12 production was unaffected [29]. On the contrary, in murine bone marrow-derived mast cells, Btk is dispensable in LPS- or lipopeptide-induced secretion of IL-6 and TNF- α [30]. FLS express the epithelial and endothelial tyrosine kinase (Etk), which is implicated in IL-6 and IL-8 release [31], but they fail to express either Btk mRNA or the mature protein constitutively or after LPS activation. Our results established that in FLS, inhibition of miR-346 expression resulted i) in stabilization of TNF- α mRNA and ii) intracellular expression of the mature protein. However this was not sufficient to override completely the inhibition of TNF- α release in cell supernatants. The fact that TNF- α is neither expressed at the cell surface nor secreted indicates that additional mechanisms exist to regulate TNF- α release from activated FLS. There are multiple transport pathways to the cell surface, which depend on the individual cargo. Recently, Lieu et al. showed that secretion of TNF- α in LPS-activated macrophages is controlled by a trans-Golgi network golgin, p230 which is mobilized in response to LPS [32]. It is possible that in RA FLS this mechanism is

compromised and additional experiments are now required to resolve this possibility.

Further investigations revealed that LFMA-13, a Btk inhibitor, inhibited TNF- α secretion in THP-1 cells. This result was consistent with other reports, which demonstrated that LFMA-13 inhibited the activation of NF- κ B by LPS in THP-1 cells [33]. Moreover, we also demonstrated that transfection of miR-346 mimic in THP-1 cells strongly diminished TNF- α release. As we previously showed that miR-346 inhibits Btk expression in THP-1 cells by an indirect mechanism probably involving yet undefined transcription factors, we propose that in THP-1 cells, the control of TNF- α release by miR-346 involves the inhibition of Btk expression. At present the details of the mechanism that mediate the effect of Btk on TNF- α mRNA stability are unclear. Arisvatham et al. indicated that the components of the ARE-mediated decay pathway are heavily targeted by miRNAs [34]. It appears that ARE control of TNF- α expression may operate at multiple post-transcriptional levels including the miRNAs regulation of ARE-binding proteins.

Among the many ARE-binding proteins that target TNF- α , TTP has emerged as a primary player as it was shown to promote its mRNA lability [11]. As a matter of fact, TTP knocked-out mice

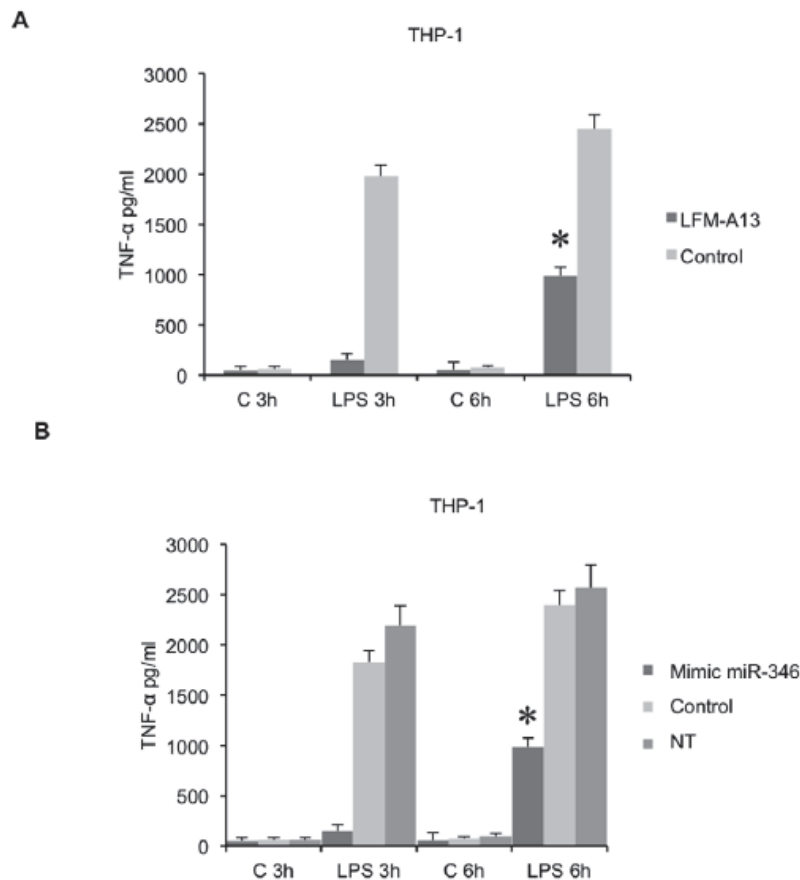


Figure 6. Effect of transfection of miR-346 mimic on TNF- α release by THP-1 cells. **A.** TNF- α release by THP-1 cells preincubated or not (control) with LFM-A13 (172 nM) for 1 h and then stimulated with LPS or medium (C) for 3 and 6 h, was evaluated by ELISA. **B.** THP-1 cells were transfected with miR-346 mimic or with the miRNA mimic negative control (control) and activated 24 h post-transfection with either LPS or medium (C) for 3 and 6 h. TNF- α release was evaluated by ELISA. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD of three independent experiments for each patient. $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0019827.g006

show elevated levels of TNF- α production in response to LPS [12]. The question naturally arose whether Btk would be implicated in TTP expression. We showed that transfection of miR-346 antisense oligonucleotides decreased TTP mRNA expression in LPS-activated RA FLS. Furthermore, we also demonstrated that Btk inhibition by either LFM-A13 or miR-346 mimic transfection increased TTP mRNA accumulation in LPS-activated THP-1 cells. These results suggest that stabilization of TNF- α mRNA by Btk is mediated by down-regulation of TTP.

We therefore propose a model of regulation of TNF- α release in which LPS induces TNF- α mRNA, miR-346 and TTP expression in FLS. Inhibition of Btk expression by miR-346 would then enable stabilization of TTP expression and would therefore result in the rapid decay of TNF- α mRNA. Blocking Btk either chemically (with the inhibitor LFM-A13), or by overexpressing miR-346 (in THP-1 cells), would therefore result in the inhibition of TNF- α secretion (Figure 8A, B). Taken together, our data indicate an important role for miR-346 in the regulation of TNF- α release by controlling Btk which in turn regulates TTP expression.

In conclusion, our findings provide clear evidence that miR-346 which is induced by bacterial ligands can act as a negative regulator of inflammation in human.

Materials and Methods

Reagents

Cell culture media (RPMI 1640, M199 and DMEM), fetal calf serum (FCS), L-glutamine, penicillin, streptomycin, amphotericin B, TRIzol reagent were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). LPS from *Salmonella abortus equi* and type XI collagenase, actinomycin D, LFM-A13 and anti- β -actin mouse IgG monoclonal antibodies were obtained from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). The Lightcycler Faststart DNA Master SYBR Green I was from Roche Applied Science (Penzberg, Germany). The miScript System was obtained from Qiagen (Courtabeuf, France). Clear-miRTM miRNA inhibitors were from Eurogentec (Seraing, Belgium). MiRIDIAN[®] miR-346 mimic and miRIDIAN miRNA mimic negative control and siRNATTP were supplied by Dharmacon (Brebieres, France). Human Dermal Fibroblast NucleofectorTM kit and Cell Line Nucleofector Kit V were from Amaxa (Cologne, Germany). The enzyme immunoassay kits for human TNF- α detection and for human IL-6 detection were from R&D (Lille, France). Anti-Btk mouse IgG monoclonal antibodies were from BD Transduction Laboratories (Le Pont de Claix, France) and anti-TNF- α mouse monoclonal antibodies were from

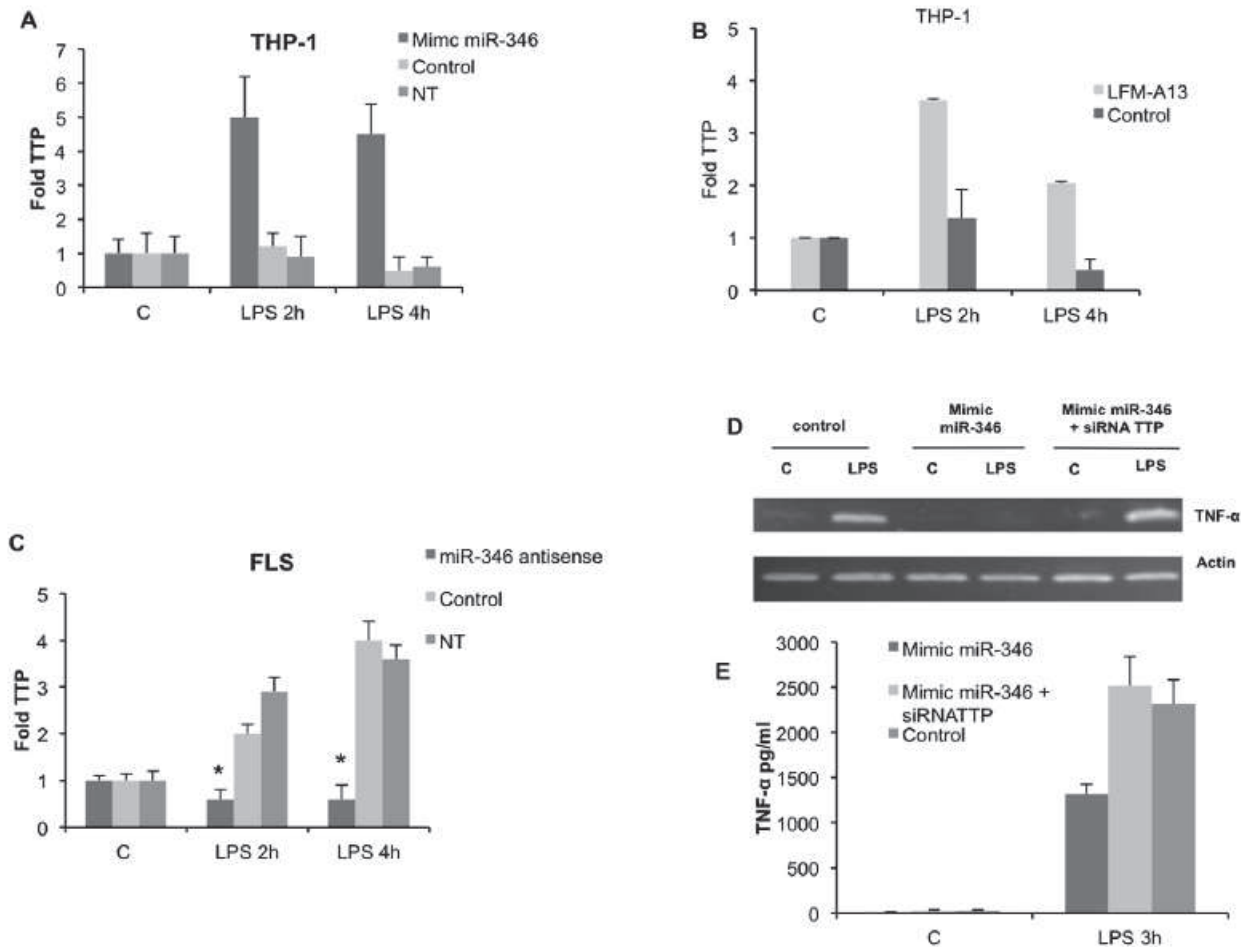


Figure 7. MiR-346 regulates the expression of TTP in activated RA FLS and THP-1 cells. **A, B:** TTP mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR in LPS-activated THP-1 cells transfected with miR-346 antisense molecules or preincubated for 1 h with LFM-A13. **C:** TTP mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR in LPS-activated RA-FLS transfected with miR-346 antisense molecules. Results were normalized to GAPDH and expressed as fold change compared with samples from cells incubated in medium (C). **D, E:** THP-1 cells were transfected with miR-346 mimic, with miR-346 mimic and siRNATTP or with a negative control (control) and activated 48 h post-transfection with either LPS or medium (C). TNF- α mRNA levels were determined using RT-PCR and TNF- α release was evaluated by ELISA. Data are expressed as the mean of triplicate samples \pm SD of three independent experiments for each patient. doi:10.1371/journal.pone.0019827.g007

Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Throughout this study, buffers were prepared with apyrogenic water obtained from Braun Medical (Boulogne, France). The microarray data were submitted to the Minimum Information About Microarray Experiment (MIAME) database with the accession number E-MEXP-1970.

Cell culture

Human FLS were isolated from synovial tissues from four different RA patients at the time of knee joint arthroscopic synovectomy as described previously after informed consent was obtained from patients [35]. The diagnosis was conformed to the revised criteria of the American College of Rheumatology [36]. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki and obtained from all patients. Approval by the ethical committee of the Hopitaux Universitaires de Strasbourg was obtained. FLS cultures were done as previously described [37]. Experiments were performed between the 3rd and the 9th passage.

During that time, cultures were constituted of a homogeneous population of fibroblastic cells, negative for CD16 as determined by FACS analysis. Cell number and cell viability were checked by the MTT test (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test) as described elsewhere [38]. THP-1 cells (no. 88081201, European collection of cell cultures, Salisbury, UK) were cultured as described previously [39].

Cell activation

FLS ($5 \cdot 10^5$ cells) and THP-1 cells (10^7 cells) cells were stimulated with 2 ml of medium alone or medium containing LPS (1 μ g/ml) for 3 h, 6 h and 24 h. After stimulation, supernatants were harvested and assayed for cytokine contents using commercially available ELISA tests for human IL-6 and TNF- α .

Stimulation of cells for total extraction

Total RNA was extracted from human FLS (10^6 cells) or THP-1 cells (10^7 cells) incubated for 2 h, 4 h and 6 h with 2 ml of

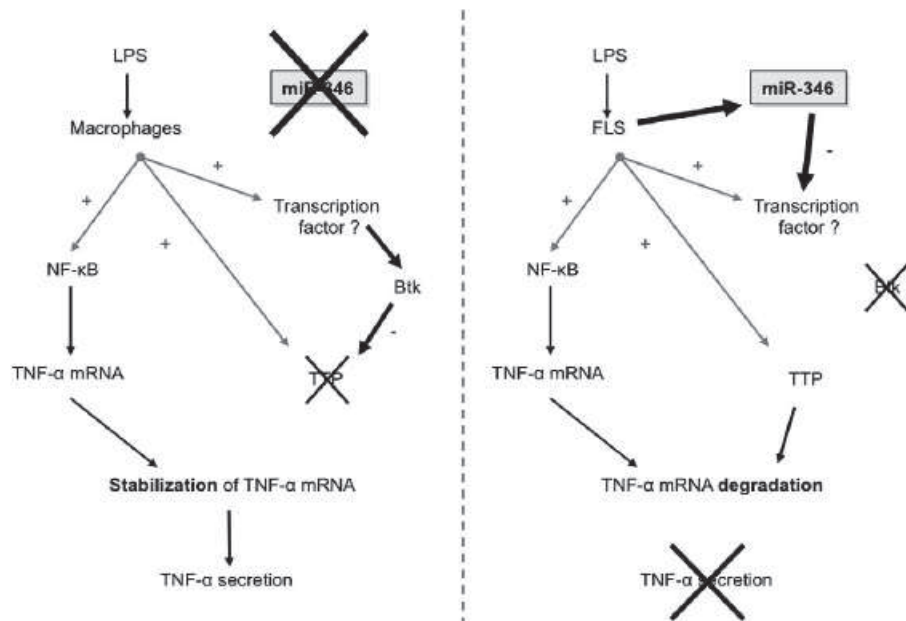


Figure 8. Model of action for miR-346 and Btk in the regulation of TNF- α secretion. See text for details.
doi:10.1371/journal.pone.0019827.g008

medium alone or medium containing LPS (1 μ g/ml) using TRIzol according to the manufacturer's instructions.

Total RNA isolated from FLS and THP-1 cells was reverse transcribed using the First-Strand cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (In Vitrogen) and amplified. For TNF- α , after an initial denaturing at 95°C for 5 min, the temperatures used were 95°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 2 min followed by an extension of 5 min at 72°C. For β -actin, after an initial denaturing at 94°C for 5 min, the temperatures used were 94°C for 1 min, 56°C for 45 s and 72°C for 1 min followed by an extension of 5 min at 72°C. PCR products were separated in 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide. The primers used were: (i) TNF- α : 5'-AGC-ACT-GAA-AGC-ATG-ATC-CGG-3' and 5'-CAT-GGG-CTA-CAG-GCT-TGT-CAC-3'; and (ii) β -actin: 5'-CCA-ACC-GCG-AGA-AGA-TGA-CC-3' and 5'-GAT-CTT-CAT-GAG-GTA-GTC-AGT-3'.

Real-time quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR analyses for miRNAs were performed using the miScript System and the primers (Qiagen). RNA concentrations were determined with a NanoDrop instrument (NanoDrop Technologies). Reverse transcriptase reactions and quantitative RT-PCR were performed according to the manufacturer's protocols. A U6 endogenous control was used for normalization. All reactions were run in triplicate in a Lightcycler Instrument (Roche Applied Science). Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method. All reactions were run in triplicate in a using a Rotor-GeneTM 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science[®], Sydney, Australia). Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method.

Total RNA isolated from FLS was reverse transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (In Vitrogen). Real-time quantitative RT-PCR was

performed in a total volume of 20 μ l using a SensiMix Plus SYBR[®] (Quantace, Corbett Life Science[®], Sydney, Australia), and gene specific primers:

GAPDH: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3'
and 5'-GAGGGATCTCGCTCGCTCCTGGAAGA-3'
TTP: 5'-TCGGGACCCTGGAGCCTGAG-3'
and 5'-AGCCAGCGGTGCCAAGCC-3'

TTP and GAPDH were reverse transcribed and amplified. Amplification products were detected as an increased fluorescent signal of SYBR[®]Green during the amplification cycles. Results were obtained using SDS Software (Perkin Elmer) and evaluated using Excel (Microsoft). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products.

Transfections

The Clear-miR anti-miR-125b, anti-miR-939 and anti-miR-346 used in our study were designed to inhibit efficiently the activity of miR-125b, miR-939 and miR-346. They consist of a sequence of 21 nucleotides complementary to the miRNA.

Transient transfection of FLS with Clear-miRTM miRNA inhibitors (200 nM) was performed using the Human Dermal Fibroblast NucleofectorTM kit from Amaxa as previously described [26]. Transient transfection of THP-1 cells with the miR-346 mimic (200 nM) or with miR-346 mimic and siRNATTP was performed using the Cell Line Nucleofector Kit V from Amaxa. FLS and THP-1 cells were then plated in 24-well plates (2.10⁵ cells per well and 10⁶ cells per well respectively). All assays were performed 24 h for miR-346 mimic and 48 h for siRNATTP, post-transfection. Controls were carried out with the Clear-miRTM negative control or with the mimic miRNA negative control. Transfection efficiency was evaluated with the PmaxGFP vector.

Cell numbers and cell viability were assessed using the MTT test. TNF- α release was measured in culture supernatants by a

heterologous two-site sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions.

Western Blot

10^6 cells (FLS) were incubated for various times (3 h, 6 h and 24 h) with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Controls were performed with cells maintained in medium with 5% heat inactivated FCS for 6 h. After stimulation, cells were centrifuged and the pellets were suspended 20 min on ice in 300 μL of ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 130 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors). Lysates were centrifuged for 10 min at 14,000 g at 4°C and supernatants were subjected to SDS-PAGE and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked using 1% bovine serum albumin in TBS (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl) for 1 h at 25°C. The blots were incubated with mouse anti-TNF- α IgG monoclonal antibodies for 2 h at 25°C followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG monoclonal antibodies (1 h at 25°C) and detected by enhanced chemiluminescence (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce) according to the manufacturer's instructions. To confirm the presence of equal amounts of proteins, bound antibodies were removed from the membrane by incubation in 62.5 mM Tris, pH 6.7, 100 mM β -mercapto-

ethanol, 2% SDS for 30 min at 50°C and reprobed again with anti- β -actin (clone AC-74, Sigma) mouse monoclonal antibodies.

Detection of cellular TNF- α

Transfected FLS (2.10^4 cells) with miR-125b, miR-939 and miR-346 antisense oligonucleotides, were seeded into 96-well plates and then incubated 24 h post-transfection in 200 μL of complete medium containing LPS, (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS pH 7.4 for 20 min. Free aldehyde groups were quenched with NH_4Cl 50 mM in PBS pH 7.4 for 20 min. Non specific binding was blocked by incubation in PBS containing either 0.2% bovine serum albumin or 0.2% bovine serum albumin and 0.05% saponin for 30 min at 37°C. The cells were then incubated with biotinylated anti-TNF- α antibodies for 2 h. Absorbance was measured at 450 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's t-test. Values were compared between different groups in the experiment. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DW SP JS JEG. Performed the experiments: NS LF GA GS. Analyzed the data: GA DW SP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JS JEG. Wrote the paper: DW SP.

References

- van Vollenhoven RF (2009) Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol* 5: 531–541.
- Firestein GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356–361.
- Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Synovial fibroblasts. Arthritis Res Ther* 9: 223.
- Bartok B, Firestein GS (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233: 233–255.
- Neumann E, Lefevre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U (2010) Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med* 16: 458–468.
- Noss EH, Brenner MB (2008) The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 223: 252–270.
- Tolboom TC, Pieteman E, van der Laan WH, Toes RE, Huidekoper AL, et al. (2002) Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis* 61: 975–980.
- Harashina SI, Tsukamoto H, Horiuchi T (2004) Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand expression in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 43: 396–397; author reply 397.
- Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebaul A, Chan E, Drexler S, et al. (2009) Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature Med* 15: 774–780.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 113–126.
- Carballo E, Lai WS, Blakeshear PJ (1998) Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science* 281: 1001–1005.
- Carballo E, Gilkeson GS, Blakeshear PJ (1997) Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (–/–) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNF α overproduction. *J Clin Invest* 100: 986–995.
- Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, et al. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120: 623–634.
- Engels BM, Hutvagner G (2006) Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25: 6163–6169.
- Kim VN, Nam JW (2006) Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22: 165–173.
- Pauley KM, Cha S, Chan EK (2009) MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 32: 189–194.
- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 111–122.
- Tili E, Michaille JJ, Calin GA (2008) Expression and function of micro-RNAs in immune cells during normal or disease state. *Int J Med Sci* 5: 73–79.
- Kloosterman WP, Plasterk RH (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11: 441–450.
- Croce CM (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10: 704–714.
- Lindsay MA (2008) microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 29: 343–351.
- Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, et al. (2007) Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 179: 5082–5089.
- Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, et al. (2008) Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10: R101.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12481–12486.
- Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, Juncker T, Frenzel L, et al. (2009) Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 182: 5088–5097.
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, et al. (2007) Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of microRNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 282: 1479–1486.
- Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, et al. (2003) Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor α production. *J Exp Med* 197: 1603–1611.
- Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, et al. (2006) Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol* 176: 3635–3641.
- Taneichi H, Kanegane H, Sira MM, Futatani T, Agetatsu K, et al. (2008) Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 126: 148–154.
- Zorn CN, Keck S, Hendriks RW, Leites M, Freudenberg MA, et al. (2009) Bruton's tyrosine kinase is dispensable for the Toll-like receptor-mediated activation of mast cells. *Cell Signal* 21: 79–86.
- Semaan N, Alsaleh G, Gottenberg JE, Wachsmann D, Sibilia J (2008) Etk/BMX, a Btk family tyrosine kinase, and Mal contribute to the cross-talk between MyD88 and FAK pathways. *J Immunol* 180: 3485–3491.
- Lieu ZZ, Lock JG, Hammond LA, La Gruta NL, Stow JL, et al. (2008) A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3351–3356.
- Jefferies CA, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, et al. (2003) Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 278: 26258–26264.

TRAVAUX 3

« La régulation de la protéine Btk via les mécanismes d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN permet de moduler l'expression du TNF- α dans la polyarthrite rhumatoïde en réponse LPS par l'intermédiaire du miR-346 »

Dans les études précédentes, nous avons montré que Btk permet de réguler l'expression du TNF- α par la voie TLR4 via la TTP dans les FLS et les cellules THP-1. Par ailleurs, nous avons montré que la transfection d'un analogue du miR-346 dans les cellules THP-1 permet une diminution significative de la synthèse de TNF- α . Nous nous sommes donc intéressés aux différentes voies de régulation de l'expression de ce miR-346 et particulièrement le rôle de l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN.

Des études antérieures avaient démontré que l'hypométhylation de l'ADN par des agents déméthylants s'associait à une augmentation de synthèse de cytokines inflammatoires dans la PR. Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que l'inhibition de la déacétylation des histones par les HDAC était corrélée à une diminution de la synthèse de cytokines inflammatoires dans la PR.

Nous avons montré que l'utilisation d'un agent déméthylant, la 5-azacytidine, s'accompagnait d'une augmentation de synthèse de TNF- α dans les cellules THP-1 en réponse au LPS et que l'ajout d'un inhibiteur des HDAC, la Tricho-A, entraînait une diminution de cette cytokine dans les mêmes conditions. Par ailleurs, nous avons démontré que la modulation de l'expression du TNF- α par ces mécanismes épigénétiques était liée directement à l'expression du couple Btk-miR-346.

Ces résultats feront l'objet d'une publication ultérieure dans un journal international.

La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones contrôlent l'expression du TNF- α en réponse au LPS par l'intermédiaire de la protéine Btk et du miR-346

MATERIELS ET METHODES

1. Réactifs :

Les milieux de cultures cellulaires (RPMI 1640 et M199), le sérum de veau fœtal (SVF), la pénicilline, la streptomycine, l'amphotéricine B, le réactif TRIzol et la trypsine-EDTA proviennent de Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Le LPS (*Salmonella abortus equi*), la collagénase XI et le LFM-A13 ont été fournis par SIGMA-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Le Lightcycler Faststart DNA Master SYBR Green I provient de Roche Applied Science (Penzberg, Germany). Le miScript System provient de Qiagen (Courtabeuf, France). Les kits Human Dermal Fibroblast Nucleofactor™ et Cell Line Nucleofactor™ Kit V proviennent d'Amaxa (Cologne, Allemagne). Les mimiques MiRIDIAN® miR-346, les inhibiteurs de miR-346 et miRIDIAN miRNA contrôle négatif proviennent de Dharmacon (Brebieres, France). Le kit ELISA pour le TNF- α humain provient de PreproTech Inc (Neuilly sur seine, France) et ceux de l'IL-6 humaines proviennent de R&D system. Les inhibiteurs de protéases ont été fourni par Roche. La Trichostatine A ou TrichoA et la 5-Azacytidine ou 5-Aza ont été fournies par SIGMA-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

2. Culture cellulaire :

Les FLS humains ont été isolés à partir des membranes synoviales de PR prélevées au cours de synovectomies arthroscopique de genou. Le diagnostic de PR a été posé selon les critères révisés de l'American College of Rheumatology. La membrane synoviale est découpée dans des conditions stériles, puis incubée 3h à 37°C dans du RPMI 1640 contenant 1mg/mL de collagénase de type XI (Sigma). Après centrifugation (130g, 10 min, 4°C), le culot cellulaire est repris dans 8 mL de milieu de culture à 20% de SVF décomplémenté,ensemencé dans une boîte de culture de 25 cm², puis placé dans un incubateur à 37°C dans

une atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé au bout de 24h pour éliminer les cellules non adhérentes, puis deux fois par semaine. A confluence, le tapis cellulaire est décollé par addition de 2 à 3mL de trypsine-EDTA 0,05 % pendant 5 min à 37°C. Après centrifugation (130 g, 10 min, 4°C), le culot cellulaire est repris dans 13mL de RPMI 1640/M199 à 10% de SVFD et les cellules sont réensemencées dans une boîte de 75 cm² : les cellules sont à passage 1. Par la suite, les FLS ont été cultivés dans du RPMI 1640 et du M199 (1 :1 V/V) additionnés de pénicilline (100 UI/L), de streptomycine (100µg/mL), d'amphotéricine B (0,25 µg/mL) et du SVF décomplémenté 20% (puis 10% après le premier passage). Les expériences ont été faites pendant le 3ème et le 9ème passage. Pendant ce temps, les cultures se sont constituées d'une population homogène de cellules fibroblastiques, négatives pour CD16 comme déterminés par analyse FACS. Le nombre de cellules et la viabilité cellulaire ont été contrôlés par le test MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test), après le prélèvement des surnageants, 200µL de RPMI 1640 contenant 0,4 mM de MTT sont ajoutés aux cellules (4h, 37°C) : le MTT forme en présence de cellules vivantes un composé orange insoluble, le formazan. Celui-ci sera dissout par l'élimination des 200 µL de surnageant et ajout de 100% de DMSO. L'absorbance des lysats cellulaires est ensuite mesurée à 540 nm.

Les cellules THP-1 (no. 88081201 European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) ont été cultivées dans un milieu comprenant du RPMI 1640 et SVF à 10%.

3. Activation cellulaire :

Les FLS et les THP1 ont étéensemencées dans une plaque 6 puits à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules par puit pour les FLS et de 10^7 cellules par puit pour les THP-1.

La Trichostatine A a été ajoutée dans le milieu pendant 24 heures avant stimulation, avec des concentrations respectives de 1, 2 et 5 µM selon les recommandations du laboratoire.

La 5-azacytidine a été ajouté dans le milieu toutes les 24 heures pendant 72 heures avant stimulation, avec des concentrations respectives de 1, 2, 5 et 10 µM selon les recommandations du laboratoire.

Elles seront stimulées par 2ml par puit de milieu (RPMI 1640 et M199/5% SVFD) ou de milieu (RPMI 1640/ 5% SVFD) contenant du LPS (1µg/ml). Pour les différentes analyses, les cellules ont été incubées pendant 4 heures et 8 heures avec le LPS ; l'ARN total a été extrait par l'utilisation de TRIzol selon les recommandations du laboratoire ; les surnageants

ont été isolés puis préparés pour analyse de cytokines par kit ELISA pour TNF- α humain et l'IL-6 humaines fournis par laboratoire.

4. Dosage des cytokines par un test ELISA sandwich :

Le TNF- α et l'IL-6 ont été dosées dans les surnageants de culture des FLS activées. La technique utilisée est un test ELISA sandwich réalisé selon les recommandations des fabricants de chaque kit.

Pour l'IL-6 et le TNF- α , le protocole suivant a été utilisé :

Pour le coating, adsorption des anticorps anti-IL-6 (R&D System) dilués au 1/250^e et des anticorps anti-TNF- α à une concentration de 100 μ g/mL dans du PBS 5 mM, pH 7,4. [100 μ L/puits, 18h, 25°C]. Lavage en tampon PBST pH 7,4 (PBS 5 mM + Tween 20 0,05%), 3x200 μ L/puits. Puis saturation avec de la BSA 1% dans du PBS 5 mM pH 7,4 [100 μ L/puits, 1h, 25°C]. Lavage puis addition des surnageants de culture, dilués au 1/4 pour l'IL-6, dans du tampon TBST (Tris HCl 20 mM + BSA 0,1% + Tween 20 0,05%). [100 μ L/puits, 2h, 25°C]. Lavage puis addition des anticorps anti-IL-6 biotinylés dilués au 1/250^e et des anticorps anti-TNF- α à une concentration de 100 μ g/mL dans le TBST. [100 μ L/puits, 2h, 25°C]. Lavage puis addition d'extravidine-HRP (Sigma) diluée au 1/2000^e dans le TBST. Lavage puis addition du substrat de la peroxydase, (H₂O₂ + TMB ou 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (BD Pharmingen). [100 μ L/puits, 30 min, 25°C, à l'abri de la lumière]. La réaction enzymatique se traduit par l'apparition d'une coloration bleue ; la réaction est alors stoppée par addition d'H₂SO₄ 1M (50 μ L/puits). Lecture des absorbances à 450 nm.

5. Transfection cellulaire de miRNA analogue:

Le miR-346 analogue ou mimique utilisé dans notre étude ont été confirmés comme étant efficace pour avoir la même structure et activité du miR-346. Il s'agit de séquences de 21 nucléotides, fournis par Dharmacon. La transfection de FLS avec les mimics miRTM miRNA (200nM) a été faite en utilisant le kit Human Dermal Fibroblast NucleofactorTM de Amaxa, celle des cellules THP-1 avec le kit Cell Line NucleofactorTM Kit V de Amaxa. Après transfection, les FLS et les cellules THP-1 ont été placées dans des plaques de 24 puits (3 x 10⁵ cellules par puit et 10⁶ cellules respectivement). Toutes les expériences ont été faites 24h post-transfection. Le contrôle négatif Clear-miRTM, ne ciblant aucun miRNA, a été utilisé

comme témoin négatif. Le nombre et la viabilité cellulaire ont été assurés par le test MTT. Les cellules ont été mises en présence de TrichoA ou de 5-Aza puis stimulées avec le LPS selon les mêmes conditions que décrites antérieurement. Le TNF- α soluble et l'IL-6 sécrété a été mesuré dans le surnageant cellulaire par un test ELISA sandwich selon les recommandations du fabricant.

6. **Extraction de l'ARNm, réaction de polymérase en chaîne avec transcription inverse (RT-PCR) et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) :**

Les cellules sont lavées avec 5mL de PBS 5mM pH 7,4 puis lysées par le TRIZOL. L'addition de 200 μ L de chloroforme suivie d'une centrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) permet de reprendre la phase supérieure contenant l'ARN total. Ce surnageant est additionnée de 500 μ L d'isopropanol (20 min à -20°C) puis centrifugé (12000 g, 15 min, 4°C). Après lavage à l'éthanol et centrifugation (7500 g, 5 min, 4°C), l'ARN est dissous dans de l'eau stérile, puis chauffé à 10 min à 65°C (Thermocycler PTC 200 « DNA engine » MJ Research Prolabo Biotech) puis conservé dans la glace. La quantité d'ARN extraite est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm avec l'appareillage NanoDrop (NanoDrop Technologies). L'ADN contaminant est éliminé par addition de DNase (Ambion)(1 μ L pour 10 μ g d'ARN). Après chauffage 30 min à 37°C, l'enzyme est inactivée pendant 10 min à 75°C. Il y a avait une phrase répétée. La transcription inverse de l'ARN est effectuée au moyen du kit de synthèse d'ADNc d'Invitrogen pendant 50 min à 42°C. L'enzyme est inactivée pendant 15 minutes à 72°C.

Pour la PCR, le protocole suivant a été utilisé pour l'actine : après une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, les échantillons ont été exposés à 25 cycles d'amplification (température de 94°C pendant 1 minute, 56°C pendant 45 secondes, et 72°C pendant 1 minute). Les primers suivants ont été utilisé pour la β -actine 5'-CCA-ACC-GCG-AGA-AGA-TGA-CC-3'et 5'-GAT-CTT-CAT-GAG-GTA-GTC-AGT-3'.

La RT-PCR quantitative pour l'analyse des miRNA a été exécutée en utilisant le miScript System dans un volume total de 20 μ l. Les concentrations en ARN ont été déterminées avec l'appareillage NanoDrop (NanoDrop Technologies). 1 μ g d'ARN par échantillon a été utilisé pour les expériences. Les réactions de transcription inverse et de RT-PCR quantitative en temps réel ont été exécutées selon les recommandations du fabricant. Un contrôle endogène U6 a été utilisé comme contrôle. Toutes les réactions ont été répliquées

trois fois dans l'appareil *Rotor-Gene™ 6000 real-time PCR machine* (Corbett Life Science®, Sydney, Australia). L'expression relative a été calculée en utilisant la méthode comparative du cycle seuil (threshold cycle Ct).

L'ARN total isolée des FLS et des cellules THP-1 ont été inversement transcrit en utilisant le kit First Strand cDNA Synthesis Kit conformément aux instructions du fabriquant (In Vitrogen). Real-time quantitative RT-PCR a été réalisée avec un volume total de 20 µl en utilisant un mélange SensiMix Plus SYBR® (Quantace, Corbett Life Science®, Sydney, Australia), and les primers spécifiques suivants:

- *GAPDH*: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3'
- et 5'-GAGGGATCTCGCTCGCTCCTGGAAGA-3'
- *TTP*: 5'-TCGGGACCCTGGAGCCTGAG-3'.
- et 5'-AGCCAGCGGTGCGAAGCC-3'
- *Btk* 5'-AAAAAGCAGGCTTGTCATGGATGAAGAATCCTG-3'
- et 5'-AGAAAGCTGGGTCCTCCCCTCCCATCTTTATG-3'.

Toutes les réactions ont été répliquées trois fois dans l'appareil *Rotor-Gene™ 6000 real-time PCR machine* (Corbett Life Science®, Sydney, Australia). L'expression relative a été calculée en utilisant la méthode comparative du cycle seuil (threshold cycle Ct)

7. Analyses statistiques :

Les résultats sont représentatifs de deux expériences différentes. Chaque expérience représente la moyenne de deux essais +/- SEM effectués en double.

RESULTATS

1. L'hypométhylation de l'ADN s'accompagne d'une augmentation du TNF- α et de Btk ainsi qu'une diminution de la TTP en réponse au LPS dans les cellules THP-1

Dans cette étude, nous avons regardé l'expression de TNF- α et d'IL-6 par les cellules THP-1 en réponse au LPS et en présence d'un agent hypométhylant, le 5-Azacytidine. Nous avons ensuite regardé l'expression de Btk et de la TTP dans ces mêmes cellules THP-1.

Les cellules THP-1 (10^7 cellules par puit d'activation) ont été incubées pendant 72 heures en présence de 5-Aza à des concentrations variables (1, 2, et 5 μM) ; le 5-Aza a été ajouté toutes les 24 heures dans chaque puit. Le contrôle C correspond à un temps d'incubation de 72 heures en l'absence de 5-Aza. Après cette incubation initiale de 72 heures, les cellules THP-1 ont été ré-incubées en présence de LPS (1 $\mu\text{g/L}$) pendant 4 heures et 8 heures, le contrôle milieu correspond à une incubation de 6 heures en l'absence de LPS. Les dosages de TNF- α et d'IL-6 ont été réalisés par un test ELISA sandwich. Les ARNs messagers de Btk et de la TTP ont été analysés, après extraction de l'ARN total, par RT-qPCR en utilisant les primers décrits antérieurement.

L'analyse de ces résultats montre, premièrement, que l'utilisation de concentrations croissantes de 5-Aza est corrélée à une augmentation de synthèse de TNF- α (Figure 1A) et d'IL-6 (Figure 1B) en réponse au LPS. Ces résultats confirment les travaux déjà publiés qui avaient montré une augmentation de l'inflammation de la membrane synoviale en présence de 5-Azacytidine. Deuxièmement, l'utilisation de 5-Aza modifie l'expression de Btk et de la TTP ; on observe une augmentation de l'expression de Btk (figure 2A) et une diminution de la TTP (Figure 2B) après ajout du 5-Aza.

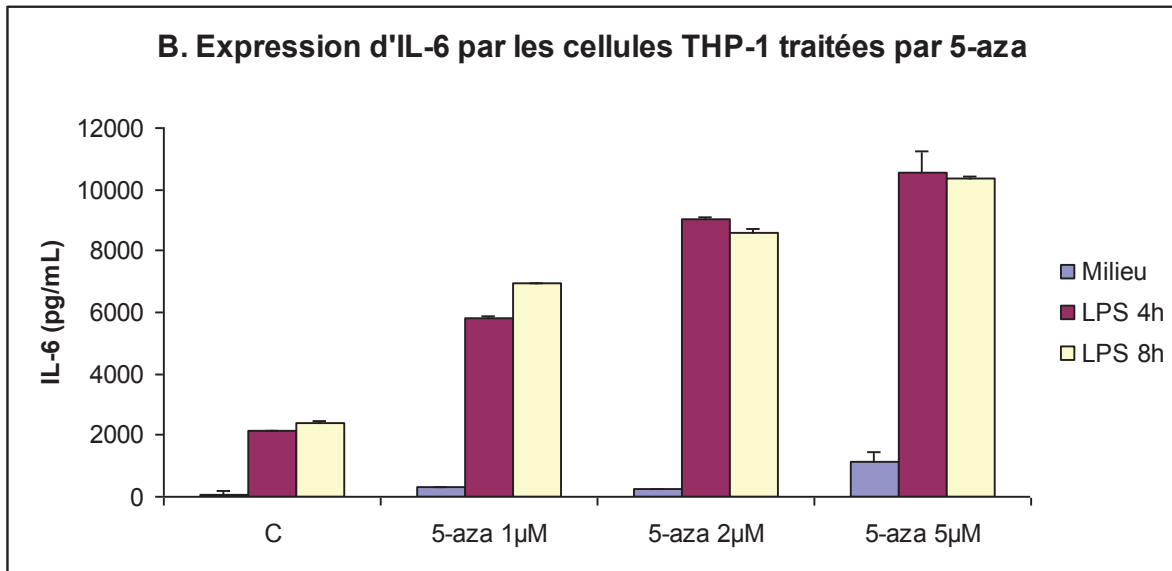
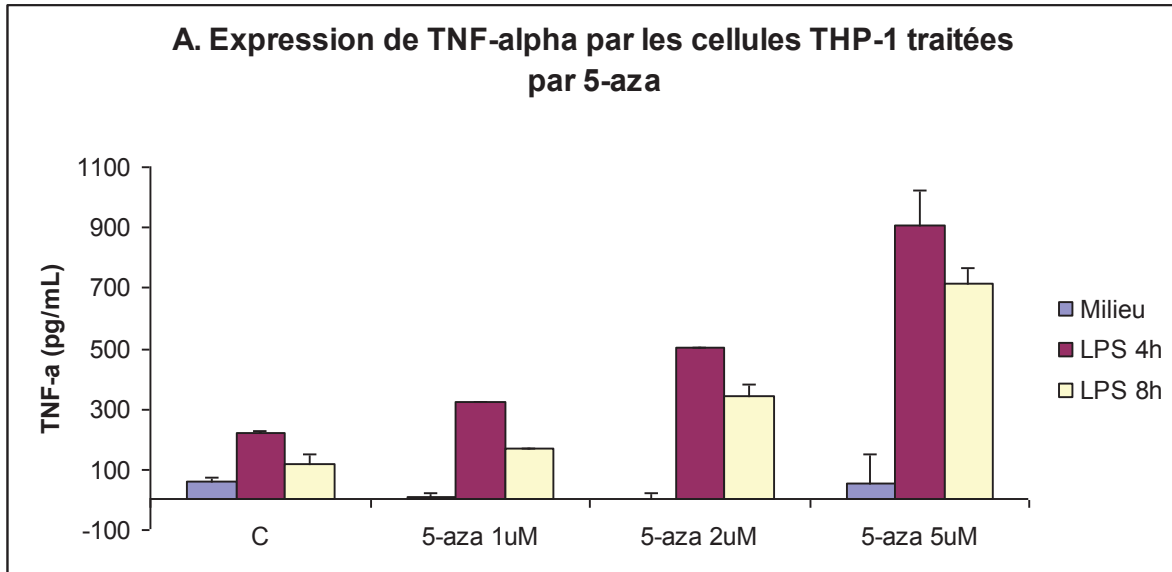


Figure 1 : Etude de la synthèse de TNF- α (A) et d'IL-6 (B) dans les THP-1 activés ou non par le LPS. Les cellules ont été mises en présence pendant 72 heures de 5-Aza à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M) ; le 5-Aza a été ajouté toutes les 24 heures dans chaque puit. Le contrôle C correspond a un temps d'incubation de 72 heures en l'absence de 5-Aza. Ces cellules ont été incubées par la suite avec du RPMI + 5% de SVF (Milieu) pendant 6 heures ou du LPS (1 μ g/mL) + 5% de SVF pendant 4 et 8 heures. Le TNF- α et l'IL-6 ont été dosés dans les surnageants de culture par un test ELISA sandwich. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués en double avec des FLS et THP-1 isolés de trois patients différents. Les écart-types indiquent la déviation standard.

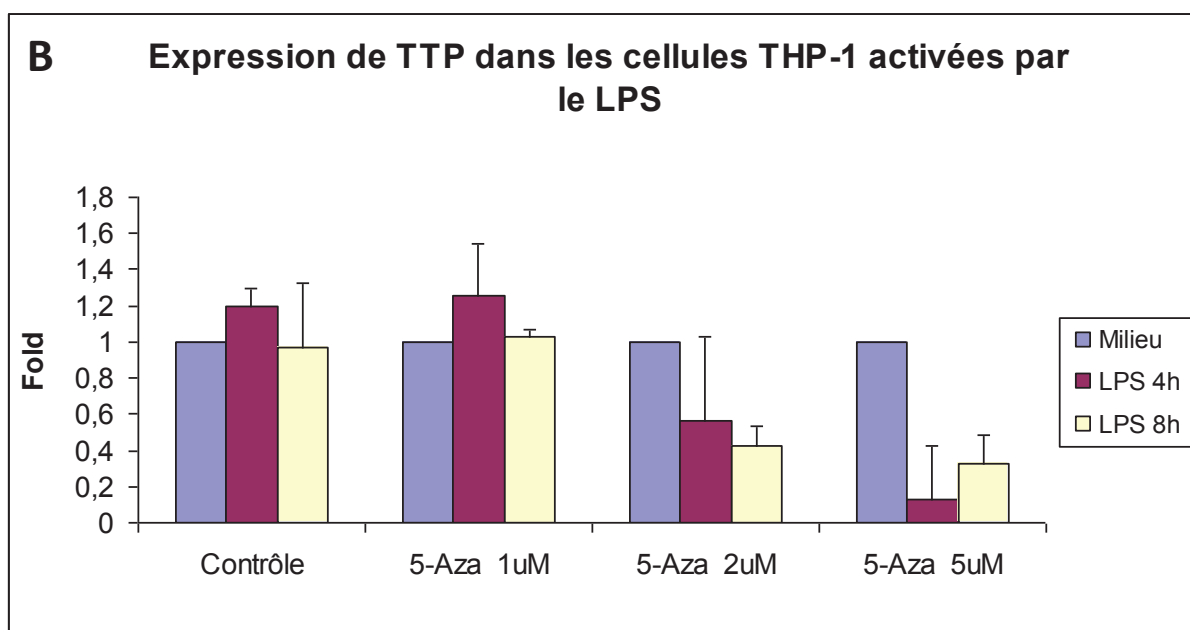
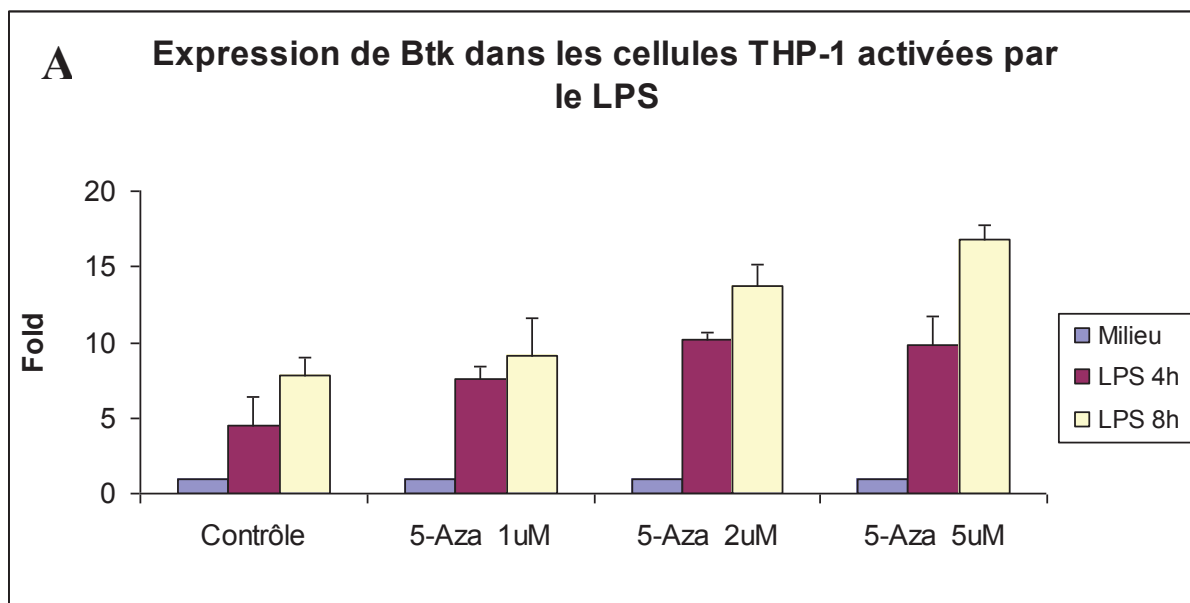


Figure 2 : Etude de l'expression de l'ARNm de Btk(A) et de la TTP (B) dans les THP-1 activés ou non par le LPS. Les cellules ont été mises en présence pendant 72 heures de 5-Aza à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M) ; le 5-Aza a été ajouté toutes les 24 heures dans chaque puit. Le contrôle C correspond à un temps d'incubation de 72 heures en l'absence de 5-Aza. Ces cellules ont été incubées par la suite avec du RPMI + 5% de SVF (Milieu) pendant 6 heures ou du LPS (1 μ g/mL) + 5% de SVF pendant 4 et 8 heures. Les ARNs messagers de Btk et de la TTP ont été analysés, après extraction de l'ARN total, par RT-qPCR en utilisant les primers décrits antérieurement. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués en double avec des FLS et THP-1 isolés de trois patients différents. Les écart-types indiquent la déviation standard.

2. L'hyperacétylation des histones entraîne une diminution de synthèse de TNF- α , de la TTP et une augmentation de Btk en réponse au LPS dans les cellules THP-1

De manière similaire à l'étude précédente, nous avons regardé l'expression de TNF- α , d'IL-6, de la TTP et de Btk par les cellules THP-1 en réponse au LPS et en présence, cette fois-ci, d'un inhibiteur d'HDAC, la TrichoA, entraînant une hyperacétylation des histones. Les cellules THP-1 (10^7 cellules par puit d'activation) ont été incubées pendant 24 heures en présence de TrichoA à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M). Le contrôle C correspond à un temps d'incubation de 24 heures en l'absence de TrichoA. Après cette incubation initiale de 24 heures, les cellules THP-1 ont été ré-incubées en présence de LPS (1 μ g/L) pendant 4 heures et 8 heures, le contrôle milieu correspond à une incubation de 6 heures en l'absence de LPS. Les dosages de TNF- α et d'IL-6 ont été réalisés par un test ELISA sandwich. Les ARNs messagers de Btk et de la TTP ont été analysés, après extraction de l'ARN total, par RT-qPCR en utilisant les primers décrits antérieurement.

Ces résultats montrent que l'inhibition des HDAC par la TrichoA entraîne une diminution de l'expression de TNF- α (Figure 3A) et d'IL-6 (Figure 3B) en réponse au LPS dans les cellules THP-1. Par ailleurs, on observe une augmentation de l'expression de la TTP (Figure 4A) et une diminution de Btk (Figure 4B). L'hyperacétylation des histones par inhibition des HDAC s'accompagne donc d'une diminution de la réponse inflammatoire dépendante du TNF- α et de l'IL-6 en réponse au LPS, confirmant les précédents travaux montrant le potentiel rôle anti-inflammatoire des inhibiteurs d'HDAC.

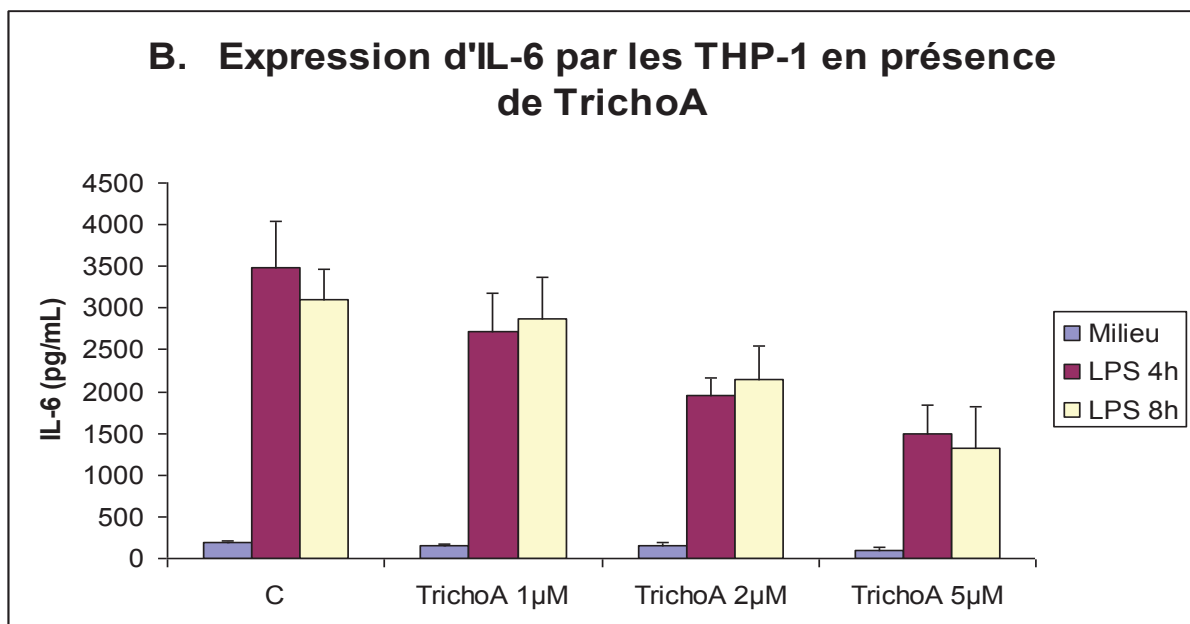
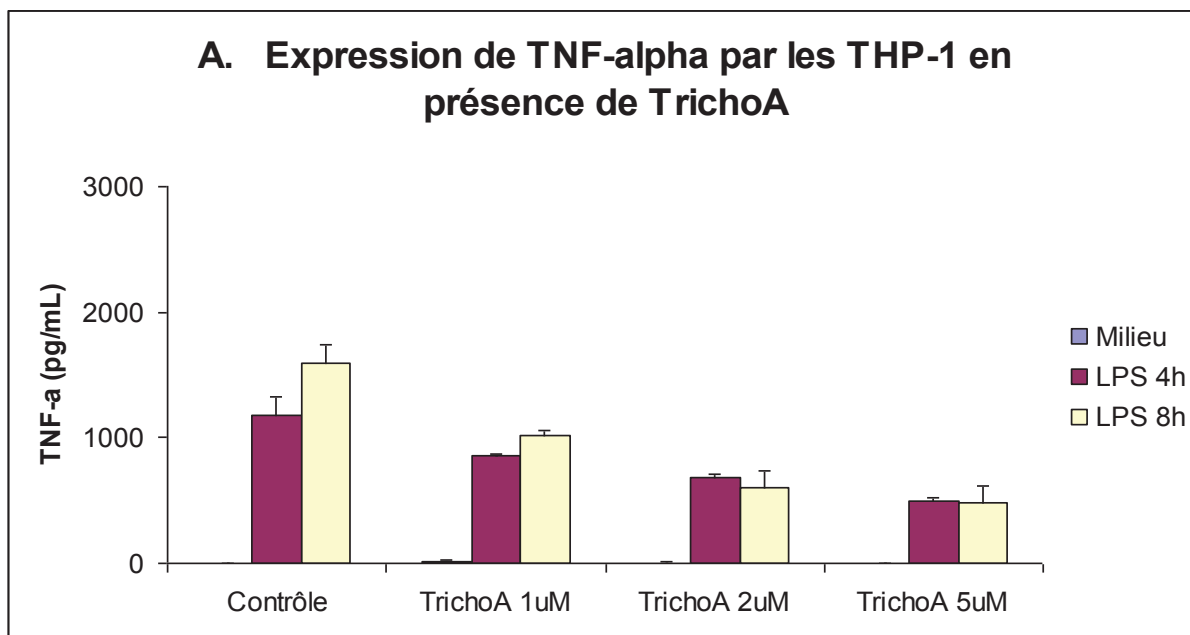


Figure 3 : Etude de la synthèse de TNF- α (A) et d'IL-6 (B) dans les THP-1 activés ou non par le LPS. Les cellules ont été mises en présence pendant 24 heures de TrichoA à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M). Le contrôle C correspond à un temps d'incubation de 72 heures en l'absence de 5-Aza. Ces cellules ont été incubées par la suite avec du RPMI + 5% de SVF (Milieu) pendant 6 heures ou du LPS (1 μ g/mL) + 5% de SVF pendant 4 et 8 heures. Le TNF- α et l'IL-6 ont été dosés dans les surnageants de culture par un test ELISA sandwich. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués en double avec des FLS et THP-1 isolés de trois patients différents. Les écart-types indiquent la déviation standard.

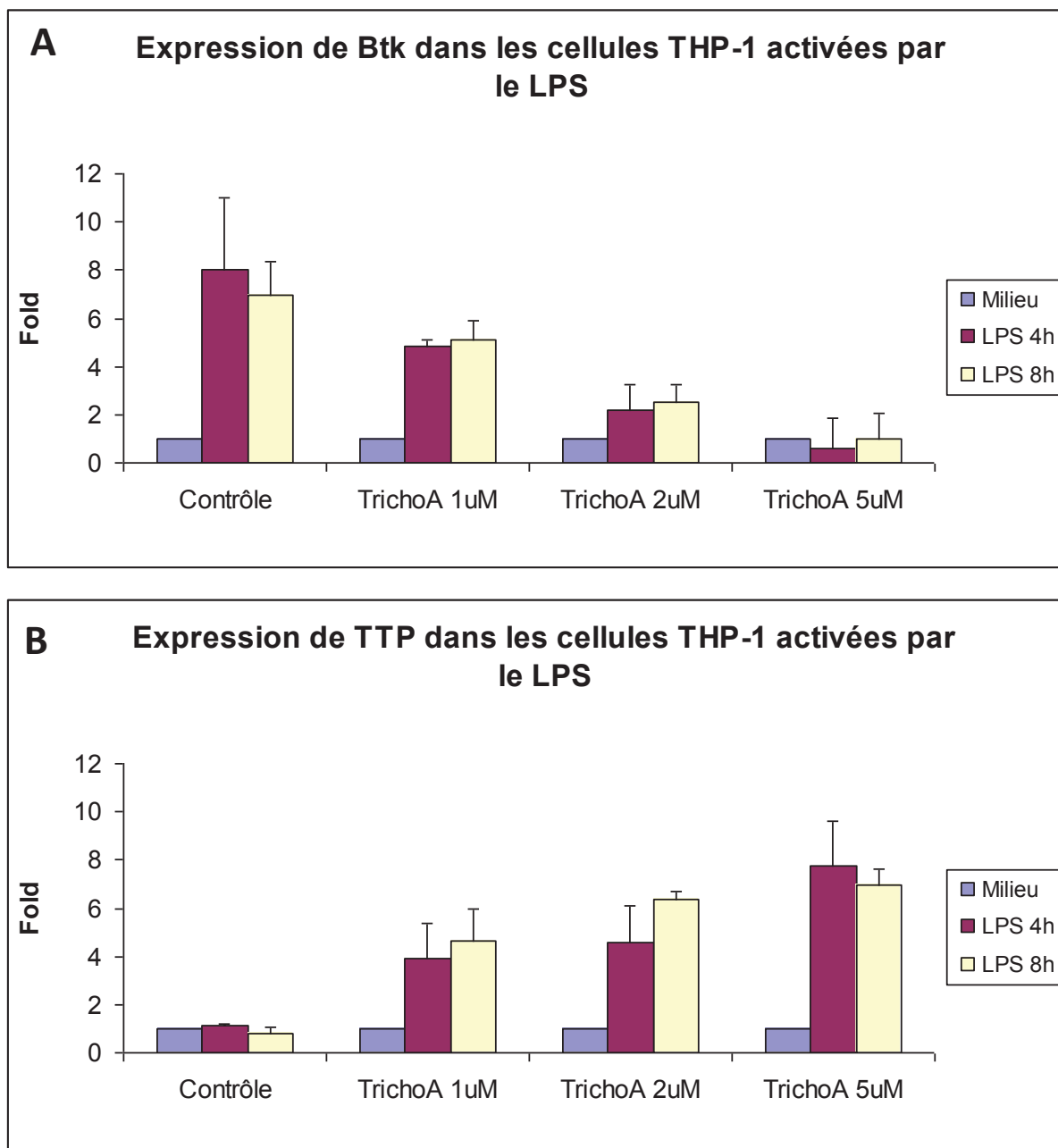


Figure 4 : Etude de l'expression de l'ARNm de Btk(A) et de la TTP (B) dans les THP-1 activés ou non par le LPS. Les cellules ont été mises en présence pendant 24 heures de TrichoA à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M). Le contrôle C correspond a un temps d'incubation de 24 heures en l'absence de TrichoA. Ces cellules ont été incubées par la suite avec du RPMI + 5% de SVF (Milieu) pendant 6 heures ou du LPS (1 μ g/mL) + 5% de SVF pendant 4 et 8 heures. Les ARNs messagers de Btk et de la TTP ont été analysés, après extraction de l'ARN total, par RT-qPCR en utilisant les primers décrits antérieurement. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués en double avec des FLS et THP-1 isolés de trois patients différents. Les écart-types indiquent la déviation standard.

3. L'expression du miR-346 est régulée positivement par la TrichoA et négativement par le 5-Aza, en réponse au LPS dans les FLS et les cellules THP-1

En accord avec les résultats de nos études précédentes sur le rôle du miR-346 dans le contrôle du TNF- α , nous nous sommes intéressés l'expression de ce miR-346 en fonction de l'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN.

Les cellules THP-1 (10^7 cellules par puit d'activation) et les FLS (10^6 cellules par puit d'activation) ont été incubées :

- soit pendant 24 heures en présence de TrichoA à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M). Le contrôle C correspond a un temps d'incubation de 24 heures en l'absence de TrichoA.

- soit pendant 72 heures en présence de 5-Aza à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M) ; le 5-Aza a été ajouté toutes les 24 heures dans chaque puit. Le contrôle C correspond a un temps d'incubation de 72 heures en l'absence de 5-Aza

Après cette incubation initiale, les cellules THP-1 et les FLS ont été ré-incubées en présence de LPS (1 μ g/L) pendant 4 heures, le contrôle milieu correspond à une incubation de 4 heures en l'absence de LPS. Après extraction totale de l'ARN, les RT-qPCR des miR-346, 125b et 939 ont été réalisée avec le kit miSCRIPT system comprenant les primers pour chacun de ces miARNs. Afin de confirmer l'activation cellulaire, un dosage de TNF- α et d'IL-6 ont été réalisés par un test ELISA sandwich (résultats non montrés).

Ces résultats montrent tout d'abord que l'ajout de 5-azacytidine entraine une diminution significative de l'expression du miR-346 dans les FLS en réponse au LPS (figure 5A) alors que l'expression des miR-125b et 939 est augmentée. Dans les cellules THP-1, on observe une réponse similaire avec une diminution modérée de l'expression du miR-346 avec par contre une augmentation significative de celles des miR-125b et 939 (figure 5B). Par contre, l'ajout de TrichoA dans les milieux de culture des FLS (figure 6A) et des cellules THP-1 (figure 6B) entraine une augmentation de l'expression du miR-346 en réponse au LPS ainsi que, à moindre mesure, celle des miR-125b et 939.

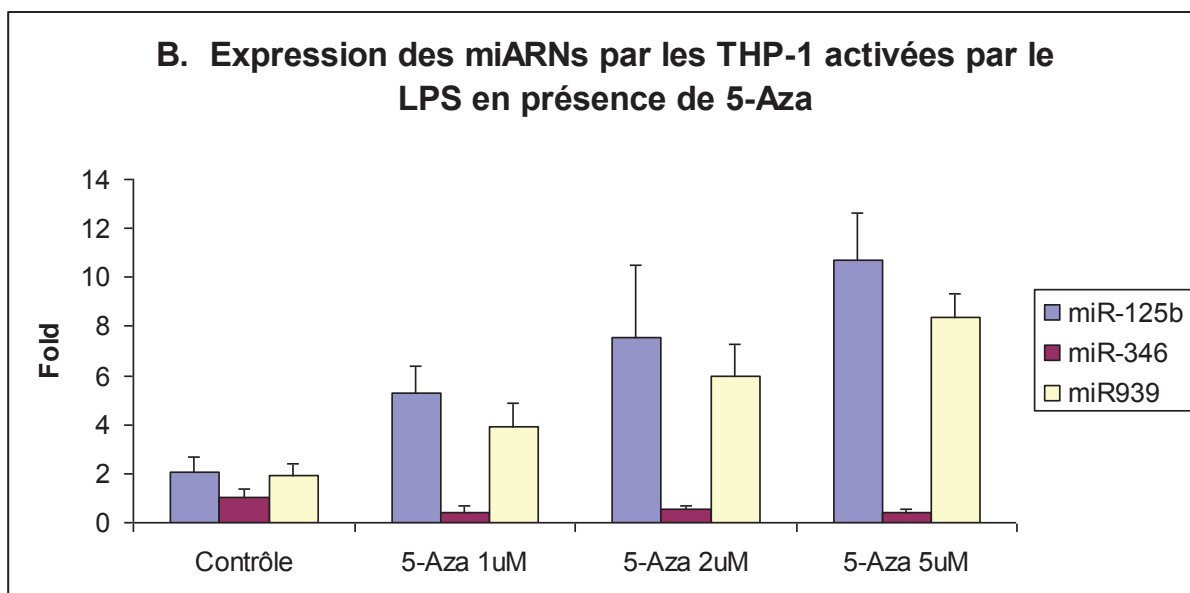
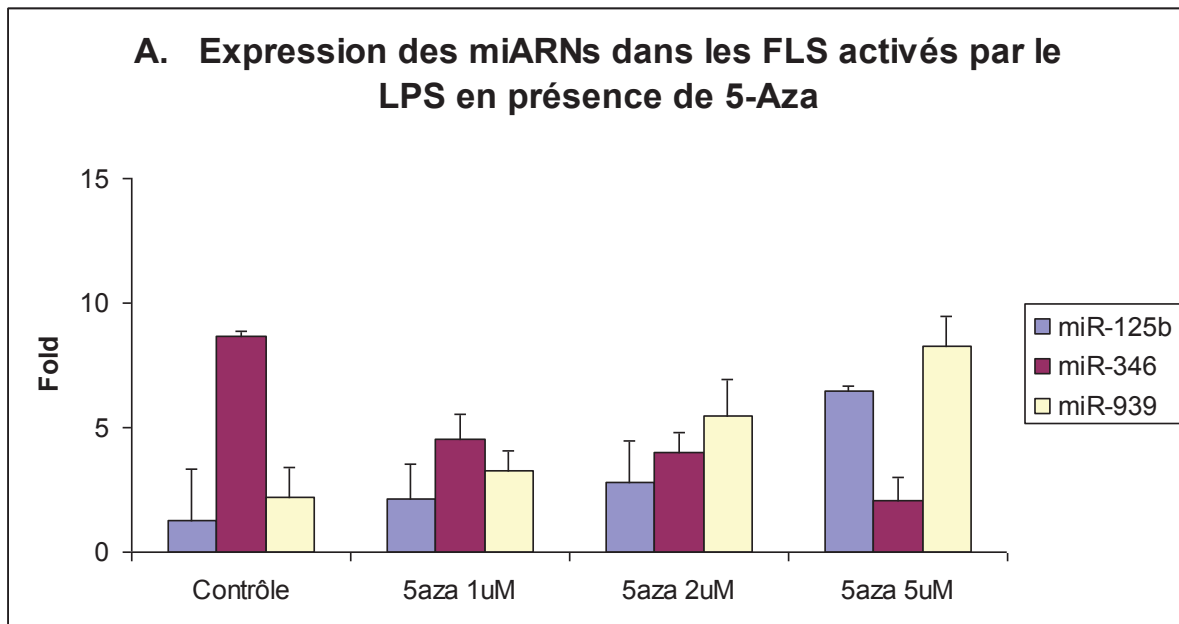


Figure 5 : Etude de l'expression par RT-qPCR des miR-125b, miR-346 et miR-939 dans les FLS (A) et THP-1 (B) activés ou non par le LPS. Les cellules ont été mises en présence pendant 72 heures de 5-Aza à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M) ; le 5-Aza a été ajouté toutes les 24 heures dans chaque puits pendant 24 heures. Le contrôle correspond à l'absence de 5-Aza. Ces cellules ont été par la suite incubées avec du RPMI + 5% de SVF (Milieu) ou du LPS (1 μ g/mL) + 5% de SVF pendant 4h. Le milieu, utilisé comme étalonage, n'est pas représenté. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués en double avec des FLS et THP-1 isolés de trois patients différents. Les écart-types indiquent la déviation standard.

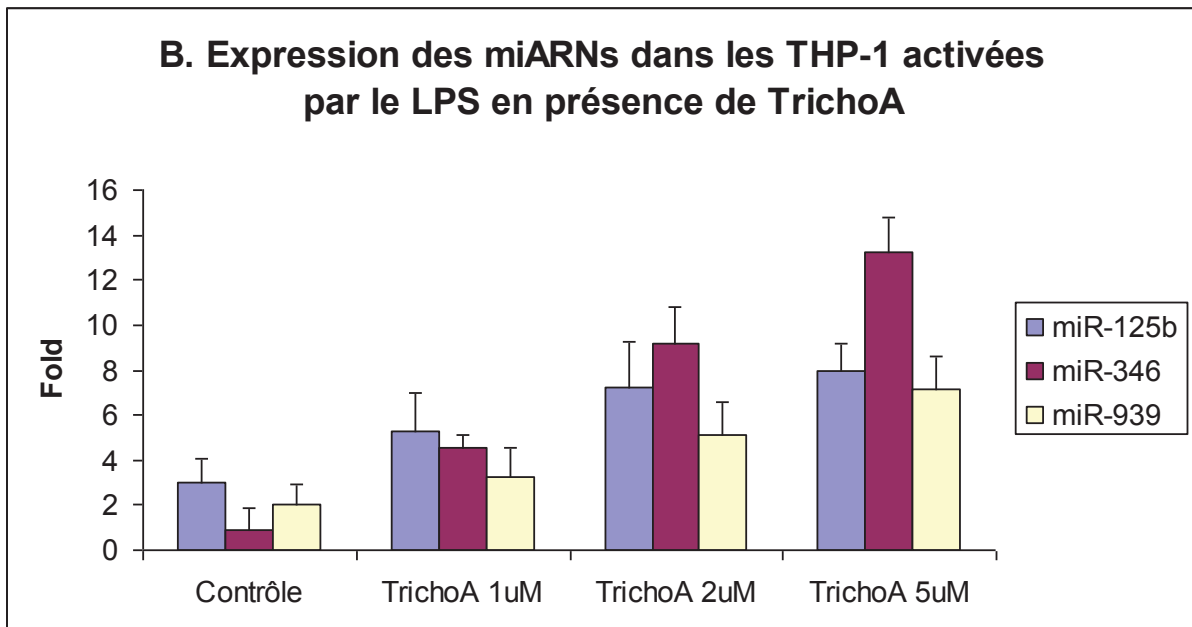
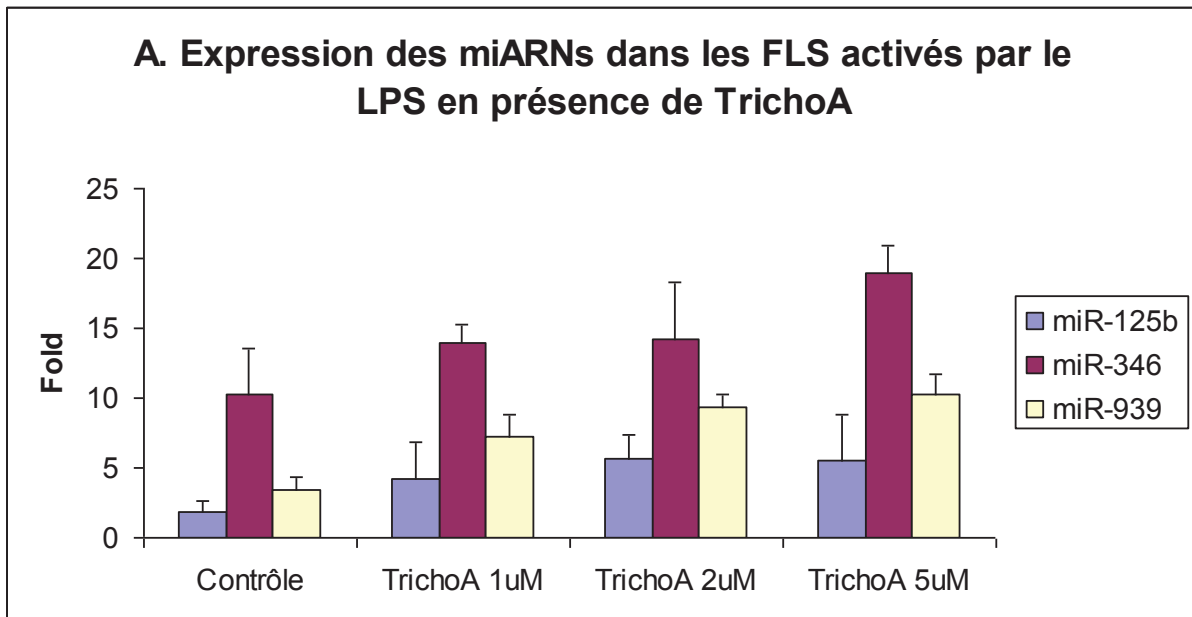


Figure 6 : Etude de l'expression par RT-qPCR des miR-125b, miR-346 et miR-939 dans les FLS (A) et THP-1 (B) activés ou non par le LPS. Les cellules ont été mises en présence pendant 24 heures de TrichoA à des concentrations variables (1, 2, et 5 μ M). Ces cellules ont été par la suite incubées avec du RPMI + 5% de SVF (Milieu) ou du LPS (1 μ g/mL) + 5% de SVF pendant 4h. Le milieu, utilisé comme étalonage, n'est pas représenté. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués en double avec des FLS et THP-1 isolés de trois patients différents. Les écart-types indiquent la déviation standard.

4. La modulation de l'expression de Btk par le miR-346 permet de rétablir l'expression du TNF- α après ajout de TrichoA et de 5-Aza dans les cellules THP-1 en réponse au LPS.

Compte tenu des résultats précédents, nous avons voulu démontrer que le rôle de la TrichoA ou du 5-Aza sur la synthèse du TNF- α dans les cellules THP-1 en réponse au LPS dépendant de l'expression de Btk via le miR-346.

Les cellules THP-1 (10^6 cellules par puits d'activation) ont été incubées soit pendant 24 heures en présence de TrichoA à 5 μ M avec un contrôle C correspondant à un temps d'incubation de 24 heures en l'absence de TrichoA, soit pendant 72 heures en présence de 5-Aza à 5 μ M ; le 5-Aza a été ajouté toutes les 24 heures dans chaque puits. Le contrôle C correspond à un temps d'incubation de 72 heures en l'absence de 5-Aza. Ces cellules ont été ensuite soit transfectées par un inhibiteur de miR-346, par un mimic de miR-346 ou par un contrôle négatif Clear-MiR ne ciblant aucun miARNs, soit elles ont été mises en présence du LFM-A13, un inhibiteur de Btk, à 172 nM pendant 1 heure. Un contrôle de cellules non transfectées sans LFM-A13 a également été utilisé. Après 24 heures, ces cellules ont été activées par le LPS pendant 4 et 8 heures. Le contrôle milieu correspond à une incubation de 6 heures en l'absence de LPS. Les dosages de TNF- α et d'IL-6 ont été réalisés par un test ELISA sandwich. L'ARN messager de Btk a été analysé, après extraction de l'ARN total, par RT-qPCR en utilisant les primers décrits antérieurement. L'expression du miR-346 par RT-qPCR a été analysée afin de confirmer l'efficacité de chaque transfection soit par son augmentation pour le mimic, soit par sa diminution pour l'inhibiteur (résultats non montrés).

L'analyse de ces résultats confirme tout d'abord que l'inhibition de l'expression de Btk par la transfection d'un mimic du miR-346 ou par le LFM-A13 est corrélée à une diminution de synthèse du TNF- α dans les cellules THP-1 en réponse au LPS (Figure 7A). Par ailleurs, ces résultats montrent que la synthèse de TNF- α par les cellules THP-1 transfectées par le mimic du miR-346 n'est plus augmentée après exposition au 5-Aza comme constatée précédemment sans transfection. Des résultats similaires ont également été montrés avec l'utilisation du LFM-A13. Enfin, la réexpression de Btk par la transfection d'un inhibiteur du miR-346 dans les cellules THP-1 après exposition à la TrichoA permet une augmentation de l'expression du TNF- α en réponse au LPS, annulé par l'ajout de l'inhibiteur de Btk LFM-A13 (Figure 7B). Ces résultats semblent donc démontrer que la régulation épigénétique du TNF- α par acétylation des histones ou par méthylation de l'ADN des cellules THP-1 via TLR4 est liée à l'expression de la protéine Btk par l'intermédiaire du miR-346.

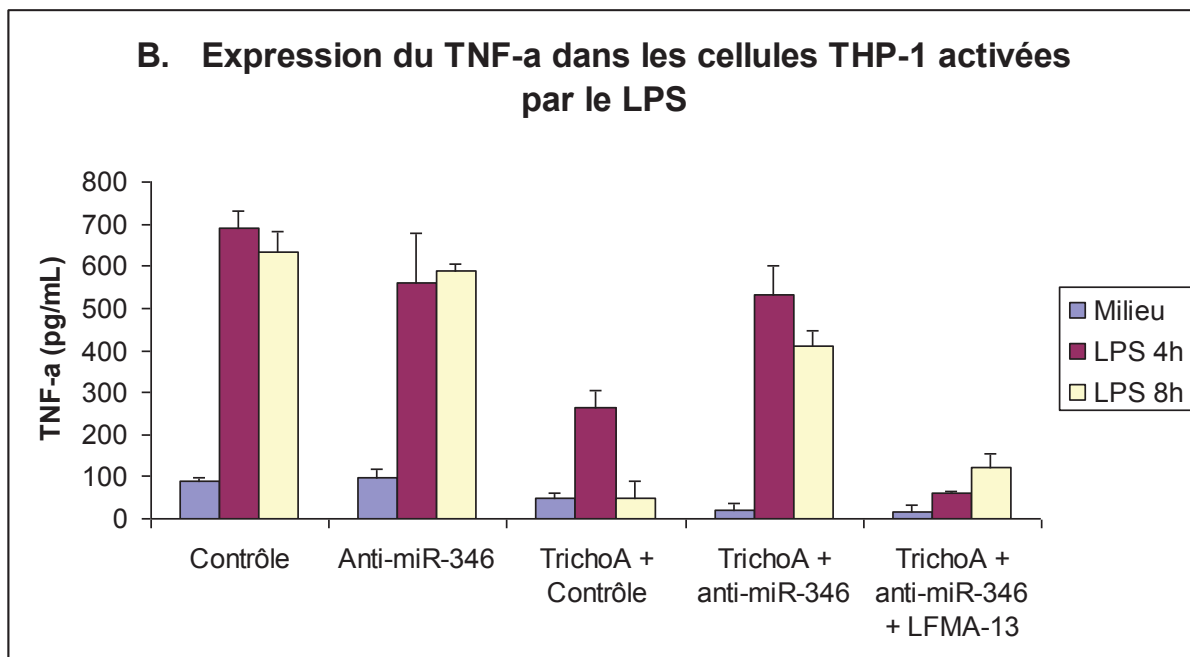
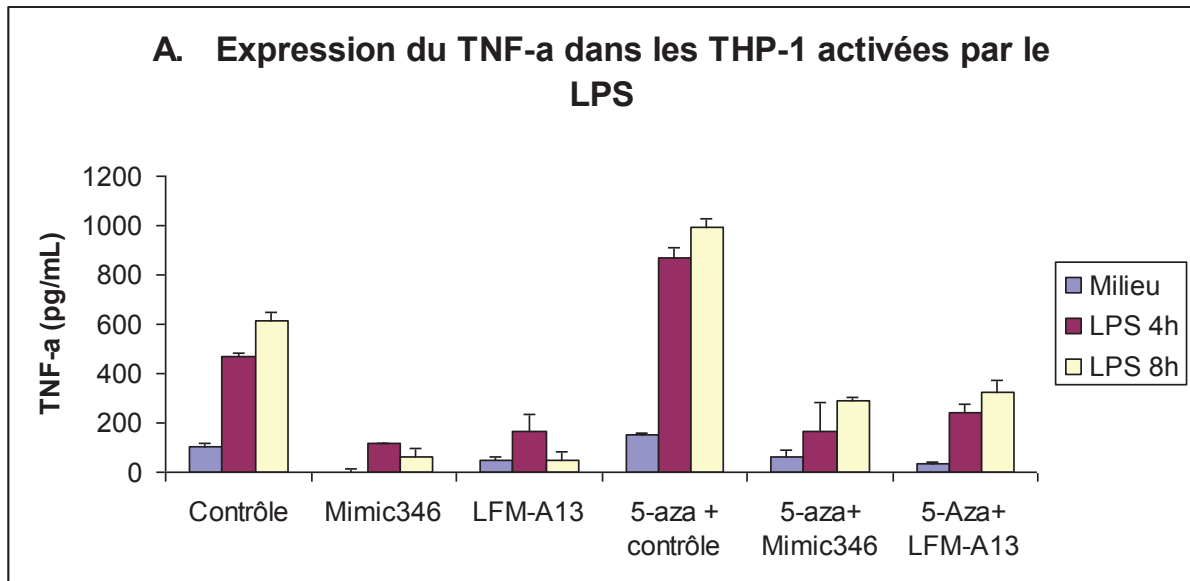


Figure 7 : Synthèse de TNF- α dans les cellules THP-1 activés ou non par le LPS avec :

. *Figure 7A* = transfection soit par le mimic du miR-346 soit par un contrôle ne ciblant aucun miRNA (Contrôle), en présence ou non de 5-Aza à 5 μ M et de LFMA-13 à 172mM.

. *Figure 7B* = transfection soit par l'inhibiteur du miR-346 soit par un contrôle ne ciblant aucun miRNA (Contrôle), en présence ou non de TrichoA à 5 μ M et de LFMA-13 à 172mM.

Les THP-1 on été incubés avec du RPMI + 5% de SVF (Milieu) ou du LPS (1 μ g/mL) + 5% de SVF pendant 4 et 8 h. Les valeurs représentent les moyennes de deux essais effectués en double avec des FLS isolés de trois patients différents. Les écart-types indiquent la déviation standard

DISCUSSION

Le rôle des mécanismes épigénétiques tels que l'acétylation des histones, la méthylation de l'ADN ou les miARNs dans l'inflammation est encore mal connu. Dans les cancers, l'utilisation de thérapies efficaces ciblant ces mécanismes épigénétiques ont permis de mieux comprendre et de proposer des hypothèses mécanistiques quant à leur place dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire.

Dans la PR, il a été montré que l'agressivité des FLS était corrélée au degré d'hypométhylation de l'ADN (Karouzakis et al., 2009). De même, l'hypométhylation du promoteur d'IL-6 entraînait une augmentation de l'expression de cette IL-6 en réponse au LPS (Nile et al., 2008). Nous avons donc tout d'abord confirmé ces résultats en montrant que l'hypométhylation par un agent déméthylant, le 5-Aza, permettait une augmentation significative de l'expression de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF- α en réponse au LPS dans les cellules macrophagique THP-1, et dans les FLS mais uniquement pour l'IL-6 (résultats non montrés). L'utilisation thérapeutique d'un agent déméthylant dans la PR ne semble pas être intéressante au vue de ces résultats.

Cependant, tout comme dans les cellules néoplasiques, nous nous sommes intéressés à la compréhension de cet effet pro-inflammatoire de l'hypométhylation, notamment sur le TNF- α . En accord avec nos précédents résultats, nous avons montré que l'augmentation du TNF- α en réponse au LPS par l'hypométhylation avec le 5-Aza était directement liée à la régulation de Btk. En effet, on observe une augmentation de l'expression de Btk et la diminution de la TTP expliquant la stabilité augmentée de l'ARNm du TNF- α permettant sa traduction. Nous avons confirmé qu'il s'agissait bien d'un mécanisme Btk dépendant puisque l'utilisation d'un inhibiteur de Btk diminue l'expression du TNF- α . Du fait de ces résultats, les études de méthylation et de présence d'ilots CpG au niveau des promoteurs de Btk s'avèreraient être intéressantes. Une hypométhylation d'un ou plusieurs promoteurs permettrait d'expliquer l'augmentation de l'expression de l'ARNm de Btk en réponse au 5-Aza. Cependant, nous avons également montré que l'expression du miR-346 était diminuée après hypométhylation par le 5-aza et que la transfection d'un analogue de ce miR-346 annulait l'effet du 5-Aza sur l'expression de Btk en diminuant son expression. Il s'avère donc que la modulation de Btk par la méthylation soit dépendante de l'expression du miR-346.

Il est intéressant de noter que, probablement, l'hypométhylation de l'ADN a un effet indirect sur l'expression du miR-346 puisqu'on observe une diminution de son expression alors que les expression des miR-125b et 939 sont augmentées. Plusieurs études ont démontré que

différents mécanismes pouvaient interférer avec le contrôle de l'expression de miARNs. L'équipe de Zhang (Zhang et al., 2012) a montré que, dans certaines hémopathies caractérisées par la surexpression de c-myc, la répression du miR-29 était liée à l'interaction de c-myc au niveau de promoteur d'enzymes contrôlant l'acétylation des histones comme l'HDAC3 ; l'augmentation de l'activité d'HDAC3 entraîne une déacétylation de la région du miR-29 et la diminution de son expression. D'autres études avaient également mis en évidence le rôle de facteur de transcription dans le contrôle de miARNs via l'acétylation des histones (Chang et al., 2011 ; Sampath et al., 2012).

Dans notre modèle, l'hypométhylation pourrait amener à l'augmentation de synthèse d'un facteur de transcription pouvant alors interagir et contrôler l'acétylation de la région du miR-346 par l'intermédiaire des HDACs. Cette hypothèse pourrait être corrélée avec les résultats obtenus avec la TrichoA (Figure 6).

Contrairement à la méthylation de l'ADN, l'hyperacétylation ne s'accompagne pas d'une augmentation de synthèse de cytokines inflammatoires dans la PR mais une diminution de leur expression, notamment pour l'IL-6 et le TNF- α (Grabiec et al., 2010 ; Sato et al., 2006). L'utilisation d'inhibiteurs des HDACs, comme la TrichoA, s'accompagne d'une diminution de l'inflammation synoviale alors que la conformation de la chromatine est favorable à la transcription (Nishida et al., 2004). Nous avons tout d'abord confirmé ces travaux antérieurs à partir de notre modèle cellulaire THP-1 en montrant que l'utilisation d'un inhibiteur d'HDAC, la TrichoA, est corrélée à la diminution significative de synthèse de TNF- α et d'IL-6 en réponse au LPS. De la même manière que pour le 5-Aza, nous avons montré que cette diminution de TNF- α était liée à l'augmentation de l'expression de la TTP et la diminution de celle de Btk. L'expression du miR-346 était augmentée et l'utilisation d'un inhibiteur de miR-346 permettait de rétablir l'expression de TNF- α en présence de la TrichoA. Il semblerait donc que l'expression du miR-346 soit dépendante de la conformation de la chromatine et que l'hyperacétylation des histones par la TrichoA permet l'augmentation de son expression. Afin de faire le lien avec l'étude précédente sur la méthylation de l'ADN, il serait intéressant d'analyser l'activité des HDACs après déméthylation. En effet, une augmentation de l'expression des HDAC, soit par la déméthylation des promoteurs des HDACs soit par l'augmentation de l'expression d'un facteur de transcription interagissant avec les promoteurs des HDACs, permettrait de faire le lien entre diminution de l'expression du miR-346 et l'hypométhylation médiée par le 5-Aza (Figure 8).

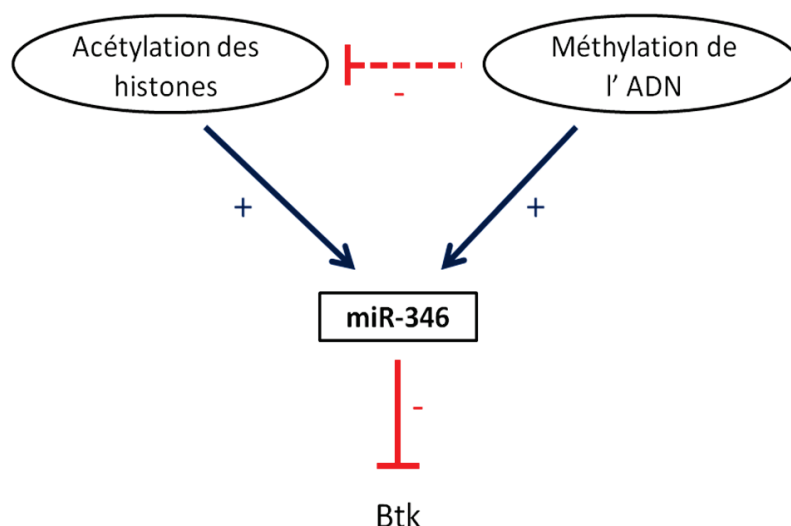


Figure 8 : Schéma représentatif du rôle des mécanismes d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN dans le contrôle de l'expression de la protéine Btk via le miR-346.

La déméthylation via la 5-Azacytidine diminue l'expression de miR-346 et augmente celle de Btk probablement par modulation de l'acétylation des histones. De manière inverse, la méthylation de l'ADN pourrait entraîner une augmentation de l'expression de miR-346 par 2 mécanismes : soit directement sur l'ADN du miR-346, soit indirectement via l'inhibition de l'acétylation des histones.

L'utilisation de la TrichoA accentue l'acétylation des histones par inhibition des HDAC, et entraîne l'augmentation de l'expression du miR-346.

La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones entraîneraient donc une diminution de l'expression de Btk et du TNF- α en réponse au LPS via le miR-346.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Au vue de l'ensemble des résultats de ce travail, nous avons donc pu contribuer à la compréhension de certains mécanismes de contrôle de l'inflammation et répondre aux objectifs proposés :

- nous avons pu tout d'abord faire le lien entre la protéine Btk et l'expression du TNF- α par la voie TLR4 : *Btk contrôle l'expression de la protéine TTP qui dégrade l'ARNm du TNF- α .*

- nous avons également mis en évidence le rôle du miR-346 dans le contrôle de la protéine Btk et donc de l'expression du TNF- α . Nous avons également mis en avant le potentiel *effet anti-TNF- α de ce miR-346.*

- enfin, nous avons montré que le contrôle de l'inflammation, notamment la synthèse de TNF- α , par les *phénomènes d'acétylation des histones ou de déméthylation de l'ADN* dépendait au moins en partie de cette *coopération entre le miR-346 et la protéine Btk.*

L'analyse de ces résultats ouvre certaines perspectives de travaux ultérieurs qui permettraient d'une part d'approfondir les données actuelles et, d'autre part, d'envisager des applications cliniques dans le domaine de la PR mais également en oncologie. Parmi les principales pistes à développer :

- 1) ***L'identification de la cible du miR-346*** : nous avons montré par plusieurs expériences que l'expression de Btk et celle du miR-346 était étroitement liée. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence la relation directe entre miR-346 et l'ARNm de Btk. Nous avons réalisé un test à la luciférase dans des cellules HEK : la transfection de l'analogue du miR-346 en présence de la région 3'UTR de l'ARNm de Btk associée au gène rapporteur de la luciférase ne s'accompagne pas d'une diminution de l'activité de la luciférase (résultats non montrés). Ceci montre qu'il n'y a, a priori, pas d'interaction entre le miR-346 et la région 3'UTR de l'ARNm de Btk. Par contre, plusieurs études ont montré que certains miARNs peuvent interagir avec leurs ARNm cibles sur d'autres régions qu'en 3'UTR, notamment en 5'UTR (Gray et al., 2010) ou dans la région codante de l'ARNm (Tay et al., 2008). L'équipe de Tsai et al. (2009) ont montré que miR-346 interagissait avec la région 5'UTR de l'ARNm de RIP140. Par ailleurs, l'analyse statistique à partir de la base de données de miARNs Sanger Institute montre que le miR-346 pourrait interagir avec plusieurs régions de l'ARNm de Btk, notamment au niveau sa région codante. De nouveaux tests à la luciférase pourraient donc être réalisés, comportant cette fois ci la région codante de l'ARNm de Btk ainsi que la région 5'UTR. Une autre cible potentielle et additionnelle du miR-346 est le facteur de transcription

PU-1. En effet, toujours selon la base de données Sanger Institute, miR-346 pourrait cibler la région 3'UTR de l'ARNm de ce facteur de transcription PU-1. Ceci serait particulièrement intéressant puisque PU-1 interagit avec la région promotrice du gène de Btk.

2) **Les autres rôles de miR-346** : en effet, chaque miARN peut cibler statistiquement plusieurs centaines d'ARNm. Il serait donc très improbable que ce miR-346 ne cible que l'ARNm de Btk ou de PU-1. D'autre part, il serait intéressant d'analyser l'ensemble des modifications apportées après régulation de l'expression de miR-346 au niveau du transcriptome et de la protéomique. Nous avons débuté cette analyse en proposant la réalisation d'un microarray du transcriptome de cellules THP-1 activées par le LPS, transfectées par l'analogue du miR-346 et comparé aux cellules THP-1 non transfectées ou transfectées avec un contrôle négatif. Cette expérience n'a pu aboutir dans un premier temps mais pourrait être reconduite. Les résultats de cette étude permettraient de déterminer d'autres voies de régulation du miR-346 mais également de Btk.

3) **L'utilisation in vivo du miR-346** : au vue de son activité anti-TNF- α , le miR-346 s'avère donc être potentiellement intéressant sur le plan thérapeutique dans la PR. Nous avons proposé d'évaluer son efficacité à partir d'un modèle in vivo murin. Nous avons contacté et collaboré avec l'équipe des Drs Neumann et Muller-Ladner de l'université Justus-Liebig de Giessen en Allemagne à propos d'un modèle murin Hu-RA-SCID (Wünder et al., 2003 ; Lefevre et al., 2009 ; Serrati et al, 2011). Il s'agit d'une souris immunodéprimée SCID, à partir de laquelle une greffe sous-cutanée de tissus synovial est réalisée. Ce tissu provient d'une membrane synoviale humaine d'un patient atteint de PR, prélevée lors d'une intervention chirurgicale. Des travaux antérieurs avaient montré que l'expression de TNF- α humain est augmentée chez ces souris Hu-RA-SCID à la fois au niveau sanguin et localement ; l'utilisation d'un anticorps anti-TNF- α permettait une diminution de l'expression de TNF- α et une inhibition de la prolifération de la synoviale greffée (Matsuno et al., 2002). Nous avons donc proposé d'évaluer l'efficacité du miR-346 sur ce modèle murin Hu-RA-SCID comparativement à un anticorps anti-TNF- α . Nous avons tout d'abord modélisé le miR-346 par l'ajout de groupements O-Methyl en 5' et Cholestérol en 3', permettant son passage passif dans la membrane cellulaire du milieu extracellulaire au cytosol cellulaire (Mercatelli et al., 2008). Ce miR-346 modifié a été synthétisé et produit par Perbio Science France. Les premiers résultats n'ont pas été contributifs en raison de problème technique et

d'approvisionnement en membrane synoviale humaine. Cependant, ces travaux sont actuellement poursuivis et devrait amener à des résultats.

4) **Le rôle de Btk et du miR-346 en cancérologie** : compte tenu de son implication dans d'autres voies que celles des TLRs comme la voie du BCR et du récepteur BAFF-R, la recherche de l'implication de la protéine Btk et du miR-346 dans d'autres modèles que la PR semble être prometteuse. Notamment, de nombreuses études récentes ont montré l'intérêt de l'utilisation de l'inhibiteur spécifique et irréversible de Btk, le PCI-32765 ou Ibrutinib®, en hématologie notamment dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique, le lymphome agressif et le myélome (Edwards et al., 2012 ; Herman et al., 2011 ; Honigberg et al., 2010 ; Ponader et al., 2012 ; De Rooij et al., 2012). L'équipe de Yang et al. (2012) ont mis en évidence l'importance de l'inhibition la protéine Btk dans la réponse au lenalidomide, un traitement immunomodulateur, dans les cellules de lymphome agressif de type ABC via l'hyperactivation constitutionnelle de MyD88 et du BCR. En effet, l'inhibition de Btk permet de diminuer la synthèse de protéines oncogénique via la diminution de l'activité de NF-κB et le lenalidomide augmente la réponse à l'interféron entrainant une réponse pro-apoptotique (figure 25).

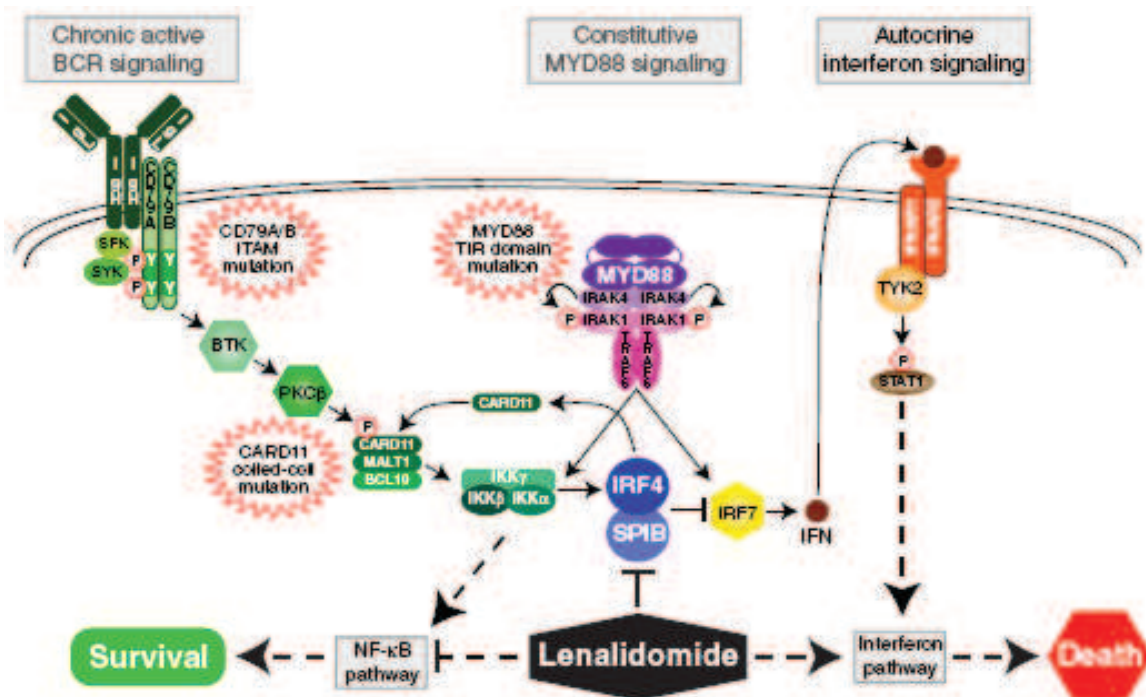


Figure 25 : Schéma représentatif du rôle de Btk dans la réponse au lenalidomide des cellules de lymphomes agressifs (Yang et al., 2012).

Compte tenu du rôle de Btk dans la pathogénie de ces hémopathies et de l'impact des traitements anti-Btk, l'étude de l'expression de miR-346 dans ces modèles paraît donc particulièrement intéressante. Le profil d'expression de ce miR-346 permettrait de définir une signature Btk et permettrait de mieux adapter les traitements chez les patients en fonction de ce profil.

Un autre modèle d'hémopathie particulièrement intéressant est celui des hémopathies lymphoïdes T liées au rétrovirus HTLV-1. En effet, à la différence des autres hémopathies caractérisées par la prolifération d'un lymphocyte B exprimant de manière constitutionnelle la protéine Btk, l'intérêt d'un inhibiteur de Btk dans les hémopathies de type T semble moins évident compte tenu de l'absence d'expression constitutionnelle de la protéine Btk dans les lymphocytes T. Cependant, il a été montré que, dans les lymphocytes T infectés par HTLV-1, la protéine virale Tax interagissait avec la protéine TTP en la réprimant par un mécanisme inconnu (Twisere et al., 2003). Ceci expliquant l'augmentation significative de synthèse de TNF- α entraînant la prolifération des cellules tumorales. Par analogie avec nos résultats, il serait donc très intéressant d'étudier l'expression de la protéine Btk dans ces lymphocytes T infectés. Si ces résultats venaient à confirmer la présence de Btk et son rôle dans ce mécanisme, des travaux devront alors être réalisés quant à l'identification du rôle de l'intégration virale dans le contrôle de Btk, notamment via l'expression du miR-346 et par les mécanismes d'acétylation et de méthylation.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Alugupalli, K.R., Akira, S., Lien, E., Leong, J.M., 2007. MyD88- and Bruton's tyrosine kinase-mediated signals are essential for T cell-independent pathogen-specific IgM responses. *J. Immunol.* 178, 3740–3749.
- Anderson, P., Phillips, K., Stoecklin, G., Kedersha, N., 2004. Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J. Leukoc. Biol.* 76, 42–47.
- Archin, N.M., Liberty, A.L., Kashuba, A.D., Choudhary, S.K., Kuruc, J.D., Crooks, A.M., Parker, D.C., Anderson, E.M., Kearney, M.F., Strain, M.C., Richman, D.D., Hudgens, M.G., Bosch, R.J., Coffin, J.M., Eron, J.J., Hazuda, D.J., Margolis, D.M., 2012. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487, 482–485.
- Asirvatham, A.J., Magner, W.J., and Tomasi, T.B. 2009. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* 45, 58-69

B

- Bajpai, U.D., Zhang, K., Teutsch, M., Sen, R., Wortis, H.H., 2000. Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation. *J. Exp. Med.* 191, 1735–1744.
- Ballestar, E., 2011. Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 7, 263–271.
- Bao, Y., Zheng, J., Han, C., Jin, J., Han, H., Liu, Y., Lau, Y.-L., Tu, W., Cao, X., 2012. Tyrosine kinase Btk is required for NK cell activation. *J. Biol. Chem.* 287, 23769–23778.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bartok, B., Firestein, G.S., 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233, 233–255.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., and Izaurralde, E. 2006. MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 523-530.
- Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H., and Cuppen, E. 2005. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120, 21-24.
- Berg, L.J., Finkelstein, L.D., Lucas, J.A., Schwartzberg, P.L., 2005. Tec family kinases in T lymphocyte development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 549–600.
- Bhoj, V.G., and Chen, Z.J. 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458, 430-437.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., Izaurralde, E., 2011. GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* 44, 120–133.

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

Brooks, S.A., Connolly, J.E., Rigby, W.F.C., 2004. The role of mRNA turnover in the regulation of tristetraprolin expression: evidence for an extracellular signal-regulated kinase-specific, AU-rich element-dependent, autoregulatory pathway. *J. Immunol.* 172, 7263–7271.

C

Cao, H., Tuttle, J.S., Blackshear, P.J., 2004. Immunological characterization of tristetraprolin as a low abundance, inducible, stable cytosolic protein. *J. Biol. Chem.* 279, 21489–21499.

Carballo, E., Blackshear, P.J., 2001. Roles of tumor necrosis factor- α receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome. *Blood* 98, 2389–2395.

Carballo, E., Lai, W.S., Blackshear, P.J., 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science* 281, 1001–1005.

Cha, H. S., Rosengren, S., Boyle, D. L., and Firestein, G. S. 2006. PUMA regulation and proapoptotic effects in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 54, 587-592.

Chang, B.Y., Huang, M.M., Francesco, M., Chen, J., Sokolove, J., Magadala, P., Robinson, W.H., Buggy, J.J., 2011. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. *Arthritis Res. Ther.* 13, R115.

Chang, S., Wang, R.-H., Akagi, K., Kim, K.-A., Martin, B.K., Cavallone, L., Haines, D.C., Basik, M., Mai, P., Poggi, E., Isaacs, C., Looi, L.M., Mun, K.S., Greene, M.H., Byers, S.W., Teo, S.H., Deng, C.-X., Sharan, S.K., 2011. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat. Med.* 17, 1275–1282.

Chen, X., Wei, Z., Wang, W., Yan, R., Xu, X., Cai, Q., 2012. Role of RNA-binding protein tristetraprolin in tumor necrosis factor- α mediated gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428, 327–332.

Collins, R.E., and Cheng, X. 2006. Structural and biochemical advances in mammalian RNAi. *J. Cell.Biochem.* 99, 1251-1266.

Cornish, A.L., Campbell, I.K., McKenzie, B.S., Chatfield, S., Wicks, I.P., 2009. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5, 554–559.

D

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

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

- Gassart, A.D., Camosseto, V., Thibodeau, J., Ceppi, M., Catalan, N., Pierre, P., and Gatti, E., 2008. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *PNAS* 105, 3491–3496.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- De Gorter, D.J.J., Beuling, E.A., Kersseboom, R., Middendorp, S., Van Gils, J.M., Hendriks, R.W., Pals, S.T., Spaargaren, M., 2007. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* 26, 93–104.
- De Rooij, M.F.M., Kuil, A., Geest, C.R., Eldering, E., Chang, B.Y., Buggy, J.J., Pals, S.T., Spaargaren, M., 2012. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 2590–2594.
- Di Paolo, J.A., Huang, T., Balazs, M., Barbosa, J., Barck, K.H., Bravo, B.J., Carano, R.A.D., Darrow, J., Davies, D.R., DeForge, L.E., Diehl, L., Ferrando, R., Gallion, S.L., Giannetti, A.M., Gribling, P., Hurez, V., Hymowitz, S.G., Jones, R., Kropf, J.E., Lee, W.P., Maciejewski, P.M., Mitchell, S.A., Rong, H., Staker, B.L., Whitney, J.A., Yeh, S., Young, W.B., Yu, C., Zhang, J., Reif, K., Currie, K.S., 2011. Specific Btk inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nat. Chem. Biol.* 7, 41–50.
- Dinh, M., Grunberger, D., Ho, H., Tsing, S.Y., Shaw, D., Lee, S., Barnett, J., Hill, R.J., Swinney, D.C., Bradshaw, J.M., 2007. Activation mechanism and steady state kinetics of Bruton's tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 282, 8768–8776.
- Doyle, S.L., Jefferies, C.A., Feighery, C., O'Neill, L.A.J., 2007. Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 282, 36953–36960.

E

- Edwards, C.M., 2012. BTK inhibition in myeloma: targeting the seed and the soil. *Blood* 120, 1757–1759.
- Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., Mauri, C., 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* 200, 277–285.
- Ellmeier, W., Jung, S., Sunshine, M.J., Hatam, F., Xu, Y., Baltimore, D., Mano, H., Littman, D.R., 2000. Severe B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members Tec and Btk. *J. Exp. Med.* 192, 1611–1624.
- Engels, B.M., and Hutvagner, G. 2006. Principles and effects of microRNA-mediated Post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25, 6163-6169.
- Esteller, M., 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 8, 286–298.

Esteller, M., 2008. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine* 358, 1148–1159.

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

F

Fairhurst, A.-M., Connolly, J.E., Hintz, K.A., Goulding, N.J., Rassias, A.J., Yeager, M.P., Rigby, W., Wallace, P.K., 2003. Regulation and localization of endogenous human *tristetraprolin*. *Arthritis Res. Ther.* 5, R214–225.

Farrajota, K., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Afif, H., Pelletier, J.-P., Li, X., Ranger, P., Fahmi, H., 2005. Inhibition of interleukin-1 β -induced cyclooxygenase 2 expression in human *synovial* fibroblasts by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum.* 52, 94–104.

Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N., 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell* 85, 307–310.

Fiedler, K., Sindrilaru, A., Terszowski, G., Kokai, E., Feyerabend, T.B., Bullinger, L., Rodewald, H.-R., and Brunner, C. 2011. Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 117, 1329–1339.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102-114.

Finkelstein, L.D., Schwartzberg, P.L., 2004. Tec kinases: shaping T-cell activation through actin. *Trends Cell Biol.* 14, 443–451.

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

Firestein, G.S., 2006. Inhibiting Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 354, 80–82.

G

Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J., 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 113–126.

Gassart, A.D., Camosseto, V., Thibodeau, J., Ceppi, M., Catalan, N., Pierre, P., and Gatti, E. 2008. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *PNAS* 105, 3491–3496.

Genovese, M.C., Van den Bosch, F., Roberson, S.A., Bojin, S., Biagini, I.M., Ryan, P., Sloan-Lancaster, J., 2010. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 62, 929–939.

- Gillespie, J., Savic, S., Wong, C., Hempshall, A., Inman, M., Emery, P., Grigg, R., McDermott, M.F., 2012. Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 64, 418–422.
- Gleixner, K.V., Mayerhofer, M., Cerny-Reiterer, S., Hörmann, G., Rix, U., Bennett, K.L., Hadzijušufovic, E., Meyer, R.A., Pickl, W.F., Gotlib, J., Horny, H.-P., Reiter, A., Mitterbauer-Hohendanner, G., Superti-Furga, G., Valent, P., 2011. KIT-D816V-independent oncogenic signaling in neoplastic cells in systemic mastocytosis: role of Lyn and Btk activation and disruption by dasatinib and bosutinib. *Blood* 118, 1885–1898.
- González-Serrano, M.E., Estrada-García, I., Mogica-Martínez, D., González-Garay, A., López-Herrera, G., Berrón-Ruiz, L., Espinosa-Padilla, S.E., Yamazaki-Nakashimada, M.A., Vargas-Hernández, A., Santos-Argumedo, L., Estrada-Parra, S.A., Espinosa-Rosales, F.J., 2012. Increased Pro-inflammatory Cytokine Production After Lipopolysaccharide Stimulation in Patients with X-linked Agammaglobulinemia. *Journal of clinical immunology*.
- Grabiec, A.M., Korchynskyi, O., Tak, P.P., Reedquist, K.A., 2012. Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 424–431.
- Grabiec, A.M., Krausz, S., De Jager, W., Burakowski, T., Groot, D., Sanders, M.E., Prakken, B.J., Maslinski, W., Eldering, E., Tak, P.P., Reedquist, K.A., 2010a. Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J. Immunol.* 184, 2718–2728.
- Grabiec, A.M., Reedquist, K.A., 2010. Histone deacetylases in RA: epigenetics and epiphenomena. *Arthritis Res. Ther.* 12, 142.
- Gray, P., Dunne, A., Brikos, C., Jefferies, C.A., Doyle, S.L., O'Neill, L.A.J., 2006. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J. Biol. Chem.* 281, 10489–10495.
- Grey, F., Tirabassi, R., Meyers, H., Wu, G., McWeeney, S., Hook, L., Nelson, J.A., 2010. A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. *PLoS Pathog.* 6, e1000967.

H

- Haberland, M., Montgomery, R.L., Olson, E.N., 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 10, 32–42.
- Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204–207

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.
- Harada, S., Yamamura, M., Okamoto, H., Morita, Y., Kawashima, M., Aita, T., and Makino, H. 1999. Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42, 1508-1516.
- Harashima, S.I., Tsukamoto, H., and Horiuchi, T. 2004. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand expression in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 43(3), 396-397.
- Haringman, J.J., Gerlag, D.M., Zwinderman, A.H., Smeets, T.J.M., Kraan, M.C., Baeten, D., McInnes, I.B., Bresnihan, B., Tak, P.P., 2005. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 834-838.
- Hasan, M., Lopez-Herrera, G., Blomberg, K.E.M., Lindvall, J.M., Berglöf, A., Smith, C.I.E., Vargas, L., 2008. Defective Toll-like receptor 9-mediated cytokine production in B cells from Bruton's tyrosine kinase-deficient mice. *Immunology* 123, 239-249.
- Hashimoto, K., Oreffo, R.O.C., Gibson, M.B., Goldring, M.B., Roach, H.I., 2009. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 60, 3303-3313.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J., and Bird, A. 1999. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401, 301-304.
- Henley, T., Kovesdi, D., and Turner, M. 2008. B-cell responses to B-cell activation factor of the TNF family (BAFF) are impaired in the absence of PI3K delta. *Eur. J. Immunol.* 38, 3543-3548.
- Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. 2008. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* 32, 276-284.
- Herman, S.E.M., Gordon, A.L., Hertlein, E., Ramanunni, A., Zhang, X., Jaglowski, S., Flynn, J., Jones, J., Blum, K.A., Buggy, J.J., Hamdy, A., Johnson, A.J., Byrd, J.C., 2011. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 117, 6287-6296.
- Hirth, A., Skapenko, A., Kinne, R.W., Emmrich, F., Schulze-Koops, H., and Sack, U. 2002. Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4, 117-125.
- Honda, F., Kano, H., Kanegane, H., Nonoyama, S., Kim, E.-S., Lee, S.-K., Takagi, M., Mizutani, S., Morio, T., 2012. The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat. Immunol.* 13, 369-378.

Honigberg, L.A., Smith, A.M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., Li, S., Pan, Z., Thamm, D.H., Miller, R.A., Buggy, J.J., 2010. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 13075–13080.

Horwood, N.J., Mahon, T., McDaid, J.P., Campbell, J., Mano, H., Brennan, F.M., Webster, D., Foxwell, B.M.J., 2003. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* 197, 1603–1611.

Horwood, N.J., Page, T.H., McDaid, J.P., Palmer, C.D., Campbell, J., Mahon, T., Brennan, F.M., Webster, D., Foxwell, B.M.J., 2006. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J. Immunol.* 176, 3635–3641.

Huber, L.C., Brock, M., Hemmatazad, H., Giger, O.T., Moritz, F., Trenkmann, M., Distler, J.H.W., Gay, R.E., Kolling, C., Moch, H., Michel, B.A., Gay, S., Distler, O., Jüngel, A., 2007. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 56, 1087–1093.

Hyvönen, M., Saraste, M., 1997. Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase: molecular explanations for X-linked agammaglobulinaemia. *EMBO J.* 16, 3396–3404.

I

Iyer, A.S., Morales, J.L., Huang, W., Ojo, F., Ning, G., Wills, E., Baines, J.D., August, A., 2011. Absence of Tec family kinases interleukin-2 inducible T cell kinase (Itk) and Bruton's tyrosine kinase (Btk) severely impairs Fc epsilonRI-dependent mast cell responses. *J. Biol. Chem.* 286, 9503–9513.

J

Jefferies, C.A., Doyle, S., Brunner, C., Dunne, A., Brint, E., Wietek, C., Walch, E., Wirth, T., O'Neill, L.A.J., 2003. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 278, 26258–26264.

Jongstra-Bilen, J., Puig Cano, A., Hasija, M., Xiao, H., Smith, C.I.E., Cybulsky, M.I., 2008. Dual functions of Bruton's tyrosine kinase and Tec kinase during Fc gamma receptor-induced signaling and phagocytosis. *J. Immunol.* 181, 288–298.

Jüngel, A., Baresova, V., Ospelt, C., Simmen, B.R., Michel, B.A., Gay, R.E., Gay, S., Seemayer, C.A., Neidhart, M., 2006. Trichostatin A sensitises rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 910–912.

K

- Kagan, J.C., and Medzhitov, R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125, 943-955.
- Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9, 361-368
- Kanzler, H., Barrat, F.J., Hessel, E.M., and Coffman, R.L. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13, 552-559
- Karouzakis, E., Gay, R.E., Gay, S., Neidhart, M., 2009a. Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Nat Rev Rheumatol* 5, 266–272.
- Karouzakis, E., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S., Neidhart, M., 2009b. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 60, 3613–3622.
- Kawabata, T., Nishida, K., Takasugi, K., Ogawa, H., Sada, K., Kadota, Y., Inagaki, J., Hirohata, S., Ninomiya, Y., Makino, H., 2010. Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R133.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslari, E., Kioussis, D., Kollias, G., 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10, 4025–4031.
- Khan, W.N., 2009. B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J. Immunol.* 183, 3561–3567.
- Kil, L.P., De Bruijn, M.J.W., Van Nimwegen, M., Corneth, O.B.J., Van Hamburg, J.P., Dingjan, G.M., Thaiss, F., Rimmelzwaan, G.F., Elewaut, D., Delsing, D., Van Loo, P.F., Hendriks, R.W., 2012. Btk levels set the threshold for B-cell activation and negative selection of autoreactive B cells in mice. *Blood* 119, 3744–3756.
- Kim, V.N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 376-385.
- Kubo, T., Uchida, Y., Watanabe, Y., Abe, M., Nakamura, A., Ono, M., Akira, S., Takai, T., 2009. Augmented TLR9-induced Btk activation in PIR-B-deficient B-1 cells provokes excessive autoantibody production and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 1971–1982.

L

- Lai, W.S., Carballo, E., Strum, J.R., Kennington, E.A., Phillips, R.S., and Blackshear, P.J. 1999. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4311–4323.

- Lee, K.-G., Xu, S., Kang, Z.-H., Huo, J., Huang, M., Liu, D., Takeuchi, O., Akira, S., Lam, K.-P., 2012. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5791–5796.
- Lee, K.-G., Xu, S., Wong, E.-T., Tergaonkar, V., Lam, K.-P., 2008. Bruton's tyrosine kinase separately regulates NFkappaB p65RelA activation and cytokine interleukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 11189–11198.
- Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinser, R., Korb, A., Schnäker, E.-M., Tarner, I.H., Robbins, P.D., Evans, C.H., Stürz, H., Steinmeyer, J., Gay, S., Schölmerich, J., Pap, T., Müller-Ladner, U., Neumann, E., 2009. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* 15, 1414–1420.
- Liedtke, C., Trautwein, C., 2012. The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. *European Journal of Cell Biology* 91, 582–589.
- Li, X., and Carthew, R.W. 2005. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 123, 1267-1277.
- Li, Y.-T., Chen, S.-Y., Wang, C.-R., Liu, M.-F., Lin, C.-C., Jou, I.-M., Shiau, A.-L., and Wu, C.-L. 2012. Brief report: amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223. *Arthritis Rheum.* 64, 3240–3245.
- Liew, F.Y., McInnes, I.B., 2002. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol. Immunol.* 38, 887–890.
- Lindvall, J.M., Blomberg, K.E.M., Väliäho, J., Vargas, L., Heinonen, J.E., Berglöf, A., Mohamed, A.J., Nore, B.F., Vihinen, M., Smith, C.I.E., 2005. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol. Rev.* 203, 200–215.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441
- Liu, X., Zhan, Z., Li, D., Xu, L., Ma, F., Zhang, P., Yao, H., Cao, X., 2011. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nat. Immunol.* 12, 416–424.
- Liu, Z., Mai, A., Sun, J., 2010. Lysine acetylation regulates Bruton's tyrosine kinase in B cell activation. *J. Immunol.* 184, 244–254.
- Loiarro, M., Ruggiero, V., and Sette, C. Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. 2010 *Mediators Inflamm* 674363.
- Lyons, R.M., Cosgriff, T.M., Modi, S.S., Gersh, R.H., Hainsworth, J.D., Cohn, A.L., McIntyre, H.J., Fernando, I.J., Backstrom, J.T., Beach, C.L., 2009. Hematologic response to three alternative dosing schedules of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 27, 1850–1856.

Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNAs-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9667-9672

M

Maeda, A., Scharenberg, A.M., Tsukada, S., Bolen, J.B., Kinet, J.P., Kurosaki, T., 1999. Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* 18, 2291-2297.

Mahajan, S., Vassilev, A., Sun, N., Ozer, Z., Mao, C., Uckun, F.M., 2001. Transcription factor STAT5A is a substrate of Bruton's tyrosine kinase in B cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31216-31228.

Marron, T.U., Martinez-Gallo, M., Yu, J.E., Cunningham-Rundles, C., 2012. Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 184-190.e1-4.

Mata, J., Marguerat, S., Bahler, J. 2005. Post-transcriptional control of gene expression: a genomewide perspective. *Trends Biochem. Sci.* 30, 506-514.

Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S. 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764-767.

Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., and Kuroki, Y. 2007. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 8, 124.

Matsuno, H., Yudoh, K., Katayama, R., Nakazawa, F., Uzuki, M., Sawai, T., Yonezawa, T., Saeki, Y., Panayi, G.S., Pitzalis, C., Kimura, T., 2002. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford)* 41, 329-337.

McInnes, I.B., Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 429-442.

McInnes, I.B., Schett, G., 2011. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 365, 2205-2219.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.

Meister, G., and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.

- Melcher, M., Unger, B., Schmidt, U., Rajantie, I.A., Alitalo, K., Ellmeier, W., 2008. Essential roles for the Tec family kinases Tec and Btk in M-CSF receptor signaling pathways that regulate macrophage survival. *J. Immunol.* 180, 8048–8056.
- Mercatelli, N., Coppola, V., Bonci, D., Miele, F., Costantini, A., Guadagnoli, M., Bonanno, E., Muto, G., Frajese, G.V., De Maria, R., Spagnoli, L.G., Farace, M.G., Ciafrè, S.A., 2008a. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS ONE* 3, e4029.
- Mohamed, A.J., Yu, L., Bäckesjö, C.-M., Vargas, L., Faryal, R., Aints, A., Christensson, B., Berglöf, A., Vihinen, M., Nore, B.F., Smith, C.I.E., 2009. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol. Rev.* 228, 58–73.
- Mueller, H., Stadtmann, A., Van Aken, H., Hirsch, E., Wang, D., Ley, K., Zarbock, A., 2010. Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways. *Blood* 115, 3118–3127.
- Muljo, S.A., Ansel, K.M., Kanellopoulou, C., Livingston, D.M., Rao, A., and Rajewsky, K. 2005. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J. Exp. Med.* 202, 261-269.

N

- Nakano, K., Whitaker, J.W., Boyle, D.L., Wang, W., Firestein, G.S., 2012. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.*
- Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., Asahara, H., 2008. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 58, 1284–1292.
- Nawaz, H.M., Kylsten, P., Hamada, N., Yamamoto, D., Smith, C.I.E., Lindvall, J.M., 2012. Differential evolutionary wiring of the tyrosine kinase Btk. *PLoS ONE* 7, e35640.
- Neff, L., Zeisel, M., Sibia, J., Schöller-Guinard, M., Klein, J.P., and Wachsmann, D. 2001. NF-kappaB and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci. *Cell. Microbiol.* 3, 703–712.
- Neff, L., Zeisel, M., Druet, V., Takeda, K., Klein, J.-P., Sibia, J., and Wachsmann, D. 2003. ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 27721–27728.
- Ní Gabhann, J., Jefferies, C.A., 2011. TLR-induced activation of Btk -- role for endosomal MHC class II molecules revealed. *Cell Res.* 21, 998–1001.

- Ní Gabhann, J., Spence, S., Wynne, C., Smith, S., Byrne, J.C., Coffey, B., Stacey, K., Kissenpfennig, A., Johnston, J., Jefferies, C.A., 2012. Defects in acute responses to TLR4 in Btk-deficient mice result in impaired dendritic cell-induced IFN- γ production by natural killer cells. *Clin. Immunol.* 142, 373–382.
- Niederer, F., Trenkmann, M., Ospelt, C., Karouzakis, E., Neidhart, M., Stanczyk, J., Kolling, C., Gay, R.E., Detmar, M., Gay, S., Jüngel, A., Kyburz, D., 2012. Down-regulation of microRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis Rheum.* 64, 1771–1779.
- Nile, C.J., Read, R.C., Akil, M., Duff, G.W., Wilson, A.G., 2008. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 2686–2693.
- Nishida, K., Komiyama, T., Miyazawa, S.-I., Shen, Z.-N., Furumatsu, T., Doi, H., Yoshida, A., Yamana, J., Yamamura, M., Ninomiya, Y., Inoue, H., Asahara, H., 2004. Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice *via* regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* 50, 3365–3376.
- Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., Komatsu, N., Bandobashi, K., Taniguchi, A., Kuwayama, Y., Togitani, K., Koeffler, H.P., Taguchi, H., 2008. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and apoptosis of HTLV-1-infected T-cells *via* blockade of signaling by nuclear factor kappaB. *Leuk. Res.* 32, 287–296.
- Ng, L.G., Ng, C.-H., Woehl, B., Sutherland, A.P.R., Huo, J., Xu, S., Mackay, F., and Lam, K.-P. 2006. BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 1837–1846.
- Nomura, K., Kanegane, H., Karasuyama, H., Tsukada, S., Agematsu, K., Murakami, G., Sakazume, S., Sako, M., Tanaka, R., Kuniya, Y., Komeno, T., Ishihara, S., Hayashi, K., Kishimoto, T., Miyawaki, T., 2000. Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway. *Blood* 96, 610–617.
- O**
- O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P.P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A. J., Miska, E. A., and Tarakhovsky, A. 2007. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNAs pathway. *Genes Dev.* 21, 1999-2004.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130, 89-100.
- Olsen, E.A., Kim, Y.H., Kuzel, T.M., Pacheco, T.R., Foss, F.M., Parker, S., Frankel, S.R., Chen, C., Ricker, J.L., Arduino, J.M., Duvic, M., 2007. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 25, 3109–3115.

Ormsby, T., Schlecker, E., Ferdin, J., Tessarz, A.S., Angelisová, P., Köprülü, A.D., Borte, M., Warnatz, K., Schulze, I., Ellmeier, W., Horejsí, V., Cerwenka, A., 2011. Btk is a positive regulator in the TREM-1/DAP12 signaling pathway. *Blood* 118, 936–945.

P

Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K., 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis. Res. Ther.* 10, R101.

Palmer, C.D., Mutch, B.E., Workman, S., McDaid, J.P., Horwood, N.J., Foxwell, B.M.J., 2008. Bmx tyrosine kinase regulates TLR4-induced IL-6 production in human macrophages independently of p38 MAPK and NF κ B activity. *Blood* 111, 1781–1788.

Park, H., Wahl, M.I., Afar, D.E., Turck, C.W., Rawlings, D.J., Tam, C., Scharenberg, A.M., Kinet, J.P., Witte, O.N., 1996. Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* 4, 515–525.

Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. 2004. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J* 23, 4727-4737.

Parolini, O., Rohrer, J., Shapiro, L.H., Conley, M.E., 1995. B-cell-specific demethylation of BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics* 42, 129–135.

Parolini, O., Rohrer, J., Shapiro, L.H., Conley, M.E., 1995a. B-cell-specific demethylation of BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics* 42, 129–135.

Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21, 533-542.

Petro, J.B., Rahman, S.M., Ballard, D.W., Khan, W.N., 2000. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB in response to B cell receptor engagement. *J. Exp. Med.* 191, 1745–1754

Pfeiffer, J.R., Brooks, S.A., 2012. Cullin 4B is recruited to tristetraprolin-containing messenger ribonucleoproteins and regulates TNF- α mRNA polysome loading. *J. Immunol.* 188, 1828–1839.

Philippe, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Meyer, A., Georgel, P., Sibilia, J., Wachsmann, D., Pfeffer, S., 2012. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* 188, 454–461.

Ponader, S., Chen, S.-S., Buggy, J.J., Balakrishnan, K., Gandhi, V., Wierda, W.G., Keating, M.J., O'Brien, S., Chiorazzi, N., Burger, J.A., 2012. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and *in vivo*. *Blood* 119, 1182–1189.

Q

Qiu, L.-Q., Stumpo, D.J., Blackshear, P.J., 2012. Myeloid-specific tristetraprolin deficiency in mice results in extreme lipopolysaccharide sensitivity in an otherwise minimal phenotype. *J. Immunol.* 188, 5150–5159.

R

Rajaram, M.V.S., Ni, B., Morris, J.D., Brooks, M.N., Carlson, T.K., Bakthavachalu, B., Schoenberg, D.R., Torrelles, J.B., and Schlesinger, L.S. 2011. Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 17408–17413.

Rawlings, D.J., Saffran, D.C., Tsukada, S., Largaespada, D.A., Grimaldi, J.C., Cohen, L., Mohr, R.N., Bazan, J.F., Howard, M., and Copeland, N.G. 1993. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 261, 358–361.

Raza, K., Falciani, F., Curnow, S.J., Ross, E.J., Lee, C.-Y., Akbar, A.N., Lord, J.M., Gordon, C., Buckley, C.D., Salmon, M., 2005. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res. Ther.* 7, R784–795.

Rowe, D.C., McGettrick, A.F., Latz, E., Monks, B.G., Gay, N.J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A., and Golenbock, D.T. 2006. The myristoylation of TRIF related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6299-6304

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83-86.

S

Sakuma, C., Sato, M., Takenouchi, T., Chiba, J., Kitani, H., 2012. Critical roles of the WASP N-terminal domain and Btk in LPS-induced inflammatory response in macrophages. *PLoS ONE* 7, e30351.

Sampath, D., Liu, C., Vasan, K., Sulda, M., Pudevalli, V.K., Wierda, W.G., Keating, M.J., 2012. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 1162–1172.

Sandhu, S.K., Volinia, S., Costinean, S., Galasso, M., Neinast, R., Santhanam, R., Parthun, M.R., Perrotti, D., Marcucci, G., Garzon, R., Croce, C.M., 2012. miR-155 targets histone deacetylase 4 (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the Eμ-miR-155 transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 20047–20052.

Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., and Shimizu, N. 2003. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82, 323-330

- Sato, T.A., Mitchell, M.D., 2006. Molecular inhibition of histone deacetylation results in major enhancement of the production of IL-1 β in response to LPS. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E490–493.
- Satterthwaite, A.B., Willis, F., Kanchanastit, P., Fruman, D., Cantley, L.C., Helgason, C.D., Humphries, R.K., Lowell, C.A., Simon, M., Leitges, M., Tarakhovsky, A., Tedder, T.F., Lesche, R., Wu, H., Witte, O.N., 2000. A sensitized genetic system for the analysis of murine B lymphocyte signal transduction pathways dependent on Bruton's tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6687–6692.
- Schmidt, N.W., Thieu, V.T., Mann, B.A., Ahyi, A.-N.N., Kaplan, M.H., 2006. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production. *J. Immunol.* 177, 7203–7210.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. 2002. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 243, 215–225.
- Seko, Y., Cole, S., Kasprzak, W., Shapiro, B.A., Ragheb, J.A., 2006. The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 5, 299–305.
- Sellam, J., Miceli-Richard, C., Gottenberg, J.-E., Ittah, M., Lavie, F., Lacabaratz, C., Gestermann, N., Proust, A., Lambotte, O., and Mariette, X. 2007. Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 790–797.
- Semaan, N., Alsaleh, G., Gottenberg, J.-E., Wachsmann, D., Sibilia, J., 2008. Etk/BMX, a Btk family tyrosine kinase, and Mal contribute to the cross-talk between MyD88 and FAK pathways. *J. Immunol.* 180, 3485–3491.
- Serrati, S., Margheri, F., Chillà, A., Neumann, E., Müller-Ladner, U., Benucci, M., Fibbi, G., Del Rosso, M., 2011. Reduction of *in vitro* invasion and *in vivo* cartilage degradation in a SCID mouse model by loss of function of the fibrinolytic system of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 63, 2584–2594.
- Sharma, S., Orłowski, G., Song, W., 2009. Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. *J. Immunol.* 182, 329–339.
- Shinners, N.P., Carlesso, G., Castro, I., Hoek, K.L., Corn, R.A., Woodland, R.T., Woodland, R.L., Scott, M.L., Wang, D., Khan, W.N., 2007. Bruton's tyrosine kinase mediates NF- κ B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. *J. Immunol.* 179, 3872–3880.
- Shinners, N.P., Carlesso, G., Castro, I., Hoek, K.L., Corn, R.A., Woodland, R.T., Woodland, R.L., Scott, M.L., Wang, D., Khan, W.N., 2007. Bruton's tyrosine kinase mediates NF- κ B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. *J. Immunol.* 179, 3872–3880.

- Shinohara, M., Koga, T., Okamoto, K., Sakaguchi, S., Arai, K., Yasuda, H., Takai, T., Kodama, T., Morio, T., Geha, R.S., Kitamura, D., Kurosaki, T., Ellmeier, W., Takayanagi, H., 2008. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell* 132, 794–806.
- Sideras, P., Müller, S., Shiels, H., Jin, H., Khan, W.N., Nilsson, L., Parkinson, E., Thomas, J.D., Brandén, L., Larsson, I., 1994. Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J. Immunol.* 153, 5607–5617.
- Singhal, E., Kumar, P., Sen, P., 2011. A novel role for Bruton's tyrosine kinase in hepatocyte growth factor-mediated immunoregulation of dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 286, 32054–32063.
- Sochorová, K., Horváth, R., Rozková, D., Litzman, J., Bartunková, J., Sedivá, A., Spísek, R., 2007. Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 109, 2553–2556.
- Stanczyk, J., Ospelt, C., Karouzakis, E., Filer, A., Raza, K., Kolling, C., Gay, R., Buckley, C.D., Tak, P.P., Gay, S., Kyburz, D., 2011. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.* 63, 373–381.
- Stoecklin, G., Lu, M., Rattenbacher, B., and Moroni, C. 2003. A constitutive decay element promotes tumor necrosis factor alpha mRNA degradation via an AU-rich element-independent pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3506-3515.

T

- Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P.J., Cofield, R.H., O'Fallon, W.M., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. 2001. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 167, 1072-1080.
- Tamiya, G., Shinya, M., Imanishi, T., Ikuta, T., Makino, S., Okamoto, K., Furugaki, K., Matsumoto, T., Mano, S., Ando, S. 2005. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet* 14, 2305-2321.
- Taneichi, H., Kanegane, H., Sira, M.M., Futatani, T., Agematsu, K., Sako, M., Kaneko, H., Kondo, N., Kaisho, T., Miyawaki, T., 2008. Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin. Immunol.* 126, 148–154
- Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi- Takamura, S., and Miyake, K. 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 94-99.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I., 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124–1128.

- Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F., Blackshear, P.J., 1996. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 4, 445–454.
- Thomas, J.D., Sideras, P., Smith, C.I., Vorechovský, I., Chapman, V., and Paul, W.E. 1993. Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 261, 355–358.
- Tili, E., Michaille, J.-J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M., 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* 179, 5082–5089.
- Tolboom, T.C., Pieterman, E., van der Laan, W.H., Toes, R.E., Huidekoper, A. L., Nelissen, R.G., Breedveld, F. C., and Huizinga, T.W. 2002. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann. Rheum. Dis.* 61, 975-980.
- Tomari, Y., and Zamore, P.D. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19, 517-529.
- Tsai, N.-P., Lin, Y.-L., Wei, L.-N., 2009. MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem. J.* 424, 411–418.
- Tsutsumi, A., Suzuki, E., Adachi, Y., Murata, H., Goto, D., Kojo, S., Matsumoto, I., Zhong, L., Nakamura, H., Sumida, T., 2004. Expression of tristetraprolin (G0S24) mRNA, a regulator of tumor necrosis factor-alpha production, in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31, 1044–1049.
- Twizere, J.-C., Kruys, V., Lefèbvre, L., Vanderplasschen, A., Collete, D., Debacq, C., Lai, W.S., Jauniaux, J.-C., Bernstein, L.R., Semmes, O.J., Burny, A., Blackshear, P.J., Kettmann, R., Willems, L., 2003. Interaction of retroviral Tax oncoproteins with tristetraprolin and regulation of tumor necrosis factor-alpha expression. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1846–1859.

U

- Uckun, F., Ozer, Z., Vassilev, A., 2007. Bruton's tyrosine kinase prevents activation of the anti-apoptotic transcription factor STAT3 and promotes apoptosis in neoplastic B-cells and B-cell precursors exposed to oxidative stress. *Br. J. Haematol.* 136, 574–589.

V

- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., and Parker, R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20, 515-524.

Van den Akker, E., Van Dijk, T.B., Schmidt, U., Felida, L., Beug, H., Löwenberg, B., Von Lindern, M., 2004. The Btk inhibitor LFM-A13 is a potent inhibitor of Jak2 kinase activity. *Biol. Chem.* 385, 409–413.

Vasudevan, S., and Steitz, J.A. 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128, 1105-1118.

Vetrie, D., Vorechovský, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarström, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow, M., 1993. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 361, 226–233.

Vijayan, V., Baumgart-Vogt, E., Naidu, S., Qian, G., Immenschuh, S., 2011. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-dependent heme oxygenase-1 gene activation *via* Nrf2 in macrophages. *J. Immunol.* 187, 817–827.

W

Waite, K.A., and Eng, C. 2002. Protean PTEN: form and function. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 829-844.

Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. 2007. Let-7 microRNA mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 21, 1857-1862

Walmsley, M.J., Ooi, S.K.T., Reynolds, L.F., Smith, S.H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D.A., Cancro, M.P., and Tybulewicz, V.L.J. 2003. Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* 302, 459–462.

Walseng, E., Furuta, K., Goldszmid, R.S., Weih, K.A., Sher, A., and Roche, P.A., 2010. Dendritic cell activation prevents MHC class II ubiquitination and promotes MHC class II survival regardless of the activation stimulus. *J. Biol. Chem.* 285, 41749–41754.

Weinmann, L., Hock, J., Ivacevic, T., Ohrt, T., Mutze, J., Schwille, P., Kremmer, E., Benes, V., Urlaub, H., and Meister, G. 2009. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* 136, 496-507.

Wilkie, G.S., Dickson, K. S., and Gray, N.K. 2003. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR binding factors. *Trends Biochem. Sci.* 28, 182-188.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-4039.

Wunder, A., Müller-Ladner, U., Stelzer, E.H.K., Funk, J., Neumann, E., Stehle, G., Pap, T., Sinn, H., Gay, S., Fiehn, C., 2003. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 170, 4793–4801.

X

Y

Yang, Y., Shaffer, A.L., 3rd, Emre, N.C.T., Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Platig, J., Kohlhammer, H., Young, R.M., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Buggy, J.J., Balasubramanian, S., Mathews, L.A., Shinn, P., Guha, R., Ferrer, M., Thomas, C., Waldmann, T.A., Staudt, L.M., 2012. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 21, 723–737.

Yu, L., Mohamed, A.J., Vargas, L., Berglöf, A., Finn, G., Lu, K.P., Smith, C.I.E., 2006. Regulation of Bruton tyrosine kinase by the peptidylprolyl isomerase Pin1. *J. Biol. Chem.* 281, 18201–18207.

Yu, L., Mohamed, A.J., Simonson, O.E., Vargas, L., Blomberg, K.E.M., Björkstrand, B., Arteaga, H.J., Nore, B.F., Smith, C.I.E., 2008. Proteasome-dependent autoregulation of Bruton tyrosine kinase (Btk) promoter *via* NF-kappaB. *Blood* 111, 4617–4626.

Z

Zeisel, M.B., Neff, L.A., Randle, J., Klein, J.-P., Sibia, J., and Wachsmann, D. 2004. Impaired release of IL-18 from fibroblast-like synoviocytes activated with protein I/II, a pathogen-associated molecular pattern from oral streptococci, results from defective translation of IL-18 mRNA in pro-IL-18. *Cell. Microbiol.* 6, 593–598.

Zeisel, M.B., Druet, V.A., Wachsmann, D., and Sibia, J. 2005. MMP-3 expression and release by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes induced with a bacterial ligand of integrin alpha5beta1. *Arthritis Res. Ther.* 7, R118–126.

Zhang, H.G., Wang, Y., Xie, J.F., Liang, X., Liu, D., Yang, P., Hsu, H.C., Ray, R.B., and Mountz, J.D. 2001 Regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase Akt. *Arthritis Rheum.* 44, 1555-1567.

Zhang, X., Zhao, X., Fiskus, W., Lin, J., Lwin, T., Rao, R., Zhang, Y., Chan, J.C., Fu, K., Marquez, V.E., Chen-Kiang, S., Moscinski, L.C., Seto, E., Dalton, W.S., Wright, K.L., Sotomayor, E., Bhalla, K., Tao, J., 2012. Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas. *Cancer Cell* 22, 506–523.

Zhu, S., Pan, W., Song, X., Liu, Y., Shao, X., Tang, Y., Liang, D., He, D., Wang, H., Liu, W., Shi, Y., Harley, J.B., Shen, N., Qian, Y., 2012. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK- α . *Nat. Med.* 18, 1077–1086.

Zorn, C.N., Keck, S., Hendriks, R.W., Leitges, M., Freudenberg, M.A., Huber, M., 2009. Bruton's tyrosine kinase is dispensable for the Toll-like receptor-mediated activation of mast cells. *Cell. Signal.* 21, 79–86.

Zvaifler, N.J. 2006. Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 8, 210.

RESUME

Appartenant à la famille des Tec kinase, le rôle de la protéine Btk ou Bruton tyrosine kinase est essentiellement connue dans le développement et la maturation des lymphocytes B. C'est la compréhension du déficit immunitaire de l'agammaglobulinémie lié à l'X ou maladie de Bruton, par la mise en évidence de mutations inactivatrices dans le gène de la protéine Btk, qui a permis de mieux comprendre la place de cette protéine Btk. Son interaction avec le récepteur BCR du lymphocyte B permet l'activation de plusieurs facteurs de transcription dont NF- κ B et les MAPKs régulant de nombreuses protéines intervenant dans la maturation et la prolifération cellulaire.

Cependant, l'expression de la protéine Btk ne se limite pas aux lymphocytes B mais elle est également exprimée dans les cellules de l'immunité innée telles les monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et mastocytes. Le rôle de Btk dans ces cellules n'est pas clairement élucidé. Btk interviendrait dans la régulation de la voie des récepteurs Toll Like ou TLRs. Ces récepteurs reconnaissent des ligands appelés PAMPs (pour Pathogen Associated Molecular Pattern) entraînant 2 types de réponses : la voie MyD88 activant NF- κ B et la synthèse de cytokines pro inflammatoires comme le TNF- α , et la voie TRIF activant le facteur de transcription IRF3 et la synthèse d'interféron de type I. La protéine Btk interagirait sur ces 2 voies de signalisation soit directement par phosphorylation d'IRF3, soit par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice appelée Mal qui, phosphorylée, pourra interagir avec MyD88. Il a été montré que la protéine Btk régule l'expression du TNF- α dans les macrophages en réponse au lipopolysaccharide ou LPS, ligand de TLR4 dépendant de la voie MyD88. Cette régulation n'interviendrait pas au niveau transcriptionnel mais post-transcriptionnel sur la stabilité de l'ARNm du TNF- α par un mécanisme jusqu'alors inconnu.

Nous nous sommes donc intéressés à cette régulation de la stabilité de l'ARNm du TNF- α par la protéine Btk en réponse au LPS ligand de TLR4. Nous avons utilisé le modèle de pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde (PR), étant donné le rôle principal du TNF- α dans la physiopathologie de cette maladie. La PR se caractérise par une prolifération de la membrane synoviale liée à un infiltrat important de cellules immunitaires dont notamment les macrophages, neutrophiles, mastocytes mais également les lymphocytes B et T. La cellule résidente de cette membrane synoviale, le fibroblaste synoviocytaire ou FLS, joue également un rôle clé dans ce processus inflammatoire. Elle interagit avec les autres cellules immunitaires permettant la pérennisation de l'inflammation. En réponse aux PAMPs via la

voie TLR, les FLS peuvent exprimer certaines cytokines inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-8, par contre ils n'expriment pas d'IL-18 et notamment pas de TNF- α .

Nous avons donc tout d'abord utilisé ce modèle cellulaire du FLS et son absence d'expression du TNF- α en réponse au LPS. Nous avons confirmé que l'absence de sécrétion du TNF- α en réponse au LPS dans les FLS n'était pas liée à une diminution de la transcription de son ARN messager mais à une instabilité de celui-ci.

Parmi les facteurs intervenant dans les mécanismes d'instabilité de l'ARNm, nous nous sommes intéressés en premier lieu au rôle potentiel des microARNs (miARNs). Il s'agit de petites molécules d'ARN simple brin, non codantes, synthétisées de manière endogène dans le noyau cellulaire par une polymérase puis maturées dans le cytoplasme par un complexe enzymatique appelé Dicer. Après maturation, le miARN pourra interagir par complémentarité de bases dans la région 3' UTR de l'ARNm cible et se fixer par l'intermédiaire d'un autre complexe enzymatique RISC. Une fois fixé, le miARN va intervenir selon 2 modes : soit par recrutement de nucléases détruisant l'ARNm cible, soit par inhibition de la machinerie traductionnelle.

Nous avons initialement réalisé un microarray de miARNs dans les FLS activés par le LPS. Nous avons montré que, parmi les miARNs qui avaient une expression significativement augmentée, 2 pouvaient cibler statistiquement la région 3'UTR de l'ARNm du TNF- α , les miR-125b et 939. Nous avons donc utilisé des inhibiteurs des miR-125b et -939 que nous avons transfectés dans les FLS : après inhibition de ces 2 miARNs, on n'a pas observé de sécrétion de TNF- α ou de stabilité de son ARNm en réponse au LPS, ceci confirmant que ces miARNs n'interviendraient pas dans ce mécanisme de contrôle. Nous nous sommes alors intéressés à un autre miARN, le miR-346, dont l'expression était la plus augmentée en réponse au LPS. Après inhibition de ce miR-346 par la transfection d'un inhibiteur spécifique dans les FLS, nous avons observé une stabilité de l'ARNm du TNF- α en réponse au LPS ainsi qu'une augmentation du TNF- α intra cytoplasmique. Parmi les cibles potentielles du miR-346, la région 3'UTR de l'ARNm de Btk était statistiquement retrouvée. Btk n'est pas exprimée de manière constitutionnelle dans les FLS. Nous avons montré que l'inhibition du miR-346 dans ces FLS permettait la réexpression de la protéine Btk. Nous avons par ailleurs démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de Btk, le LFM-A13, dans ces FLS transfectés par l'inhibiteur du miR-346 annulait l'augmentation du TNF- α intracytoplasmique et la stabilisation de son ARNm. Le miR-346 contrôle donc négativement l'expression du TNF- α dans les FLS en réponse au LPS par l'intermédiaire de la protéine Btk.

Nous avons ensuite étudié le mécanisme de contrôle de la stabilité de l'ARNm du TNF- α par Btk. En dehors des miARNs, il existe d'autres systèmes intervenant sur la stabilité de l'ARNm comme les protéines RBP. Il s'agit de complexes protéiques interagissant également au niveau de la région 3'UTR des ARNm permettant la régulation des nucléases soit en les recrutant soit en les inhibant. Parmi ces protéines, la tristetraproline ou TTP est connue pour réguler négativement la stabilité de l'ARNm du TNF- α . Nous avons montré que dans les FLS activés par le LPS ne sécrétant pas de TNF- α , l'ARNm de la TTP était exprimée. La transfection de l'inhibiteur du miR-346 dans ces FLS entraînait la diminution de l'expression de l'ARNm de la TTP. Cette diminution est annulée par l'ajout du LFM-A13 ce qui montre que Btk régule la stabilité de l'ARNm du TNF- α par inhibition de l'expression de la TTP. Dans ces FLS, nous avons donc un modèle physiologique de contrôle du TNF- α via la voie TLR4 : l'ARNm du TNF- α est dégradé par la présence de la TTP du fait de l'absence de Btk par le miR-346.

Nous avons alors utilisés ce modèle cellulaire physiologique anti-TNF- α afin de le transposer au modèle cellulaire des macrophages sécrétant du TNF- α en réponse au LPS. En effet, nous avons montré tout d'abord que l'activation par le LPS des cellules macrophagiques THP-1 n'était pas corrélée à une augmentation de l'expression du miR-346. Par contre, cette activation entraîne une augmentation de l'expression de Btk et une diminution de l'expression de la TTP. Nous avons alors transfecté ces cellules THP-1 par un analogue du miR-346. On observe une diminution significative de l'expression du TNF- α en réponse au LPS ainsi qu'une diminution de l'expression de Btk et une augmentation de celle de la TTP. Des résultats similaires ont été observés par l'utilisation de l'inhibiteur de Btk, le LFM-A13. Enfin, l'utilisation d'un siARN ciblant et inhibant l'ARNm de la TTP s'accompagne d'une réaugmentation de l'expression du TNF- α et ce malgré l'inhibition de Btk soit par l'analogue du miR-346 soit par le LFM-A13. Le miR-346 s'avère donc être un anti-TNF- α de par sa régulation négative sur l'expression de Btk via la TTP.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux rôles d'autres facteurs épigénétiques dans la régulation du TNF- α par la protéine Btk, dont l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN se caractérise par l'ajout d'un groupement méthyl au niveau d'ilots CpG localisés à proximité des promoteurs. L'ajout de ce groupement inhibe l'activation du promoteur et donc la transcription. Des études antérieures avaient montré que l'ajout d'un agent hypométhylant comme le 5-azacytidine ou 5-Aza était corrélé à l'augmentation de production de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α dans les macrophages et les membranes synoviales de PR. Nous avons montré que l'ajout de 5-Aza

dans les cellules THP-1 augmentait la synthèse de TNF- α en réponse au LPS et était associé à une augmentation de l'expression de Btk et à la diminution de celle de la TTP. L'expression du miR-346 était par contre légèrement diminuée et la transfection d'un analogue du miR-346 dans ces cellules THP-1 avec le 5-Aza permettait de diminuer la sécrétion de TNF- α . Ceci montre que la régulation du TNF- α par l'hypométhylation de l'ADN est dépendante de l'expression de Btk via notamment miR-346 de manière indirecte.

Nous avons ensuite étudié la machinerie de l'acétylation des histones. En fonction de la conformation de la chromatine, l'ADN est plus ou moins accessible aux facteurs de transcription. Ce sont les histones qui régulent cette conformation ; l'acétylation de ces histones s'accompagne d'une décompaction de l'ADN. Cette acétylation est dépendante de l'équilibre entre les enzymes qui augmentent l'acétylation comme les HAT ou celles qui déacétylent comme les HDAC. L'utilisation d'inhibiteurs des HDACs comme la trichostatine A ou TrichoA permet de diminuer la synthèse de TNF- α et d'IL-6 dans les macrophages et certains modèles murins de PR. Nous avons donc montré que l'utilisation de TrichoA dans les cellules THP-1 s'accompagne d'une diminution de synthèse de TNF- α en réponse au LPS, d'une augmentation de l'expression du miR-346, de la TTP et une diminution de Btk. L'utilisation d'un inhibiteur de miR-346 dans ces cellules THP-1 avec la TrichoA rétablie la synthèse de TNF- α . L'hyperacétylation des histones inhibe la synthèse de TNF- α par l'intermédiaire du couple Btk-miR-346.

La protéine Btk a donc une place principale dans la régulation de la synthèse du TNF- α via la voie TLR4. Le contrôle de l'expression de Btk est fortement lié à la présence du miR-346. Des études *in vitro* à partir de modèles murins de polyarthrite rhumatoïde sont en cours afin d'évaluer l'intérêt de l'administration de ce miR-346 sur le contrôle inflammatoire. Enfin, il serait également intéressant d'analyser l'importance de ce couple Btk-miR-346 dans d'autres modèles cellulaires et pathologiques ; Btk a un rôle central dans le mécanisme physiopathologique de certaines hémopathies lymphoïdes comme la leucémie lymphoïde chronique, le lymphome du manteau ou le myélome. L'étude de l'expression de ce miR-346 dans ces modèles semble être intéressante, pouvant amener à la synthèse de nouvelle thérapeutique ciblant cette voie.

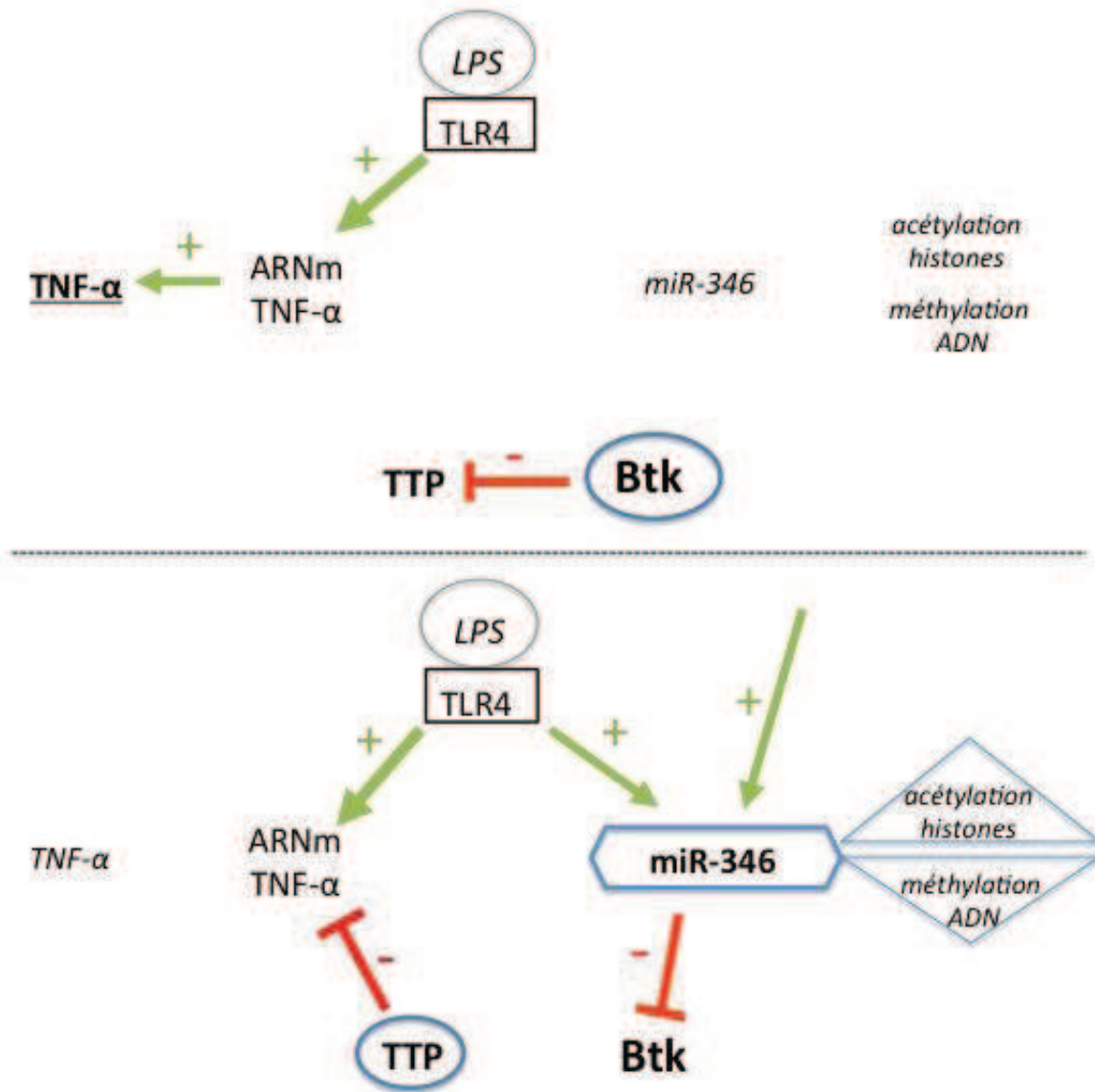


Schéma résumant le rôle du couple Btk / miR-346 sur la synthèse du TNF- α par la voie du TLR4. Les voies activatrices sont représentées par les flèches vertes et les voies inhibitrices par les rouges. Les éléments activés sont entourés en bleu.

***Régulations épigénétiques et rôles de la protéine Btk dans l'expression
du TNF- α par la voie des TLRs***

Résumé :

La Bruton tyrosine kinase ou Btk est une protéine dont le rôle dans la maturation des lymphocytes B est connu depuis plusieurs années. Par contre, son rôle dans le contrôle de l'immunité innée est moins établi. Nous avons montré que, en réponse à la voie des Toll like Receptors ou TLRs, Btk régule la stabilité de l'ARN messager du TNF- α par l'intermédiaire de la protéine TTP ou Tristétraproline. Par ailleurs, nous avons montré que l'expression d'un microARN, le miR-346, régulait négativement la protéine Btk et donc la synthèse de TNF- α . L'amplification de l'expression de ce miR-346 par transfection permet d'avoir un effet anti-TNF- α et anti-Btk intéressant notamment dans le modèle cellulaire de la polyarthrite rhumatoïde. Enfin, nous avons montré que, en réponse au TLRs, la modulation de l'expression du TNF- α en fonction de l'état de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones dépendait directement de l'expression du couple miR-346 et Btk. Btk est donc une protéine charnière dans le contrôle de l'inflammation par les mécanismes épigénétiques que sont les miARNs, la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones. Sur le plan thérapeutique, l'inhibition de cette protéine par ces différents mécanismes de régulation semble donc être très intéressante, à la fois dans les maladies inflammatoires et néoplasiques.

Mots clés : Btk ; TNF- α ; microARN ; miR-346 ; TTP ; acétylation des histones ; méthylation de l'ADN ; polyarthrite rhumatoïde

Abstact :

Bruton tyrosine kinase, or Btk, is a protein whose role in the maturation of B cells has been known for several years. However, its role in the control of innate immunity is less established. We have shown that, in response to Toll like Receptors pathway or TLRs, Btk regulates the stability of the mRNA of TNF- α via the TTP or Tristetraprolin protein. Furthermore, we showed that the expression of microRNA, the miR-346, negatively regulated the Btk protein and thus the synthesis of TNF- α . Upregulation of miR-346 by transfection act as an anti-TNF- α and anti-Btk drugs, especially in the cellular model of rheumatoid arthritis. Finally, we showed that, in response to TLRs, the modulation of the expression of TNF- α according to the state of DNA methylation and histone acetylation depended directly on crosstalk between miR-346 and Btk. Btk is a key protein in the control of inflammation by epigenetic mechanisms such as miRNAs, DNA methylation and histone acetylation. As therapeutic interest, inhibition of Btk by those different regulatory mechanisms seems to be very interesting, both in inflammatory and neoplastic diseases.

Key words : Btk ; TNF- α ; microRNA ; miR-346 ; TTP ; histone acetylation ; DNA methylation ; rheumatoid arthritis