



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UFR Faculté des Sciences et Technologies  
Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Thomas CLEMENT**

**Recherche de liens entre expression d'ARN non codants et  
physiopathologies articulaires, utilisation des microARN comme  
biomarqueurs du phénotype chondrocytaire.**

Le 10 septembre 2014

Membres du jury :  
Rapporteurs :

M. Philippe GEORGEL

Professeur, INSERM, Strasbourg

M. Hervé SEITZ

Chargé de Recherche, CNRS, Montpellier

Examineurs :

M. Denis LAFONTAINE

Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique

Mme Véronique SALONE

Docteur, membre invité, Nancy

M. Bruno CHARPENTIER

Professeur, Université de Lorraine, Nancy  
Directeur de thèse

M. Jean-Yves JOUZEAU

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier,  
Université de Lorraine, Nancy, co-Directeur de thèse

*« Si j'aurai su, j'aurai pas venu ! »  
Tigibus, La Guerre des Boutons, 1962*



Je tiens à remercier messieurs Bruno Charpentier et Jean-Yves Jouzeau, qui au travers de leur encadrement m'ont permis de réaliser cette thèse de Doctorat.

Je suis honoré de l'enthousiasme manifesté par messieurs Philippe Georgel et Hervé Seitz qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse ainsi que de la part de monsieur Denis Lafontaine qui siègera dans ce jury de thèse en tant qu'examineur.

Ma vie au laboratoire n'aurait pas été aussi agréable sans le concours de toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au sein du vieux MAEM, du moins vieux AREMS ainsi que dans ce tout jeune IMoPA : un traumatisme visuel, ou comment passer du rouge brique au vert pétant !

Mes souvenirs du MAEM et AREMS me font repenser à notre équipe fière et soudée du « Box1 » avec l'(a d)étonnante Véronique Senty-Ségault, mais aussi Valérie avec qui nous avons passé de bons moments à discuter de travail de tout, de rien, mais toujours dans la joie et la bonne humeur ! Mes souvenirs de cette époque me donnent encore le sourire aux lèvres. J'ai eu la chance de partager du temps, de recevoir les conseils de Benjamin, qui à mes yeux restera toujours le « Super Idéal PhD Student ». J'ai aussi une pensée pour Jean-Baptiste, Nicolas qui m'ont aidé à l'époque où j'étais un jeune et insouciant étudiant en Master !

Je voudrais tout spécialement remercier « Mam' Christine » avec qui j'ai travaillé, du Box1 jusqu'au Biopôle, et assisté à ses spectacles pyrotechniques ! Je te suis reconnaissant pour tous les conseils que tu m'as apportés et surtout pour ton oreille attentive, affectueuse et réconfortante dans les moments les plus compliqués de cette fin de thèse.

Je remercie aussi les personnes de l'équipe miR : David et Mériem. Je garderai en mémoire l'image de leurs yeux tous ronds lorsque je leur parlais d'épissage.

Je te remercie Véro pour être ce que tu es ! Tu m'as encadré au cours de mon M2 et nous avons travaillé ensemble jusque la fin de ton post-doc et ce fut des moments (hors du temps) très agréables. Gardes ton excellente pertinence scientifique et surtout ne fermes jamais ta boîte à parlote ! J'espère que nous continuerons à nous voir encore longtemps autour de barbecues (bancales) ou d'histoire enchantées : je « conte » sur toi !

Je remercie mon David Hasselhof et sa Pamela qui m'ont soutenu et m'ont permis de m'en sortir en m'intégrant dans l'aventure miR-9 ! Je pense bien évidemment à Arnaud B et Emilie. Espérons que les trolls nous permettent de partager encore beaucoup de cuvées !





Je voulais remercier aussi Stéphane, qui par sa grande sympathie et son originalité m'a fait prendre conscience de ce qu'est un chercheur passionné.

Mes journées passées au laboratoire sans ma joyeuse bande de « Jean ». A vous mes amis : Jean-Clémence, Jean-Guitoune, Jean-Tibo, Jean-Toinou, et Jean-Yoann. Cet ordre est purement alphabétique n'y voyez pas un ordre de préférence marqué ^^ . Que dire ... on s'est quand même vachement bien marrés. Je vous aime pour ce que vous êtes, parfois drôles, parfois chiants, mais je pense que c'est un peu la définition des amis ! Ne plus travailler à vos côtés va beaucoup me manquer, mais ne vous inquiétez pas, je crois qu'on trouvera toujours le temps pour se faire quelques « Kaboom » (avec l'accent s'il vous plait !)

Je voudrais souhaiter bon courage à tous les autres doctorants et stagiaires qui s'appêtent à le devenir. Je pense à Decebal, Samia, Maxime, JV, Benoît, Johnny et Arnaud P.

Je remercie enfin toutes les autres personnes du Laboratoire, aussi bien les membres chercheurs (Mathieu R, le père Chagot et tous les autres) que les membres administratifs et notamment Christine A. Je pense à tous ceux avec qui j'ai pu échanger de longs discours comme des simples bonjours ou des sourires.

Aussi je voudrais remercier ma famille. Je pense bien évidemment à mon Papa, ma Maman et mes frères et sœur, à Jack et Philippe mais aussi à mes grands parents et cousins. Nous avons la chance d'être une famille soudée et je vous serai toujours reconnaissant de la fierté que j'ai pu voir dans vos yeux lorsque je vous annonçais être « pris » en thèse et surtout d'avoir fait semblant de comprendre ce que je faisais durant ces trois années et demi. J'espère que ce manuscrit et ma soutenance vous éclaireront un peu.

Enfin je voudrais remercier et dédier ce manuscrit à la personne qui compte le plus pour moi, Lauriane, ma femme. Te rencontrer a fait de moi un homme meilleur et le Thomas que je suis aujourd'hui. Je te remercie pour ton soutien, tes recadrages lors de mes petits débordements post-« tracasseries du laboratoire » mais surtout d'avoir partagé avec moi cette drôle d'aventure !



## A

A : Adénosine  
ac-pré-miARN : Argonaute Cleaved-pré-miARN  
ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondine Motifs  
ADAR1/2 : Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ADNg : ADN génomique  
Ago : Argonaute  
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
ANK : Progressive ankylosis protein homolog  
ANOVA : ANalysis Of VAriance  
ARGS : Alanine-Arginine-Glycine-Sérine  
ARN : acide ribonucléique  
ARNi : ARN interférence  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomiques  
ARNt : ARN de transfert  
ARNtase : Ribonucléase des ARNt  
ARS2 : Arsenate resistance protein 2  
ASF/SF2 : Serine/arginine-rich splicing factor 1  
ATP : Adénosine TriPhosphate

## B

BMP : Bone Morphogenetic Protein  
BSA : Bovine Serum Albumin

## C

C : Cytosine  
CAF1 : Chromatine Assembly 1  
CCAL2 : ChondroCALcinosis 2  
CCL5 : Chemokine (C-C motif) ligand 5  
CCN1 : Cycline A2  
CCR4 : C-C chemokine receptor type 4  
CDS : Coding DNA Sequence  
CHS : CHalcone Synthase  
Col I/etc. : Collagène  
COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein  
CREB : Cyclic AMP-Responsive Element-Binding protein  
CS : Chondroïtine Sulfate

CSM : Cellules Souches  
Mésenchymateuses  
C<sub>T</sub> : Cycle Threshold  
CTP : Cytosine TriPhosphate  
CTX-II : Cross Linked C-Telopeptide Of Type II Collagen  
CXCL2 : C-X-C motif chemokine 2

## D

DAZAP : DAZ-associated Protein  
DCP1/2 : mRNA DeCaPping enzyme 1  
DDR : Discoïdin Domain Receptor  
DGCR8 : DiGeorge Critical Region 8  
DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium  
DMOADs : Disease-Modifying OA Drugs  
DMSO : Diméthyle sulfoxyde  
DNase : Acide Désoxyribonucléase  
dNTP : désoxyriboNucléotide TriPhosphate  
DO : Densité Optique  
dsRBD : Domaine d'interaction à l'ARN double brin  
DTT : dithiothréitol

## E

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique  
eIF2/4E/4G/6 : Eukaryotic initiation Factor  
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
EPHA5 : Ephrin Type-A receptor 5  
ePi : Phosphate inorganique extracellulaire  
ePPi : Pyrophosphate inorganique extracellulaire  
ER $\alpha$  : Estrogen Receptor alpha  
EST : Express Sequence Tag  
Exp5 : Exportine 5

## F

FFGV : Phénylalanine-Phénylalanine-Glycine-Valine  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor  
FRM : Fédération pour la Recherche Médicale  
FXR1 : Fragile X Related protein 1

## G

G : Guanosine  
GAG : GlycosAminoGlycane



GDF-5 : Growth/differentiation factor 5  
GDP : Guanosine DiPhosphate  
Gnl3 : Guanine nucleotide Binding Protein 3  
GSK-3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase-3 beta  
GTP : Guanosine TriPhosphate  
GTP : guanosine TriPhosphate  
GWASs : Genome-Wide Association Scans  
GW182 : G : Glycine – W : Tryptophane (poids moléculaire :182 kDa)

## H

HBS : HEPES Buffered Saline  
HDAC4 : Histone DéACétylase 4  
HEK : Human Epithelium Kidney  
HeLa : Henrietta Lacks  
hnRNP : heterogeneous  
RiboNucleoProtein

## I

IFN $\gamma$  : InterFeroN gamma  
IGFBP5 : Insulin-like growth factor-binding protein 5  
Ihh : Indian Hedgehog  
IL : InterLeukine  
IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinase 1  
IRES : Internal Ribosome Entry Site  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

## K

KO : Knock Out  
KS : kératane Sulfate  
KSRP : KH type-splicing regulatory protein

## L

LB : Luria Bertani  
LEF1 : Lymphoid enhancer-binding factor 1  
LMNA : Lamine A

## M

MATN3 : Matrilin-3  
Mdm2 : E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2  
MEC : Matrice ExtraCellulaire  
miARN : microARN  
MID : MIDdle  
mirtron : miARN in intron

MMP : MétalloProtéase  
MOV10 : Moloney Leukemia Virus 10  
MRE : MicroRAN Regulatory Element  
MUT68 : Polymerase beta nucleotidyltransferase

## N

N-CAM : N-Cell Adhesion Molecule  
NF90/45 : ou ILF90/45 InterLeukin enhancer binding Factor 90/45  
NF $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B  
NO : monoxyde d'azote  
NOT1 : Nocardia otitidis 1  
nt : nucléotide

## O

OA : OsteoArthritis = arthrose  
OARSI : OsteoArthritis Research Society International  
ORF : Open Reading Frame

## P

P-Bodies : Processing Bodies  
PABP : Polyadenosine Binding Domain  
PACE4 : Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4  
PAM2 : PABP interacting Motif  
PAZ : PIWI-Argonaute Zwillle  
pb : paire de bases  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PC-1 ou eNPP1 : Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1  
PCR : Polymerisation Chain Reaction  
PER2 : PERiodic circadian homolog protein 2  
Petite SU : petite Sous Unité du ribosome  
pH : potentiel Hydrogène  
PIIANP : N- propeptide of collagen IIA  
Pit-1 : Phosphate inorganic Transporter  
PITX3 : PITuitary homeoboX 3  
PIWI : P-element induced Wimpy testes  
PKA : Protéine Kinase A  
PKC : Protéine Kinase C  
PNK : polynucléotide Kinase  
PNP<sup>old35</sup> : PolyNucleotide Phosphatase old 35  
polyA : polyAdenosine  
polyU : polyUridine  
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor



PPCD : cristaux de PyroPhosphate de Calcium Dihydraté  
Pré-miARN : précurseur de miARN  
Pri-miARN : précurseur primaire de miARN  
PTB : Polypyrimidine tract-binding protein  
PTGS : Post-Transcriptional Gene Activation  
PTHrP : Parathyroïd Hormone Related Peptide  
qPCR : PCR en temps réel

## R

RCK : ou DDX6- DeaD boX protein 6  
RFX1 : Regulator Factor X1  
RISC : RNA-induced Silencing Complex  
RLC : RISC Loading Complex  
RNase : Acide ribonucléase  
rNTP : riboNucléotide TriPhosphate  
RP29 ou RPS29 : 40S ribosomal protein S29  
RRP6/41 : Ribosomal RNA processing 3'-5' exonuclease  
RT : Transcription inverse  
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2  
RXR $\alpha$  : Retinoid x Receptor alpha

## S

SAP : Shrimp Alkaline Phosphatase  
SC35 : SR family splicing factor SC35  
SDN : Small ARN Degrading Nucleases  
SDS : Sodium DodécylSulfate  
SDS PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
siARN : small interfering RNA  
simtron : splicing independant mirtrons-like  
Slug : Zinc finger protein SNAI2  
SMAD : MotherS Against Decapentaplegic homolog  
snARN : small nuclear ARN  
SNIP 1 : Smad Nuclear Interacting Protein 1  
snoARN : small nucleolar ARN  
snRNP : small nuclear RiboNucléoParticule  
Sox9 : Transcription Factor Sox9  
SR : Sérine-Arginine  
SU : Sous Unité  
SV40 : Simian Virus 40

## T

T : Thymidine  
TAP : Tobacco Acid Pyrophosphatase  
TBE : Tris Borate EDTA  
TE : Tris EDTA  
TGA : Transcriptional Gene Activation  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor beta  
TGS : Transcriptional Gene Silencing  
TIMP : inhibiteur de Métalloprotéase  
TLR : Toll Like Receptor  
TMMP : Target Mediated MiARN Protection  
TNAP : Tissue Non specific Alkaline Phosphatase  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha  
TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6  
TRBP : TAR ARN-Binding Protein  
TUT4 : Terminal UridylylTransférase 4

## U

U : Uridine  
UE : Unité Enzymatique  
UPR : Unfolded Protein Response  
UTP : Uridine Trisphosphate  
UTR : 3' UnTranslated Region

## V

VEGF : Vascular endothelial growth factor

## W

Wnt : Wingless Type  
WT : Wild Type

## X

XRN1/2 : 5'-3' exoribonuclease 1



## Présentations affichées :

- **Identification of new microRNA targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes**

Clément T\*, Salone V\*, Charpentier B., Jouzeau J-Y<sup>∞</sup>, and Bianchi A<sup>∞</sup>,  
8<sup>èmes</sup> journées du PLIC, les 26 et 27 septembre 2013, Nancy (présentation en anglais).

## Présentations orales :

- **Rôle des microARN dans la régulation de la balance Pi/PPi du cartilage**

Journée scientifique de l'école doctorale BioSE, 22 mai 2013 Nancy.

- **Rôle des microARN dans la régulation de la balance Pi/PPi du cartilage**

8<sup>ème</sup> journée de la Recherche en Santé, le 24 mai 2013, Nancy (J'ai obtenu le 2<sup>ème</sup> prix  
Bernard Fortier de la meilleure communication orale en recherche expérimentale).

- **Recherche de miARNs impliqués dans le maintien du phénotype chondrocytaire**

Journée de la Fédération de Recherche 3209, le 7 juin 2013, Nancy.

## Production scientifique :

### Articles scientifiques soumis dans des revues internationales à comité de relecture

- **Identification of new microRNA targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes**

Clément T\*, Salone V\*, Charpentier B., Jouzeau J-Y<sup>∞</sup>, and Bianchi A<sup>∞</sup>.  
Accepté et publié par le journal *Bio-Medical Materials and Engineering*

- **MicroRNA-29b limits the expression of type II collagen in human osteoarthritic and dedifferentiated articular chondrocytes**

Véronique Salone<sup>1\*</sup>, David Moulin<sup>1\*</sup>, Meriem Koufany<sup>1</sup>, Thomas Clément<sup>1</sup>, Isabelle Behm-Ansmant<sup>1</sup>, Christiane Brantant<sup>1</sup>, Bruno Charpentier<sup>1</sup>, Jean-Yves Jouzeau<sup>1†</sup>  
En préparation

### Chapitre d'ouvrage

- **Reporter gene luciferase assays to study miRNA function**

Thomas Clément & Véronique Salone  
A paraître en 2014, dans *Method in Molecular Biology*, Mathieu Rederstorff (editor),  
Springer Protocol, Humana Press.



|                                                                                         |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tableau 1 : Exemples de gènes associés à l'arthrose. ....                               | 49-1 |
| Tableau 2 : Recherches de polymorphismes génétiques au sein de plusieurs cohortes. .... | 49-2 |
| Tableau 3 : Vecteurs pSplices Express recombinants utilisés au cours de ma thèse ....   | 78-1 |
| Tableau 4 : Vecteurs pGI3-control recombinants utilisés au cours de ma thèse.....       | 78-1 |
| Tableau 5 : Vecteurs pGI3-Basic recombinants utilisés au cours de ma thèse. ....        | 78-1 |
| Tableau 6 : Vecteurs pCDNA3.1 recombinants utilisés au cours de ma thèse. ....          | 79-1 |
| Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail. ....                      | 79-2 |
| Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail (suite). ....              | 79-3 |
| Tableau 9 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot. .... | 90-1 |



|                                                                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figure 1 : Représentation graphique de l'augmentation des recherches sur les miARN.....                        | 7-1  |
| Figure 2 : Biogenèse canonique des miARN .....                                                                 | 10-1 |
| Figure 3 : Représentation schématique des domaines importants des protéines Drosha et DGCR8.....               | 10-1 |
| Figure 4 : Export des pré-miARN du noyau vers le cytoplasme, modèle adapté de (Wang et al., 2011).....         | 12-1 |
| Figure 5 : Les protéines Argonautes et composition des protéines du RLC.....                                   | 12-2 |
| Figure 6 : Représentation schématique des domaines importants des protéines GW182 et Ago2 chez l'Homme : ..... | 13-1 |
| Figure 7 : Biogénèse non canonique des miARN .....                                                             | 15-1 |
| Figure 8 : Régulation de la biogénèse des miARN à partir de leur transcription.....                            | 18-1 |
| Figure 9 : Régulation de la biogénèse des miARN <i>via</i> l'activité du microprocessor.....                   | 18-2 |
| Figure 10 : Régulation de la biogénèse des miARN <i>via</i> la régulation de l'activité de Dicer.....          | 22-1 |
| Figure 11 : Représentation schématique de l'appariement entre un miARN mature et son ARNm cible.....           | 23-1 |
| Figure 12 : Les miARN inhibent l'initiation de la traduction de leurs ARNm cibles.....                         | 26-1 |
| Figure 13 : Les miARN induisent la dégradation de leurs ARNm cibles.....                                       | 28-1 |
| Figure 14 : Activation de l'expression des gènes par les miARN.....                                            | 29-1 |
| Figure 15 : Transport intracellulaire des miARN.....                                                           | 30-1 |
| Figure 16 : Transport extracellulaire des miARN.....                                                           | 31-1 |
| Figure 17 : Les miRNases humaines.....                                                                         | 33-1 |
| Figure 18 : Régulation de la stabilité des miARN par les ARN cibles.....                                       | 33-2 |
| Figure 19 : Croissance du membre inférieur.....                                                                | 35-1 |
| Figure 20 : Embryogenèse du membre inférieur.....                                                              | 36-1 |
| Figure 21 : Chondrogenèse.....                                                                                 | 36-2 |
| Figure 22 : La voie des Wnt est impliquée dans la régulation de la chondrogenèse.....                          | 39-1 |
| Figure 23 : La voie des TGF.....                                                                               | 39-2 |
| Figure 24 : La voie FGF est importante pour la segmentation de l'ébauche osseuse.....                          | 39-3 |
| Figure 25 : Régulation de la prolifération des chondrocytes.....                                               | 40-1 |
| Figure 26 : Composition du cartilage articulaire.....                                                          | 42-1 |
| Figure 27 : Coupe de cartilage articulaire.....                                                                | 43-1 |
| Figure 28 : Intégration du chondrocyte dans la matrice extracellulaire.....                                    | 44-1 |
| Figure 29 : La balance ePPI/ePi dans le chondrocyte.....                                                       | 46-1 |
| Figure 30 : Dégénérescence des tissus articulaires au cours de l'arthrose.....                                 | 51-1 |
| Figure 31 : Synthèse et dégradation des fibres de collagène.....                                               | 59-1 |
| Figure 32 : Dégradation des agrécanes.....                                                                     | 60-1 |
| Figure 33 : Rôles des miARN impliqués dans l'induction de la chondrogenèse.....                                | 63-1 |
| Figure 34 : Rôles des miARN impliqués dans la régulation de la condensation des CSM.....                       | 64-1 |
| Figure 35 : Rôle des miARN impliqués dans l'inhibition de la chondrogenèse.....                                | 64-2 |
| Figure 36 : Rôles des miARN impliqués dans la régulation de la synthèse des composants matriciels.....         | 65-1 |
| Figure 37 : Rôle des miARN impliqués dans l'apparition d'un phénotype arthrosique.....                         | 66-1 |
| Figure 38 : Représentations schématiques des plasmides utilisés.....                                           | 77-1 |
| Figure 39 : Représentations schématiques des plasmides utilisés (suite).....                                   | 78-1 |
| Figure 40 : Principe du système de clonage par recombinaison Gateway®.....                                     | 82-1 |
| Figure 41 : Stratégie de délétion de séquence au sein d'un plasmide d'intérêt.....                             | 83-1 |
| Figure 42 : Méthode de transfection au JetPEI®.....                                                            | 85-1 |
| Figure 43 : Méthode de transfection au phosphate de calcium.....                                               | 85-2 |





|                                                                                                                                                                              |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figure 44 : Illustration du principe de la réaction de transcription inverse.....                                                                                            | 91-1  |
| Figure 45 : Expériences de validation de couple d'oligonucléotides 7381 et 7161.....                                                                                         | 91-1  |
| Figure 46 : Illustration du principe de la réaction de PCR en temps réel SYBR Green <sup>TM</sup> .....                                                                      | 92-1  |
| Figure 47 : Etape de transcription inverse au cours de la réaction de RT-qPCR TaqMan.....                                                                                    | 92-2  |
| Figure 48 : Principe de la réaction de PCR en temps réel par la méthode TaqMan.....                                                                                          | 93-1  |
| Figure 49 : Détection d'un précurseur pri-miARN par la méthode TaqMan.....                                                                                                   | 93-2  |
| Figure 50 : Représentation schématiques du principe des tests rapporteur luciférase.....                                                                                     | 94-1  |
| Figure 51 : Localisation du cluster miR-23b~27b~24-1 au sein de l'ORF <i>C9orf3</i> .....                                                                                    | 97-1  |
| Figure 52 : Analyse par PCR de la présence de la séquence d'intérêt de <i>C9orf3</i> au sein de<br>plusieurs types cellulaires.....                                          | 99-1  |
| Figure 53 : Maturation de l'ARN de <i>C9orf3</i> dans différentes lignées cellulaires.....                                                                                   | 99-2  |
| Figure 54 : Analyse par RT-PCR des transcrits polyadénylés de <i>C9orf3</i> dans différentes<br>lignées cellulaires.....                                                     | 100-1 |
| Figure 55 : Stratégie d'amplification de la séquence d'intérêt en vu de son clonage dans un<br>vecteur d'expression.....                                                     | 101-1 |
| Figure 56 : Clonage de l'amplicon de 4874 pb dans le vecteur d'expression pSplice Express.<br>.....                                                                          | 102-1 |
| Figure 57 : Discrimination entre des transcrits issus du minigène et des transcrits endogènes.<br>.....                                                                      | 102-2 |
| Figure 58 : Représentations du minigène et de ses formes variantes tronquées.....                                                                                            | 102-3 |
| Figure 59 : Expériences visant à la détection de la maturation du pré-ARNm de <i>C9orf3</i> par<br>RT-PCR semi-quantitative.....                                             | 103-1 |
| Figure 60 : Analyse de la maturation des variants raccourcis du minigène pSpseq1seq3.....                                                                                    | 103-2 |
| Figure 61 : Analyse de la maturation des variants ponctuels du minigène pSpseq1seq3.....                                                                                     | 104-1 |
| Figure 62 : Analyse de la production des miR-23b, 27b et 24 dans le modèle de stimulation à<br>l'interleukine 1 de t=0 à 24 heures de traitement.....                        | 106-1 |
| Figure 63 : Analyse de la production des miR-23b, 27b et 24 dans différents types cellulaires<br>par RT-qPCR.....                                                            | 107-1 |
| Figure 64 : Analyse du taux d'expression de l'ARNm <i>C9orf3</i> dans modèle de stimulation à<br>l'interleukine 1 de t=0 à 24 heures de traitement.....                      | 108-1 |
| Figure 65 : Etude de l'expression de l'ORF <i>C9orf3</i> au sein de chondrocytes arthrosiques et<br>non arthrosiques.....                                                    | 108-2 |
| Figure 66 : Recherche de promoteurs alternatifs potentiels en amont du cluster de miR-<br>23b~27b~24-1.....                                                                  | 109-1 |
| Figure 67 : Résultats des surexpressions des protéines SR et hnRNP.....                                                                                                      | 111-1 |
| Figure 68 : Analyses de l'influence de la surexpression de protéines régulatrices de l'épissage<br>de type SR et hnRNP sur la production de l'ORF <i>C9orf3</i> humaine..... | 111-2 |
| Figure 69 : Analyses de l'influence de la surexpression de protéines régulatrices de l'épissage<br>sur la production des miRNA miR-23b, -27b et -24-1.....                   | 112-1 |
| Figure 70 : Influence de la surexpression de protéines régulatrices de l'épissage sur les taux de<br>production des miRNA d'intérêt.....                                     | 113-1 |
| Figure 71 : Modèle de régulation potentielle de la production des miRNA du cluster miR-<br>23b~27b~24-1 par la protéine hnRNP K.....                                         | 113-2 |
| Figure 72 : Etude de l'influence de la protéine hnRNP K sur la production des miR-23b, 27b<br>et 24-1.....                                                                   | 114-1 |
| Figure 73 : Hypothèse du rôle de régulateur négatif du transcrit antisens au gène codant miR-<br>23b sur la production de miR-23b.....                                       | 114-2 |
| Figure 74 : Détection par RT-PCR d'un transcrit antisens à la séquence codant le miR-23b<br>dans les cellules HEK 293T.....                                                  | 115-1 |





|                                                                                                                                                               |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figure 75 : Caractérisation de l'extrémité 3' du transcrit antisens au gène codant miR-23b.....                                                               | 115-2 |
| Figure 76 : Illustration des biais techniques potentiels rencontrés au cours de la caractérisation d'un transcrit antisens.....                               | 116-1 |
| Figure 77 : Expérience de RACE PCR (kit Invitrogen).....                                                                                                      | 117-1 |
| Figure 78 : Caractérisation de l'extrémité 5' du transcrit antisens au gène codant miR-23b.....                                                               | 117-2 |
| Figure 79 : Expérience de RACE PCR par circularisation des ARN.....                                                                                           | 118-1 |
| Figure 80 : Etude du rôle fonctionnel du transcrit antisens au gène codant miR-23b. ....                                                                      | 119-1 |
| Figure 81 : Conservation des séquences de miR-9 et des sites prédits de l'Homme à la souris. ....                                                             | 149-1 |
| Figure 82 : Validation des prédictions de cible miRNA/3'UTR, tests de variants par mutations ponctuelles.....                                                 | 164-1 |
| Figure 83 : Validation des prédictions de cible miRNA/3'UTR suite de l'étude. ....                                                                            | 164-2 |
| Figure 84 : Stratégie pour l'étude de la maturation <i>in vitro</i> de l'ARNm <i>C9orf3</i> et pour la recherche de la machinerie moléculaire impliquée. .... | 169-1 |
| Figure 85 : Expériences de maturation <i>in vitro</i> de transcrits <i>C9orf3</i> en extraits nucléaires. ....                                                | 169-2 |
| Figure 86 : Rôle de l'épissage dans la maturation du pré-ARNm <i>C9orf3</i> . ....                                                                            | 169-3 |



## Avant Propos

|                                             |   |
|---------------------------------------------|---|
| A. L'importance des ARN.....                | 1 |
| I. Un « monde ARN ».....                    | 1 |
| II. De l'ARNm à la protéine.....            | 2 |
| B. ARN non codants et ARN interférence..... | 3 |

## Introduction

### Chapitre 1 : les microARN..... 8

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| A. Biogenèse des microARN :.....                                         | 8  |
| I. Localisation génomique des miARN .....                                | 9  |
| C. Biogenèse la plus classique des miARN.....                            | 10 |
| I. Le précurseur pri-miARN est clivé par le « microprocessor ».....      | 10 |
| II. Le précurseur pré-miARN est exporté du noyau vers le cytoplasme..... | 11 |
| III. Prise en charge du pré-miARN par le complexe composé de Dicer ..... | 12 |
| IV. Incorporation du miARN mature dans la particule RISC.....            | 13 |
| V. Biogenèse non canonique des miARN.....                                | 15 |
| VI. Régulations de la biogenèse des miARN.....                           | 17 |
| D. Régulation de l'expression des gènes par les miARN.....               | 22 |
| I. Le duplex miARN-ARNm cible.....                                       | 23 |
| II. Inhibition de la traduction de l'ARNm cible .....                    | 25 |
| III. Dégradation de l'ARNm cible .....                                   | 28 |
| IV. Activation de l'expression des gènes par les miARN.....              | 29 |
| E. Devenir des miARN .....                                               | 30 |
| I. Transport des microARN.....                                           | 30 |
| II. Stabilité et dégradation des miARN chez l'Homme .....                | 32 |

### Chapitre 2 : Le cartilage articulaire, biosynthèse, homéostasie, et pathologies..... 35

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| A. La chondrogenèse :.....                              | 35 |
| I. Embryogénèse du membre inférieur .....               | 35 |
| II. De la CSM au chondrocyte différencié.....           | 36 |
| III. Contrôle de la différenciation du chondrocyte..... | 38 |
| B. Le cartilage articulaire.....                        | 41 |
| I. Composition du cartilage sain.....                   | 41 |
| II. Organisation du cartilage articulaire.....          | 43 |
| III. Relation MEC/Chondrocyte.....                      | 44 |



|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| C. Perte de phénotype du chondrocyte et pathologies ..... | 45 |
| I. Homéostasie du cartilage .....                         | 45 |
| II. Arthrose .....                                        | 47 |

### Chapitre 3 : Rôles des miARN dans la régulation génique du chondrocyte : vers de nouveaux biomarqueurs de l'état physiologique du cartilage ? ..... 57

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. Les biomarqueurs de l'arthrose .....                                                                    | 57 |
| I. L'imagerie médicale, support de l'identification des biomarqueurs .....                                 | 58 |
| II. Les biomarqueurs collagéniques .....                                                                   | 59 |
| III. Les biomarqueurs issus du métabolisme de l'agrécan .....                                              | 60 |
| IV. Les biomarqueurs protéiques non collagéniques .....                                                    | 61 |
| V. Les marqueurs de l'inflammation synoviale .....                                                         | 61 |
| VI. Les marqueurs protéolytiques .....                                                                     | 62 |
| B. Les miARN : biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques des pathologies articulaires .....                 | 62 |
| I. Les miARN impliqués dans la régulation génique du chondrocyte sain et pathologique .....                | 63 |
| II. Utilisation des miARN en tant que biomarqueur et/ou cibles thérapeutiques de l'arthrose ? ...<br>..... | 67 |

### Objectifs ..... 71

## Matériel et Méthodes

### Matériel

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| A. Souches de cellules bactériennes et cellules utilisées : ..... | 75 |
| I. Souches bactériennes : .....                                   | 75 |
| II. Lignées cellulaires : .....                                   | 75 |
| III. Cellules humaines en culture primaire : .....                | 76 |
| B. Milieux de culture : .....                                     | 76 |
| I. Cultures bactériennes : .....                                  | 76 |
| II. Cultures de cellules humaines et murines : .....              | 76 |
| C. Plasmides et vecteurs d'expression utilisés .....              | 77 |
| I. Le plasmide pCR2.1 (Life Technologies): .....                  | 77 |
| II. Le plasmide pCR-Blunt (Life Technologies) : .....             | 77 |
| III. Le vecteur pSplice Express (don de Stefan Stamm) .....       | 77 |
| IV. Le vecteur pG13 control (Promega) .....                       | 78 |



|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| V. Le vecteur pGI3 Basic (Promega) .....          | 78 |
| VI. Le vecteur pCDNA3.1 (Life Technologies) ..... | 78 |
| VII. Le vecteur pRL-SV40 (Promega) .....          | 79 |
| D. Oligodésoxynucléotides : .....                 | 79 |

## Méthodes

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. Méthodes de génie génétique.....                                                     | 80 |
| I. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR.....                                       | 80 |
| II. Visualisation des produits PCR par électrophorèse : .....                           | 80 |
| III. Purification de produits PCR en vue d'un clonage.....                              | 81 |
| IV. Digestions enzymatiques des inserts à cloner .....                                  | 81 |
| V. Clonage de fragment d'ADN dirigé par des sites d'enzymes de restriction.....         | 81 |
| VI. Clonage T/A d'un fragment d'ADN double brin amplifié par PCR.....                   | 82 |
| VII. Clonage « bout franc » d'un fragment d'ADN double brin amplifié par PCR.....       | 82 |
| VIII. Clonage par recombinaison par la technique Gateway™.....                          | 82 |
| IX. Délétion de séquences au sein d'un plasmide.....                                    | 83 |
| X. Minipréparation et Maxipréparation d'ADN plasmidique.....                            | 83 |
| XI. Séquençage des ADN plasmidique .....                                                | 84 |
| B. Méthodes de cultures.....                                                            | 84 |
| I. Cultures bactériennes.....                                                           | 84 |
| II. Transformation bactérienne .....                                                    | 84 |
| III. Cultures de lignées humaines.....                                                  | 84 |
| IV. Traitement de cellules à l'interleukine 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....             | 85 |
| V. Différenciation de chondrocytes murins (ATDC5).....                                  | 85 |
| VI. Transfection de cellules humaines par un plasmide au réactif JetPEI™.....           | 85 |
| VII. Transfection de cellules humaines par un siARN au phosphate de calcium .....       | 85 |
| VIII. Transfection transitoires des chondrocytes par un pré-miARN.....                  | 86 |
| IX. Transfections stables des chondrocytes par un pré-miARN.....                        | 86 |
| C. Méthodes d'extraction des constituants cellulaires.....                              | 86 |
| I. Extraction des ARN totaux et de l'ADNg de cellules humaines au Trizol®. ....         | 86 |
| II. Extraction des ARN totaux de cellules humaines et murines par un kit Exiqon : ..... | 87 |
| III. Préparation et dosage d'extraits protéiques.....                                   | 87 |
| D. Méthodes d'analyses.....                                                             | 87 |
| I. Analyses in silico .....                                                             | 87 |
| II. Préparation des ARN à l'analyse par RACE PCR .....                                  | 88 |



|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| III. Epissages <i>in vitro</i> .....                                  | 89 |
| IV. Western Blot.....                                                 | 90 |
| V. Analyse par RT-PCR .....                                           | 91 |
| VI. Analyse par RT-qPCR SYBR-Green.....                               | 92 |
| VII. Détection des miARN matures et pri-miARN par RT-qPCR TaqMan..... | 92 |
| VIII. Validation des prédictions de cibles miARN/ARNm .....           | 95 |

## Résultats

### Chapitre 1 : Caractérisation de l'extrémité 3' de l'ORF C9orf3 portant le cluster de gènes codant les miR-23b, 27b et 24-1 humains..... 97

|                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A. Caractérisation de l'évènement de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm C9orf3. ....           | 98  |
| I. Etude de l'organisation génomique de l'extrémité 3' de l'ORF C9orf3 : .....                       | 98  |
| II. Détection de l'évènement de maturation de l'ARNm C9orf3 dans 6 lignées cellulaires humaines..... | 99  |
| III. Construction d'un minigène.....                                                                 | 101 |
| B. Etude de la maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm.....                                         | 102 |
| I. Analyses de variants de délétions du minigène WT.....                                             | 102 |
| II. Analyses de variants de délétions du minigène pSpseq1seq3 : .....                                | 103 |
| III. Analyses de variants ponctuels du minigène pSpseq1seq3 (105nt) : .....                          | 104 |

### Chapitre 2 : Etude de la régulation de l'expression des gènes de miARN du cluster miR-23b~27b~24-1 .....105

|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A. Mise en évidence d'une production différentielle des miARN du cluster miR-23b ~27b ~24-1                          | 105 |
| I. Expériences de puces dédiées aux petits ARN non codants.....                                                      | 105 |
| II. Vérification des données des puces et validation par RT-qPCR : .....                                             | 106 |
| III. Expériences de RT-qPCR dans différents types cellulaires.....                                                   | 107 |
| B. Recherche de mécanismes permettant la production différentielle des miARN d'intérêt ....                          | 108 |
| I. La régulation de la production des miR-23b, -27b et 24-1 est-elle liée à la maturation du pré-ARNm C9orf3 ? ..... | 108 |
| II. Recherche de la présence de promoteurs alternatifs au sein de l'intron 13 de C9orf3 : .....                      | 109 |
| C. Etude du rôle de protéines régulatrices d'épissage dans la maturation des miARN d'intérêt :                       | 110 |
| I. Surexpression de protéines SR et hnRNP en cellules HEK 293T .....                                                 | 111 |
| II. Autres pistes de régulation potentielle de l'expression des miARN du cluster d'intérêt.....                      | 113 |



|                                                                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Chapitre 3 : Etude du rôle de miR-29b dans la régulation génique du chondrocyte dédifférencié .....</b>                            | <b>122</b> |
| A. Crible de variations de profils d'expression de miARN .....                                                                        | 122        |
| I. Utilisation de micropuces dédiées aux microARN .....                                                                               | 122        |
| II. Etablissement d'un panel de miARN candidats .....                                                                                 | 123        |
| B. Validation des profils de miARN candidats .....                                                                                    | 123        |
| I. Prédiction in silico des cibles de miARN candidats .....                                                                           | 123        |
| II. Quantification des profils d'expression de miR-29b et Col-IIa1 .....                                                              | 124        |
| III. Validation des prédictions de cible de miR-29b par tests luciférase .....                                                        | 124        |
| IV. Discussion complémentaire .....                                                                                                   | 144        |
| <br><b>Chapitre 4 : Etude de l'implication des miARN dans la régulation de la balance ePi/ePPi dans la matrice du cartilage .....</b> | <b>147</b> |
| A. Plan de l'étude .....                                                                                                              | 147        |
| B. Résultats .....                                                                                                                    | 147        |
| I. Prédiction de cibles de miARN in silico .....                                                                                      | 147        |
| II. Etude de l'expression des miARN candidats dans un modèle de perte de phénotype chondrocytaire .....                               | 148        |
| III. Validation fonctionnelle des prédictions .....                                                                                   | 148        |
| IV. Surexpression transitoire de miR-9 en cellules ATDC5 .....                                                                        | 149        |
| V. Résultats complémentaires : tests luciférase .....                                                                                 | 164        |
| <br><b>Discussion et Perspectives .....</b>                                                                                           | <b>165</b> |
| <b>Annexes .....</b>                                                                                                                  | <b>178</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>                                                                                                            | <b>188</b> |

# *Avant-Propos*





# Avant-Propos

## **A. L'importance des ARN**

La molécule d'ARN pourrait être considérée comme l'une des plus importantes du règne du vivant, tant elle est impliquée dans de nombreux processus biologiques. Ces rôles conservés sont nombreux : messagers de l'information génétique pour la machinerie de traduction, activités catalytiques (ribosome, ribozymes), guides pour la machinerie d'épissage, guides pour les ribonucléoparticules de modifications des ARN ribosomiques (snoARN) ou encore régulateurs de l'expression génique par ARN interférence.

### **I. Un « monde ARN »**

Le monde du vivant actuel est basé sur un support génétique constitué d'ADN et des effecteurs de cette information génétique sous forme de protéines enzymatiques. Cependant, il existe de plus en plus d'indices permettant d'envisager que la Vie biologique contemporaine aurait été précédée par une forme de Vie plus simple au cours de laquelle l'information génétique était contenue au sein de l'ARN et où le phénotype était régi par des ARN catalytiques (pour revue (Joyce 2002)). Ce « monde ARN » a débuté il y a 4 milliards d'années.

L'apparition des ARN est encore discutée. Une première hypothèse avancée sur leur apparition repose sur l'auto-assemblage des molécules chimiques composant la « brique élémentaire » de l'ARN, les nucléotides. C'est la chimie dite pré-biotique qui aurait permis, dans des conditions adéquates, la formation des nucléotides. Mais cette hypothèse semble être contestée par la présence de nombreux analogues structuraux de ribose ( $\alpha$ ,  $\beta$ ; D ou L), de base azotée ou encore de groupements phosphates permettant de lier les nucléotides (liaisons 3'-5' ; liaisons analogues 2'-5', 2'-2', 3'-3', 5'-5'). En effet, toutes ces molécules pourraient être assemblées de manière aléatoire rendant les mécanismes de conservation et d'autoréplication sous une forme unique et stable d'un ARN très difficiles à mettre en œuvre. Une autre hypothèse, quant à l'apparition de la molécule d'ARN, serait l'existence de





molécules d'acide nucléiques précédant la molécule d'ARN. Celles-ci seraient constituées de phosphate et de bases azotées mais le ribose qui compose la forme ARN actuelle serait substitué par un peptide (APN) ou encore du tréhalose (ATN), plus stable que le ribose. Les polymères de ces formes d'acides nucléiques seraient plus stables et leur structuration en double hélice serait stabilisée par des appariements Watson-Crick canoniques. C'est à partir de ce monde « pré-ARN » et grâce à l'évolution de ces acides nucléiques particuliers que les molécules d'ARN auraient pu apparaître.

A l'apogée du règne du monde ARN, des expériences d'évolution dirigée ont mis en évidence que les ARN possédaient diverses capacités catalytiques. L'activité principale de ces acides nucléiques était leur propre réplication. Les ARN catalysaient d'autres réactions s'apparentant à des courtes voies métaboliques comme la synthèse de ribonucléotides et leur polymérisation par des ribozymes à activité ligase. Le monde de l'ARN aurait cependant commencé à périliter il y a 3,8 milliards d'années lorsque les ARN ont acquis la capacité de synthèse de peptides. En effet, certains peptides possédaient des activités enzymatiques plus efficaces que les ARN catalytiques. Les protéines ont alors vu le jour et ont été sélectionnées d'un point de vue évolutif. De plus, il y a 3,6 milliards d'années, l'ARN aurait été déchu de sa souveraineté par la sélection d'une autre forme d'acide nucléique plus grande mais plus stable et mieux adaptée au support de l'information génétique, l'acide désoxyribonucléique (ADN).

## **II. De l'ARNm à la protéine**

Aujourd'hui, l'importance de la molécule d'ARN n'est pas en reste. Elle est impliquée dans tous les processus biologiques de la cellule, d'une part, en tant qu'intermédiaire ARNm codant l'information génétique de l'ADN permettant la production de l'effecteur protéique et, d'autre part, en tant qu'ARN non codant régulateur.

La famille d'ARN non codant la plus abondante en termes de nombre de copies au sein d'une cellule, est sans conteste la famille des ARN ribosomiques (ARNr). Ces ARNr matures se complexent avec de nombreuses protéines pour former le ribosome actif. C'est une astucieuse coopération entre des activités enzymatiques et des activités d'ARN catalytiques ancestrales qui permet la synthèse protéique et sa régulation.

D'autres familles d'ARN non codant existent, dont les rôles sont de guider des ribonucléoparticules impliquées dans la maturation des ARNm ou ARNr. La famille des snARN (small nuclear ARN) est composée d'ARN qui, assemblés avec des protéines, forment



des facteurs de l'épissage. La séquence de ces ARN permet de guider ces particules sur des séquences spécifiques des pré-ARNm pour réaliser l'épissage des introns.

Il a été longtemps pensé qu'un type d'ARNm portait l'information génétique nécessaire à la synthèse d'une seule protéine. En 1977, les travaux de l'équipe dirigée par le Pr Philip Allen Sharp sur l'adénovirus a mis en évidence la présence de séquences non codantes dans les ARNm appelées introns (Berget, Moore, and Sharp 1977). Cette découverte pionnière vaudra le prix Nobel à PA Sharp en 1993. Ces travaux ont alors révélé l'existence du mécanisme d'épissage permettant de maturer le pré-ARNm constitué des séquences codantes (exons) et non codantes (introns). Cette machinerie moléculaire permet de cliver les introns et produire l'ARNm mature. Ces régions non codantes sont reconnues par la machinerie d'épissage constituée des particules snARN grâce à des séquences consensus situées aux bornes des introns (pour revue (Kornblihtt et al. 2013)). La reconnaissance des bornes des introns par les snARN est médiée par une multitude de facteurs protéiques accessoires (comme les protéines hnRNP et les protéines SR) et régulant ainsi la disponibilité de certaines bornes d'introns. Cette régulation aboutit alors à l'omission ou l'inclusion de séquences codantes par l'épissage d'introns non consécutifs. On parle de phénomène d'épissage alternatif. L'épissage alternatif permet, à partir d'un même transcrit pré-ARNm, de produire plusieurs ARNm matures différents et au final la production de plusieurs protéines à partir d'un même gène.

La famille des snoARN (small nucleolar ARN) est constituée d'ARN inclus dans des particules ribonucléoprotéiques. Ces ARN guident, par complémentarité de séquence avec les ARNr, la modification de bases (pseudourydilation) ou des nucléosides (2'-O-méthylation).

## **B. ARN non codants et ARN interférence**

D'autres ARN non codants sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *via* le phénomène d'ARN interférence (pour revue (Green and Weinberg 2011)).

Une particularité de ces petits ARN (miARN, siARN) est qu'ils sont inclus dans un complexe comprenant la protéine argonaute (AGO). Ces ARN, par complémentarité de base guideront la particule ribonucléoprotéique sur l'ADN ou l'ARNm cible, pour activer (système **Transcriptional Gene Activation**) ou inhiber (système **Transcriptional Gene Silencing**) la transcription du gène cible, ou inhiber la traduction de l'ARNm, ou encore dégrader l'ARNm (système **Post-Transcriptional Gene Silencing**).

La découverte correspondant au phénomène d'interférence à l'ARNm a été permise par l'expérience fondatrice de l'équipe du Pr Richard Jorgensen en 1990 chez le pétunia (Napoli,



Lemieux, and Jorgensen 1990). Cette équipe souhaitait étudier initialement le rôle de l'enzyme chalcone synthase (*CHS*) réalisant la première étape de la synthèse du flavonoïde anthocyanine qui est responsable de la pigmentation violette du pétunia. En introduisant un gène codant la *CHS* chimérique supplémentaire (copie du gène endogène), ils voulaient savoir si l'expression de cette enzyme était limitante pour la synthèse du flavonoïde. Le résultat de cette expérience fut inattendu puisque à l'inverse d'observer une augmentation de la synthèse d'anthocyanine, la synthèse du flavonoïde était inhibée au regard des phénotypes de couleur des pétales des plantes transfectées. Les auteurs ont pu remarquer que ces phénotypes étaient persistants dans la descendance des plantes modifiées génétiquement. L'analyse des taux d'ARNm codant la *CHS* endogène et la *CHS* chimérique a été réalisée. Les auteurs ont mis en évidence que le taux d'ARNm endogène était diminué de 50 fois par rapport au taux d'ARNm chez la plante sauvage (WT) contrairement au taux d'ARNm chimérique qui ne variait pas. Les auteurs de cette étude ont conclu à une régulation agissant en *trans* et ont nommé ce phénomène : la co-suppression de gène homologue.

En 1993, des études chez le nématode *Caenorhabditis elegans* effectuées par les équipes des Pr Victor Ambros (R. C. Lee, Feinbaum, and Ambros 1993) et de Gary Ruvkun (Wightman, Ha, and Ruvkun 1993) ont porté sur la régulation négative de l'expression du gène *Lin-14* par le produit du gène *Lin-4*. Ces gènes hétérochroniques sont impliqués dans le développement du nématode et plus particulièrement la synchronisation de la division cellulaire. L'analyse de la séquence du gène *Lin-4*, conservé chez plusieurs espèces de nématodes, a permis de mettre en évidence qu'il ne code pas de protéine. L'équipe de V. Ambros a montré que le gène *Lin-4* codait deux transcrits : un dit « long » de 61 nucléotides et un dit « court » de 21 nucléotides. Ces deux transcrits ont alors été séquencés et un modèle de structuration en tige-boucle du transcrit long a été présenté. De plus l'équipe de G. Ruvkun a recensé 7 éléments de séquences complémentaires du transcrit court au sein de la région 3'UTR de l'ARNm *Lin-14* avec la particularité que ces appariements étaient imparfaits. La mise en évidence d'une fixation coopérative de l'ARN *Lin-4* sur la région 3'UTR de *Lin-14* a permis de proposer une hypothèse de régulation : la dégradation de *Lin-14* est induite par l'ARN codé par *Lin-4*. Enfin, par analyse de la conservation des séquences de l'ARN *Lin-4*, l'équipe de V. Ambros a mis en évidence que la région 5' de ce petit ARN régulateur était très conservée contrairement à son extrémité 3' dont la variabilité inter-genre de nématodes était plus grande. Aujourd'hui Victor Ambros est considéré comme le chercheur ayant découvert le premier microARN.

L'équipe de Ambros a poursuivi l'étude du développement du nématode (Moss, Lee, and Ambros 1997) et a découvert une nouvelle notion importante : la taille réduite des petits ARN



responsables de l'ARN interférence leur confère une multitude de choix d'ARNm cible. En effet, la découverte du gène *Lin-28* et l'étude de la séquence de la région 3'UTR de son ARNm a mis en évidence que le miR-Lin-4 pouvait cibler de manière imparfaite cet ARNm. Ces chercheurs ont ainsi pu proposer plusieurs modèles de régulation des gènes *Lin-14*, *Lin-28* et *Lin-4* au cours du développement du nématode. Ces résultats mettaient en évidence le rôle majeur de petits ARN non codants régulateurs de l'expression des gènes dans le développement des organismes pluricellulaires. A l'époque les chercheurs considéraient que cette régulation particulière était une singularité propre au pétunia et au nématode.

En 1998 une autre équipe américaine (Fire et al. 1998) publiait une étude qui vaudra, en 2006, un prix Nobel à Andrew Fire et Craig C. Mello en qualifiant ce phénomène de régulation des gènes : l'ARN interférence (ou ARNi). Ces auteurs ont été capables d'induire le phénomène de ARNi en injectant, dans le nématode, des ARN double brin. Leurs expériences ont permis de préciser le mécanisme d'interférence en observant que l'injection d'ARN double brin déclenchait, de manière beaucoup plus efficace, le ARNi au dépend de fragments d'ARN simple brin sens ou antisens correspondants. En comparant leurs résultats à ceux trouvés chez les plantes, ils conclurent que le phénomène de « co-suppression » s'apparentait à de l'ARN interférence.

Une autre publication parue l'année suivante (Hamilton and Baulcombe 1999) recensait les récentes études sur les phénomènes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes chez les plantes. Ces études mettaient en évidence que le phénomène de ARNi chez les plantes permettait d'établir un système de défense contre les infections virales et l'intégration de matériel génétique exogène, ou de transposons, dans le génome hôte. Ces études menées dans différentes espèces de plantes comme la tomate, ou la pomme de terre, ont permis de mettre en évidence que le ARNi était dirigé par de courts ARN de 25 nucléotides. Cependant, l'origine de ces fragments d'ARN restait encore inconnue bien que la détection de ces petits ARN sous forme de duplex sens/antisens écartait l'hypothèse qu'il s'agisse de produits de dégradation.

En 2000, deux études marquantes chez la drosophile ont fait avancer la compréhension moléculaire de l'ARN interférence. Une première étude a montré que le ARNi était dépendant de l'hydrolyse d'ATP (Zamore et al. 2000). En élaborant d'un système *in vitro* élaboré à partir d'extraits de drosophiles dont la machinerie moléculaire d'ARNi était fonctionnelle, les auteurs ont pu mettre en évidence que le ARNi était fortement diminué dans des extraits déplétés en ATP. La complémentation du système par de l'ATP permettait de retrouver une activité de ARNi. De plus, par l'utilisation d'antibiotiques bloquant la synthèse des protéines,



les auteurs ont découvert que le ARNi était indépendant de la machinerie de traduction. Enfin, par l'étude de la maturation des grands transcrits uniformément radiomarqués par un isotope radioactifs et fonctionnels en ARNi, cette équipe a montré que le ARNi chez la drosophile était médié par des petits ARN de 21 à 23 nucléotides.

Une autre étude sur le ARNi chez la drosophile a été menée par une approche biochimique. En induisant un phénomène de ARNi validé par la perte de fonction d'un gène, les auteurs ont émis l'hypothèse que ce petit ARN était intégré au sein d'un complexe protéique portant l'activité nucléase responsable de la dégradation de l'ARNm cible. Pour la première fois le nom de complexe RISC (ARN-induced silencing complex) était utilisé. Une expérience de traitement des extraits cellulaires par la nucléase micrococcalle (dégradant les ARN) a montré que l'activité de ARNi était perdue. L'équipe du Pr GJ Hannon émit alors l'hypothèse qu'au sein du complexe RISC le petit ARN non codant permettait de guider le complexe sur l'ARNm cible et qu'une nucléase induisait la dégradation de cet ARNm cible.

Il faudra attendre l'année 2001, et les travaux de Sayda M Elbashir pour que soit appréhendée l'étude de la biogenèse des microARN (miARN). Cette étude a permis la découverte de la nature de l'activité nucléase permettant la production efficace de ces petits ARN du ARNi (Elbashir, Lendeckel, and Tuschl 2001). Cette équipe a comparé l'efficacité du phénomène de ARNi en fonction de la taille de l'ARN double brin testé. Ainsi, les auteurs ont pu remarquer que l'efficacité du ARNi était plus élevée en présence de fragments d'ARN de grande taille que lorsque des fragments de taille de 21 à 23 nucléotides étaient employés. L'activité de ARNi était donc permise grâce à la maturation de grands ARN double brins en fragments plus petits. Les auteurs ont ensuite entrepris d'étudier la nature des extrémités des petits ARN non codants produits et ont pu remarquer que leurs extrémités étaient caractéristiques de clivages et que ces duplex ARN de 21 à 23 nucléotides possédaient une extrémité 3' débordante. Cette caractéristique est la signature des clivages par les RNases de la famille de la RNase de type III bactérienne. Ces résultats ont été confirmés par l'intégration de duplexes d'ARN synthétiques de 22 nucléotides, dont les extrémités 3' étaient débordantes, dans leur système de mesure de l'activité ARNi. Ces petits ARN synthétiques étaient, en effet, capables de mimer l'activité ARNi observée à partir des grands ARN double brins testés auparavant.

Cette même année, les mêmes auteurs publiaient une étude mettant en évidence la présence de la machinerie du ARNi chez les mammifères (Elbashir et al. 2001). En utilisant le gène rapporteur de bioluminescence codant la luciférase, cette équipe a transfecté des cellules HeLa et HEK 293T par un plasmide exprimant un ARNm chimérique codant l'ORF de la

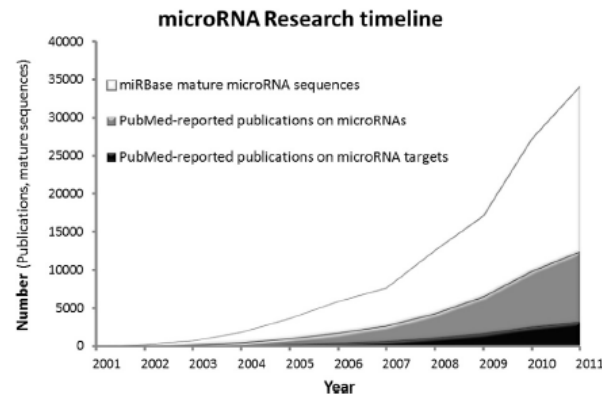


luciférase. Certaines de ces cellules ont été traitées par un siARN et la diminution de la bioluminescence a été observée contrairement aux cellules non traitées.

Ce phénomène de ARNi ne se cantonnait pas au nématode et semblait être un mode de régulation génique conservé chez de nombreuses espèces, y compris l'Homme. Ces découvertes ont été considérées comme une révolution dans la compréhension de la régulation de l'expression génique.

Dès lors, l'étude du phénomène d'interférence à l'ARN a été très soutenue au cours de la dernière décennie et, aujourd'hui, les voies de biogénèse des miARN ainsi que leur rôle sont bien caractérisés. Les miARN n'ont cessé d'être étudiés et l'évolution des techniques de pointe, comme le séquençage à haut-débit, ainsi que le développement d'algorithmes de prédiction de cibles de miARN n'ont fait qu'accroître l'intérêt des chercheurs pour cette thématique (Figure 1) (Reyes~Herrera and Ficarra 2012).

Les travaux de recherche réalisés au cours de mon doctorat portent sur l'étude des microARN chez l'Homme. Bien que les voies de biogénèse des miARN soient aujourd'hui bien décrites, la régulation de la production des miARN est moins bien caractérisée. Dans cette optique nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation de la production de miARN dans le chondrocyte à partir d'un cluster de gènes de miARN. De plus, nous avons étudié l'implication potentielle des miARN dans les modifications phénotypiques chondrocytaires lors de la perte de phénotype articulaire différencié ou l'acquisition d'un phénotype hypertrophique. Ces modifications phénotypiques classiquement associées aux altérations matricielles rapportées pour le cartilage arthrosique.



**Figure 1 : Représentation graphique de l'augmentation des recherches sur les miARN**

Au cours des dix dernières années le nombre de publications (référéncées par PubMed) portant sur la découverte de nouveaux miARN ainsi que leurs ARNm cibles n'ont cessé de croître. De plus l'alimentation de la banque de donnée de séquences de miARN miRBase augmente très fortement d'année en année (Reyes~Herrera et Ficarra, 2012).

# *Introduction*







# Chapitre 1 : les microARN

Les miARN font partie d'une grande famille d'ARN dont le rôle est de réguler de manière post-transcriptionnelle l'expression des gènes. La découverte de l'existence des miARN chez les mammifères au début des années 2000 a révolutionné l'étude et la compréhension de la régulation de l'expression des gènes (cf. Avant Propos). On estime que les miARN réguleraient environ 60 % des gènes de la cellule de mammifère (Friedman et al. 2009). Ils seraient impliqués dans presque tous les processus cellulaires comme la différenciation cellulaire, l'apoptose ou encore le développement tumoral. Au cours de ces dix dernières années, la compréhension du degré d'implication des miARN dans ces processus biologiques a débuté par l'étude et la caractérisation de leur biogénèse. Ensuite le développement de technologies à haut débit comme les micropuces dédiées aux petits ARN ou encore le séquençage de transcriptomes entiers ont facilité les recherche du rôle des miARN dans les pathologies et permis d'envisager de les utiliser comme moyen thérapeutiques pour traiter ces pathologies.

Dans ce chapitre je décrirai les différentes voies de biogénèse canonique et non canonique des miARN. Ensuite je discuterai du mode d'action des miARN et des conséquences de l'appariement des miARN sur leur ARNm cible. Pour terminer ce chapitre, je ferai un point sur le devenir des miARN.

## **A. Biogenèse des microARN :**

La biogénèse des miARN est un processus cellulaire qui se déroule en plusieurs étapes délimitées dans les compartiments cellulaires que sont le noyau et le cytoplasme. Les miARN sont produits à partir de précurseurs ARN de plus grande taille appelés pri-miARN, ou précurseur primaire d'une taille variable de plusieurs milliers à plusieurs centaines de nucléotides, et de pré-miARN dont la taille varie entre 65 et 70 nucléotides (Yoontae Lee et



al. 2003). Une succession de clivages catalysés par des enzymes permettent de produire les miARN matures d'une taille de 20 à 22 nucléotides.

## **I. Localisation génomique des miARN**

L'organisation génétique des gènes de miARN est variée. Ils peuvent être intergéniques et être alors produits à partir d'unités transcriptionnelles qui leur sont propre. Les précurseurs pri-miARN sont alors transcrits par l'ARN polymérase II à partir de leur propre promoteur (Cai, Hagedorn, and Cullen 2004). Ces transcrits sont alors coiffés à leur extrémité 5' (coiffe triméthylée m<sup>7</sup>G) et polyadénylés à leur extrémité 3' (Corcoran et al. 2009).

Les gènes codant les miARN peuvent également être localisés au sein de séquences introniques de gènes codant des protéines (Lau et al. 2001). Dans ce cas les miARN sont généralement transcrits à partir du promoteur de l'ORF hôte et le profil d'expression des miARN se superpose à celui du gène hôte (Baskerville and Bartel 2005). Toutefois, certains miARN sont transcrits à partir de promoteurs situés au sein de la séquence du gène hôte. Ces promoteurs alternatifs sont dédiés à la transcription du pri-miARN.

Certains précurseurs de miARN sont issus d'une organisation intronique particulière puisque l'intron lui-même correspond au précurseur de miARN. Dans ce cas l'intron représente l'intégralité du précurseur pré-miARN. Les miARN de cette classe sont appelés mirtrons (Ruby, Jan, and Bartel 2007). Ce précurseur dépend de la transcription du gène hôte ainsi que de la machinerie d'épissage. Récemment une nouvelle catégorie de mirtron a été mise en évidence par une équipe américaine. Ces miARN ont une localisation identique aux mirtrons classiques mais sont produits indépendamment de la machinerie d'épissage, et sont alors qualifiés de simtrons (Havens et al. 2012).

D'autres miARN sont issus de gènes codant des snoARN (Ender et al. 2008). Les transcrits ARN précurseurs issus de ces structures génétiques possèdent à la fois des séquences caractéristiques des snoARN et de miARN. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que ces ARN hybrides étaient capables soit d'assembler la ribonucléoparticule propre des snoARN ou d'interagir avec AGO, protéine effectrice de l'ARN interférence (Ender et al. 2008).

De façon similaire des séquences codant des miARN sont retrouvées de manières contiguës à des séquences d'ARNt (Cole et al. 2009).

Dans de rares cas des gènes de miARN ont été identifiés au sein de séquences codantes exoniques (Rodriguez et al. 2004).



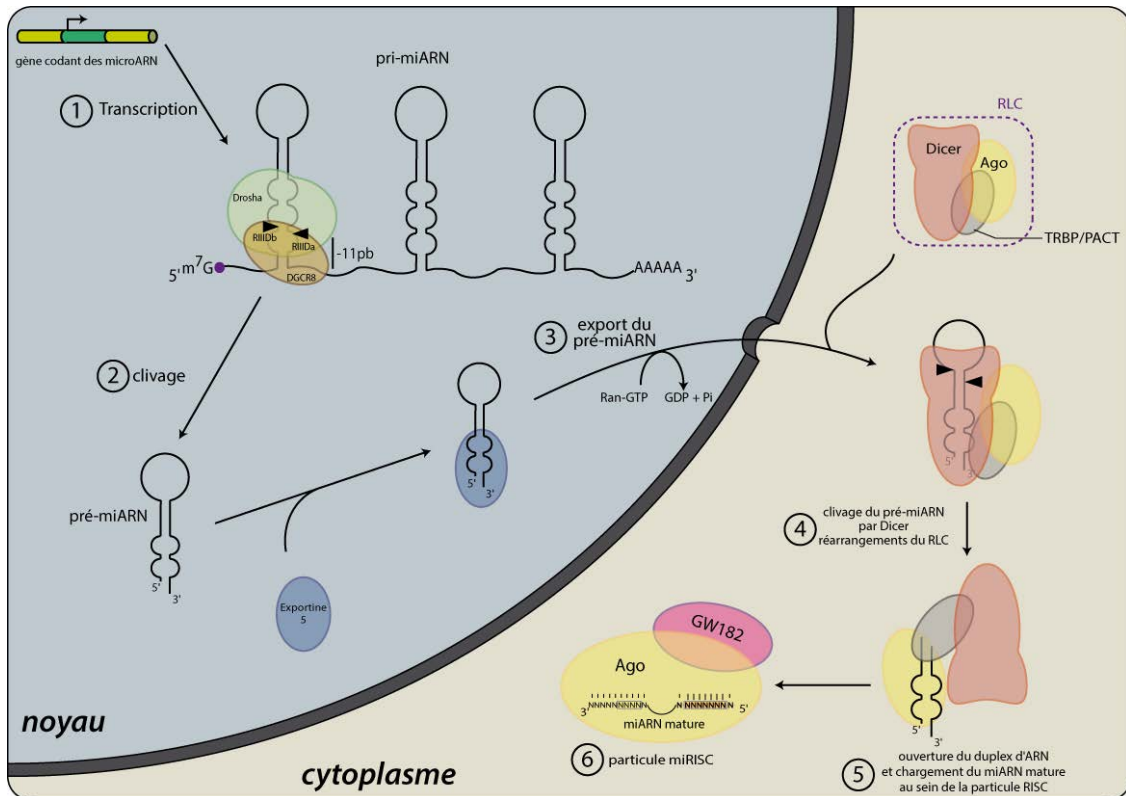
Les précurseurs pri-miARN peuvent porter la séquence d'un ou plusieurs miARN matures. Enfin, il est important de noter qu'environ 50% des séquences codant des miARN se retrouvent situées physiquement proches les unes des autres au sein du génome (distance <10 kb ; d'après la nomenclature miRBase). On parle alors de clusters de gènes codant des miARN (Y. Lee 2002). Il est généralement admis que ces clusters sont transcrits sous la forme d'un transcrit polycistronique unique à partir d'un promoteur commun, cependant des études de recherche de promoteurs alternatifs *in silico* récentes (Marsico et al. 2013; Sethupathy 2013), ont mis en évidence des activités promotrices compatibles avec la transcription de certains gènes de miARN, situés au sein d'un même cluster.

## **C. Biogénèse la plus classique des miARN**

### **I. Le précurseur pri-miARN est clivé par le « microprocessor »**

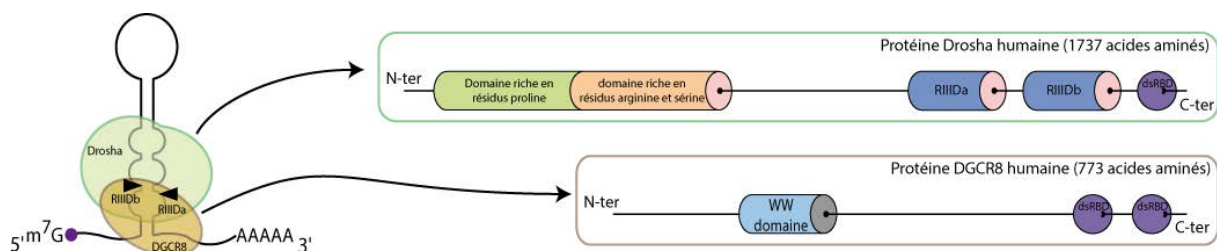
La première étape de la biogénèse des miARN est la transcription du précurseur primaire par l'ARN polymérase II au sein du noyau. Les séquences de pri-miARN sont en général de très grande taille (plusieurs milliers de nucléotides) et se structurent sous la forme d'une seule ou plusieurs structures en tige-boucle longues et irrégulières d'environ 30 paires de base entourées de séquences ARN en simple brin. Chacune de ces structures en tige-boucle porte au sein des séquences de la tige, la séquence d'un ou deux miARN (Figure 2).

Ces grandes structures d'ARN sont prises en charge dans le noyau par un complexe mutliprotéique constitué au minimum de l'enzyme Drosha et de son cofacteur DGCR8 (DiGeorge critical region 8) ou encore Pasha chez la drosophile (Denli et al. 2004; Gregory et al. 2004) (Figure 3). Chez l'Homme le complexe formé qualifié de « microprocessor » est d'un poids moléculaire d'environ 650 kDa (Jinju Han et al. 2004). La protéine Drosha humaine (1374 acides aminés) est exclusivement nucléaire et possède une activité ARN nucléase de type RNase III. Cette protéine de 145 à 160 kDa possède deux domaines protéiques en tandem portant l'activité RNase III : les domaines RIIIDa/b. Au sein de la protéine Drosha ces deux domaines se dimérisent de manière intramoléculaire pour rapprocher les deux domaines catalytiques. Au sein de ce dimère chaque domaine RIIID sera responsable du clivage d'un des deux brins de la structure en tige-boucle du pri-miARN. Bien que la protéine Drosha possède un domaine de fixation à l'ARN double brin, il n'est pas suffisant pour que Drosha puisse fixer le pri-miARN. Ce domaine sera engagé dans une interaction avec le cofacteur protéique DGCR8. Cette protéine de 773 acides aminés est



**Figure 2 : Biogenèse canonique des miARN**

La production des miARN matures s'effectue au sein de deux compartiments cellulaires, le noyau et le cytoplasme. Dans le noyau, les précurseurs pri- et pré-miARN sont synthétisés. **1.** Le pri-miARN est transcrit à partir du promoteur de l'ORF hôte ou à partir d'une unité transcriptionnelle qui lui est propre. **2.** Le pri-miARN est clivé par le "microprocessor", grâce à l'activité RNase III de Drosha, pour former le pré-miARN. **3.** Le pré-miARN est exporté vers le cytoplasme par transport actif. **4.** Il est ensuite pris en charge par le complexe RLC (Risc Loading Complex) qui clive la boucle apicale du pré-miARN grâce à l'activité RNase III de Dicer. **5.** Le brin d'ARN correspondant au miARN mature est alors chargé sur la protéine Argonaute pour former la particule RISC. **6.** La séquence du miARN mature permet de guider le complexe RISC jusqu'à l'ARNm cible pour induire sa dégradation ou réguler sa traduction en protéine.



**Figure 3 : Représentation schématique des domaines importants des protéines Drosha et DGCR8.**

La protéine nucléaire Drosha, de poids moléculaire 130 à 160 kDa, possède deux domaines (RNIIDa et RNIIDb) portant l'activité RNase III qui se dimérisent par des interactions intramoléculaires. Le domaine de fixation à l'ARN (dsRBD) est nécessaire à l'activité de la protéine mais est insuffisant pour permettre la fixation de Drosha à ses substrats pri-miARN. Drosha via son extrémité COOH-terminale s'associe à la protéine DGCR8 qui possède deux domaines dsRBD. Le complexe Drosha/DGCR8 a un poids moléculaire de 650 kDa.

Drosha est aussi retrouvée au sein d'un autre complexe de plus haut poids moléculaire, comprenant les protéines hélicases p68 et p72 (Gregory et al., 2004). Ce macro-complexe est capable de produire des pré-miARN.



composée de deux domaines de fixation à l'ARN. Ces domaines permettront au « microprocessor » d'interagir avec le pri-miARN. DGCR8 interagit avec le pri-miARN en reconnaissant les jonctions ARN simple brin/ARN double brin aux extrémités 5' et 3' à la base de la structure en tige boucle. Ce placement très précis de DGCR8 permet d'orienter la protéine catalytique Drosha vers les sites de clivages spécifiques au sein du précurseur de miARN. Ces clivages se déroulent à 11 nucléotides de la jonction ARN simple brin/ARN double brin (Jinju Han et al. 2006; Yan Zeng and Cullen 2005). En plus du positionnement de Drosha par DGCR8, il a été démontré récemment que la structure en tige-boucle possède une certaine flexibilité qui permet de créer des « micro-régions » ARN simple brin à proximité des sites de clivage de Drosha pour faciliter la maturation du transcrit primaire (Quarles et al. 2013).

Le clivage par le « microprocessor » permet de libérer un ARN structuré en tige-boucle dont l'extrémité 3' est débordante de 2 nucléotides, signature de l'activité RNase III de Drosha. Cet ARN constitue un précurseur intermédiaire des miARN et est nommé pré-miARN et de taille comprise entre 65 et 70 nucléotides (Yoontae Lee et al. 2003) (Figure 2).

Dans le cas des miARN introniques, la maturation du pri-miARN porté par l'intron du gène hôte, est réalisée de manière co-transcriptionnelle et dans les mêmes conditions que précédemment. L'intron clivé ayant libéré le pré-miARN sera pris en charge par le spliceosome (Y. K. Kim and Kim 2007).

## **II. Le précurseur pré-miARN est exporté du noyau vers le cytoplasme**

Une fois produit, le précurseur pré-miARN est alors exporté vers le cytoplasme. La connaissance des mécanismes de transports d'ARN viraux ont servi de modèle pour la mise en évidence du rôle de la protéine Exportine 5 (Exp5) (Yi 2003) : Exp5 forme un complexe avec la protéine Ran-GTP et le pré-miARN. D'autres études ont permis de valider son action dans le transport actif des pré-miARN hors du noyau en mettant en évidence l'importance de l'extrémité 3' débordante du précurseur pour l'interaction avec la protéine de transport. S'ajoute de plus une contrainte de taille du pré-miARN puisque les structures en tige-boucle de taille inférieure à 16 pb ne sont pas exportées. De plus l'incorporation du pré-miARN au sein de l'Exp5 le protège de la dégradation par les nucléases (Lund et al. 2004; Y. Zeng 2004).

Une étude récente a conduit à proposer un modèle de la structure de Exp5 en complexe avec la protéine Ran-GTP (Okada et al. 2009; Wang et al. 2011). La protéine Exp5 produite dans le



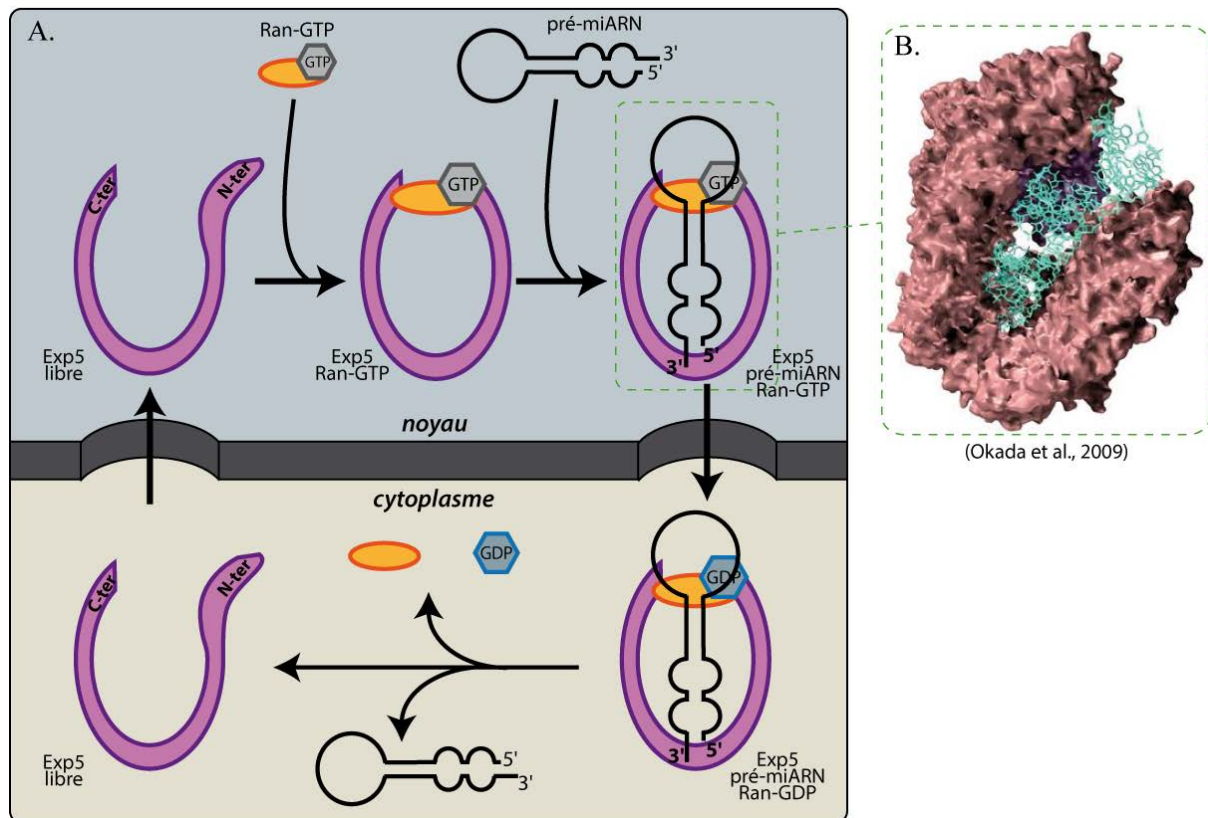
cytoplasme est importée dans le noyau. Dans un premier temps la protéine Ran-GTP interagit avec Exp5 et permet de rapprocher les extrémités N-terminale et C-terminale. Cette interaction permet de structurer la protéine d'export en forme U et de créer une cavité permettant l'accueil du pré-miARN. Le pré-miARN est ensuite incorporé dans ce complexe protéique qui est par la suite exporté vers le cytoplasme. C'est alors que la molécule de GTP est hydrolysée pour former du GDP permettant de relâcher la structuration de l'Exp5 et de libérer le pré-miARN dans le cytoplasme (Figure 4). La protéine Exp 5 libre est enfin réimportée dans le noyau.

### **III. Prise en charge du pré-miARN par le complexe composé de Dicer**

Le précurseur pré-miARN exporté est aussitôt pris en charge par un nouveau complexe multiprotéique appelé RLC (RISC Loading Complex). Ce complexe a pour rôle de poursuivre la maturation du miARN pour aboutir à l'incorporation du miARN mature au sein de la particule RISC. Le RLC est constitué d'une nucléase à activité RNase III appelée Dicer, de deux protéines accessoires TRBP (TAR ARN- Binding Protein) (Haase et al. 2005) et PACT, et d'une protéine de la famille des Argonautes. Chez l'Homme huit gènes codent des protéines Argonaute classées en deux sous-familles : « PIWI » et « Ago » pour revue (Carmell et al. 2002). Les protéines PIWI sont exprimées majoritairement dans les tissus gonadiques et participent à la régulation de l'expression des gènes en interagissant avec les petits ARN non codant piARN (d'après (Ishizu, Siomi, and Siomi 2012)). Les protéines Ago1 à 3, exprimées ubiquitairement dans l'organisme, et Ago4 plus rarement exprimée, sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes guidée par les séquences de petits ARN non codant, les miARN. Les quatre protéines Ago sont constituées des mêmes domaines protéiques (détaillés dans le paragraphe suivant), cependant la protéine Ago2 se différencie des autres par son activité endonucléotidique. En effet des études réalisées en 2004 et 2005, ayant pour but de caractériser le rôle fonctionnel des protéines Ago humaines ont permis d'identifier l'activité « slicer » d'Ago2 portée par le domaine PIWI permettant le clivage des ARN cibles de la particule RISC dans laquelle Ago2 est impliquée (J.-J. Song et al. 2004; Meister et al. 2004; Liu et al. 2004; Rivas et al. 2005).

La protéine TRBP interagit avec les protéines Dicer et Ago. Elle est constituée de trois domaines de fixation à l'ARN double brin (dsRBD) dont deux sont capables d'interagir avec le pré-miARN (Benoit et al. 2013) (Figure 5). La protéine PACT interagit avec Ago et la partie N-terminale de Dicer (Yoontae Lee et al. 2006). Ces trois domaines d'interaction



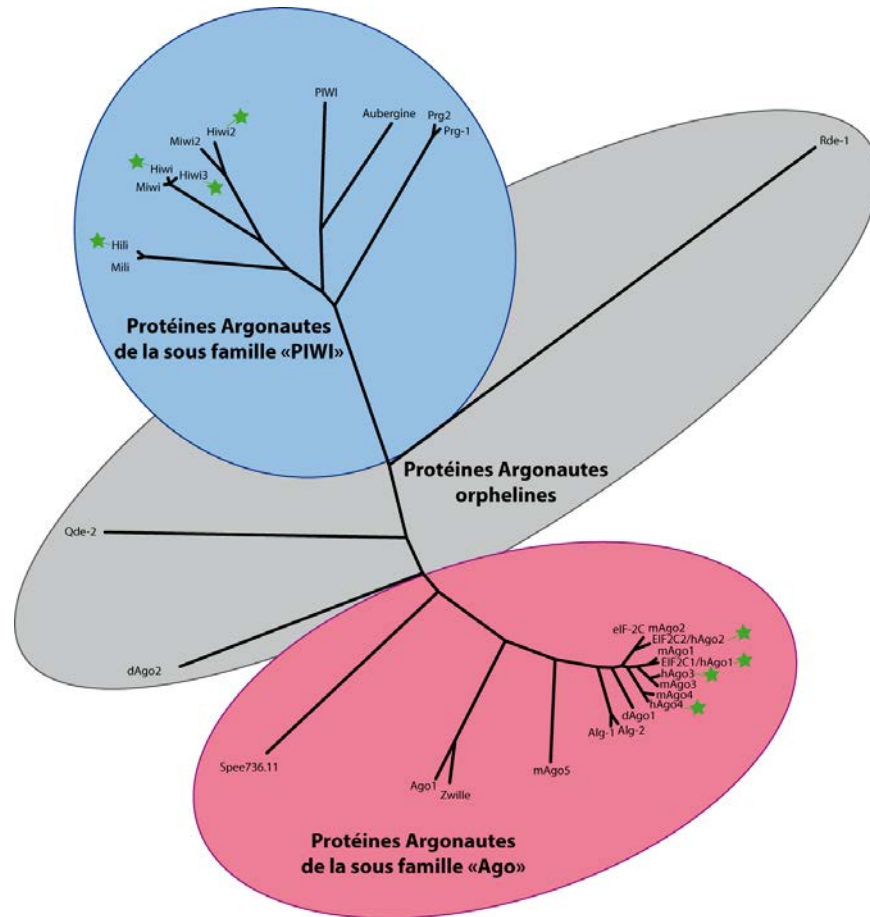


**Figure 4 : Export des pré-miARN du noyau vers le cytoplasme, modèle adapté de (Wang et al., 2011)**

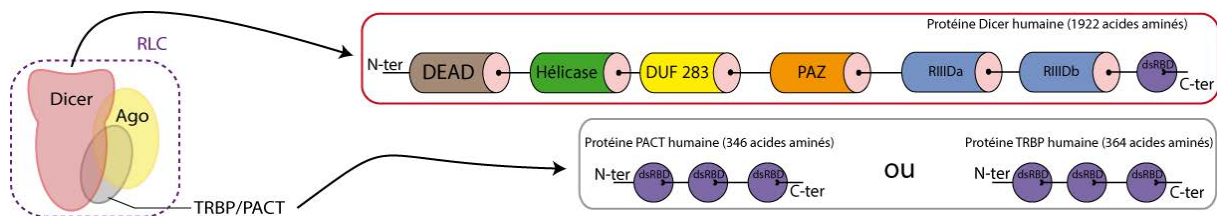
**A.** À l'état libre la protéine Exportine 5 (Exp5) est incapable de s'associer au pré-miARN. Son association avec la protéine Ran-GTP lui permet de rapprocher ses extrémités N-ter et C-ter et de se structurer en « U ». Sous cette forme, la reconnaissance entre Exp5/Ran-GTP et le pré-ARNm est possible. La spécificité de cette interaction dépend de la signature du clivage de type RNase III de Drosha mais est indépendante de la séquence du pré-miARN. Elle engendre une déformation de la structure tige-boucle de l'ARN. La structure du complexe d'export des pré-miARN a été résolue par radiocristallographie en 2009 et est illustrée en B. (en rouge Exp5 ; en vert pré-miARN ; bleu : Ran-GTP) (Okada et al., 2009). L'hydrolyse du GTP en GDP est nécessaire pour exporter le pré-miARN. Une fois dans le cytoplasme le complexe ribonucléoprotéique est dissocié. L'Exportine 5 libre est réimportée dans le noyau tandis le précurseur de miARN est pris en charge par le RLC.



A.



B.



**Figure 5 : Les protéines Argonautes et composition des protéines du RLC.**

**A.** Un arbre phylogénétique de la famille des protéines Argonautes, des espèces *Caenorhabditis elegans*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* et *Homo sapiens*, est représenté (d'après (Carmell et al., 2002)). Les protéines Argonautes de la sous famille PIWI sont indiquées par l'ellipse bleue, les protéines Argonautes de la famille Ago sont indiquées par l'ellipse rose et les protéines Argonautes orphelines sont indiquées dans l'ellipse grise. Les protéines Argonautes humaines sont repérées par les étoiles vertes.

**B.** La protéine cytoplasmique Dicer, de poids moléculaire 200 kDa possède un domaine central PAZ, qui interagit spécifiquement avec l'extrémité 3' protubérante du pré-miARN. Le centre catalytique de Dicer est composé des domaines à activité RNase III, RIIIDa et RIIIDb. La distance entre le domaine PAZ et le centre catalytique est de 65 Å. Cette organisation permet à Dicer de produire des fragments d'ARN de ~25 nucléotides. Les autres domaines ne sont pas indispensables pour l'activité de Dicer *in vitro* d'après (Kim, Han, et Siomi, 2009). La protéine Dicer possède deux cofacteurs : TRBP ou PACT. Ces deux protéines possèdent chacune trois domaines de fixation à l'ARN. Très récemment une étude a montré que le RLC contenant la protéine TRBP favoriserait la biogénèse des siARN tandis que le RLC constitué de PACT serait impliqué dans la biogénèse des miARN (Lee et al., 2013).





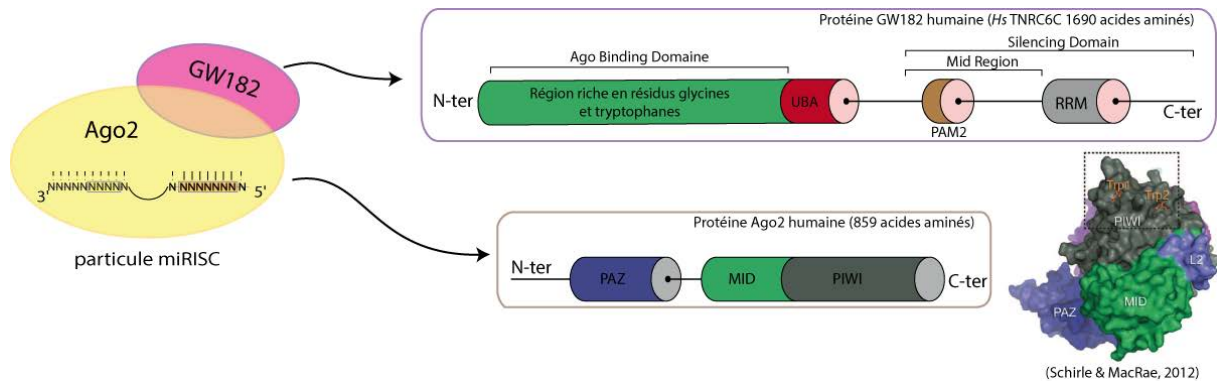
dsRBD lui permettent également de se fixer au pré-miARN. Ces deux protéines n'ont pas de rôle catalytique dans la maturation du pré-miARN mais assurent un rôle dans le maintien de la structure des complexes RLC et RISC. De surcroît la déplétion de la protéine PACT affecte fortement l'accumulation des miARN matures dans la cellule (Haase et al. 2005).

La protéine Dicer est une nucléase de 1922 acides aminés (environ 200 kDa) (Figure 5). Elle possède un domaine central PAZ (PIWI-Argonaute-Zwille) indispensable pour la reconnaissance spécifique du pré-miARN. En effet, ce domaine reconnaît de manière spécifique les ARN en double brin dont l'extrémité 3' est débordante. De plus cette protéine est capable de se lier à l'ARN en double brin par un domaine dsRBD présent dans sa partie C-terminale et possède deux activités catalytiques distinctes. Une activité nucléase de type RNase III est portée, comme Drosha, par deux domaines RIIID a et b. Aussi une activité ARN hélicase est portée par un domaine à l'extrémité N-terminale. Lorsque le pré-miARN est incorporé au sein du RLC, la protéine Dicer interagit par son domaine PAZ avec l'extrémité 3' sortante du pré-miARN (Figure 4). Le repliement de Dicer est tel que les domaines RIIIDa et b se positionnent pour générer les sites de clivage, soit à environ 65 Å de l'extrémité proximale du pré-miARN. La boucle apicale du pré-miARN est alors clivée, libérant un duplex ARN d'environ 22 nucléotides correspondant au miARN mature (ou brin guide) en complémentarité avec le miARN\* (ou brin passager). Ce duplex ARN est ensuite pris en charge par l'une des protéines de la famille Ago (cf. Figure 2).

#### **IV. Incorporation du miARN mature dans la particule RISC**

La particule RISC est constituée au minimum par l'association de la protéine Ago et d'autres protéines comme la protéine GW182 (Eulalio, Huntzinger, and Izaurralde 2008) ou encore d'autres facteurs à activité hélicase (par exemples : RCK ou MOV10). Le poids moléculaire de cette particule varie, en théorie, entre 160 kDa jusqu'à 80S lorsqu'elle est associée avec le ribosome.

Chez l'Homme la protéine GW182 (182 kDa) possède 3 isoformes TNRC6A, B et C, (pour revue (Eulalio, Tritschler, and Izaurralde 2009)), qui se différencient par la taille de leur région riche en glycines et tryptophanes (GW) à leur extrémité N-terminale (Figure 6). La partie N-terminale de la protéine, riche en répétitions GW, est impliquée dans l'interaction avec la protéine Ago. Ces répétitions sont également impliquées dans la séquestration des particules miRISC au sein des P-bodies (Processing Bodies) cytoplasmiques. Deux domaines conservés ont été identifiés mais qui ne semblent pas jouer un rôle habituel. En effet un



**Figure 6 : Représentation schématique des domaines importants des protéines GW182 et Ago2 chez l'Homme :**

Les protéines qui forment le complexe RISC minimal sont illustrées, d'après (Huntzinger et al., 2013 ; Schirle et MacRae, 2012). La protéine GW182 possède deux grandes régions importantes. Une région dans la partie N-terminale riche en glycines et tryptophanes permet l'interaction avec Ago2 et l'adressage de la particule miRISC vers les P-bodies. En C-terminal une région comprenant les domaines PAM2 (PABP interacting Motif) et un domaine RRM est importante pour le rôle d'ARN interférence de la particule miRISC. La protéine Ago2 interagit avec le miARN mature au sein de la particule miRISC. Elle possède trois domaines principaux : un domaine de reconnaissance de l'ARN substrat (PAZ), un domaine d'interaction avec l'ARN substrat (MID), et un domaine PIWI à activité endonucléolytique et responsable de l'interaction avec GW182, *via* des poches hydrophobes accueillant des tryptophanes de GW182.



domaine UBA (UBiquitine Associated) possède les caractéristiques d'un site d'ubiquitinylation mais qui n'est pas fonctionnel. Le deuxième domaine en question est un motif de fixation à l'ARN (RRM). Leurs rôles sont encore mal connus mais pourraient être liés dans la fonction répressive des futurs miARN comme le sous-entendent la mutation de résidus de ces domaines par l'équipe de Filipowicz (Zipprich et al. 2009). L'extrémité C-terminale est impliquée quant à elle dans la fonction d'ARN interférence des miARN. Il a été montré chez l'Homme que la diminution du taux de la protéine GW182 entraînait une baisse de l'activité de la répression des gènes par les miARN (Eulalio, Tritschler, and Izaurralde 2009).

Les mécanismes de biogenèse des miARN matures ont en particulier été étudiés dans le cas des particules RISC contenant la protéine Ago2. Tout comme les protéines Ago1, -3 et -4, Ago2 est constituée de 3 domaines (Figure 6). Un premier domaine PAZ reconnaît le duplex ARN d'environ 22 nucléotides possédant une extrémité 3'sortante libérée par le clivage de type RNase III catalysé par Dicer. Un second domaine MID (MIDdle) interagit avec l'extrémité 5' du miARN mature. Cette interaction est très spécifique puisque ce domaine est capable de discriminer les bases du miARN mature et de lier préférentiellement les uridines et les adénosines de l'extrémité 5' au dépend des cytosines et guanosines (Frank, Sonenberg, and Nagar 2010). Le troisième domaine, appelé PIWI (P-element Induced Wimpy testes), possède une similarité de structure avec les nucléases à activité RNase H correspond au domaine effecteur du ARNi, induisant le clivage éventuel de l'ARNm cible. En 2012, la structure de la protéine Ago2 en interaction avec miR-20a a été décrite et est compatible avec les données préalables sur les interactions entre Ago2 et les miARN (Elkayam et al. 2012). Bien que les 4 protéines possèdent les mêmes domaines protéiques, seule Ago2 possède un domaine PIWI dont le site catalytique responsable de l'activité « slicer » est actif ((Ender and Meister 2010; Hauptmann et al. 2013).

L'incorporation du miARN mature dans la particule RISC est commune aux 4 protéines Ago humaines et se réalise en deux étapes (pour revue (Kawamata and Tomari 2010)). Une première étape consiste à la prise en charge par la protéine Ago du duplex ARN, présent au sein du complexe RLC, et une deuxième étape correspond à l'ouverture du duplex ARN et à la sélection du futur miARN mature.

Au sein de la protéine Ago, le duplex ARN est déstabilisé et l'un des deux brins, correspondant au miARN « star » (miARN\*) est alors dégradé. Potentiellement, les deux brins du duplex peuvent être utilisés comme miARN guidant la particule RISC. Le choix du



brin incorporé au sein de la particule RISC est réalisé en fonction des caractéristiques de stabilités thermodynamiques des extrémités du duplex (Schwarz et al. 2003).

Plus récemment il a été décrit que, dans le cas où la particule RISC est constituée de la protéine Ago2, la stabilité thermodynamique du duplex serait elle-même régie par le clivage du brin passager, lié à l'activité « slicer » du domaine PIWI de la protéine Ago2 (Leuschner et al. 2006). Ce clivage faciliterait la sélection du miARN mature et la dégradation du brin passager afin d'activer la particule RISC (cf. Figure 2). Récemment une seconde étude a fait état du rôle de l'activité « slicer » d'Ago2 dans l'incorporation d'un miARN au sein de la particule RISC dans un contexte Dicer indépendant (Cifuentes et al. 2010). Ces travaux de l'équipe de Tomari ont mis en évidence que la maturation du pre-miR-451 était initiée par le clivage du brin complémentaire du futur miR-451 par Ago2, produisant le ac-pré-miR-451 (Ago Cleaved pre-miARN-451, cf. Intro. Chapitre 1 B.VI.4.), qui s'accompagnait d'une dégradation exonucléotidique par l'enzyme PARN (PolyA-specific RiboNuclease) pour aboutir à la formation de miR-451 mature. Encore peu d'exemples de maturation de miARN dépendant de l'activité « slicer » d'Ago2 ont été mis en évidence. Enfin cette activité endonucléotidique d'Ago2 nécessite la présence d'un long appariement parfait au sein du duplex ARN ou du précurseur pré-miARN (pour revue (Kawamata and Tomari 2010)), limitant alors le nombre de précurseurs disponibles. Ceci pourrait indiquer qu'il s'agit d'un processus marginal.

Le miARN mature en interaction avec une protéine Argonaute permet de guider la particule RISC vers l'ARNm cible pour catalyser le phénomène de ARNi.

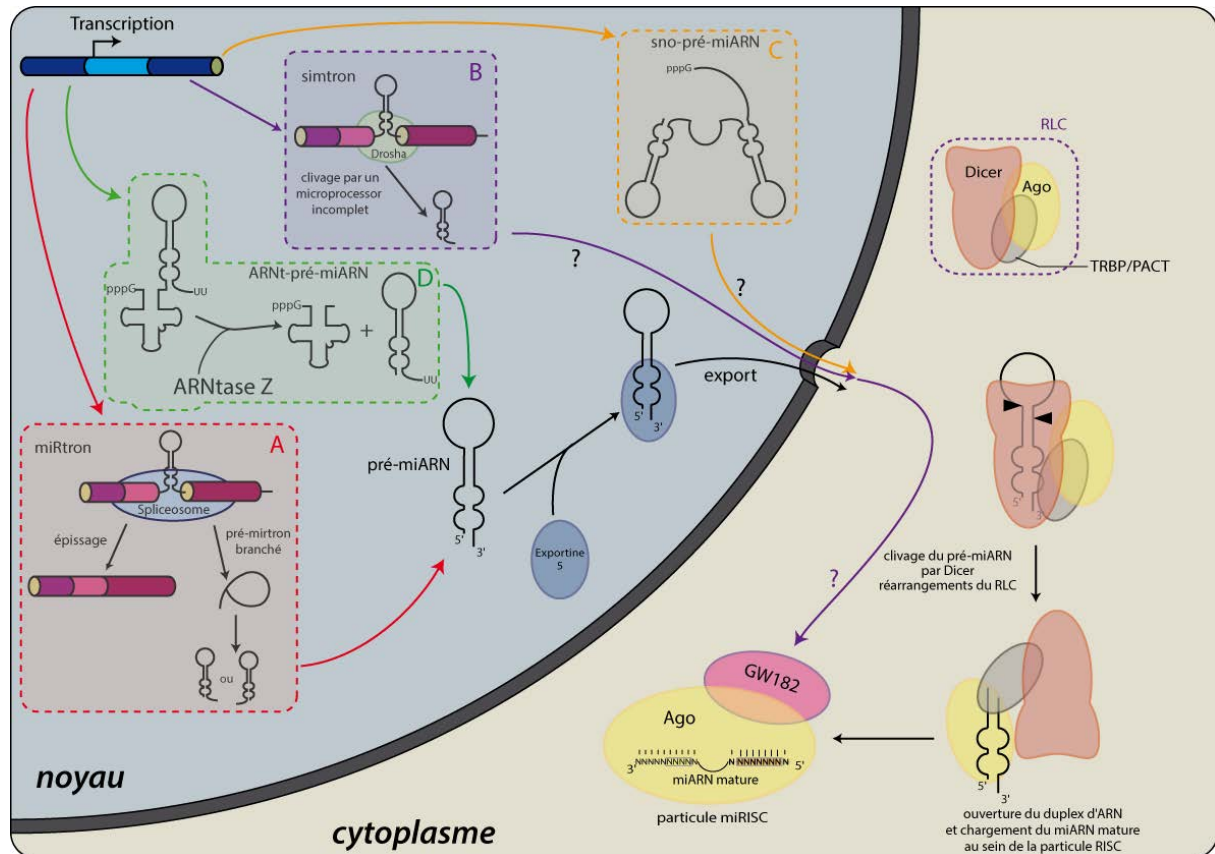
## **V. Biogénèse non canonique des miARN**

### **1. Cas des mirtrons**

Dans le cas des mirtrons l'étape de clivage du pri-miARN par le « microprocessor » est absente du processus de biogénèse (Ruby, Jan, and Bartel 2007). En effet ces miARN sont introniques et la séquence de l'intron correspond à celle du pré-miARN. C'est donc l'épissage de ces introns qui permet de produire le pré-miARN (Figure 7, encadré A en rouge). Ce précurseur sera ensuite intégré dans la voie canonique de biogénèse des miARN.

### **2. Cas des simtrons**

Une étude récente a mis en évidence une voie particulière de biogénèse des miARN (Havens et al. 2012). Ces miARN ont les caractéristiques de localisation génomique des mirtrons.



**Figure 7 : Biogénèse non canonique des miARN**

Schéma représentant les différentes voies de biosynthèse non conventionnelle des miARN. Sont illustrées les voies de biogénèse :

- A.** des miRtrons : le précurseur pré-miARN correspond à l'intégralité d'un intron. La machinerie d'épissage produit le pré-miARN au cours de l'épissage.
- B.** des simtrons : le précurseur pré-miARN correspond à l'intégralité d'un intron. Mais dans ce cas la protéine Drosha clive le précurseur pré-miARN avant l'intervention de la machinerie d'épissage.
- C.** des sno-pré-miARN : des espèces ARN présentent des caractéristiques séquentielles communes à des précurseurs de snoARN et au pré-miARN. La machinerie permettant la production de miARN à partir de ces précurseurs singuliers est inconnue.
- D.** des ARNt-pré-miARN : des espèces ARN présentent des caractéristiques de séquences communes à un ARNt et un pré-miARN. Cet ARN est clivé par une enzyme ARNtase Z et permet de libérer le pré-miARN qui sera pris en charge par la suite par la machinerie classique de biogénèse des miARN.



Cependant la machinerie d'épissage ne serait pas impliquée dans leur maturation. Ces miARN nommés simtrons (splicing-independant mirtrons-like) seraient produits par une voie de biogénèse faisant appel, dans le noyau, à un « microprocessor imparfait ». Les auteurs ont montré que le pré-miARN est produit par un clivage de la RNase Drosha dépourvue de son partenaire DGCR8, tout en n'excluant pas la participation d'un autre facteur protéique de nature inconnue (Figure 7B). La suite de la biogénèse reste mal connue : les simtrons ne seraient pas exportés vers le cytoplasme par Exp5 et ne sembleraient pas être incorporés dans la particule RISC par le concours du RLC. Cependant, à ce jour, aucun autre simtron n'a été identifié. Bien que les expériences de cette étude démontrent que les miR-1225 et -1228 sont produits de manière non canonique, il existe encore trop d'incertitudes concernant les événements de maturation de ces miARN dans le compartiment cytoplasmique, dont les acteurs protéiques sont inconnus. Il semblerait que ce type de biogénèse soit peu répandu, ou forcé par les conditions expérimentales drastiques, loin du contexte physiologique de la cellule.

### 3. Cas des snomiARN

En 2008, plusieurs études basées sur l'approche RNAseq ont proposé que des miARN partageraient un précurseur commun avec des snoARN (Ono et al. 2011)). Ainsi certaines séquences de pré-miARN ont été prédites comme chevauchant certaines séquences connues de snoARN (Ender et al. 2008). Ces observations suggèrent que les ARN seraient alors associés à des protéines accessoires communes, à la fois impliquées dans la biogénèse ou la fonction des miARN et des snoARN (pour revue (Scott and Ono 2011)), mais également l'accumulation de ces deux espèces d'ARN non codants dans le nucléole. Les ARN précurseurs de snomiARN étudiés se structurent en une ou plusieurs structures en tige-boucles qui correspondraient aux pré-miARN (Figure 7C). Les pré-miARN seraient produits indépendamment de Drosha et leur export vers le cytoplasme serait réalisé par une voie encore inconnue. Les miARN produits à partir de ces pré-miARN seraient produits par le complexe RLC avant d'être incorporés dans la particule RISC. Cependant une étude récente a montré par la technique de PAR-CLIP que bien que les ARN non codants dérivant des snoARN soient abondants, seule une très faible proportion de ceux-ci était retrouvée associée à la protéine Ago2 (Shivendra Kishore et al. 2013). Aujourd'hui il n'existe pas encore d'étude démontrant un rôle fonctionnel de ces espèces ARN, ni de description précise et détaillée d'une voie de biogénèse commune entre les snoARN et les miARN. Il semblerait donc que les





snomiARN soient une espèce ARN peu commune et pourrait correspondre en définitive à des produits de dégradation des snoARN.

#### 4. Cas des ARNt-miARN

Un autre modèle de biosynthèse non canonique des miARN a été proposé. Certains miARN seraient produits à partir de précurseurs dont la séquence est située en aval de gènes codant des ARN de transfert (ARNt) (Cole et al. 2009). Les produits de ces gènes « hybrides » seraient des ARNt dont la séquence d'un pré-miARN est accolée à son extrémité 3'. Dans ce cas, la production des pré-miARN dans le noyau ne serait pas assurée par Drosha mais par une RNase spécifique des ARNt, l'endonucléase ARNtase Z (Figure 7D). Les produits de ce clivage seraient alors un ARNt et un pré-miARN. Ce dernier serait pris en charge par la voie canonique de la biogénèse des miARN. Une fois encore un consensus concernant le mode d'action de ces miARN dérivant des ARNt n'est pas déterminé. Deux équipes s'accordent à dire que ces ARN non codants répriment la traduction des ARNm mais se contredisent sur la nécessité d'une complémentarité de séquence entre l'ARN non codant et l'ARN messager cible (Sobala and Hutvagner 2011; Maute et al. 2013).

## **VI. Régulations de la biogénèse des miARN**

Aujourd'hui les étapes de la biogénèse canonique des miARN des mammifères sont bien caractérisées. De plus comme je l'ai décrit ci-dessus, la découverte d'autres voies de biogénèse, dites non canoniques, complexifie encore plus les modèles de régulations fines de la production des miARN dans la cellule. Il devient de plus en plus évident que chaque étape de la biogénèse des miARN peut être spécifiquement régulée, permettant de moduler l'expression de chaque miARN. Dans ce chapitre nous aborderons des exemples de régulation décrits pour certains des miARN qui ne représentent aucunement des règles générales de régulation des miARN. Cependant ces exemples nous permettent de mettre en évidence la complexité des voies régulatrices cellulaires rendant l'intégration de la fonction des miARN au sein des voies métaboliques plus compliquée mais non moins intéressante.

### **1. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes codant les miARN**

- Le premier niveau possible de régulation de l'expression des miARN est une régulation transcriptionnelle. Dans le cas de certains miARN introniques, il a été observé que la régulation de la transcription à partir du promoteur du gène hôte permet de réguler celle de



ces miARN. C'est par exemple le cas pour le proto-oncogène c-Myc qui est responsable de l'activation de l'ORF portant le cluster de miARN oncogènes miR-17~92 (Tagawa et al. 2007), ou encore de la répression de l'ORF hébergeant miR-15a, un miARN suppresseur de tumeur (Chang et al. 2008).

- Il a été montré que pour un tiers des miARN introniques, des promoteurs alternatifs ont été détectés en analysant la structure de la chromatine aux alentours des gènes codant ces miARN (Corcoran et al. 2009). Dans le cas des miARN codés par à des loci intergéniques, leur transcription par l'ARN polymérase II peut être soumise non seulement à des régulations par des facteurs transcriptionnels mais aussi par la modification chimique locale du génome (Saito et al. 2006) (cf. Figure 8). La méthylation peut réguler l'expression des gènes de miARN, de par la présence d'îlots CpG au niveau des promoteurs de gènes de miARN. C'est le cas de miR-127 (ayant un rôle de suppresseur de tumeur) dont l'expression est négativement régulée par l'hyperméthylation de son promoteur au cours du cancer de la vessie (Saito et al. 2006). De plus, la modification du code des histones peut aussi réguler l'expression des miARN. Au cours du cancer du sein, l'expression de miR-1 est réprimée du fait d'une hypoacétylation des histones à ce locus génétique (Nasser et al. 2008).

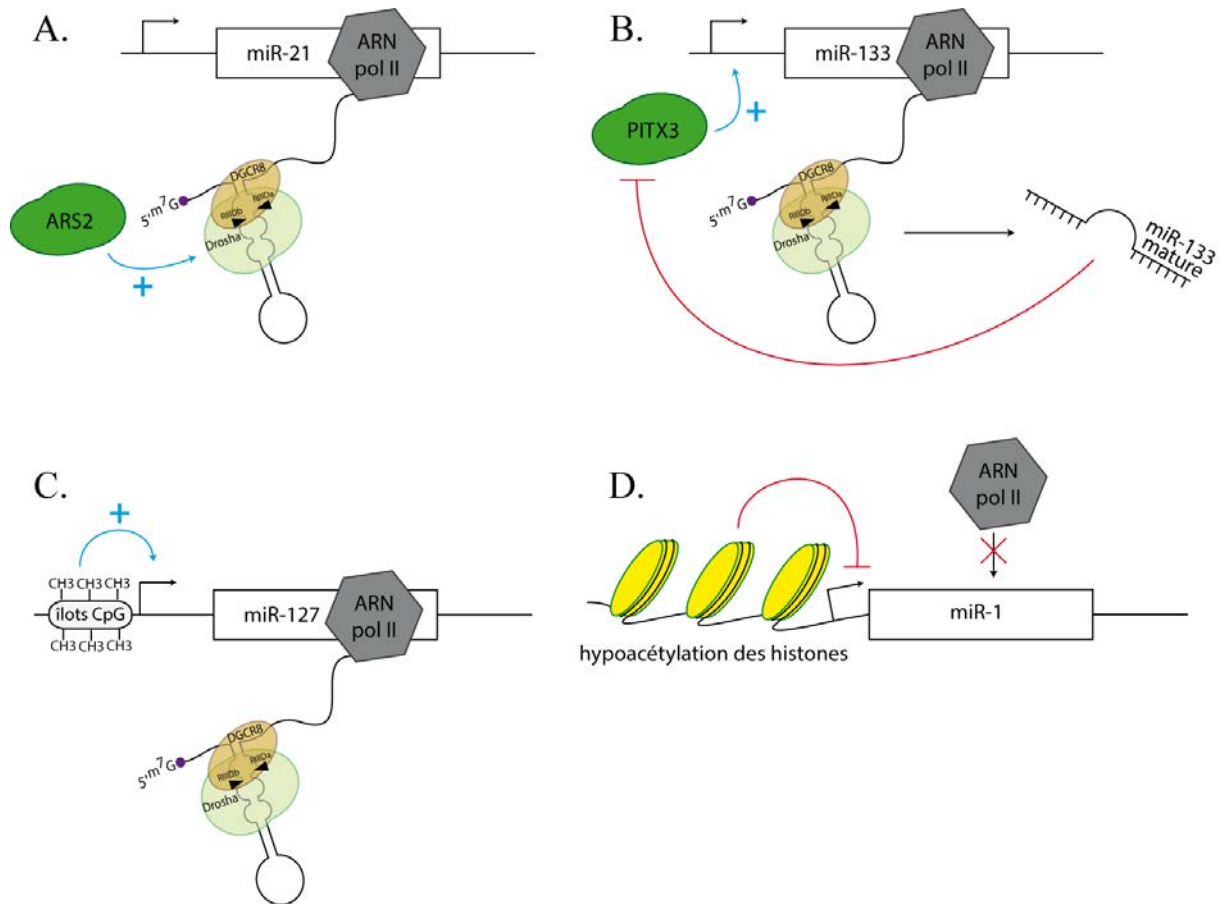
- Certains miARN peuvent opérer un rétro-contrôle sur l'expression du facteur de transcription qui régule leur propre expression (cf. Figure 7). Pour illustrer ce propos une étude réalisée au sein de neurones dopaminergiques montre une régulation fine de l'expression de miR-133b. En effet le facteur de transcription PITX3 agit en *trans* pour favoriser l'expression de miR-133b. Ce miARN effectue un rétrocontrôle négatif en ciblant l'ARNm *PITX3* pour réprimer l'expression de ce gène (Jongpil Kim et al. 2007).

- Une régulation post-transcriptionnelle de miR-21 dont le gène est transcrit par l'ARN polymérase II a été mise en évidence chez la souris (Gruber et al. 2009) (Figure 8). La protéine Ars2 (connue pour être impliquée dans la résistance contre un stress à l'arsenic) interagit avec la coiffe du transcrit pri-miARN portant miR-21 et le stabilise. Des expériences d'ARNi dirigées contre l'ARNm *Ars2* montrent une diminution du taux de miR-21 mature. De plus la protéine Ars2 a été décrite comme faisant partie du complexe « microprocessor » en interaction avec Drosha, elle régule alors la maturation des miARN.

## 2. Régulation de l'activité du microprocessor

La biogénèse des miARN peut aussi être régulée à un niveau post-transcriptionnel et notamment à l'étape correspondant à la prise en charge du pri-miARN par le « microprocessor » (Figure 9).





**Figure 8 : Régulation de la biogénèse des miARN à partir de leur transcription.**

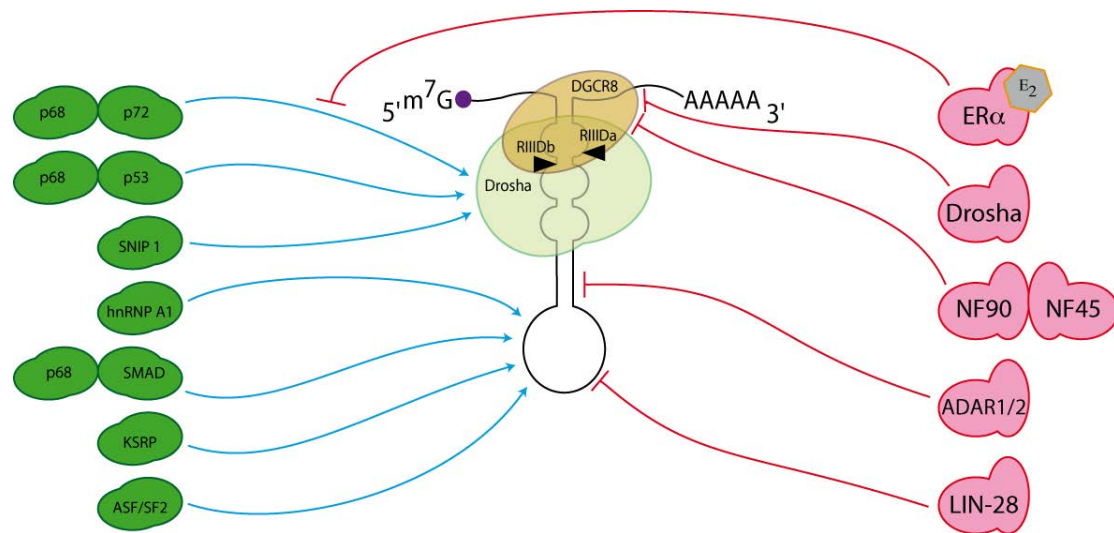
Représentations schématiques des voies de régulations transcriptionnelles des miARN. L'induction de la biogénèse des miARN est indiquée par les flèches bleues et l'inhibition de leur biosynthèse est indiquée par les flèches rouges.

**A.** La protéine ARS2 interagit avec la protéine Drosha et favorise le clivage du pri-miARN (Gruber et al., 2009).

**B.** Le facteur PITX3 interagit avec le promoteur codant miR-133 pour induire son expression. Le miR-133 peut en retour établir un rétrocontrôle négatif sur l'ARNm *PITX3* (Kim et al., 2007).

**C.** L'hyperméthylation du promoteur de miR-127 induit la transcription de miR-127 (Saito et al., 2006).

**D.** L'hypoacétylation de la région du promoteur de miR-1 active la transcription de miR-1 (Nasser et al., 2008).



**Figure 9 : Régulation de la biogénèse des miARN via l'activité du microprocessor.**

Les différents acteurs protéiques impliqués dans la régulation de la biogénèse des miARN par la modulation de l'activité du microprocessor sont illustrés, d'après (Krol, Loedige, et Filipowicz, 2010). Les facteurs dont le rôle est de favoriser le clivage des pri-miARN sont représentés en vert et leur cible protéique ou ARN sont indiqués par les flèches bleues. Les facteurs dont le rôle est d'inhiber le clivage des pri-miARN sont représentés en rouge et leur cible protéique ou ARN sont indiqués par les flèches rouges.



Récemment il a été montré qu'il existe un rétro-contrôle exercé par les partenaires du « microprocessor » sur leur propre production (J Han et al. 2009). L'ARNm DGCR8 se structure en deux structures en tige-boucle au niveau de la séquence de l'exon 2. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que le complexe Drosha/DGCR8 est capable de reconnaître cet ARNm comme substrat et de cliver ces motifs en tige-boucle. Ce clivage entraîne alors la dégradation de l'ARNm DGCR8. La production de la protéine DGCR8 est alors diminuée et la concentration cellulaire du complexe Drosha/DGCR8 est ainsi réduite.

Le « microprocessor » peut être soumis à un autre niveau de régulation. Des protéines telles que des ARN hélicases, des protéines fixant l'ARN ou encore des protéines hnRNP (heterogenous RibonucleoProtein) décrites pour participer à l'épissage des pré-ARNm agissent en tant que facteurs *trans* pour réguler spécifiquement la maturation du pri-miARN d'un miARN donné. Ainsi :

- Deux études ont montré que le « microprocessor » pouvait inclure les protéines p68 et p72. Une première étude en 2004 chez l'Homme (Gregory et al. 2004) et une seconde étude en 2007 chez la souris (Fukuda et al. 2007) indiquent que ces protéines DEAD-box hélicases peuvent faire partie du microprocessor. Des expériences d'ARNi ont permis d'observer que la déplétion des produits des gènes p68 et p72 a pour effet la diminution du taux de pré-miARN tandis que le taux de pri-miARN ne change pas. Ces hélicases agiraient en tant que protéines « échafaudage » permettant le recrutement de facteurs régulant la maturation des pri-miARN en pré-miARN.

- En 2009, une étude a montré que la protéine suppresseur de tumeur p53 humaine était impliquée dans la régulation de la production de certains miARN (miR-16-1, -143 et -145) (Suzuki et al. 2009). Les auteurs ont montré que p53, en complexe avec p68, est capable d'interagir avec Drosha pour moduler la maturation des pri-miARN en question. La protéine p53 facilite la maturation des précurseurs pri-miARN de ces trois miARN dans un contexte de stress causé par la détection de dommages de l'ADN.

- Chez le nématode, plusieurs études ont montré qu'il existait un mécanisme de régulation réciproque entre le gène *LIN-28* et le gène codant le microARN *let-7*. Il a été montré que *let-7* était capable de reconnaître un élément de séquence présent au sein de la région 3'UTR de l'ARNm *LIN-28* pour réguler négativement l'expression de son gène. La protéine LIN-28 est capable de se fixer au niveau de la tige-boucle apicale du pré-miARN pré-*let-7* (Viswanathan and Daley 2010). Cette interaction peut avoir un effet au niveau de deux étapes de la biogénèse des miARN (régulation du « microprocessor » et du RLC). Au



cours de l'étape de clivage des pri-miARN, LIN-28 provoque une gêne stérique et empêche le clivage du pré-let-7 par Drosha.

- En 2007, des travaux ont montré que la protéine hnRNP A1 humaine est capable d'optimiser le clivage du pri-miR-18a par le « microprocessor ». La fixation de hnRNP A1 au niveau de la boucle du pri-miARN provoquerait un changement conformationnel favorisant la reconnaissance du pri-miARN par le complexe de maturation (Guil and Caceres 2007).

- Une autre étude portant sur la maturation de miR-21 montre que l'induction du clivage du pri-miR-21 peut être induite par le facteur de croissance TGF $\beta$ . La voie d'activation des protéines SMAD est alors activée et l'association d'une protéine SMAD et de l'hélicase p68 avec le complexe Drosha/pri-miR-21 permet de favoriser la production de pré-miR-21 par le « microprocessor » (Davis-Dusenbery and Hata 2010). Ces mêmes auteurs ont montré que la protéine SMAD se fixait sur la structure en tige-boucle du précurseur de miR-21 par reconnaissance d'éléments de séquence spécifiques (Davis-Dusenbery and Hata 2011).

- La protéine SNIP1, un cofacteur de SMAD favoriserait la biogénèse de plusieurs miARN (Yu et al. 2008). Cette protéine interagit avec Drosha et des expériences de siARN dirigées contre l'ARNm SNIP1 entraînent la diminution de deux fois du taux des microARN let-7, miR-21, -23 et -25 matures.

- L'implication des protéines KSRP (KH-type splicing regulatory protein) et ASF/SF2 (Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2), deux protéines de la famille des protéines SR (Sérine/aRginine rich), a été également soulignée. Ces protéines SR interviennent dans la régulation et la sélection des sites d'épissage (Trabucchi et al. 2009). La fixation de KSRP sur le pri-miR-let-7a-1 induit la production du pré-miARN, lequel est exporté vers le cytoplasme toujours associé à cette protéine (Trabucchi et al. 2009). KSRP est aussi capable de réguler l'étape de maturation du pré-miARN en miR mature (cf. § A. II. 1.). De plus la fixation de KSRP n'est pas systématique pour la production de ces miARN let-7a-1 matures ce qui montre que cette régulation semble être dépendante des conditions physiologiques. Récemment, l'implication de la protéine ASF/SF2 dans la production du miR-7 a été démontrée (Wu et al. 2010). La protéine ASF/SF2 et miR-7 sont impliqués dans une boucle d'auto-régulation. ASF/SF2 favorise la production de miR-7 en s'associant au pri-miARN-7 au niveau de la structure en tige-boucle qui sera clivée pour former le pré-miARN-7. Dans le cytoplasme miR-7 mature cible l'ARNm du gène codant la protéine ASF/SF2.

- En 2009, une étude a mis en évidence que les facteurs nucléaires NF90 et NF45 étaient impliqués dans la régulation de la production du miARN let-7a-1 (Sakamoto et al. 2009). Ces deux facteurs protéiques sont capables de former un hétérodimère dont la capacité à lier



l'ARN lui permet de rentrer en compétition avec le facteur DGCR8. L'accumulation du complexe NF90-NF45 et son interaction avec le pri-miARN plus affine que celle de DGCR8 entraîne une inhibition de la maturation du pri-miARN en question. De façon remarquable le complexe NF90-NF45 induit la production de Drosha. La production de DGCR8 est alors régulée négativement car l'accumulation de Drosha provoque une dérégulation dans le mécanisme de rétrocontrôle entre ces acteurs du « microprocessor », présenté en début de ce paragraphe.

- Une étude chez la souris en 2009, a montré que la biogénèse de certains miARN pouvait être régulée par une hormone, l'œstrogène ( $E_2$ ) (Yamagata et al. 2009). Le récepteur  $\alpha$  à l'œstrogène ( $ER\alpha$ ) est capable d'interagir au niveau du « microprocessor » avec les hélicases p68/p72. L'interaction  $ER\alpha/E_2$  avec ces deux hélicases interfère avec la formation du micoprocessor, inhibant alors la maturation des pri-miARN (pri-miR-16 et pri-miR-145).

- L'édition des ARN consiste en la substitution de certains nucléotides de l'ARN en nucléotides non canoniques comme par exemple la substitution des adénosines en inosines. Dans ce cas précis la modification des ARN est réalisée par des enzymes ADAR (Adenosine deaminase acting on ARN). Une étude menée dans le cerveau (Kawahara et al. 2008) a mis en évidence que certains pri-miARN sont édités au niveau des sites de clivage par Drosha. Cette modification de base azotée perturbe la structure du précurseur en créant des appariements de base non canoniques I-U. Ces précurseurs édités peuvent alors être reconnus par des nucléases spécifiques appelées Tudor-SN dégradant les ARN contenant des appariements I-U (Figure 8). Les auteurs ont conclu de leurs travaux que l'édition des pri-miARN pourrait donc entraîner une diminution du taux de certains miARN matures.

### 3. Régulation de l'export du pré-miARN

A ce jour il n'existe que très peu de données concernant la régulation de l'export par l'Exp5 des pré-miARN vers le cytoplasme (Okada et al. 2009). Il a été montré que la taille de la cavité présente au sein de la protéine qui permet d'accommoder le pré-miARN, pouvait être modulée pour permettre le co-export des protéines fixées sur la structure en tige-boucle de l'ARN. Aussi une autre étude indique que la délétion de l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique de l'Exp5 était observée dans certains cancers (Melo et al. 2010). Cette mutation rend impossible la formation du complexe ternaire Exp5/RanGTP/pré-miARN ce qui conduit à de graves défauts dans l'export des pré-miARN.



Pour certains miARN il apparaît que l'étape d'export des pré-miARN est régulée. C'est le cas de miR-31 dont le pri-miARN, une fois pris en charge par le « microprocessor », reste séquestré dans le noyau (E. J. Lee et al. 2007).

#### **4. Régulation du complexe Dicer et de l'incorporation du miARN dans la particule RISC**

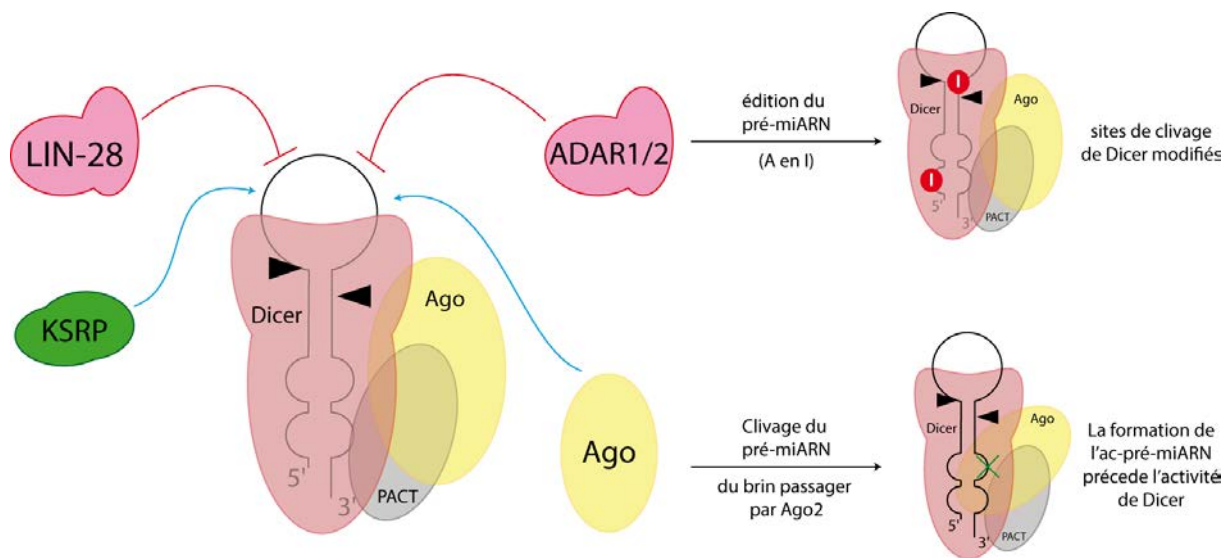
- Pour certains miARN, le choix du brin guide ou passager qui sera incorporé au sein de la particule RISC serait déterminé avant le clivage de la boucle apicale par Dicer (Diederichs and Haber 2007). Dans ce cas, une fois le pré-miARN chargé au sein du RLC, la protéine Ago2 cliverait le brin complémentaire du futur miARN mature. On parle alors de ac-pré-miARN (Ago2 Cleaved pre-miARN). Dicer cliverait ensuite la boucle apicale de l'ac-pré-miARN et le brin non clivé du duplex ARN serait incorporé au sein de la particule RISC, tandis que le brin clivé serait dégradé (Figure 10).

- La protéine LIN-28 peut réguler à un second niveau la production de let-7 (Viswanathan and Daley 2010). Dans le cytoplasme, LIN-28 peut aussi interagir avec la boucle apicale de pré-let-7. Ce complexe LIN-28/pré-let-7 recrute l'enzyme TUT4, une enzyme à activité 3'-mononucléotidyl terminale transférase qui polymérise un poly-U à l'extrémité 3' de pré-let-7 en son extrémité 3'. Ce processus d'urydilation bloque alors l'étape de clivage par Dicer en induisant la dégradation de pré-let-7.

En comparaison avec les données disponibles sur les régulations du « microprocessor », nous ne disposons que de peu d'information sur les régulations de l'activité du RLC. Il est possible que la régulation du clivage de Dicer serait moins déterminante que celle de l'activité du « microprocessor ».

### **D. Régulation de l'expression des gènes par les miARN**

Le miARN mature guide la particule RISC au sein de laquelle il est incorporé en association avec la protéine Ago, jusqu'à l'ARNm cible. L'association de la particule miRISC s'effectue par complémentarité de base imparfaite entre le miRNA et la séquence de l'ARNm, conduisant à la répression de l'expression des gènes *via* une régulation post-transcriptionnelle. Les miARN peuvent agir en tant que régulateurs négatifs de la traduction des ARNm du gène cible, dont les différents niveaux de régulation seront abordés ci-après. De plus, les miARN peuvent induire la dégradation de l'ARNm cible. Il semblerait que l'association de plusieurs



**Figure 10 : Régulation de la biogénèse des miARN via la régulation de l'activité de Dicer.**

L'activation du clivage de la boucle apicale est indiquée par les flèches bleues et l'inhibition de l'activité de Dicer est représentée par les flèches rouges. Les rôles particuliers des protéines ADAR 1/2 de l'édition et de argonaute sont détaillées sur la droite de la figure.





mécanismes non exclusifs de régulation soit réalisée pour affiner le degré de régulation de l'expression des gènes.

## **I. Le duplex miARN–ARNm cible**

### **1. L'appariement canonique :**

L'interaction entre un miARN et son ARN cible est basée sur la complémentarité des bases de leurs séquences (Figure 11). Cette interaction ARN/ARN peut être décomposée en plusieurs domaines gouvernant le mode de répression de l'ARNm par la particule miRISC impliquée: la région 5' « seed » du miARN engagée dans un appariement parfait, et une région 3' dont l'appariement avec la région 3'UTR cible peut être parfait ou imparfait (pour revue (Filipowicz, Bhattacharyya, and Sonenberg 2008)).

- La région graine ou « seed » du miARN est localisée à l'extrémité 5' du miARN mature. Elle est constituée des nucléotides des positions 2 à 8 et l'appariement entre la région « seed » et la séquence cible de la région 3'UTR de l'ARNm est essentiel et doit être parfait pour conduire au phénomène de régulation. De plus, la présence du nucléoside adénosine complémentnaire du nucléotide en position 1 du miARN ainsi que celle d'une adénosine ou d'une uridine complémentaires du nucléotide en position 9 du miARN améliorent l'efficacité d'appariement du miARN sur la région 3'UTR de l'ARNm (Lewis, Burge, and Bartel 2005; Grimson et al. 2007; Nielsen et al. 2007).

- L'extrémité 3' du miARN doit posséder une certaine complémentarité avec l'ARN cible permettant la stabilisation du duplex miARN/ARNm. L'appariement de ce duplex tolère cependant des mésappariements, bien que la complémentarité des nucléotides 13 à 16 semble importante dans le cas où l'appariement de la région « seed » est sous-optimal (Brennecke et al. 2005).

Enfin, au centre de l'appariement entre le miARN et l'ARNm cible, une région de mésappariement appelée « bulge » peut être formée sans altérer l'interaction miARN/ARNm ni la fonctionnalité de la régulation orchestrée par le miARN. Lorsque que le complexe RISC est composé de la protéine Ago2, le « bulge » empêche le clivage de l'ARNm par l'activité « slicer » de Ago2 (Filipowicz, Bhattacharyya, and Sonenberg 2008).

### **2. Appariements non canoniques**

Même si l'impact de l'appariement de la région « seed » semble très important, il apparaît des variations d'appariement de base entre la séquence du miARN et celle de la région 3'UTR.







Ainsi des appariements de bases de l'extrémité 3' du miARN peuvent se réaliser (pour revue (Bartel 2009)) (Figure 11). Ces appariements non canoniques pourraient être favorisés par de légères fluctuations de la configuration du complexe miRISC et du positionnement du miARN dans la particule. Aussi ces types d'appariements non canoniques pourraient être maintenus au cours de l'évolution pour discriminer certains couples miARN/ARNm cible et par conséquent des voies de régulation géniques soumises à pression de sélection. En effet les ARNm sont la cible potentielle de plusieurs dizaines de miARN, et favoriser des appariements de séquence supplémentaires entre certains miARN et la séquence de l'ARNm par une évolution conjointe de leurs séquences permettrait de sélectionner et discriminer des voies de régulation des gènes par les miARN (Friedman et al. 2009).

i. Les sites 3'-supplémentaires

Une étude réalisée en 2007 par l'équipe de David Bartel, a permis de mettre en évidence l'importance des appariements de base entre le miARN et sa cible ARNm parmi les nucléotides 12 à 17 du miARN. Ces travaux ont mis en exergue qu'un appariement des nucléotides 13 à 16 composé de préférence de 3 à 4 appariements Watson-Crick stricts contigus améliore fortement l'efficacité fonctionnelle du miARN. On parle alors de sites 3' supplémentaires (Grimson et al. 2007).

ii. Les sites 3'-compensatoires

Un mésappariement de la région « seed » peut être compensé par un appariement de la partie 3' du miARN. On parle alors de site 3'-compensatoire. Cet appariement 3' se caractérise par la succession d'au moins 9 appariements Watson-Crick à partir du nucléotide 12 du miARN pour revue (Bartel 2009).

iii. Les sites centrés

Cette structure est caractérisée par l'absence d'un appariement parfait de la région « seed » et la présence d'un appariement parfait impliquant un site 3'-compensatoire (Shin et al. 2010). Ainsi le miARN est associé à son ARNm cible par une succession de 11 à 12 appariements de type Watson-Crick, abolissant la formation d'un « bulge » en opposition avec les autres types d'appariements présentés ci-dessus.

Dans la cellule, les ARNm dont la traduction est réprimée s'accumulent au sein de « foci » appelés P-Bodies. Ils rassemblent des protéines riches en glycines et tryptophanes notamment des enzymes de décoiffage (DCP1/DCP2) et de déadénylation (complexe CCR4 /CAF1/NOT1) (pour revue (Kulkarni, Ozgur, and Stoecklin 2010)). La protéine GW182



est un composant majeur des P-Bodies. Son association connue avec la protéine Ago2 conduit alors à la séquestration des complexes miRISC/ARNm cibles au sein des P-Bodies. La structure de la protéine Ago2 humaine a récemment été caractérisée par radiocristallographie (Schirle and MacRae 2012). Chaque domaine de la protéine a pu être décrit ainsi que leur organisation spatiale au cœur de la protéine entière. Les auteurs ont pu mettre en évidence l'importance de plusieurs résidus essentiels pour l'interaction entre Ago2 et la protéine GW182. Ainsi deux poches hydrophobes agencées en tandem, à la surface du domaine PIWI, permettent des interactions avec les tryptophanes de GW182. Aussi les résidus essentiels à l'interaction entre Ago2 et les miARN ont été mis en évidence. Ces résidus appartiennent tous au domaine PIWI et leur importance a été testée par mutagenèse dirigée. En croisant les données structurales et celles préexistantes, les auteurs ont pu regrouper des résidus essentiels à ces interactions en deux groupes : les résidus impliqués dans les interactions Ago2/GW182 et ceux impliqués dans les interactions Ago2/miARN.

## **II. Inhibition de la traduction de l'ARNm cible**

Le rôle principal des miARN est d'inhiber la traduction des ARNm cibles. Une étude récente réalisée par l'équipe de Witold Filipowicz a mis en évidence par des expériences de cinétique que l'inhibition de l'expression des gènes par les miARN serait un processus dynamique débutant par l'inhibition de la traduction de l'ARNm cible et se terminant par l'induction de la dégradation de cet ARNm (Béthune, Artus-Revel, and Filipowicz 2012). Cette étude indique que l'inhibition de la traduction des ARNm par les miARN serait le processus prédominant de la régulation des gènes par les miARN.

Cependant, l'étape du mécanisme de traduction soumis à la régulation reste discutée, et des modèles impliquant l'initiation de la traduction, l'élongation de la traduction et la dégradation du peptide naissant ont été proposés mais certains de ceux-ci sont controversés. De plus, il a été admis depuis 1997 que la traduction des ARNm est favorisée par le rapprochement spatial des extrémités 5' et 3' des ARNm pour les circulariser (Tarun et al. 1997). Ce rapprochement est permis par l'interaction entre le facteur d'initiation eIF4G fixant la coiffe de l'ARNm et la protéine PABP (PolyA Binding Protein) interagissant avec la queue polyA de ce même ARNm. Le mécanisme d'action des microARN fixés sur les séquences 3'UTR est donc à intégrer dans ce modèle d'initiation de la traduction.



### 1. Inhibition de la traduction à l'étape d'initiation

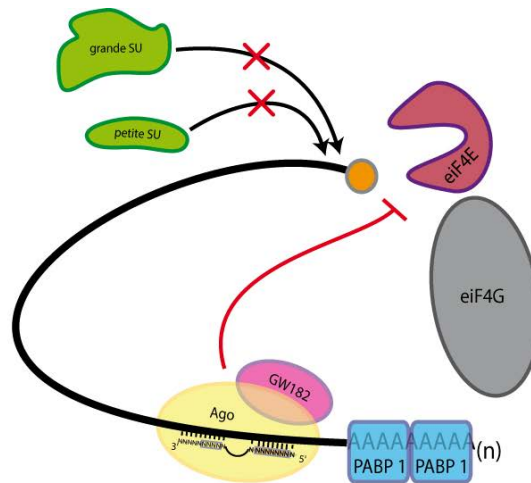
Deux études menées par des équipes australienne et suisse ont montré en 2005 que l'inhibition de la traduction par l'activité des miARN pouvait être causée par la répression de l'initiation de la traduction de l'ARNm d'intérêt (Humphreys et al. 2005; Pillai et al. 2005).

Ces études ont été réalisées à partir d'ARNm chimériques dont la région 3'UTR contient un ou plusieurs sites complémentaires de let-7. Humphreys et ses collègues ont mis en évidence qu'en présence de let-7, la coiffe m<sup>7</sup>G en 5' perd sa fonction pour établir l'initiation de la traduction ; alors que les ARNm dont la traduction est indépendante de la coiffe (initiation via un élément IRES (Internal Ribosome Entry Site)) ne semblent pas subir de régulation négative par des miARN. De plus l'équipe de Filipowicz souligne par des expériences de sédimentation en gradient de sucrose que les polysomes de cellules dont l'ARNm chimérique est soumis à l'activité régulatrice de let-7, possèdent le même profil que des polysomes inactivés par des drogues bloquant l'étape d'initiation de la traduction. De plus cette même équipe a localisé ces polysomes en cours d'inhibition, au niveau des P-bodies dans le cytoplasme des cellules.

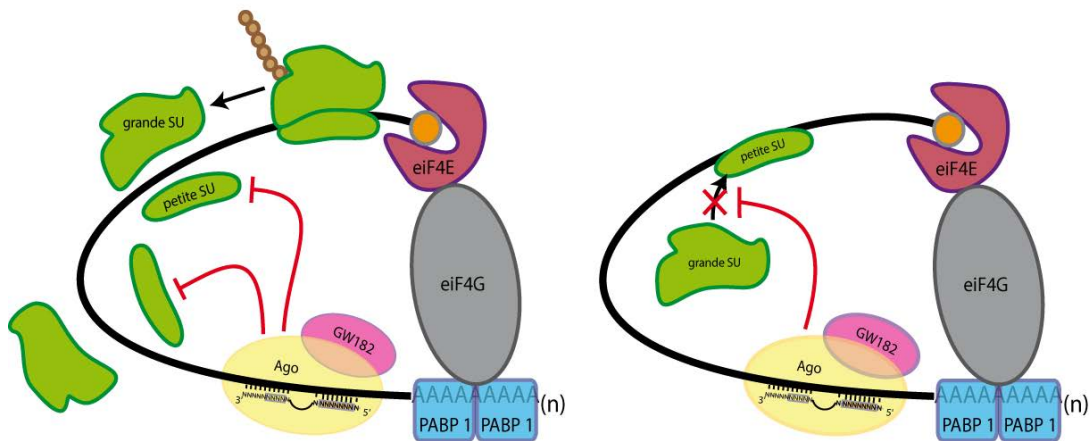
En 2007, des travaux de l'équipe de Mourelatos ont conduit à une avancée importante dans la compréhension de l'inhibition de la traduction par le complexe miRISC (Kiriakidou et al. 2007) (Figure 12A). Par un alignement de séquences entre la protéine d'initiation de la traduction eIF4E et d'une partie du domaine MID de Ago2 les auteurs ont observé des séquences similaires et notamment des acides aminés phénylalanine et valine conservés. Des expériences de mutagenèse de ces acides aminés au sein de Ago2 ont démontré qu'ils étaient importants pour l'inhibition de la traduction des ARNm. Les auteurs ont alors proposé que l'inhibition de la traduction des ARNm engendrée par les particules miRISC reposerait sur une compétition entre eIF4E et le domaine MID de Ago2 pour la fixation de la coiffe de l'ARNm ciblé par un miARN. Ces travaux ont été remis en cause par plusieurs études (pour revue (Chekulaeva and Filipowicz 2009)) dont les travaux de Eulalio et al, qui ont émis l'hypothèse que les résidus incriminés comme interagissant avec la coiffe de l'ARNm seraient en interaction avec la protéine partenaire GW182 (Eulalio, Huntzinger, and Izaurralde 2008), et les travaux de Kinch et Grishin dont les analyses bioinformatiques ont confirmé le fait qu'aucun motif de fixation de la protéine eIF4 n'est retrouvé dans la protéine Ago2 humaine (Kinch and Grishin 2009).

Autre hypothèse concernant l'inhibition de l'initiation de la traduction : elle reposerait sur l'inhibition de l'assemblage des sous-unités du ribosome (Chendrimada et al. 2007) (Figure 12B). En effet les travaux d'une équipe américaine ont mis en évidence la présence d'un

A.



B.



**Figure 12 : Les miARN inhibent l'initiation de la traduction de leurs ARNm cibles.**

**A.** L'initiation de la traduction peut être bloquée par une compétition directe ou indirecte entre le complexe RISC et le complexe d'initiation de la traduction. **B.** L'étape d'élongation de la traduction peut être aussi inhibée sous l'action des miARN. Ainsi deux modèles ont été proposés : l'inhibition de l'assemblage d'un ribosome actif ou encore le désassemblage du ribosome en cours de traduction. D'après (Chekulaeva et Filipowicz, 2009 ; Eulalio, Huntzinger, et Izaurralde, 2008).



facteur inhibiteur de l'assemblage des sous-unités 60S et 40S, eIF6, au sein d'un complexe RISC. Chez l'Homme et le nématode, les auteurs ont purifié un gros complexe RISC de très haut poids moléculaire constitué de l'hélicase MOV10, d'eIF6 et de la sous-unité 60S du ribosome. Des expériences de déplétion d'eIF6 ont montré une diminution de l'activité de répression de l'expression du gène d'intérêt par les miARN. Les auteurs ont alors proposé un modèle selon lequel la particule miRISC s'associerait au facteur eIF6 inhibant ainsi l'assemblage du ribosome et exposant l'ARNm cible à la dégradation.

Ce modèle a été réfuté par deux études. Une première, réalisée chez la drosophile par l'équipe d'Elisa Izaurralde par des expériences de déplétion de eIF6, a contredit l'importance de eIF6 dans la répression de la traduction des ARNm par les miARN (Eulalio, Huntzinger, and Izaurralde 2008). De plus des travaux chez la souris (Gandin et al. 2008) ont montré que la déplétion d'un allèle du facteur eIF6 ne modifiait pas le taux d'expression des gènes cibles des miARN étudiés. Une difficulté supplémentaire liée à l'étude de ce facteur protéique est son implication dans la biogenèse des ribosomes (Miluzio et al. 2009), la perturbation du facteur eIF6 pourrait entraîner la diminution de ribosomes actifs et biaiser les études *in vivo*.

## 2. Inhibition de l'élongation de la traduction des ARNm cibles

Nous avons évoqué précédemment que les miARN co-sédimentent avec les polysomes en cours de traduction. De plus il a été montré que la répression de l'expression des miARN peut entraîner la diminution du taux de traduction cellulaire (John Kim et al. 2004). Une étude récente visant à préciser les caractéristiques d'interaction entre le miARN et les polysomes a mis en évidence que l'occupation des polysomes par les miARN était dépendante de plusieurs paramètres (Molotski and Soen 2012): le type cellulaire et l'état physiologique de la cellule, la nature du miARN, la force de l'interaction entre le miARN et l'ARNm cible.

En 2006, deux études ont mis en évidence que l'inhibition de la traduction des ARNm par les miARN pouvait s'effectuer au cours de l'étape d'élongation de la traduction (Figure 12B).

Une première étude a montré que la particule miRISC pouvait causer la dissociation des polyribosomes au cours de l'élongation conduisant à la production de polypeptides abortifs (Petersen et al. 2006).

Une deuxième équipe a émis l'hypothèse que le peptide naissant en cours de synthèse pouvait être dégradé par protéolyse (Nottrott, Simard, and Richter 2006). Cette étude suggérait que la dégradation peptidique serait effectuée par une protéase non identifiée qui agirait de façon concomitante à l'inhibition de l'initiation de la traduction et à la déadénylation de l'ARNm cible. Cependant cette étude est remise en cause par les conclusions des travaux réalisés par



Selbach et ses collègues (Selbach et al. 2008) par bioinformatique. Les auteurs ont mis en évidence que l'activité des ribosomes associés au réticulum endoplasmique (RE) était la plus sensible à la répression de la traduction induite par les miARN. Tenant en compte le faible taux de protéase au sein du RE, les auteurs en ont conclu que le phénomène de répression de la traduction par la dégradation du polypeptide naissant induite par les miARN ne devait pas être prédominant.

Une étude récente a mis en évidence l'implication du complexe de déadénylation (CCR4/CAF1/NOT1) dans la répression de la traduction induite par les miARN (Zekri, Kuzuoğlu-Öztürk, and Izaurralde 2013). Ainsi le complexe miRISC en interaction avec les protéines PABP recruterait le complexe de déadénylation qui déplacerait les protéines PABP. Ceci provoquerait alors la perte de la circularisation de l'ARNm par ses extrémités 5' et 3', réprimant alors sa traduction.

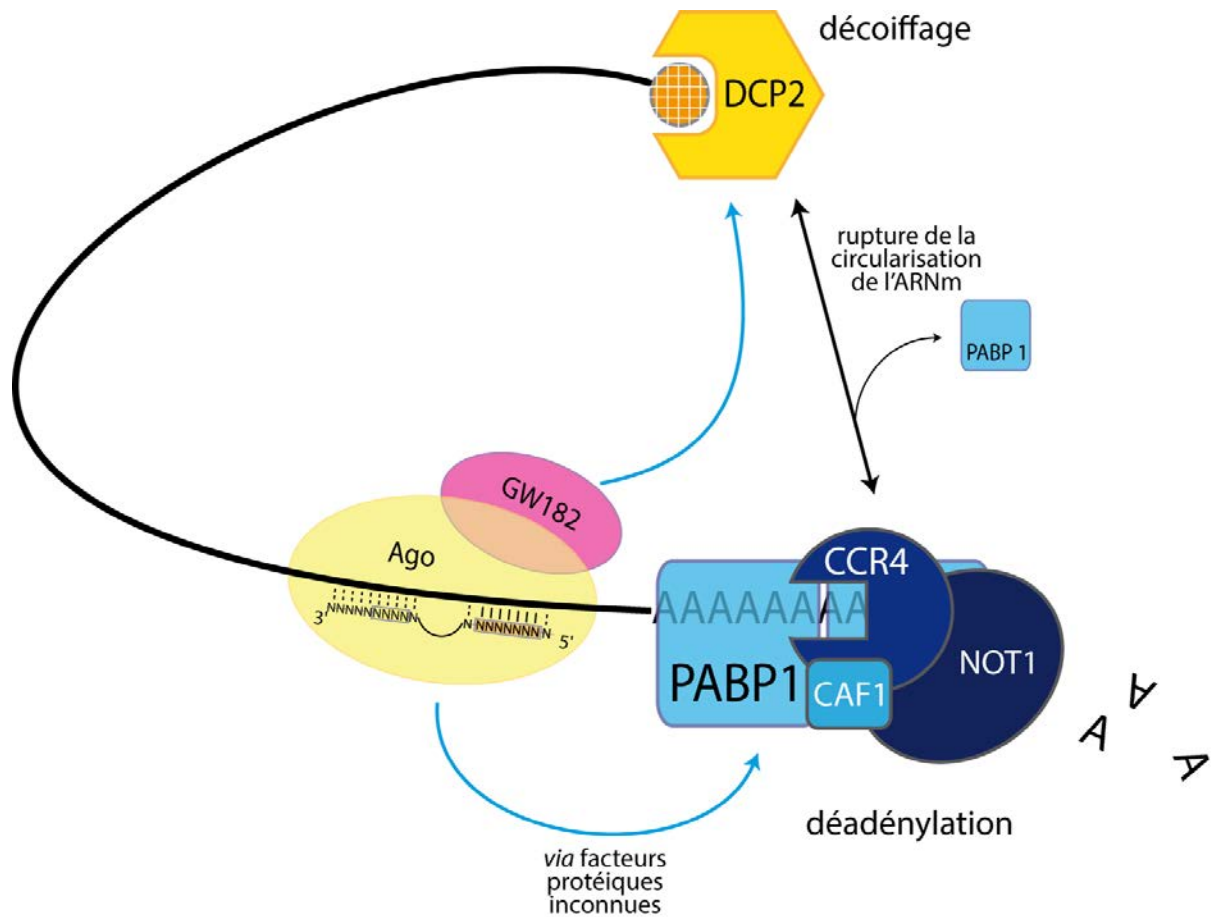
### **III. Dégradation de l'ARNm cible**

La machinerie de répression de l'expression des gènes par les miARN entraîne non seulement l'inhibition de la traduction des ARNm cibles mais peut porter atteinte à l'intégrité de l'ARNm lui-même. En effet, il a été montré dans plusieurs études que la régulation de l'expression des gènes par les miARN pouvait consister en la dégradation de l'ARNm cible. Dans certains cas il est possible que l'interaction miARN/ARNm corresponde à un appariement parfait. Le miRISC opère alors un clivage endonucléolytique par Ago2 pour dégrader l'ARNm. Dans la majorité des cas l'appariement est imparfait et la dégradation des ARNm messagers se produit à l'issue de la séquestration du complexe ternaire miARN/ARNm/complexe RISC au sein des P-Bodies.

Cette interaction est perturbée par la fixation des particules miRISC sur l'ARNm et entraîne la dégradation de l'ARNm par déstabilisation des extrémités 5' et 3' de l'ARNm cible au sein des P-Bodies (Behm-Ansmant 2006; Eulalio, Huntzinger, and Izaurralde 2008) (Figure 13).

Comme mentionné au chapitre précédent, la particule miRISC peut s'associer à la protéine PABP par le biais d'une interaction directe avec la protéine GW182 (Fabian et al. 2009; Huntzinger et al. 2013). La queue polyA de l'ARNm est alors exposée à la dégradation par le complexe de déadénylation (CCR4/CAF1/NOT1). La circularisation de l'ARNm serait alors impossible et la traduction affectée. En outre, l'ARNm déadénylé est alors sensible aux exonucléases et il est dégradé.





**Figure 13 : Les miARN induisent la dégradation de leurs ARNm cibles.**

La particule RISC permet la séquestration des ARNm cibles dans les P-Bodies. Des enzymes de décoiffage (DCP1/DCP2) et de déadénylation (CCR4/NOT1/CAF1) sont recrutées de manière indirecte, et dégradent la coiffe méthylée en 5' et la queue polyA en 3' de l'ARNm. L'ARNm cible est ensuite dégradé par des exonucléases. D'après (Chekulaeva et Filipowicz, 2009 ; Eulalio, Huntzinger, et Izaurralde, 2008).





De plus, le complexe miRISC est capable de recruter le complexe de décoiffage à l'extrémité 5' de l'ARNm cible. La coiffe m<sup>7</sup>G sera alors dégradée et l'extrémité 5' rendue accessible aux exonucléases. Ce phénomène a été montré récemment par des expériences de co-immunoprécipitation entre un transcrit ARN polymérase III, dépourvu de coiffe en 5', et le complexe miRISC (Nishihara et al. 2013). Les auteurs ont mis en évidence que la particule miRISC était capable de recruter les protéines de décoiffage DCP1/DCP2 et des facteurs protéiques accessoires indépendamment de la présence de la coiffe. De plus les auteurs ont montré, en utilisant un ARN substrat coiffé en 5' mais dénué de queue polyA, que le complexe miRISC était capable d'induire sa dégradation en initiant son décoiffage.

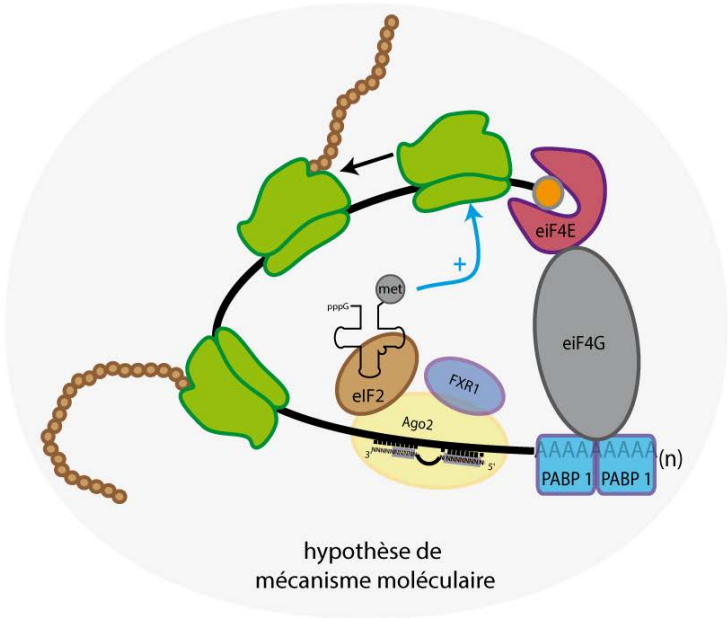
Toutes ces études indiqueraient alors que la particule RISC serait capable d'accélérer la dégradation de l'ARNm cible par des processus qui peuvent être dissociés, à savoir le décoiffage de l'extrémité 5' et la dégradation de sa queue polyA.

#### **IV. Activation de l'expression des gènes par les miARN**

Malgré le rôle des miARN de répresseur de l'expression des gènes aujourd'hui bien établi, des études mettent en évidence la fonction d'activateurs de l'expression des gènes par certains miARN (pour revue (Iwasaki and Tomari 2009)). Dans certains cas, la formation du complexe ternaire miARN/ARNm/RISC peut entraîner l'activation de l'expression d'un gène (pour revue (Vasudevan 2012)).

En prenant l'exemple de miR-369-3p, des études ont montré que son expression était augmentée au cours de la phase de quiescence G0 du cycle cellulaire (Figure 14). miR-369-3p cible la région 3'UTR de l'ARNm codant le *TNFα*. Au cours de la prolifération cellulaire miR-369-3p est incorporé dans une particule RISC constituée de Ago2 et GW182. Le rôle de ce miARN est alors de réguler négativement l'expression du gène *TNFα*. En phase de quiescence miR-369-3p possède un rôle tout à fait opposé. Ainsi des travaux (Vasudevan, Tong, and Steitz 2007) ont mis en évidence que ce miARN est incorporé dans une particule RISC différente au sein de laquelle la protéine GW182 est absente et dans laquelle la protéine FXR1 (Fragile X-Related protein 1) est présente. Cette particule miRISC singulière est capable d'accroître le taux de traduction des ARNm *TNFα*.

Une hypothèse sur le mécanisme moléculaire permettant l'augmentation du taux de traduction de l'ARNm cible est l'implication du facteur d'initiation de la traduction eIF2. En effet, bien que l'étude de ce processus reste encore à approfondir, il semblerait qu'Ago2 interagisse avec



L'ARNm *TNFα* est ciblé par le miR-369-3p. Lorsque la cellule est en division cellulaire la particule RISC est constituée de la protéine GW182. Au cours de la division cellulaire, l'expression du gène *TNFα* est réprimée. En phase de quiescence, la protéine GW182 est substituée par la protéine FXR1. Cette particule RISC modifiée est capable d'activer la traduction de l'ARNm cible. Une hypothèse de mécanisme moléculaire a été proposée : la particule RISC pourrait favoriser l'entrée du codon initiateur de la traduction dans le ribosome. D'après (Vasudevan, 2012).



le facteur eIF2, lui-même en complexe avec l'ARNt méthionine aminoacylé, facilitant ainsi la reconnaissance du codon d'initiation de la traduction des ARNm.

L'importance de ce type de phénomène n'est soutenue que par quelques études et son importance reste encore très peu connue. Il semble néanmoins que l'état physiologique de la cellule soit déterminant pour le passage d'un rôle répresseur vers un rôle activateur pour un miARN donné (Iwasaki and Tomari 2009). Ainsi des études réalisées chez la drosophile montreraient que l'activation de l'expression des gènes coïnciderait avec le raccourcissement de la queue polyA des ARN cibles. Des études supplémentaires sont indispensables afin de mieux apprécier ce caractère ambivalent de certains miARN.

## **E. Devenir des miARN**

Pour clore ce chapitre, nous nous intéresserons au devenir des miARN. Sont-ils uniquement dédiés à la régulation de l'expression gènes de la cellule qui les produit ? Comment le renouvellement du pool de miARN dans la cellule est-il réalisé ?

Nous aborderons dans un premier temps un rôle secondaire mais tout aussi important de la fonction des miARN et dans un deuxième temps nous discuterons du temps de demi-vie et de la dégradation des miARN.

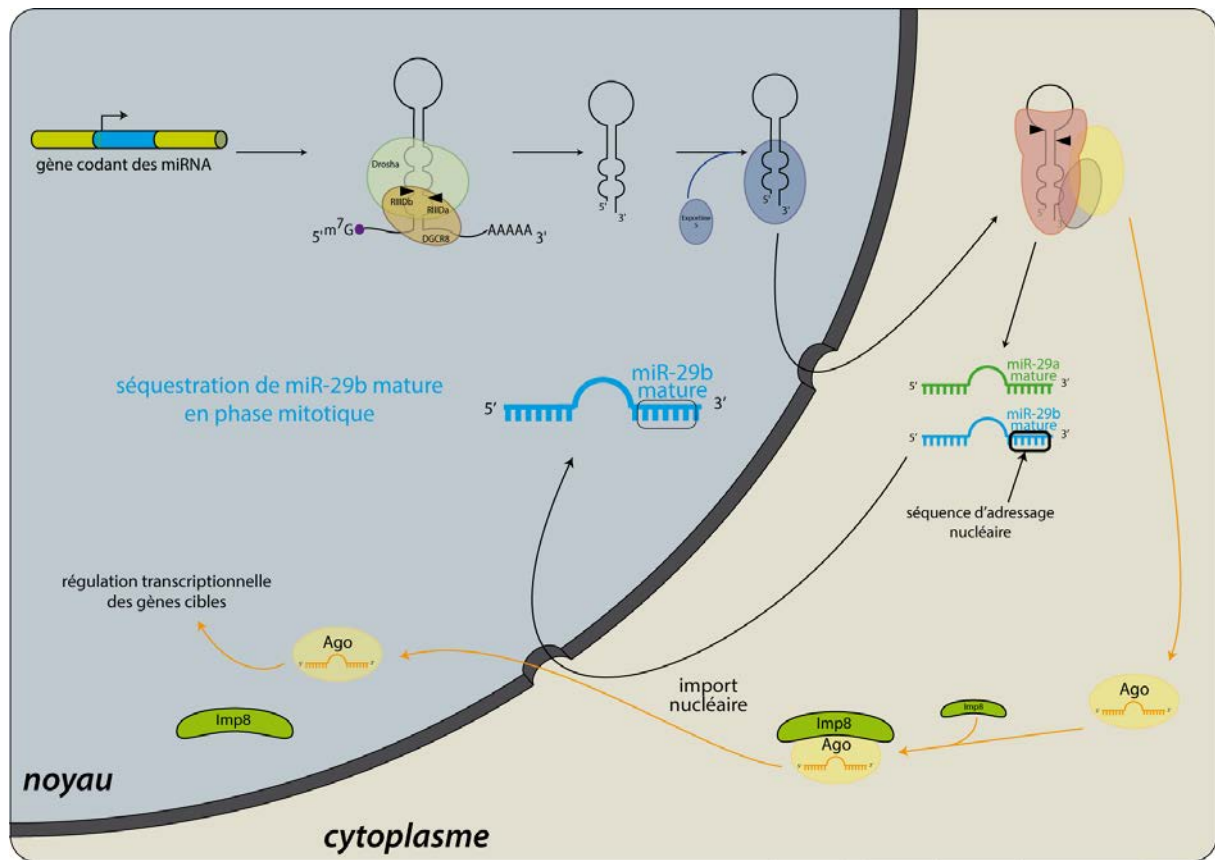
## **I. Transport des microARN**

### **1. Transport intra-cellulaire**

Comme le processus de biogénèse des miARN le sous-entend les miARN matures sont produits dans le cytoplasme. Cependant tous les miARN ne sont pas destinés à opérer leur fonction au sein de ce compartiment cellulaire. Une fois mûré au sein de la particule miRISC, le miARN peut être importé dans le noyau (pour revue (Huang and Li 2012)) (Figure 15). Ce transport pourrait être réalisé grâce à l'interaction entre la protéine Argonaute et la protéine importine 8 (Imp8). Une fois dans le noyau ces RNP miRISC joueraient un rôle d'activateur de la transcription de gènes cibles *via* le système de régulation TGS.

La particule miRISC pourrait aussi être importée dans le noyau grâce à la protéine GW182 (Nishi et al. 2013). En effet, les auteurs de cette étude ont identifié au sein de la protéine GW182 des signaux d'export et d'import nucléaire, et ceci dans un contexte où les signaux d'import nucléaire de la protéine argonaute sont inactivés.

L'import nucléaire du miARN miR-29b a été décrit en 2007 (H.-W. Hwang, Wentzel, and Mendell 2007) (Figure 15). En comparant les profils d'expression de miR-29b dans les



**Figure 15 : Transport intracellulaire des miARN.**

Les miARN produits dans le cytoplasme peuvent être réimportés dans le noyau de la cellule. Un premier modèle (flèches noires) proposé en 2007 illustre que le miR-29b serait réimporté dans le noyau cellulaire lorsque la cellule entre en phase de mitose (Hwang, Wentzel, et Mendell, 2007). Cet import est basé sur la reconnaissance d'une séquence hexanucléique présente au sein de l'extrémité 3' de miR-29b. Son paraglogue miR-29a n'est pas concerné par ce transport. Un second modèle indique que les miARN en complexe avec une protéine Argonaute pourraient être importés dans le noyau par le concours de la protéine Importine 8. Les miARN nucléaires pourraient réguler l'expression des gènes (système TGS) (pour revue (Huang et Li, 2012)).



cellules HeLa en cours de division cellulaire et en phase mitotique, les auteurs ont mis en exergue que miR-29b était réimporté dans le noyau de la cellule contrairement à son paralogue miR-29a. La comparaison des séquences de miR-29a et miR-29b, et la mutation des nucléotides 3' qui les différencient, ont conduit les auteurs à proposer la séquence responsable de l'import dans le noyau de miR-29b mature au cours de la mitose. Une question importante qui reste en suspens est de savoir par quel mécanisme cette séquence d'adressage nucléaire est-elle reconnue. Cependant, ces résultats au potentiel pharmacologique indiscutable pourraient être biaisés par l'utilisation de systèmes de surexpression de miARN chimériques dont les concentrations surpassent les concentrations physiologiques de microARN ?

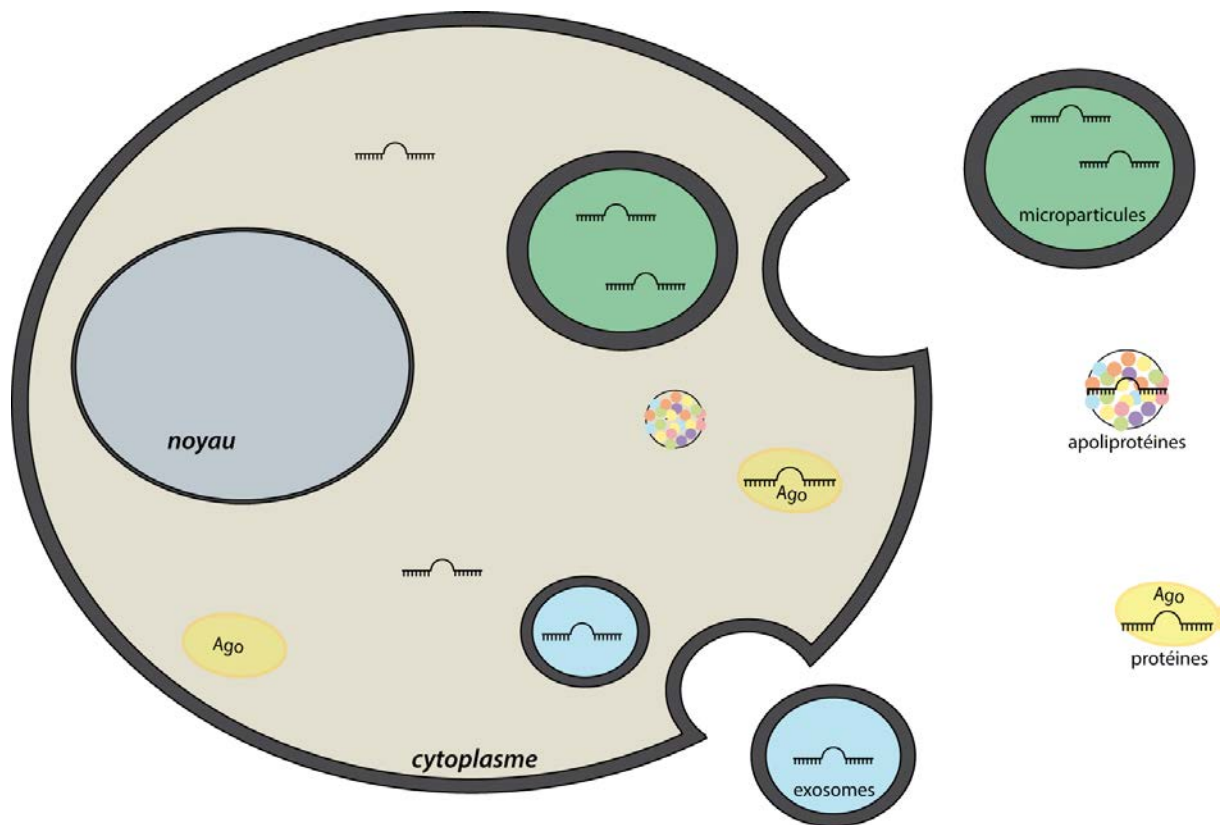
## 2. miARN et communication intercellulaire : les miARN circulants

L'amélioration des techniques de détection des miARN ainsi que le développement de techniques à haut débit (micro-arrays, RNAseq) a permis de mettre en évidence la présence des miARN dans de nombreux fluides biologiques (sang, urine, liquide céphalo-rachidien, liquide séminal, salive ou encore le lait maternel) (pour revue, (Boon and Vickers 2013)). On parle alors de miARN circulants. Les cellules exportent ces miARN par l'intermédiaire de particules tels les exosomes (Mathivanan et al. 2012) ou encore au sein de lipoprotéines ou les corps apoptotiques (Figure 16).

Les miARN sont exportés au sein de ribonucléoparticules et souvent en association avec une protéine Argonaute (préférentiellement Ago2 et Ago1) ce qui permet leur protection vis à vis de la dégradation par des enzymes de type RNases (Turchinovich et al. 2011).

En 2007, une étude portant sur la caractérisation des exosomes de mastocytes de souris et humains, a permis d'identifier la présence de miARN (Valadi et al. 2007). La capacité des exosomes à transférer ce matériel acide nucléique au sein d'autres cellules mastocytes a été mise en évidence. L'intérêt d'une telle communication intercellulaire serait la transmission d'informations de régulation de l'expression des gènes au sein d'un tissu donné voir au sein d'un organisme entier. Un tel mode de transport intercellulaire renforce l'implication des miARN circulants dans les processus de régulation de l'homéostasie ou encore de la propagation de maladies comme le cancer. En effet des miARN dont l'activité promeut l'apparition de phénotypes cancéreux ont également été identifiés au sein des exosomes.

Cependant le transport d'un microARN ne semble pas dépendre d'un mode d'export exclusif (pour revue (L. Xu, Yang, and Ai 2013)). En effet, plusieurs études ont mis en évidence qu'un miARN donné pouvait être retrouvé au sein d'exosomes comme au sein de complexes



**Figure 16 : Transport extracellulaire des miARN.**

Les miARN participent à la communication intercellulaire. Ils sont alors exportés hors de la cellule. Afin d'être protégés contre la dégradation, les miARN sont transportés par différentes particules : microparticules, exosomes, protéines (ex : Ago) ou encore des lipoprotéines. Ces transporteurs sont ensuite adressés puis intégrés au sein de cellules réceptrices. Les miARN transportés y sont alors libérés.



protéiques libres. L'étude de ce mode de sélection des miARN est à poursuivre et les chercheurs devront faire face à un écueil important : la mise au point des procédés d'extraction des miARN compte tenu de leur faible concentration au sein de ces différents transporteurs. De plus, bien que le nombre de miARN circulants détectés soit important (par exemple, 692 miARN humains sont présents dans les exosomes, selon la base de données ExoCarta v4.1), l'intégration de leur influence dans les réseaux de communications cellulaires reste un enjeu majeur de recherche.

## **II. Stabilité et dégradation des miARN chez l'Homme**

### **1. Les miARNses dans différents organismes**

La mise en évidence d'enzymes dédiées à la dégradation des miARN est très récente (pour revue (Rüegger et Großhans, 2012)). En 2008, des enzymes appelées Small RNA Degrading Nucleases (SDN) ont été décrites comme dégradant les miARN chez *Arabidopsis thaliana* (Ramachandran and Chen 2008). Ces enzymes sont regroupées en 5 familles et des études sur l'enzyme SDN1 a permis de mieux comprendre son activité. L'activité exonucléolytique de SDN1, spécifique des extrémités 3'-OH et orientée de 3' vers 5', dégrade de 8 à 9 nucléotides du miARN. De plus des contraintes de taille de l'ARN substrat sont observées : les petits ARN de plus de 27 nucléotides ne sont pas dégradés par les SDN. De plus chez cet organisme, il semble que l'uridylation de ces petits ARN entraîne leur dégradation par des enzymes encore non identifiées.

En 2010, ce mécanisme d'induction de dégradation des miARN a été retrouvé chez l'algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, où la miARNse RRP6, un composant de l'exosome dégrade spécifiquement les miARN uridylés par le partenaire protéique MUT68 (Ibrahim et al. 2010). Ces enzymes pourraient être utilisées comme un mécanisme de contrôle qualité permettant d'éliminer les miARN non fonctionnels.

Des études chez *C. elegans* sur le miARN historique let-7 ont révélé que les exonucléases XRN-1 et XRN-2 à activité de 5' vers 3' jouaient le rôle de miARNses spécifiques des extrémités 5'-P (Chatterjee et al. 2011). Des expériences d'ARNi dirigées contre ces deux enzymes ont conduit à l'accumulation des miARN matures étudiés sans pour autant modifier le profil d'expression de leurs précurseurs pri- ou pré-miARN.





## 2. Les miARNs chez l'Homme

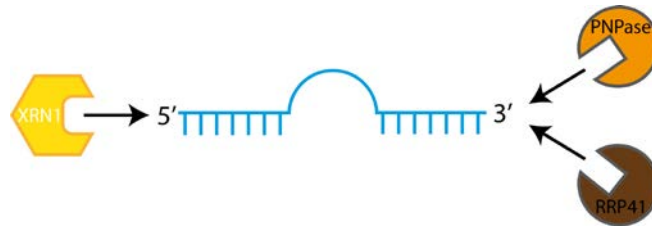
Une étude chez l'Homme a été réalisée en 2010 (Bail et al. 2010). Des hybridations sur des puces dédiées à l'analyse des miARN ont été effectuées à partir d'ARN extraits de cellules HEK 293T et dans des conditions de cinétique après blocage de la transcription par un traitement à l'actinomycine D. Ces études ont permis aux auteurs d'étudier le temps de demi-vie des miARN. Cette équipe s'est alors intéressée au miARN miR-382 dont la demi-vie est inférieure à 8h. L'implication de l'exosome mais aussi des protéines XRN-1 et XRN-2 humaines ont été vérifiées par ARNi. Les résultats ont mis en évidence un rôle de l'exosome au travers de l'activité exoribonucléase 3' vers 5' de la protéine RRP41 et la contribution uniquement de la protéine XRN-1. L'analyse approfondie de la séquence de miR-382 et l'étude comparative de miARN et des variants de séquence a révélé l'importance des nucléotides 16 à 22 dans la stabilité de ce miARN et sa sensibilité aux miARNs (Figure 17). D'autres études ont montré qu'une enzyme mitochondriale pouvait être impliquée dans la dégradation des miARN (pour revue (Das et al. 2011)). Les profils d'expression des miARN de cellules de mélanome traitées à l'interféron  $\gamma$  ( $\square\square\square\gamma$ ) ont été analysés par micro-array et les auteurs ont mis en évidence l'implication de l'enzyme mitochondriale PNP<sup>old-35</sup> (Polynucléotide phosphatase) dans la dégradation de miR-222. Cette enzyme, inductible à l'I  $\gamma$ , dégrade le miR-222 dans le sens 3' vers 5'. Le lieu d'action de cette enzyme mitochondriale reste discuté. Actuellement cette enzyme semble être localisée dans la membrane interne des mitochondries. La question de l'accessibilité des miARN pour cette enzyme est alors posée. Une étude récente propose que la dégradation des ARN par la PNPase pourrait avoir lieu au sein de « foci » localisés à proximité des mitochondries (Borowski et al. 2012).

## 3. Régulation de la stabilité des miARN par leur ARN cible

Il semble de plus en plus évident que le lien qui lie le miARN et son ARNm cible ne se résume pas qu'à une fonction d'inhibiteur de l'expression de son gène. De plus, la qualité de l'appariement entre le miARN et sa séquence cible semble très importante pour la régulation de la stabilité du miARN (Figure 18).

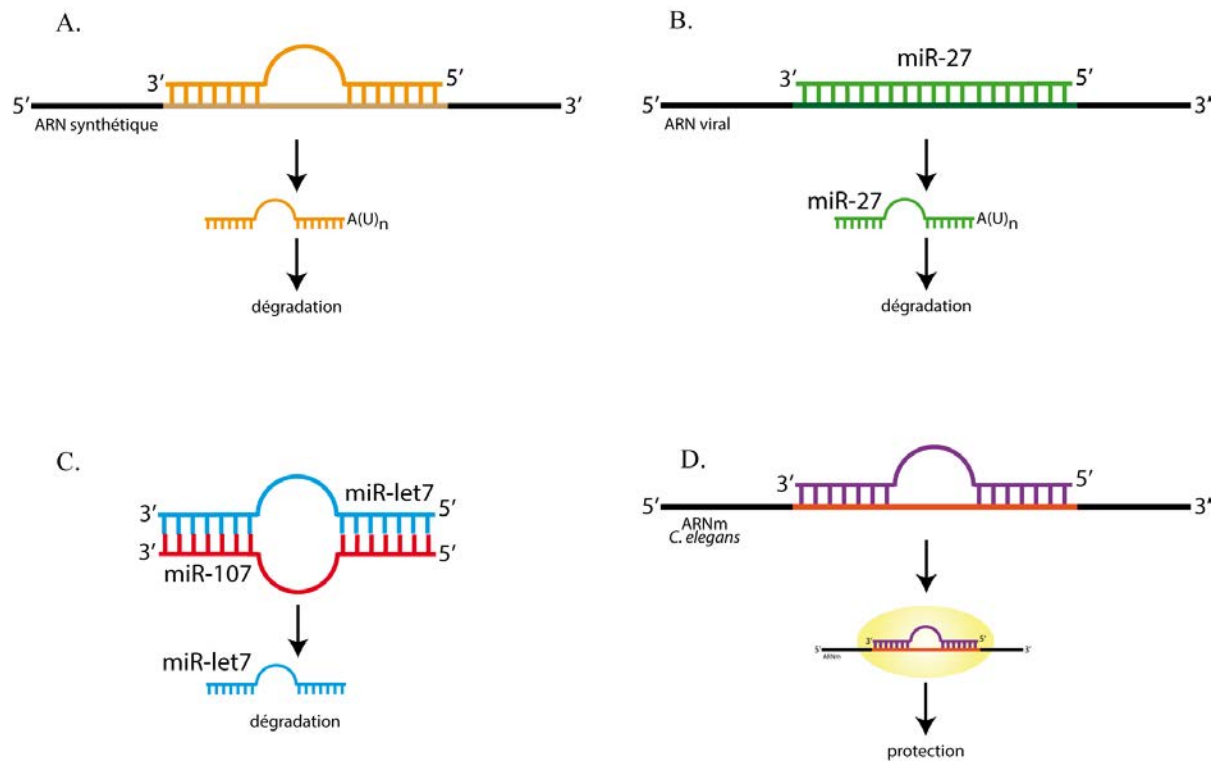
Dans leur revue, Rüegger et Grosshans énumèrent quatre exemples de régulation de la stabilité des miARN (Rüegger and Großhans 2012). Le miARN mature peut être destabilisé par l'interaction avec un ARN synthétique arborant une complémentarité parfaite (Stefan L. Ameres et al. 2010). Cette association entraîne alors la dégradation immédiate du miARN ou conduit le miARN à être polyadénylé ou polyuridylylé ce qui le guidera vers la dégradation.





**Figure 17 : Les miRNases humaines.**

Chez l'Homme les miARN peuvent être dégradés par des exonucléases appelées miRNases. A ce jour plusieurs miRNases ont été décrites : XRN1 est une exonucléase dégradant de 5' vers 3' ; PNP<sup>old-35</sup> et RRP41 sont des exonucléases dégradant de 3' vers 5'. Encore trop peu d'exemples sont décrits pour pouvoir en déduire des généralités sur la dégradation des miARN.



**Figure 18 : Régulation de la stabilité des miARN par les ARN cibles.**

Les ARN cibles des miARN peuvent réguler la stabilité de leur miARN régulateurs. **A.** L'introduction d'un ARN synthétique portant un site de reconnaissance à un miARN donné peut entraîner la dégradation de ce miARN. **B.** Chez le singe, le virus de l'herpès code un ARN portant une séquence cible de miR-27 dont la complémentarité est parfaite. miR-27 est alors dégradé par la cellule. **C.** Certains miARN peuvent réguler la stabilité d'autres miARN. C'est le cas de miR-107 qui est capable de s'apparier à miR-let7 mature. Cette association entraîne la dégradation de miR-let7. Le taux de miR-let7 peut être modulé par l'expression de miR-107. **D.** Chez *C. elegans*, l'association entre un miARN et son ARNm peut conduire à la protection du miARN de la dégradation.



La déstabilisation d'un miARN peut aussi être provoquée suite à son association avec un ARN transcrit par un virus (Cazalla, Yario, and Steitz 2010). C'est le cas de l'herpès virus simien qui en infectant les lymphocytes T du primate peut transcrire un ARN dont la complémentarité même imparfaite avec miR-27a ou miR-27b provoque la dégradation de ces miARN. Cette dégradation peut être induite par l'ajout d'une queue polyA ou polyU.

Il a également été montré chez l'Homme que les séquences des miARN let-7 et miR-107 étaient complémentaires (P.-S. Chen et al. 2011). Cet appariement imparfait entraîne la dégradation de let-7 mature alors que les précurseurs ne sont pas affectés par cette régulation. La déplétion de miR-107 conduit alors à l'accumulation de let-7 et à la répression des cibles de let-7. Cependant cette étude ne s'est pas portée vers la compréhension du mécanisme moléculaire à l'échelle de la particule RISC. On peut donc tout à fait se questionner quant à la gêne stérique potentielle pouvant être due aux protéines des complexes RISC chargés des miARN d'intérêt. Sachant que les miARN matures sont chacun intégrés dans une particule RISC distincte, il reste encore à déterminer comment ces deux ribonucléoparticules sont capables de former un hétérodimère rendant accessibles les miARN l'un à l'autre pour former le duplex miR-107/let-7 dans lequel la dégradation de let-7 sera effective.

Enfin une étude chez *C. elegans* a montré que les ARNm cibles peuvent protéger les miARN de la dégradation (Chatterjee et al. 2011). Ce système de protection a été nommé TMMP (Target Mediated MiARN Protection) et pourrait être utilisé par la cellule comme un mécanisme de surveillance de bon appariement miARN/ARNm cible.



## Chapitre 2 : Le cartilage articulaire, biosynthèse, homéostasie, et pathologies

Tout au long de ma thèse, j'ai pu m'initier à cette nouvelle thématique de la physiopathologie articulaire. Cette thématique fait appel à des disciplines telles que la biologie cellulaire, la physiologie et la pharmacologie, des spécialités qui m'étaient peu familières de part ma formation de biologiste moléculaire/biochimiste. Dans ce chapitre j'ai souhaité brosser une vue d'ensemble des articulations diarthroïdales en me focalisant sur la cellule productrice de la matrice extracellulaire du cartilage, le chondrocyte. Gardant toujours à l'esprit ma position de « néophyte en la matière », je propose ici une synthèse qui n'a pas la prétention d'être exhaustive, mais qui témoigne de mon intérêt pour cette thématique et à vocation à faciliter la compréhension du lecteur non spécialiste.

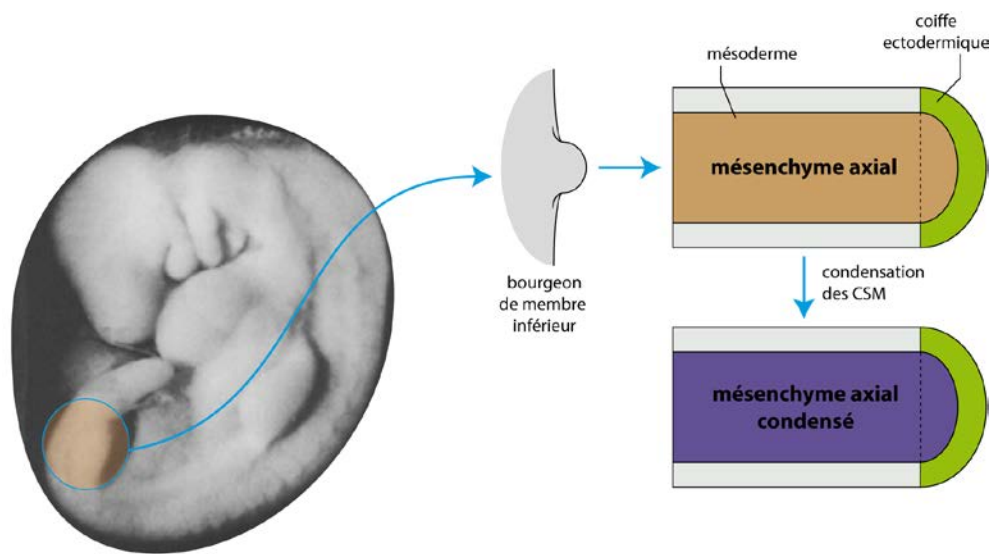
Je commencerai par décrire la formation de la cavité articulaire, puis expliquerai comment le chondrocyte maintient l'homéostasie du cartilage articulaire, et terminerai ce chapitre en décrivant comment la perte de phénotype différencié du chondrocyte est associée à l'apparition de pathologies articulaires comme l'arthrose des membres.

### **A. La chondrogenèse :**

#### **I. Embryogénèse du membre inférieur**

##### **1. Croissance du membre inférieur**

Les membres inférieurs sont formés à partir de bourgeons qui apparaissent dès le 24-1<sup>ère</sup> jour après la fécondation (Figure 19). Cette formation des membres inférieurs débute dès la 4<sup>ème</sup> semaine de développement de l'embryon vers le 28<sup>ème</sup> jour. Ce développement est induit par des facteurs de croissance, les FGF (Fibroblast Growth Factor) qui permettent la croissance du membre comprenant un axe mésenchymateux de mésoderme et une coiffe ectodermique. Cette coiffe ectodermique s'épaissit pour former une crête apicale. Cette crête est très



**Figure 19 : Croissance du membre inférieur.**

Représentation schématique du bourgeonnement des membres inférieurs au cours de l'embryogenèse, adapté de (Larsen, 2003). Le FGF induit la croissance du membre à partir du jour 28. Le mésenchyme axial pousse une coiffe ectodermique située à l'apex du membre en croissance. Au fur et à mesure de la poussée du membre le mésenchyme axial sera modifié pour aboutir à la formation des ébauches osseuses.



importante pour le développement spatial du membre et l'orientation des cellules en croissance qui formeront le futur membre.

Le mésenchyme axial est constitué de cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui se multiplient et se condensent pendant la formation du membre. Au cours de la condensation cellulaire, les CSM s'engagent vers une différenciation en cellules ostéo-chondro-progénitrices. Cette condensation aboutit à la formation d'ébauches cartilagineuses. Les chondrocytes synthétisent du cartilage autour de la condensation mésenchymateuse appelé périchondre.

## **2. Formation de la cavité articulaire et ossification**

Au niveau des futures régions articulaires (interzones), les CSM se différencient en cellules fibroblastiques (Figure 20) qui constitueront ultérieurement les cellules de la couche bordante de la membrane synoviale. Les interzones permettent la segmentation des ébauches osseuses.

Au cours de la croissance du membre des chondrocytes différenciés se retrouvent localisées en bordure de la future articulation. Ensuite les ligaments intra-articulaires, la capsule articulaire et le ménisque sont formés, puis la cavité synoviale est observée. La cavité articulaire du genou est alors formée et elle permettra l'articulation entre le fémur et le tibia.

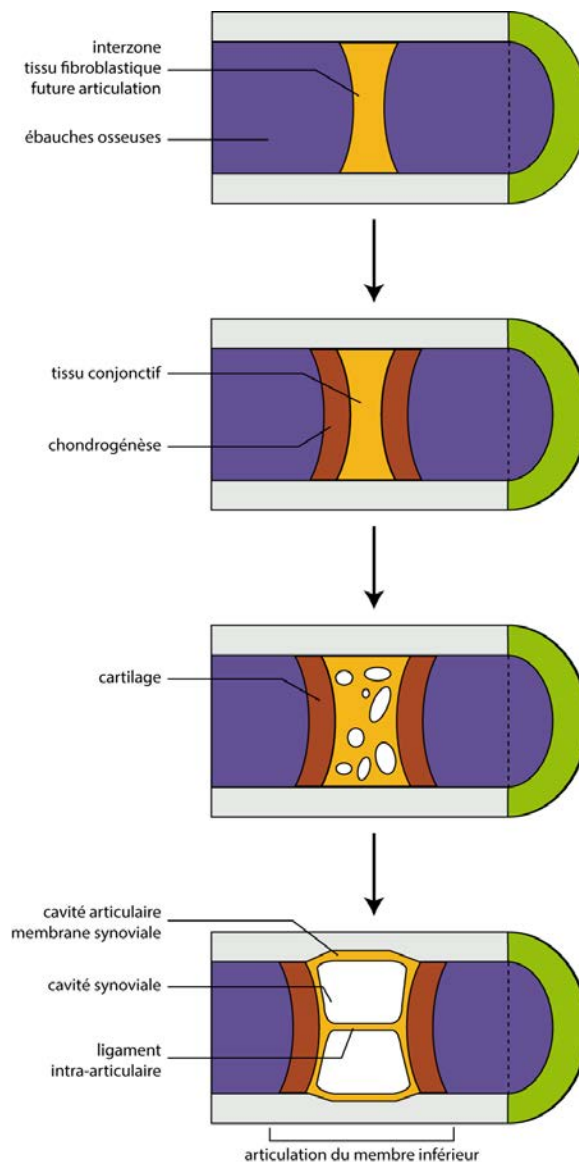
Les CSM présentes au sein du périchondre vont ensuite se différencier en ostéoblastes, pour permettre l'ossification des ébauches cartilagineuses, au niveau des zones d'ossification primaires. Le processus d'ossification durera jusqu'à la 16<sup>ème</sup> semaine de développement.

## **II. De la CSM au chondrocyte différencié**

### **1. Les différents types cellulaires successifs**

La différenciation des cellules souches mésenchymateuses du mésoderme en chondrocyte sain peut être décrite en 4 stades distincts (pour revue (DeLise, Fischer, and Tuan 2000)). Chacun de ces stades se distingue des autres par la composition de la matrice extracellulaire, par le taux d'expression de facteurs de transcription favorisant la chondrogenèse ou encore par la forme et l'état de condensation des cellules (Figure 21).

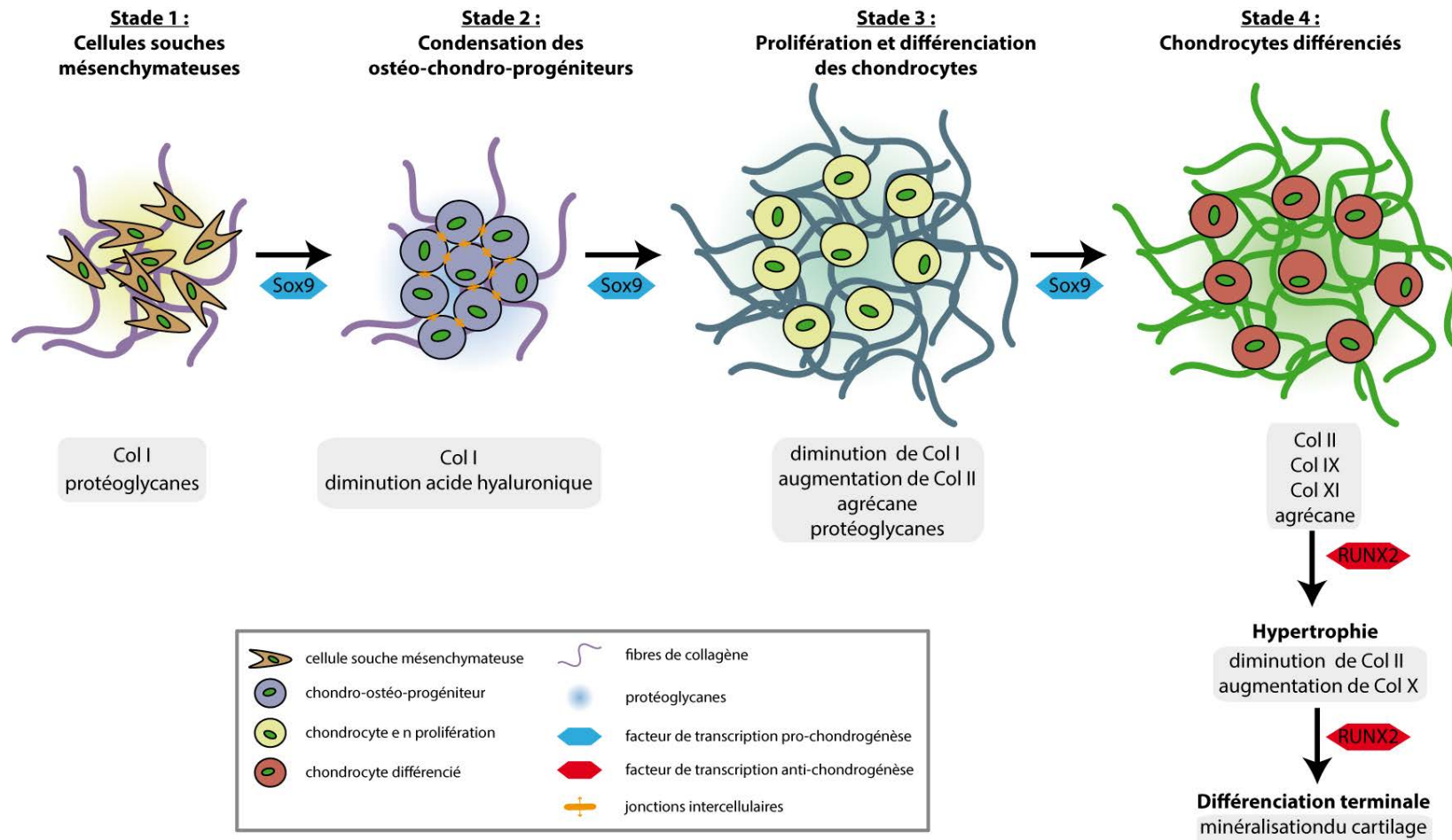
Lors du 1<sup>er</sup> stade, les CSM changent de forme pour devenir globulaires et se condensent. Cette condensation est accomplie par des mouvements cellulaires qui permettent d'augmenter le nombre de cellules dans un volume donné et non par la prolifération cellulaire. Au cours du deuxième stade, les pré-chondrocytes regroupés voient leurs contacts cellule/cellule augmenter grâce à la production de molécules d'adhésion. Ces jonctions intercellulaires facilitent les communications entre les cellules. Au stade suivant (stade 3), les pré-



**Figure 20 : Embryogenèse du membre inférieur.**

Représentation schématisque de la formation du membre inférieur et de la création de la cavité articulaire du genou, adapté de (Larsen, 2003). Les cellules souches du mésenchyme axial se différencient en cellules chondro-ostéoprogénitrices et se condensent (en violet). Au milieu de l'ébauche osseuse, ces cellules se différencient en tissu fibroblastique : on parle d'interzone (en jaune). De part et d'autre de ce tissu le mésenchyme est différencié en chondrocyte et le cartilage recouvre l'interzone (en marron). Le tissu conjonctif de l'interzone se différencie alors en tissu synovial et la cavité synoviale est créée.





**Figure 21 : Chondrogenèse.**

Représentation schématique du processus de chondrogenèse dans la plaque de croissance, adapté de (Singh et Schwarzbauer, 2012). L'expression du gène Sox9 est essentielle pour l'induction de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en chondrocyte. A chaque stade, le phénotype de la cellule change. Les CSM changent de forme et deviennent globulaires. La composition de la matrice extracellulaire produite par cette cellule en différenciation change : les types de collagène et de protéoglycanes exprimés sont modifiés. Le chondrocyte peut perdre son phénotype différencié sous l'influence du facteur de transcription RUNX2 qui induit les gènes impliqués dans l'hypertrophie. Cette modification de phénotype peut, à l'extrême, conduire à la minéralisation du cartilage. On parle alors de différenciation terminale du chondrocyte telle qu'elle est observée dans le processus d'ossification endochondrale.



chondrocytes condensés synthétisent une matrice extracellulaire différente ce qui entraîne l'écartement des cellules et facilite leur prolifération. Au dernier stade, les pré-chondrocytes arrêtent de proliférer et s'engagent vers un état de chondrocytes différenciés.

## 2. Evolution de la matrice extracellulaire

### i. Stade 1 : les CSM

Au sein du mésenchyme axial, les CSM ne sont pas différenciées. Ces cellules multipotentes produisent une matrice extracellulaire composée de collagène de type 1 (ColI), de GAG (GlycosAminoGlycanes) dont l'acide hyaluronique, de protéoglycanes comme le versican et de quelques protéines de structure comme la fibronectine. Les CSM sont des cellules ostéochondro-progénitrices et peuvent se différencier soit en ostéocyte sous l'influence du facteur de transcription RUNX2, soit en chondrocyte sous l'influence du facteur de transcription Sox9.

### ii. Stade 2 : les pré-chondrocytes

Les pré-chondrocytes en condensation synthétisent de la hyaluronidase qui dégrade l'acide hyaluronique de la MEC, et des molécules d'adhésion qui favorisent les jonctions intercellulaires : les N-CAM (Cell Adhesion Molecule) et les N-cadhérines. Ces protéines transmembranaires favorisent les contacts intercellulaires grâce à leur extrémité N-terminale extracellulaire, et ces contacts vont favoriser l'acquisition d'une forme cellulaire globulaire. Cette condensation cellulaire induit un changement de constitution de la MEC. Des fibres de ColI sont toujours présentes cependant l'isoforme de la fibronectine est changée. La concentration en fibronectine atteint son maximum juste avant la différenciation des pré-chondrocytes en chondrocytes. On observe également la présence de la tenascine-C comme protéoglycane dans la MEC.

### iii. Stade 3 : Les chondrocytes prolifératifs

Après la condensation cellulaire, les pré-chondrocytes sont stimulés pour proliférer. La prolifération/pré-différenciation du chondrocyte est orchestrée par deux hormones antagonistes Ihh (Indian Hedgehog) et PTHrP (ParaTHyroïd Hormone related Peptide). La composition de la matrice change à nouveau. On observe une diminution du ColI au profit de l'augmentation de ColIIa. De plus, les molécules d'adhésion N-CAM et les N-cadhérines ne sont plus produites, et le taux de fibronectine diminue. Ceci indique que les contacts intercellulaires sont diminués et que la prolifération cellulaire est favorisée. Les chondrocytes en différenciation produisent alors une MEC dense qui favorise la dispersion des cellules



entre elles. Ces pré-chondrocytes espacés les uns des autres s'engagent vers un phénotype différencié.

iv. Stade 4 : Les chondrocytes différenciés

Les chondrocytes différenciés expriment toujours le facteur de transcription Sox9 qui est essentiel pour la différenciation cartilagineuse et tout particulièrement la synthèse des fibres de collagène de type II. D'autres types de collagènes spécifiques sont aussi présents dans la MEC comme les ColIX et ColXI. De plus des protéoglycanes comme le versican et l'agrécan, sont synthétisés en grande quantité.

### **III. Contrôle de la différenciation du chondrocyte**

Dans la plaque de croissance, au delà du phénotype différencié, le chondrocyte peut acquérir un phénotype pro-minéralisant. Ce changement de phénotype est induit par la répression du gène *Sox9* et l'activation de *RUNX2*. Le phénotype du chondrocyte tendra vers un état hypertrophique, durant lequel il synthétisera une MEC appauvrie en ColII et riche en ColX, puis vers un phénotype « ostéoblaste-like » durant lequel il exprimera des activités pro-minéralisantes comme la phosphatase alcaline. Cette différenciation ultime observée au cours de l'ossification endochondrale est connue sous le nom de différenciation terminale du chondrocyte.

Tous ces états phénotypiques se retrouvent organisés tout au long de l'os long en croissance, les chondrocytes hypertrophiques se situant au niveau de la diaphyse de l'ébauche osseuse en croissance et les chondrocytes prolifératifs au niveau de l'épiphyse. Cette organisation est importante pour la croissance de l'os long et la formation du cartilage aux surfaces des cavités articulaires, et régie notamment par des communications hormonales intercellulaires.

#### **1. Les voies de signalisation impliquées dans la chondrogenèse**

Plusieurs voies de signalisation cellulaires ont été identifiées comme régulatrices de la chondrogenèse : Wnt, TGF- $\beta$ /BMP, FGF, Ihh/PTHrP, PKA et PKC.

i. La voie Wnt :

L'étape de condensation du mésenchyme est très contrôlée. La voie de signalisation Wnt participe à cette régulation. Les Wnt (Wingless Type) composent une famille de glycoprotéines très conservées qui sont impliquées dans la morphogénèse des organismes. Dans les CSM, la voie de signalisation, dite canonique, induite par les Wnt permet la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, qui une fois transportée dans le noyau s'associe avec son



partenaire Lef1 (pour revue (Day and Yang 2008)) (Figure 22). Le complexe  $\beta$ -caténine/Lef1 active la transcription de gènes impliqués dans la condensation du mésenchyme comme les cadhérines. Lorsque les protéines Wnt ne sont pas exprimées la voie de signalisation est inactivée la protéine GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3-beta) qui phosphoryle la  $\beta$ -caténine cytoplasmique. Une fois phosphorylée la  $\beta$ -caténine sera ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Lorsque les Wnt sont exprimées et présentes dans la MEC, elles interagissent avec la partie extracellulaire de leur récepteur Frizzled/LRP5-6. Ce récepteur est alors activé et recrute, à son extrémité intracellulaire le complexe constitué de GSK-3 $\beta$  et de la protéine Dsh inhibe l'activité kinase de cette dernière. La  $\beta$ -caténine cytoplasmique n'est alors plus phosphorylée et peut jouer son rôle de facteur de transcription. Au cours de la condensation du mésenchyme plusieurs protéines Wnt peuvent avoir des effets antagonistes. Ainsi la protéine Wnt3A favoriserait la condensation alors que les protéines Wnt1 et Wnt7 l'inhiberaient.

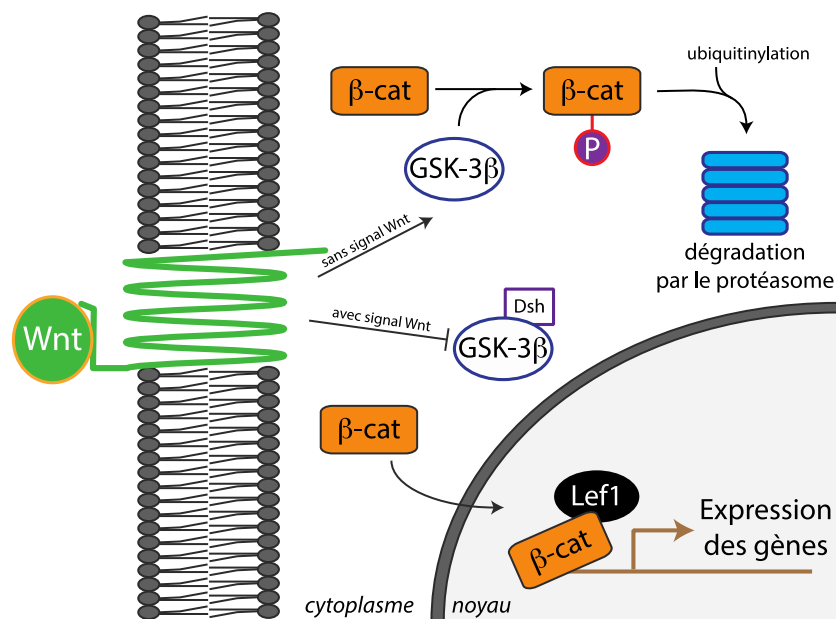
ii. La voie TGF-BMP :

Une autre voie de signalisation régulant la chondrogenèse est la voie TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) (Figure 23). L'activation du récepteur au TGF par le TGF- $\beta$  ou le BMP (Bone morphogenetic Protein), faisant partie de la superfamille des TGF, induit une cascade de phosphorylations des protéines SMAD activant, au final la transcription de gènes codant les constituants de la MEC comme les collagènes et l'agrécan. Il est important de noter que bien que les BMP et le TGF- $\beta$  permettent l'activation des SMAD, ces deux ligands n'induisent pas les mêmes expressions géniques (pour revue (B. Song, Estrada, and Lyons 2009)). En effet, les BMP induiraient des gènes favorisant la condensation du mésenchyme *via* les SMAD1 et 5, tandis que le TGF- $\beta$  induirait l'expression de Sox9 préalablement à l'étape de condensation, *via* SMAD3.

iii. La voie FGFs :

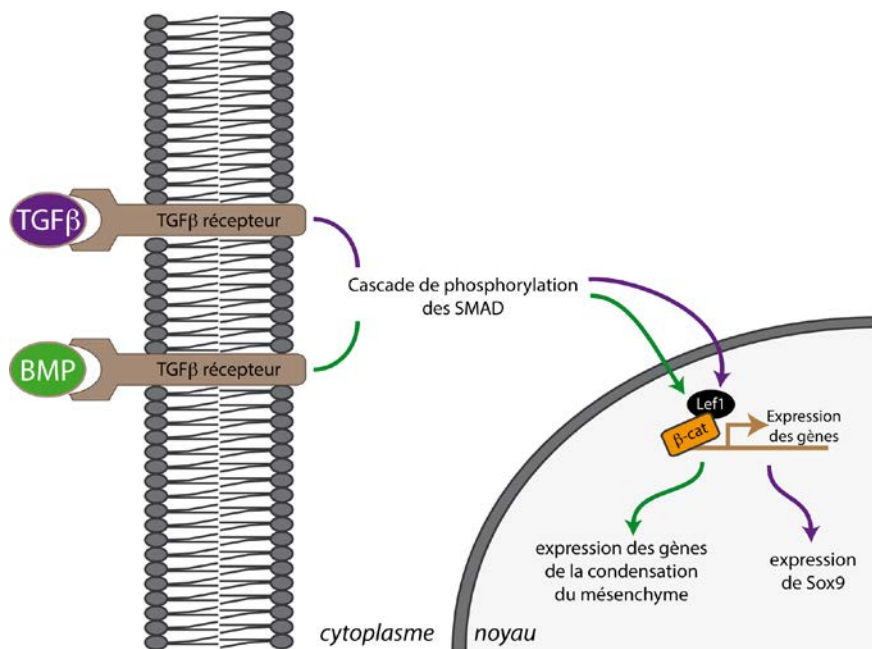
Une autre voie de signalisation cellulaire importante, dans la hiérarchisation des phénotypes chondrocytaires au sein de l'ébauche osseuse est la voie des FGF. Ainsi les cellules du périchondre sont capables de synthétiser le FGF18 (pour revue (Kronenberg 2003)). Ce ligand des récepteurs au FGF récepteur va induire des réponses différentes selon la localisation de la cellule réceptrice au sein de l'ébauche osseuse, celle-ci étant associée à un profil d'expression de récepteurs FGF variable (Figure 24). Des études d'inactivation de gène ont ainsi indiqué que FGF18 :

inhibe la prolifération des chondrocytes *via* le FGF récepteur 3,



**Figure 22 : La voie des Wnt est impliquée dans la régulation de la chondrogenèse.**

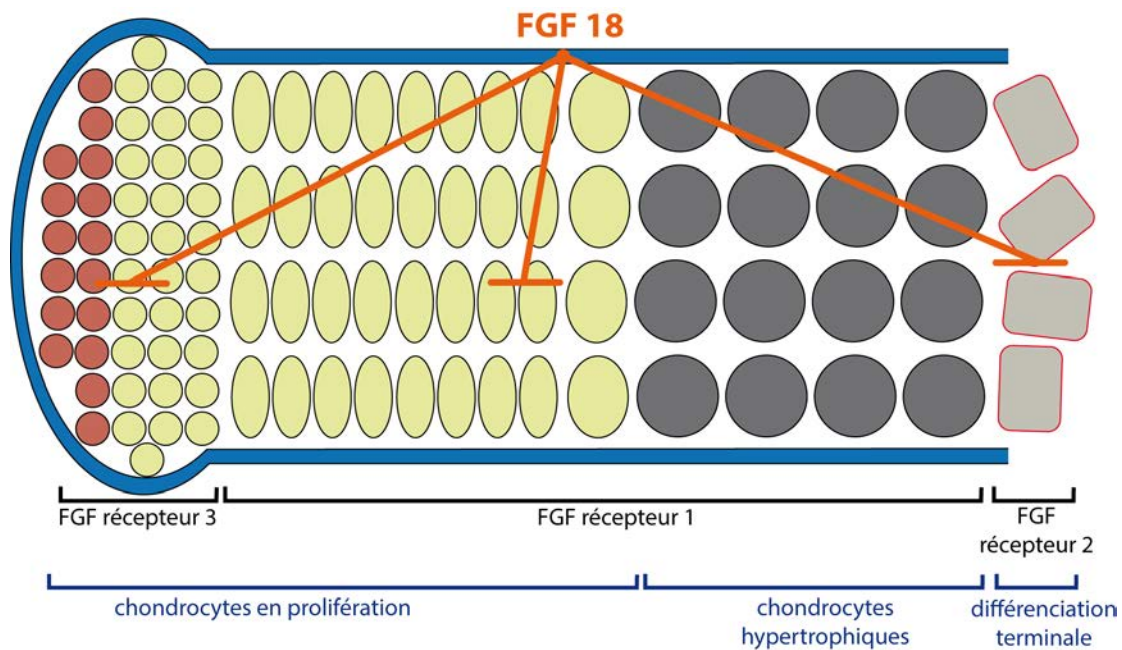
Représentation schématique de la régulation de la chondrogenèse par la voie de signalisation des Wnt, adapté de (DeLise, Fischer, et Tuan, 2000). L'effecteur terminal de cette voie au cours de la chondrogenèse est la  $\beta$ -caténine. Lorsque la cellule ne perçoit aucun signal Wnt, la protéine GSK-3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine induisant son ubiquitinylation au préalable de sa dégradation par le protéasome. Lorsque Wnt3A interagit avec son récepteur membranaire, le récepteur recrute un inhibiteur de GSK-3 $\beta$  et la  $\beta$ -caténine non phosphorylée n'est plus dégradée. Elle peut induire l'expression des gènes de la condensation des CSM.



**Figure 23 : La voie des TGFβ est impliquée dans la régulation de la chondrogenèse.**

Les récepteurs membranaires TGFβ stimulés par le TGFβ ou des BMP, induisent une cascade de phosphorylation des protéines SMAD, d'après (DeLise, Fischer, et Tuan, 2000). Cette voie conduit à la non phosphorylation des β-caténines qui une fois dans le noyau et en association avec son partenaire Lef1 induit l'expression de gènes de la chondrogenèse. Il semble que l'induction de cette voie par le TGFβ induise principalement l'expression de Sox9 tandis que les BMP induisent l'expression des protéines des jonctions cellulaires essentielles au cours de la condensation du mésenchyme axial.





**Figure 24 : La voie FGF est importante pour la segmentation de l'ébauche osseuse.**

Au cours de la biogenèse du membre inférieur, la voie des FGF permet la segmentation des phénotypes des chondrocytes au sein de l'ébauche osseuse (d'après (Kronenberg, 2003)). Le périchondre (en bleu) synthétise le FGF18 qui sera alors reconnu par différents récepteurs de FGF. Le signal perçu par les chondrocytes exprimant FGFr3 induira un ralentissement de la prolifération des chondrocytes. Le signal induit par les cellules arborant des FGFr1 sera de ralentir l'hypertrophie des chondrocytes proliférant. Les chondrocytes exposant le FGFr2 voient leur différenciation terminale ralentie.



retarde la minéralisation de la MEC des chondrocytes hypertrophiques *via* le FGF récepteur 1, bloque retarde la différenciation ostéoblastique *via* le FGF récepteur 2.

#### iv. La voie Ihh/PTHrP

Une autre voie importante pour la régulation de la prolifération des chondrocytes est la balance entre Ihh et PTHrP (pour revue (Kronenberg 2003), Figure 25). Ces hormones sont très importantes pour réguler la croissance de l'ébauche osseuse et pour la stratification des chondrocytaire le long de l'os en formation. Les chondrocytes de la zone péri-articulaire, ainsi que les cellules du périchondre sont capables de synthétiser le PTHrP. Une fois en interaction avec son récepteur transmembranaire, PTHrP bloque la prolifération des chondrocytes et inhibe leur capacité de synthèse d'Ihh. Seules les cellules trop éloignées des cellules productrices de PTHrP seront capables quant à elle de synthétiser de l'Ihh car elles deviennent hypertrophiques. L'expression de cette hormone aura plusieurs conséquences. Elle stimule la croissance des chondrocytes proliférants et agit sur les cellules du périchondre proche pour induire leur différenciation en ostéoblaste. Enfin l'Ihh est capable, par un mécanisme de rétrocontrôle positif, d'activer la synthèse de PTHrP pa les cellules de l'épiphyse osseuse.

#### v. Les voies PKA-PKC

L'activation des PKA (Protéine Kinase A) et PKC (Protéine Kinase C) ont aussi été présentées comme régulant chondrogenèse. Ainsi la PKA activée par de l'AMPC (Adénosine MonoPhosphate cyclique) induirait une voie de signalisation activant le facteur de transcription CREB qui favorise la synthèse de GAG *in vitro*.

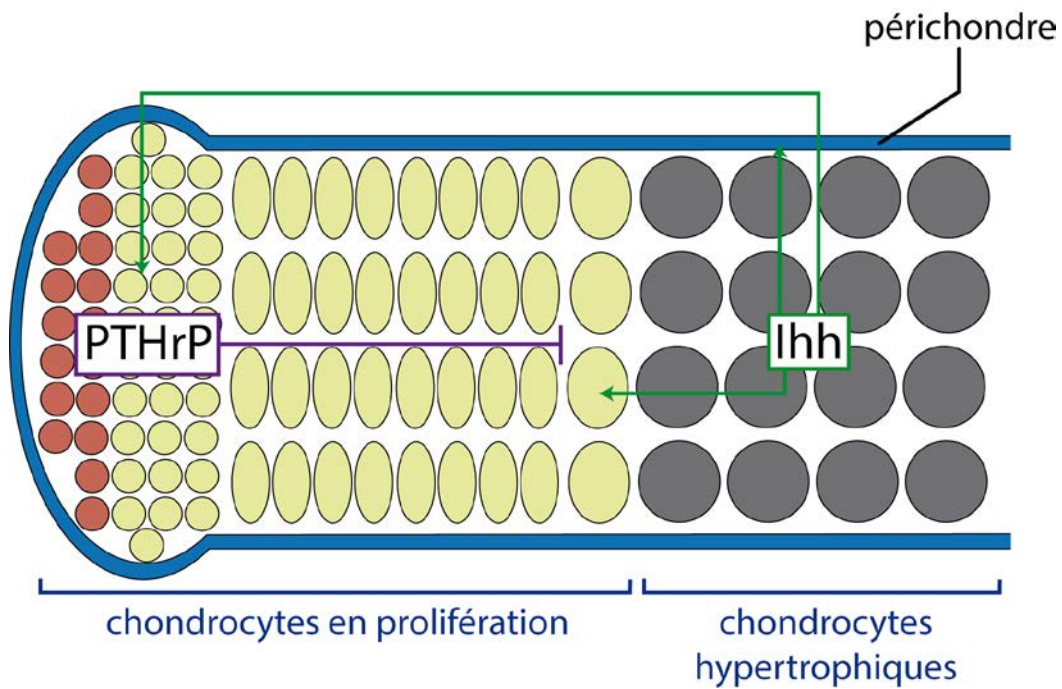
La PKC a été aussi beaucoup étudiée mais son nombre important d'isoformes, a conduit à des résultats contradictoires (pour revue (DeLise, Fischer, and Tuan 2000)). Ainsi certaines études indiquent que la PKC une activerait la chondrogenèse en favorisant la prolifération cellulaire *via* l'inhibition de la synthèse des protéines d'adhésions cellulaires (cadhérines et fibronectines); d'autres études sont, au contraire, en faveur de l'inhibition de la chondrogenèse par l'activation de PKC.

## 2. **Intercommunications de ces voies de signalisation**

Comme nous l'avons vu précédemment, la chondrogenèse est régulée par de multiples voies de signalisation. Toutes ces voies n'interviennent pas de manière indépendante et il faut considérer toutes ces régulations comme interconnectées.

Il a ainsi été montré que la voie des TGF-BMP régule la signalisation par les Wnt. En effet, une stimulation du chondrocyte par BMP2 favorise la condensation du mésenchyme par l'augmentation de l'expression de *Wnt3A* et l'inhibition de celle de *Wnt7A*. D'autre part





**Figure 25 : Régulation de la prolifération des chondrocytes.**

Représentation du contrôle de la régulation de la prolifération des chondrocytes au sein de l'ébauche osseuse (d'après (Kronenberg, 2003)). Les hormones PTHrP et Ihh sont antagonistes. L'hormone PTHrP a pour rôle de stopper le chondrocyte en état prolifératif. Elle est synthétisée par les cellules proches de l'articulation. Les cellules trop éloignées de ces cellules entrent en hypertrophie. Les cellules hypertrophiques synthétisent l'Ihh qui a des propriétés pro-prolifératives sur les chondrocytes de l'ébauche osseuse. De plus l'Ihh induit la différenciation en ostéocyte des cellules du périchondre. On observe un rétrocontrôle positif de l'Ihh sur les cellules productrices de PTHrP.



la stimulation par TGF- $\beta$  induit la phosphorylation de LEF-1 inactivant ainsi l'effecteur de la  $\beta$ -caténine, et donc la signalisation dépendante des Wnt.

Il a été également montré chez le poulet que la voie BMP interagit avec la voie de signalisation PKA (Y. S. Lee and Chuong 1997). Une stimulation des CSM par le BMP2 active la voie PKA et l'activation du facteur de transcription terminal CREB.

Une autre connexion inter-signalisation a été rapportée entre la voie Wnt et la voie PKC (Cook et al. 1996). Ainsi la phosphorylation de la kinase GS3K pourrait avoir lieu de manière non canonique grâce à l'activation d'une PKC.

Très récemment une étude a révélé un lien étroit entre la voie des TGF $\beta$ -BMP et l'activation d'une PKC sous l'influence de la concentration en glucose extracellulaire. L'activation d'une PKC induirait la synthèse du récepteur 2 au TGF à la surface du chondrocyte en différenciation (DeLise, Fischer, and Tuan 2000).

Enfin une autre connexion entre les voies FGF et Ihh/PTHrP a été rapportée par des expériences d'inactivation génique de FGFR3. Une stimulation par le FGF est capable d'inhiber la répression de la prolifération des chondrocytes en réprimant l'expression d'Ihh (DeLise, Fischer, and Tuan 2000).

## **B. Le cartilage articulaire**

Une articulation diarthrodale est constituée de plusieurs tissus différents : fibreux, synovial, osseux et cartilagineux. Au sein de celle-ci, le tissu cartilagineux est essentiel pour permettre un mouvement libre des os, dans la limite des degrés de liberté de l'articulation. Le cartilage, qui recouvre la surface des épiphyses osseuses facilite le glissement des os les uns par rapport aux autres et assure un mouvement fluide et sans douleur. Bien que l'épaisseur de ce tissu puisse varier entre les différentes zones anatomiques dans une même cavité articulaire, le cartilage possède de grandes capacités de résistance aux contraintes biomécaniques et permet donc d'amortir les lourdes charges et les charges exercées sur les jointures osseuses pour protéger l'os sous-chondral (pour revue (Buckwalter, Mankin, and Grodzinsky 2005)).

### **I. Composition du cartilage sain**

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hyalin constitué d'une matrice extracellulaire dense et de cellules chondrocytaires éparses. Ce tissu est dépourvu de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et d'innervations. Les chondrocytes ne représentent que 2 à 5 % de la masse totale du tissu cartilagineux.



Le cartilage possède une structuration très élaborée avec une matrice extracellulaire composée d'un enchevêtrement de macromolécules réticulées et d'un liquide tissulaire. Cet agencement est indispensable pour conférer au tissu ses propriétés de rigidité et de résilience face aux contraintes mécaniques.

### 1. Les macromolécules de structure

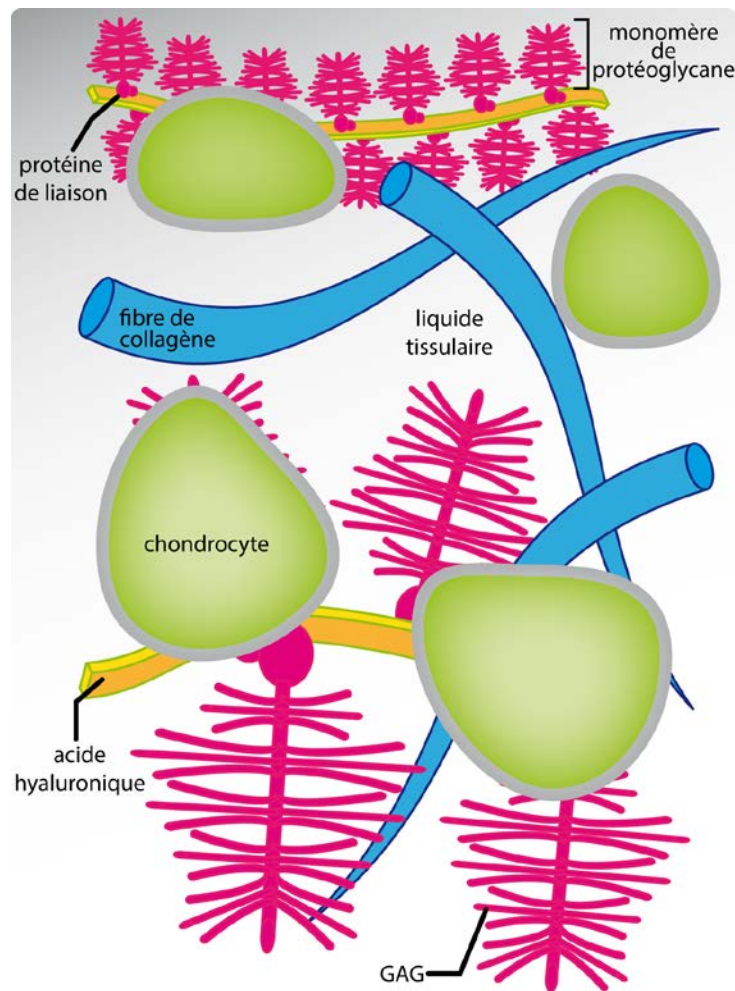
Les macromolécules de structure ne représentent que 20 à 40% du poids total du cartilage mais elles sont indispensables à son organisation réticulée. Parmi ces molécules on retrouve des protéoglycanes (~25%), des glycoprotéines non collagéniques (~15%) et des collagènes (~60%). Les collagènes sont distribués de façon homogène au sein de l'épaisseur du tissu cartilagineux mais sont particulièrement abondants au niveau de la couche superficielle (la plus proche de la cavité articulaire). Les collagènes s'organisent sous formes de fibres qui s'agencent en un maillage rigide résistant aux forces de tension. Les protéoglycanes sont emprisonnés dans ce maillage en interagissant de manière covalente avec les fibres de collagène ou encore avec les membranes cellulaires des chondrocytes (Figure 26).

#### i. Les collagènes du cartilage sain :

Le cartilage est constitué de plusieurs formes de collagène : ColII, ColVI, ColIX, ColXI. La forme majoritaire de collagène est sans conteste le ColII puisqu'il représente 95% du collagène exprimé dans la MEC. La MEC est organisée sous la forme d'un réseau de fibres de ColII avec lesquelles se lient covalamment des fibres de ColIX et de ColXI. Le ColVI est non fibreux. Ce collagène est utilisé pour recouvrir la surface des chondrocytes et faciliter les échanges entre la cellule et la MEC.

#### ii. Les protéoglycances et autres protéines :

Les protéoglycanes sont constitués d'un corps protéique lié à 1 ou plusieurs GAG. Les GAG correspondent à des chaînes carbonées formées par des répétitions de disaccharides sulfatés ou non. Chaque répétition expose vers la MEC une charge négative. Parmi ces GAG on retrouve l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane sulfate ou encore le dermatane sulfate. Le plus grand et le plus abondant des protéoglycanes (90% du total des protéoglycanes) est l'agrécan. L'agrécan est capable d'interagir avec d'autres GAG tel que l'acide hyaluronique pour former des agrégats *via* ses domaines G1 et G2. La formation de ces agrégats est propice à l'intégration des protéoglycane dans le réseau de collagènes. Les plus petits protéoglycanes ne participent pas à la formation des agrégats mais sont impliqués dans la stabilisation du réseau de collagène ou encore dans la communication entre la MEC et les chondrocytes. Par exemple la fibromoduline et la décorine sont capables de former des



**Figure 26 : Composition du cartilage articulaire.**

Représentation schématique des composants du cartilage, adapté de (Bhosale et Richardson, 2008). Les cellules chondrocytes différenciées (en vert) synthétisent les composants matriciels. La matrice extracellulaire est constituée d'un liquide tissulaire (en gris) et de macromolécules de structures : fibres de collagènes (en bleu), de protéoglycanes (acide hyaluronique, en jaune ; agrécans, arborescences roses) et de glycosaminoglycans (GAG, en rose).



liaisons covalentes avec le ColIII ou encore de lier des facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ .

D'autres protéines composent la MEC comme la fibronectine. Outre son rôle dans la formation des os longs, la fibronectine aurait pour rôle de faciliter l'agencement des fibres de collagène (Singh and Schwarzbauer 2012). La composition de la MEC en protéoglycanes est variable selon l'articulation considérée, l'âge du sujet, ou encore au cours des pathologies articulaires.

## 2. Le liquide tissulaire du cartilage

La matrice extracellulaire est constituée de 60 à 80% d'eau. Cette eau est indispensable au tissu cartilagineux puisqu'elle participe d'une part aux propriétés d'amortissement des contraintes biomécaniques et, d'autre part, au comblement des cavités formées par la réticulation du collagène et des protéoglycanes. De plus, cette eau est très importante car elle dissout les gaz, les petites protéines de la MEC, les métabolites, les cations, et permet la diffusion des nutriments par imbibition à partir du liquide synovial. Les charges positives du liquide tissulaire sont importantes pour neutraliser les charges négatives des GAG et maintenir l'eau au sein du tissu cartilagineux.

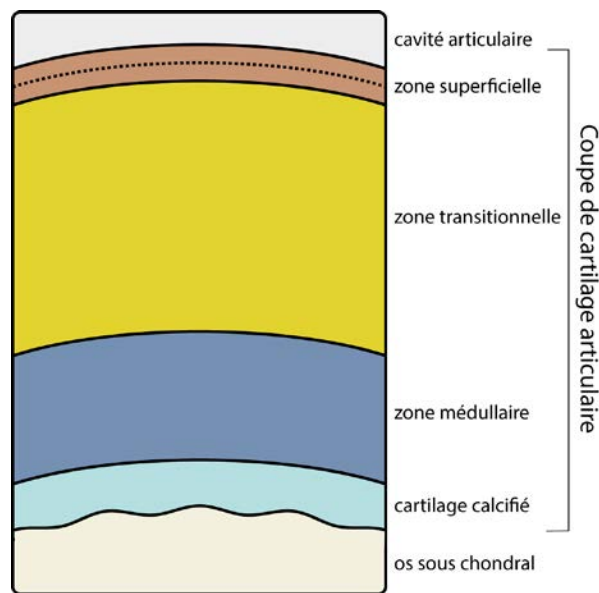
## II. Organisation du cartilage articulaire

Au sein d'un même cartilage la composition de la MEC ainsi que l'organisation, la concentration et le phénotype chondrocytaire peuvent varier. Ces variations sont observées selon un axe imaginaire que l'on pourrait tracer depuis le cartilage le plus proche de la cavité articulaire jusqu'à l'os sous-chondral.

### 1. Compartimentation de la MEC au sein du cartilage

Le cartilage peut se compartimenter en 4 zones (Figure 27).

La première zone, la plus proche de la cavité articulaire, est appelée zone superficielle. Cette zone est la plus fine et recouvre toute la surface articulaire. On peut subdiviser cette zone en deux couches, la plus superficielle étant très riche en fibres de collagènes, pauvre en protéoglycanes et dépourvue en chondrocytes. La couche la plus interne est, quant à elle, constituée des chondrocytes nécessaires à la synthèse des collagènes de la couche superficielle. Cette première zone est importante puisque sa forte concentration en collagène lui confère une grande rigidité. De plus elle représenterait une barrière efficace contre l'entrée de protéines de la synovie dans le cartilage.



**Figure 27 : Coupe de cartilage articulaire.**

Représentation schématique d'une coupe de cartilage articulaire sain, d'après (Buckwalter, Mankin, et Grodzinsky, 2005). En haut la cavité articulaire est représentée en gris et en bas l'os sous chondral est illustré en beige. Le cartilage est stratifié en zones bien distinctes en fonction du phénotype des chondrocytes qui composent chaque zone et donc de la nature de la matrice extracellulaire. La zone superficielle est enrichie en collagène et représente une barrière protectrice du cartilage. La zone transitionnelle est composée de chondrocytes dont le phénotype est proliférant. Au sein de la zone médullaire les chondrocytes sont hypertrophiques. Au sein de la zone calcifiée, la matrice cartilagineuse se minéralise et les chondrocyte entrent en différenciation terminale.



La zone sous-jacente est appelée zone transitionnelle et sa constitution est intermédiaire entre la zone superficielle et la zone médullaire.

Au sein de la zone médullaire les chondrocytes tendent vers un phénotype hypertrophique et s'alignent perpendiculairement à la surface du tissu articulaire. Les fibres de collagène s'épaississent et la concentration en protéoglycanes est augmentée. La concentration en eau est diminuée.

Enfin zone dite calcifiée recouvre l'os sous-chondral. Le volume des chondrocytes est fortement diminué et les activités métaboliques sont réduites. La MEC se minéralise.

## **2. Inclusion des chondrocytes dans la MEC**

Au sein même de l'organisation stratifiée du tissu cartilagineux, décrite ci-dessus, les chondrocytes sont intégrés dans le tissu par l'intermédiaire d'une superposition de trois réticulations matricielles différentes (Figure 28).

Le premier réseau matriciel est appelé matrice péricellulaire. Cette matrice recouvre directement la surface membranaire du chondrocyte. Elle est constituée de ColVI et de protéoglycanes.

Cette matrice est intégrée dans un second réseau appelé matrice territoriale. Cette matrice territoriale est fine et est constituée de fibres de collagènes qui s'enchevêtrent de la façon d'un maillage de filet de panier de basket. Cette seconde matrice est importante car elle absorbe les contraintes mécaniques subies par le tissu. Les chondrocytes sont protégés contre une déformation ou un écrasement.

Dans la zone médullaire les chondrocytes alignés sont proches les uns des autres. La matrice territoriale englobe alors les cellules alignées en colonnes.

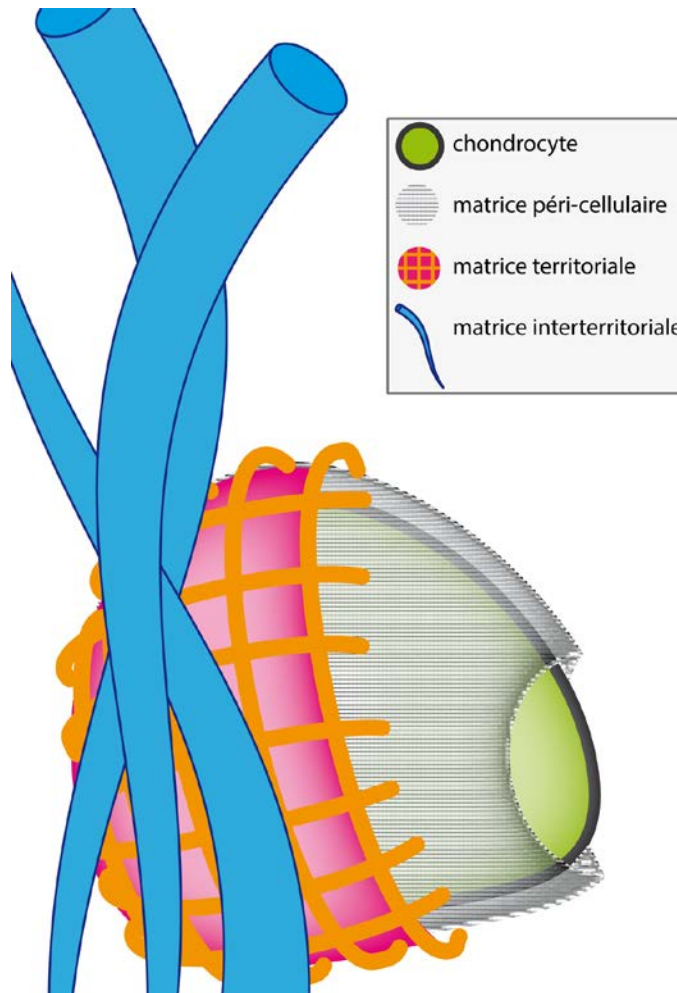
Enfin une matrice dite interterritoriale est constituée de fibres de collagènes perpendiculaires à la surface articulaire. Ces fibres interagissent avec les fibres de collagène des matrices territoriales.

## **III. Relation MEC/Chondrocyte**

La MEC joue un rôle de protection du chondrocyte contre les contraintes mécaniques. Elle participe ainsi au maintien de la forme cellulaire et du phénotype du chondrocyte.

La matrice contient des nutriments et des substrats nécessaires à la synthèse des composants matriciels, des molécules synthétisées au sein du chondrocyte puis excrétées (ex : des enzymes de dégradation de la MEC), des débris des composants de la MEC dégradée ou encore des molécules régulant les fonctions cellulaires (ex : cytokines, facteurs de croissance).





**Figure 28 : Intégration du chondrocyte dans la matrice extracellulaire.**

Le chondrocyte est recouvert d'une fine couche de matrice constituée de fibres de collagène ColVI : c'est la matrice péricellulaire. Cette matrice interagit avec les fibres de collagène, organisées en « filet », de la matrice territoriale. Cette seconde matrice s'intègre par interactions covalentes avec les grandes fibres de collagène de la matrice interterritoriale. Cet agencement offre une protection du chondrocyte face aux contraintes d'écrasement subies par le cartilage. D'après (Buckwalter, Mankin, et Grodzinsky, 2005).



L'accès de ces molécules de régulation au chondrocyte dépend de la concentration de ces molécules mais aussi de la composition locale de la MEC. En effet ces molécules elles-mêmes peuvent réguler la composition de la MEC :

- cas de l'IL1- $\beta$  : cette cytokine est capable d'induire la synthèse de métalloprotéases ou collagénases, dégradant les collagènes. De plus elle inhibe la synthèse des protéoglycanes est inhibée à un niveau transcriptionnel.
- cas du TGF- $\beta$  : ce facteur de croissance favorise la prolifération cellulaire et la synthèse des composants matriciels.

De plus, en fonction des stimuli auxquels elle est soumise, la cellule peut elle-même induire la synthèse de cytokines qui seront secrétées dans la MEC. Des communications auto/paracrine peuvent alors être mises en place.

Les contraintes mécaniques subies par la MEC peuvent aussi induire des signaux de régulation de la synthèse de la matrice. Ainsi, *in vitro*, une compression excessive continue ou un choc sévère peuvent conduire à la dégradation de la MEC en inhibant la synthèse de ColIII. Au contraire, la stimulation du cartilage par des compressions non traumatisantes et cycliques peut conduire à l'activation de la synthèse d'agrécan par le chondrocyte.

## **C. Perte de phénotype du chondrocyte et pathologies**

### **I. Homéostasie du cartilage**

#### **1. Régulation de l'homéostasie**

L'homéostasie du cartilage correspond au maintien d'un équilibre entre la dégradation de la MEC du cartilage et la synthèse de celle-ci. Cet équilibre est régi d'une part par l'environnement du tissu cartilagineux mais, surtout, par la régulation des voies de signalisations cellulaires au sein du chondrocyte différencié.

Ainsi, tous les tissus présents dans la cavité articulaire (tissu osseux, cartilage, membrane synoviale) participent à cette homéostasie (Chevalier, Eymard, and Richette 2013). Leur dégradation et/ou l'apparition d'une inflammation articulaire provoquent la synthèse de cytokines qui sont potentiellement capables de perturber le phénotype chondrocytaire différencié.

D'autre part, le chondrocyte lui-même est au cœur de cette homéostasie. Dans les conditions physiologiques il est capable d'équilibrer la synthèse des composants de la MEC avec celle



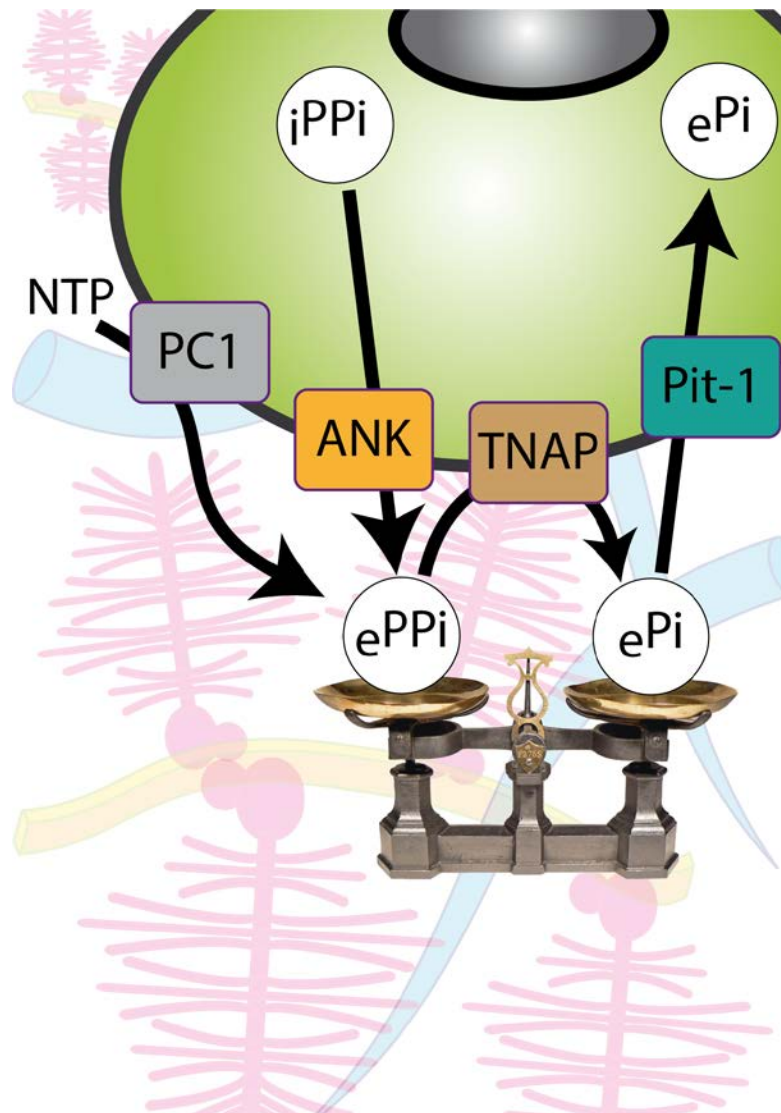
d'enzymes dégradant cette matrice, principalement des collagénases (famille des MMP [Matrix MetalloProteinase]) et des agrécanases (famille des ADAMTS [A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs]). Plusieurs mécanismes régulateurs permettent de maintenir cette homéostasie fonctionnelle. La régulation l'autophagie mais aussi du stress UPR (Unfolded Protein Response) doit être fine (Lotz and Caramés 2011). Il apparaît également que le maintien d'un niveau faible de production d'espèces réactives de l'oxygène contribue à cette homéostasie (Kurz et al. 2004). De plus, une étude récente a mis en évidence le rôle de l'horloge circadienne dans la régulation de gènes de la dégradation de la MEC (Gossan et al. 2013). En effet la perturbation de l'expression du facteur de transcription circadien PER2 (PERiod circadian homolog protein 2) provoque la modification du profil d'expression MMP14 (une enzyme transmembranaire impliquée dans le clivage de la pro-MMP13 en MMP13 mature (Koziol et al. 2012), et ADAMTS9, ainsi que de la protéine Gnl3 (Guanine nucleotide Binding Protein like-3), dont la fonction d'induction de la prolifération cellulaire pourrait altérer le phénotype différencié du chondrocyte.

## 2. La balance phosphate/pyrophosphate chondrocytaire

Au laboratoire, des travaux ont montré que l'équilibre entre les concentrations extracellulaires en phosphate (ePi) et pyrophosphate inorganiques (ePPi) est important pour le maintien du phénotype chondrocytaire différencié (Cailotto et al. 2010). Dans ce paragraphe je détaillerai les 4 acteurs principaux de cette balance, sujet d'une partie de mes travaux de thèse.

Quatre protéines transmembranaires sont responsables de la régulation de l'équilibre ePi/ePPi. Il s'agit de 2 transporteurs de phosphate et 2 protéines à activité phosphatasique (Figure 29). La protéine ANK (progressive ANKylosis protein homolog) participe au transport de PPi. Elle permet l'export de PPi intracellulaire vers la matrice extracellulaire. En 2000, le rôle physiopathologique de cette protéine a été mis en évidence mutagenèse au sein de souris transgéniques (Ho, Johnson, and Kingsley 2000). Ainsi, la protéine ANK mutée était alors incapable d'exporter le PPi, et favorisait l'apparition de dépôts calciques dans l'articulation. Cette accumulation de cristaux est déterminante dans l'apparition de pathologies articulaires inflammatoires que sont les chondrocalcinoses.

Le ePPi n'est pas uniquement exporté du chondrocyte vers la MEC mais peut être également produit par une enzyme à activité phosphatasique appelée PC-1, ou eNNP1 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1). Cette enzyme déphosphoryle les nucléotides libres présents dans le milieu extracellulaire, y compris le liquide synovial



**Figure 29 : La balance ePPi/ePi dans le chondrocyte.**

L'équilibre des phosphates dans le cartilage est régi par 4 acteurs protéiques transmembranaires principaux. Deux enzymes à activité phosphatase participent respectivement à la production de pyrophosphate (ePPi) extracellulaire (PC1) et à sa métabolisation (TNAP). Deux transporteurs régulent les concentrations intra et extracellulaires en pyrophosphate (ANK) et en phosphate (Pit-1). Cet équilibre est essentiel au maintien du phénotype différencié du chondrocyte.



(Mackenzie et al. 2012). L'inactivation de ce gène provoque le dépôt de cristaux calciques dans les tissus articulaires

Le troisième acteur de cette balance est une seconde enzyme à activité phosphatasique : TNAP (Tissue-Non-Specific Alkaline Phosphatase). TNAP déphosphoryle le ePPi pour produire de ePi et favorise la minéralisation de la matrice osseuse. L'inactivation de ce gène cause, chez la souris, des défauts de minéralisation des os et des anomalies du squelette (Narisawa, Fröhlander, and Millán 1997).

Enfin, un deuxième transporteur est chargé de l'import de ePi de la MEC vers le chondrocyte : Pit-1 (Phosphate inorganic Transporter). La protéine Pit-1 est importante pour le processus de chondrogenèse (Sugita et al. 2011), qui est un processus ATP-dépendant, pour lequel l'import chondrocytaire de ePi est indispensable à la synthèse des molécules d'ATP.

## **II. Arthrose**

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons plus particulièrement à la physiopathologie de l'arthrose. En effet la perte de phénotype différencié du chondrocyte est associée au développement de plusieurs types d'arthropathies et peut rendre compte de tout ou partie des modifications métaboliques et structurales du cartilage arthrosique. C'est dans ce contexte pathologique que nous porterons notre intérêt dans l'étude des miARN au cours de mes travaux de thèse. Nous aborderons successivement la définition de la maladie et son épidémiologie, puis nous nous intéresserons à ses conséquences biologiques en utilisant le genou comme articulation modèle.

### **1. Définition et épidémiologie de l'arthrose :**

#### **i. Définition**

L'arthrose est une maladie progressive des articulations synoviales. Selon la définition de l'OARSI (OsteoArthritis Research Society International) l'arthrose se déclare en réponse à l'incapacité des tissus à renouveler leur dégradation causée par un stress. Elle est initiée par la rupture de l'homéostasie de l'ensemble des tissus de l'articulation : le cartilage, l'os sous-chondral, les ligaments et muscles péri-articulaires et la membrane synoviale. Ces anomalies engendrent, au final, la dégradation du tissu cartilagineux et le remodelage de l'os sous chondral.



Les symptômes évocateurs de l'arthrose sont des douleurs articulaires, une rigidité progressive de l'articulation avec limitations de l'amplitude articulaire et des difficultés fonctionnelles locomotrices.

L'arthrose diminue la qualité de vie du patient en limitant ses possibilités de mouvements et le confine ainsi à ne réaliser que ses activités habituelles. De plus, la pathologie peut perturber l'humeur du sujet et accroître sa fatigue.

On distingue classiquement l'arthrose radiologique, au cours de laquelle les manifestations pathologiques sont généralement structurales et ne sont visibles que par radiographie, de l'arthrose dite symptomatique au cours de laquelle la douleur domine, sans relation directe avec la sévérité des lésions, et la qualité de vie est altérée.

L'espérance de vie ne cessant de croître, de plus en plus de personnes sont atteintes par l'arthrose. L'absence de traitements médicamenteux efficaces conduit les patients vers des soins non pharmacologiques, comme la physiothérapie ou la réadaptation fonctionnelle, avant de recouvrir, en dernier recours aux arthroplasties. L'arthrose est devenue un enjeu de santé publique international majeur.

#### ii. Les facteurs de risque

Les facteurs de risque de l'arthrose peuvent être classés en deux catégories: les facteurs de risque systémiques et les facteurs de risques biomécaniques intrinsèques (pour revue (Suri, Morgenroth, and Hunter 2012)). Parmi les facteurs de risque systémiques on retrouve :

- L'âge : l'arthrose apparaît volontiers chez le sujet âgé. Bien que la prévalence de l'arthrose augmente avec l'âge, une corrélation entre la progression de la maladie et l'âge du patient est encore discutée. Il semble de plus en plus évident que l'augmentation de la prévalence et de l'incidence de l'arthrose chez la personne âgée semble être la conséquence d'une augmentation de la multiplicité de facteurs risques liés à l'âge : diminution des défenses anti oxydantes ou encore diminution des forces musculaires.

- Le genre : c'est un facteur de risque à ne pas négliger. La prévalence à une arthrose radiologique et symptomatique est plus élevée chez les femmes que chez les hommes. Des études portant sur l'hypothèse que cette prévalence élevée chez les femmes pourrait être due à des modifications d'expression de facteurs hormonaux au cours de la ménopause, ont été réalisées. Une étude américaine portant sur la prévalence de la gonarthrose a mis en évidence des différences notables entre les femmes et les hommes (Boyan et al. 2013). L'analyse des récepteurs hormonaux chez les deux sexes révèle que les chondrocytes féminins comptent un nombre de copies de récepteur à l'œstrogène plus grand que les chondrocytes masculins.



Aussi, la réponse inflammatoire au cours de la gonarthrose semble plus importante chez la femme. Enfin la prévalence de la gonarthrose semble plus grande chez les femmes. Enfin il l'influence du sexe sur la prévalence de l'arthrose est difficilement appréciable compte tenu d'une part, de la localisation du cartilage pathologique (main, hanche genou) et d'autre part des différences anatomiques des cartilages (les cartilages féminins sont sensiblement plus fins et moins volumineux que ceux masculins) (pour revue (Neogi and Zhang 2013)).

- Les origines ethniques : de nombreuses analyses épidémiologiques ont été réalisées sur des cohortes de patients d'ethnies différentes. L'analyse de ces données a mis en évidence que la prévalence de l'arthrose variait en fonction des origines des populations ethniques étudiées. Par exemple une étude américaine montre que les Américains d'origine africaine ont une prévalence d'atteinte d'arthrose du genou plus élevée que les sujets américains blancs ou hispaniques. Aussi une étude a montré que les populations asiatiques étaient exposées à une prévalence plus forte d'arthrose de hanche que des populations occidentales (pour revue (Y. Zhang and Jordan 2010)).

- Le patrimoine génétique : le génotypage et notamment la détection de mutations du genre SNP (Single Nucleotide Polymorphism) a permis de mettre en évidence des gènes de prédisposition à l'arthrose (pour revues (Marc C. Hochberg et al. 2013; Reynard and Loughlin 2013)). Ces recherches ont été réalisées par des techniques d'études d'analyses (GWASs : Genome-Wide Association Studies) des génomes de populations de patients (Rotterdam, arcOGEN). L'analyse de ces cohortes a permis de mettre en évidence les polymorphismes génétiques au sein de populations de patients arthrosiques par comparaison avec des populations non atteintes de la maladie. Ainsi des SNP ont été identifiés au sein de gènes connus pour être impliqués dans le développement du cartilage et de l'os ont été identifiés (par exemple le gène *RUNX2*) mais aussi d'autres gènes non décrits comme tels (Tableaux 1 et 2).

Des études fonctionnelles visant à déterminer le lien entre ces mutations ponctuelles et leurs conséquences sur les voies signalisation cellulaire conduisant à l'arthrose ont été réalisées. A ce jour le rôle du gène *GDF-5* fait partie des plus étudiés et il a été montré que ce gène codant un facteur de croissance serait impliqué dans l'apparition de gonarthrose.

Enfin l'intégration de ces informations génétiques avec les autres facteurs de risques tels que le sexe du patient, son ethnicité et son cadre de vie, est indispensable. En effet les variations génétiques dépendent en grande partie de l'environnement du patient, et les prendre en





| Gène              | Polymorphisme génétique | Protéine                                    | Fonction du gène                                                    |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>GDF5</b>       | rs143383                | Growth differentiation Factor 5             | Régulateur de la croissance et de la différenciation cellulaire     |
| <b>SMAD3</b>      | rs12901499              | Mothers against decapentaplegic homologue 3 | Voie de signalisation cellulaire                                    |
| <b>ASPN</b>       | Triplet de codon Asp    | asporin                                     | Petit protéoglycane extra cellulaire riche en leucines              |
| <b>EDG2/LPAR1</b> | rs10980705              | lysophosphatidic acid receptor 1            | Récepteur à l'acide lysophosphatidique                              |
| <b>CALM1</b>      | rs12885713              | calmodulin                                  | Sous-unité d'une enzyme kinase                                      |
| <b>DIO2</b>       | rs225014/rs12885300     | Type II iodothyronine deionidase            | Catalyse de l'inactivation de l'hormone thyroïdienne                |
| <b>DIO3</b>       | rs945006                | Type III iodothyronine deionidase           | Catalyse de l'inactivation de l'hormone thyroïdienne                |
| <b>SREBF2</b>     | rs2228314               | Sterol Regulatory Element-Binding protein 2 | Facteur de transcription impliqué dans l'homéostasie du cholestérol |

**Tableau 1 : Exemples de gènes associés à l'arthrose.**

Les recherches de polymorphismes génétiques liés à l'arthrose ont permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs gènes chez l'Homme (d'après (Reynard et Loughlin, 2012)). Dans ce tableau sont regroupés les gènes présentant un polymorphisme dont l'association avec l'apparition de l'arthrose a été validée de manière fonctionnelle.



| Cohortes étudiées par GWASs | Polymorphisme SNP          | Gène impacté   | Protéine                                           | Fonction du gène                                                    |
|-----------------------------|----------------------------|----------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Rotterdam                   | rs3815148                  | <i>PRKAR2B</i> | PRotein Kinase-cAMP dependent-Regulatory type II-β | Régulateur de la voie de signalisation de l'AMPc                    |
|                             |                            | <i>HPB1</i>    | HMG-box transcription factor 1                     | Facteur de transcription                                            |
|                             |                            | <i>COG5</i>    | Component of Oligomeric Golgi complex 5            | Contrôle de la morphologie et de la fonction de l'appareil de Golgi |
|                             |                            | <i>GPR22</i>   | G PRotein-coupled Receptor 22                      | Récepteur membranaire                                               |
|                             |                            | <i>DUS4L</i>   | dihydrouridine synthase 4-like                     | Inconnue                                                            |
|                             |                            | <i>BCAP29</i>  | B-cell receptorassociated protein 29               | Inconnue                                                            |
| arcOGEN                     | rs6976                     | <i>STAB1</i>   | Stabilin-1                                         | Récepteur membranaire                                               |
|                             |                            | <i>NT5DC2</i>  | 5'-nucleotidase domain containing protein 2        | Inconnue                                                            |
|                             |                            | <i>PBRM1</i>   | Polybromo-1                                        | Régulation de la transcription par remodelage de la chromatine      |
|                             |                            | <i>GNL3</i>    | Guanine nucleotidebinding protein-like 3           | Protéine nucléaire régulant la prolifération des cellules souches   |
|                             |                            | <i>GLT8D1</i>  | Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 1  | Glycotransférase                                                    |
|                             |                            | <i>SPCS1</i>   | Signal peptidase complex subunit 1                 | Inconnue                                                            |
|                             |                            | <i>NEK4</i>    | Serine/threonine-protein kinase NEK4               | Kinase                                                              |
|                             |                            | <i>ITIH1</i>   | InTer-alpha-trypsin InHibitor heavy chain H1       | Inhibiteur plasmatique de protéase à sérine                         |
|                             |                            | <i>ITIH3</i>   | InTer-alpha-trypsin InHibitor heavy chain H3       | Inhibiteur plasmatique de protéase à sérine                         |
|                             |                            | <i>ITIH4</i>   | InTer-alpha-trypsin InHibitor heavy chain H4       | Inhibiteur plasmatique de protéase à sérine                         |
|                             |                            | <i>MUSTN1</i>  | MUSculoskeleTal embryonic Nuclear protein 1        | Protéine nucléaire exprimée lors de la squelettogénèse              |
|                             |                            | <i>TMEM110</i> | TransMEMbrane protein 110                          | inconnue                                                            |
|                             | rs12107036                 | <i>TP63</i>    | Tumor Protein 63                                   | Facteur de transcription                                            |
|                             | rs109482172                | <i>SUPT3H</i>  | Transcription initiation protein SPT3 homologue    | Inconnue                                                            |
|                             |                            | <i>RUNX2</i>   | RUNt-related transcription factor 2                | Facteur de transcription                                            |
|                             | rs9350591                  | <i>COL12A1</i> | COLagen α-1(XII) chain                             | Collagène                                                           |
|                             |                            | <i>COX7A2</i>  | Cytochrome C OXidase subunit 7A2, mitochondrial    | Polypeptide de la cytochrome C oxydase                              |
|                             |                            | <i>TMEM30A</i> | TransMEMbrane Protein 30A                          | transporteur transmembranaire                                       |
|                             |                            | <i>FILIP1</i>  | FILamin-A-Interacting Protein 1                    | Protéine d'interaction avec la filamine                             |
|                             |                            | <i>SEN6</i>    | SENtrin-specific Protease 6                        | Protéine ubiquitine-like                                            |
|                             |                            | <i>MYO6</i>    | MYOSin-VI                                          | Vésicule de transport                                               |
|                             |                            | <i>IMPG1</i>   | Interphotoreceptor Matrix pProteoGlycan 1          | Protéoglycane exprimé dans la rétine                                |
|                             | rs4836732                  | <i>PAPPA</i>   | PAPPAlysin-1                                       | Métalloprotéinase sécrétée                                          |
|                             |                            | <i>ASTN2</i>   | ASTrotactin-2                                      | Protéine impliquée dans la migration du tube neural                 |
|                             |                            | <i>TRIM32</i>  | E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32                 | Ubiquitination des protéines dans le système immunitaire inné       |
|                             | rs10492367                 | <i>KLHDC5</i>  | KeLcH Domain-Containing protein 5                  | Ubiquitination des protéines                                        |
|                             |                            | <i>PTHLH</i>   | ParaTHyroid Hormone related protein                | Hormone                                                             |
|                             | rs835487                   | <i>CHST11</i>  | CarboHydrate SulfoTransferase 11                   | Sulfatation de la chondroïtine                                      |
|                             | rs8044769                  | <i>FTO</i>     | α-ketoglutaratedependent dioxygenase FTO           | Inconnue                                                            |
| NYUHJD & POP                | rs419598, rs315952, rs9005 | <i>IL1RA</i>   | Interleukin 1 Receptor Antagonist                  | Récepteur régulant la réponse inflammatoire induite par l'IL-1      |

**Tableau 2 : Recherches de polymorphismes génétiques au sein de plusieurs cohortes.**

Ce tableau regroupe les SNP révélées par des analyses GWASs au sein des cohortes de patients Rotterdam (1341 OA vs 3496 non OA), arcOGEN (3177 OA vs 4894 non OA ; et 7410 OA vs 11009 non OA) et NYUHJD&POP (Attur et al., 2010). Adapté de (Hochberg et al., 2013 ; Reynard et Loughlin, 2012).



compte permettra d'affiner la compréhension de l'implication des gènes candidats dans la prédisposition à l'arthrose.

- L'obésité : le surpoids est un facteur de risque de l'arthrose très important. On estime que les personnes obèses ont 3 fois plus de risques de déclencher une arthrose que les personnes de poids normal. Il a été montré que l'obésité en plus d'augmenter la prévalence de l'arthrose, accélère la progression de la maladie. De plus une étude réalisée sur des patients âgés en surpoids et atteints gonarthrose symptomatique a montré qu'une perte de poids accompagnée d'une activité physique permettait de réduire considérablement la douleur ainsi que d'améliorer les mouvements articulaires du genou (Y. Zhang and Jordan 2010).

- Apport nutritionnel : l'influence de la prise de vitamines a été étudiée au sein de plusieurs cohortes. Une étude américaine a révélé que la vitamine C pourrait ralentir la progression de l'arthrose sans pour autant diminuer le taux d'incidence de la pathologie. De plus des études ont montré qu'un régime riche en sélénium pouvait être associé à l'augmentation des risques de développement de l'arthrose du genou (pour revue (Y. Zhang and Jordan 2010)).

D'autres facteurs de risques d'origine biomécaniques sont à prendre en compte :

- Les traumatismes articulaires : des études ont montré que le risque d'arthrose était augmenté de 4 fois pour un genou ayant subi une blessure accidentelle importante. De plus le suivi de patients ménisectomisés a permis de mettre en évidence une augmentation de plus du risque d'arthrose du genou. Une étude a montré que la moitié des patients ayant subi une ménisectomie sont sujets à une gonarthrose contrairement à des sujets indemnes dont seulement 7% développent une arthrose.

- Déséquilibre articulaire (pour revue (Felson 2013)) : le déséquilibre ou un mal-alignement d'une articulation a pour conséquence une hétérogénéité dans le support des charges par le tissu articulaire. Les zones cartilagineuses qui subissent les plus fortes contraintes mécaniques auront les plus fortes prédispositions à développer de l'arthrose. Une fois que l'arthrose déclarée, la dégradation du cartilage amplifie alors le mal-alignement de l'articulation qui amplifie à nouveau l'évolution de l'arthrose.

- Activités professionnelles répétées ou pratique du sport : les activités professionnelles impliquant le port de charges lourdes ou encore la réalisation de mouvements répétés en charge pourrait augmenter l'apparition d'arthrose.

De la même façon, la pratique de sport trop intensive pourrait augmenter les risques d'arthrose au niveau des articulations sollicitées en torsion. La prévalence de la gonarthrose est augmentée chez les coureurs de haut niveau ou encore les footballeurs professionnels par



comparaison avec une population de patients sédentaires. D'autres études ont montré que la pratique de sport modérée telle que la course à pied n'aurait aucune incidence sur l'apparition de gonarthrose.

### iii. L'arthrose en France

En France l'arthrose est un enjeu de santé publique très important. Selon les données d'une étude publiée en 2005 (Le Pen, Reygrobelle, and Gérentes 2005), l'arthrose touchait environ 10 millions de personnes soit une prévalence de 17%. Parmi cette population la moitié est atteinte d'une arthrose symptomatique. Cette étude portant sur la comparaison des coûts engendrés par le traitement de l'arthrose en France entre 1993 et 2003. Les auteurs ont montré que le coût des soins par patient augmente de 2,5% par an, pendant cette période, pour atteindre en 2002 une somme globale de 1,7 milliard d'euros, soit 1,7% des charges de la Sécurité Sociale. Même si l'évolution des dépenses de santé pour l'arthrose semblait maîtrisée, face aux enjeux démographiques de vieillissement de la population et l'explosion de facteurs de risques tels que l'obésité, les disciplines sociales, médicales et scientifiques sont les acteurs majeurs pour permettre un meilleur ajustement du poids économique et social de l'arthrose en France.

## 2. **Conséquences biologiques de l'arthrose**

L'arthrose se manifeste lorsque le chondrocyte perd son phénotype différencié. Au cours de cette dédifférenciation l'équilibre entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire est perdu au profit de la dégradation du cartilage. Nous nous intéresserons dans ce paragraphe aux conséquences biologiques de l'arthrose et nous verrons que ce processus est à l'origine d'une synergie de perturbations biologiques de tous les tissus articulaires. En effet, au cours de l'arthrose, la dégradation du cartilage s'accompagne d'une inflammation du tissu synovial, d'une modification structurale de l'os sous-chondral et de la croissance aberrante de pics ostéoïdes (ostéophytes) en périphérie des zones portantes (Figure 30).

### i. Inflammation de tissu synovial.

La membrane synoviale n'a pas de membrane basale et est constituée de deux types cellulaires : les synoviocytes de type B, de phénotype fibroblastique et résidents de ce tissu, et des synoviocytes de type A, de type macrophagique. Les fibroblastes synoviaux synthétisent certains composants spécifiques du liquide synovial comme l'acide hyaluronique et la lubriline. Les autres composants de ce liquide synovial sont issus d'un dialysat plasmatique. Ce liquide synovial permet une viscosité idéale pour la lubrification de l'articulation. Le tissu

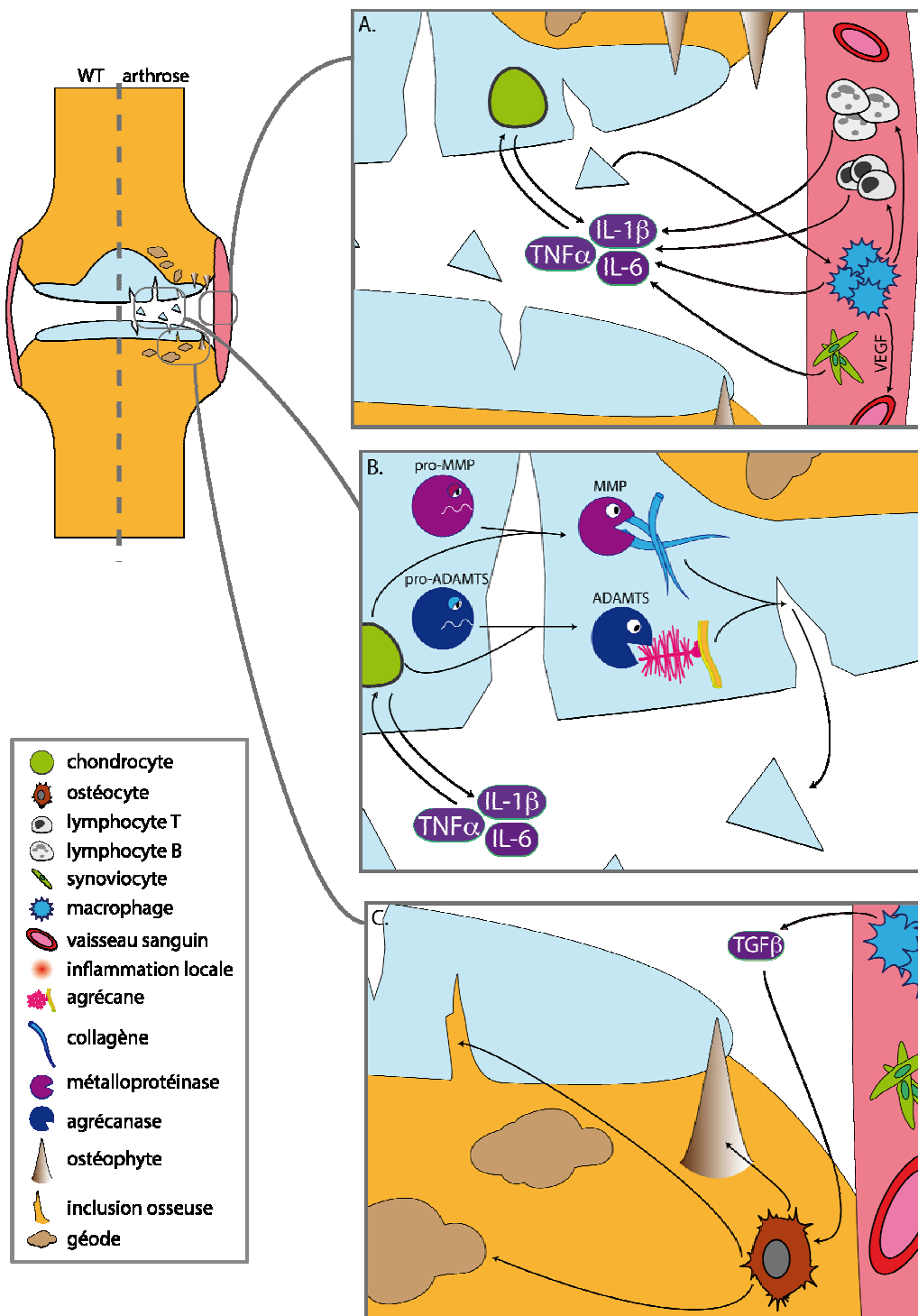


Figure 30 : Dégénérescence des tissus articulaires au cours de l'arthrose.

Au cours de l'arthrose tous les tissus de l'articulation sont altérés, d'après (Chevalier, Eymard, et Richette, 2013). La membrane synoviale est enflammée par le recrutement de macrophages et de cellules de l'immunité (**A.**). La vascularisation de ce tissu est augmentée et des cytokines sont produites. Ces cytokines activent la production d'enzymes cataboliques des composants de la matrice du cartilage (MMP et ADAMTS) (**B.**) : le cartilage est dégradé. Les macrophages synthétisent des TGFβ qui modifieront le phénotype des ostéocytes (**C.**) et induiront la nécrose de l'os (formation de géodes) ou encore la formation d'excroissances osseuses (ostéophytes et éburnation du cartilage).



synovial agit comme une membrane à la fois perméable aux protéines de faible masse moléculaire comme les cytokines et imperméable aux protéines de grande masse moléculaire comme la lubricine. Au cours de l'arthrose, les propriétés de cette membrane sont altérées et on peut observer une fuite des composants du liquide synovial et une diminution de sa viscosité. Bien que l'arthrose ne soit pas classée comme un rhumatisme inflammatoire, une inflammation locale du tissu synovial est fréquemment observée (Scanzello and Goldring 2012) (Figure 30A). En effet, au cours des stades précoces de l'arthrose, des produits de dégradation de l'agrécan ou des collagènes spécifiques sont libérés dans le liquide synovial. Ces produits sont reconnus par le système immunitaire inné qui active les macrophages de la membrane synoviale puis la synthèse de cytokines et chimiokines *via* l'activation de la voie des TLR (Toll Like Receptor) et de NFκB. De plus, les macrophages vont favoriser la néo-vascularisation par l'induction du facteur VEGF (Vascular endothelial Growth Factor) (de Lange-Brokaar et al. 2012). Les chimiokines (notamment l'IL-8 ou CCL5) vont recruter les lymphocytes dans le tissu synovial. Les cytokines (IL-1β, IL-6 et TNFα), synthétisées par les synoviocytes, les chondrocytes et les cellules du système immunitaire, vont induire la synthèse des enzymes cataboliques de la MEC : les MMPs et les ADAMTS. La synthèse des cytokines peut aussi être induite par la présence de cristaux de phosphate basique de calcium (BCP) ou de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD) ou encore par la production d'adipokines chez le sujet atteint d'obésité (Berenbaum 2013). Les cytokines vont également sensibiliser les terminaisons nerveuses présentes dans la membrane synoviale activant alors le ressenti des douleurs articulaires, ce qui n'est pas directement relié à la sévérité des modifications structurales tissulaires.

#### ii. Dégradation du cartilage

Les cytokines induites vont participer à la surexpression des collagénases et agrécanases (Troeberg and Nagase 2012) (Figure 30B).

L'agrécan et les protéoglycanes de masse moléculaire élevée sont les composants matriciels qui sont dégradés en premier. Leur dégradation entraîne la libération de GAG dans la MEC. Ces GAG libres peuvent interagir les uns avec les autres et modifier les propriétés de la MEC, comme par exemple l'accès aux cytokines par les chondrocytes par la diminution de la fixation des facteurs de croissance. Les agrécanes peuvent être clivés par les différentes protéases : cathepsines, MMPs et ADAMTS. Au cours de l'arthrose les ADAMTS4/5 sont les principales enzymes qui dégradent les agrécanes, d'où leur dénomination d'agrécanases.



Les collagènes sont ensuite dégradés par des protéases comme des cathepsine et des MMP. Le ColIII est dégradé principalement par MMP13, la métalloprotéase la plus abondante et douée de la plus forte activité catalytique vis-à-vis de ce collagène. Les MMPs peuvent être exprimées séquentiellement. C'est notamment le cas de MMP3 qui est activée plus tardivement que MMP13. Il existe également une cascade d'activation des pro-MMPs qui est initiée par des MMPs membranaires (MT-MMps dont MMP14).

D'autres enzymes dégradent les autres composants de la matrice. Les enzymes ADAM ou ADAMalysines sont ainsi capables de dégrader la fibronectine. L'expression des enzymes cataboliques décrites jusqu'à présent est elle-même activée par les fragments de dégradation de la fibronectine, ce qui favorise un « cercle vicieux » d'entretenir la dégradation matricielle.

L'expression de ces enzymes est régulée de manière transcriptionnelle par les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la réaction inflammatoire peut conduire à l'activation de facteurs de transcription tel que HIF2 (Hypoxia Induced Factor 2) ou ihh. Leur activation induit alors l'expression de RUNX2 (Husa, Liu-Bryan, and Terkeltaub 2010) qui est spécifique de l'activation des gènes favorisant l'hypertrophie du chondrocyte. Au cours de l'arthrose, RUNX2 induit la synthèse de MMP13 ou encore de facteur de vascularisation VEGF.

En plus de la réaction inflammatoire, les stimuli mécaniques peuvent induire la synthèse des collagénases puisque les contraintes biomécaniques excessives miment les effets cellulaires des cytokines pro-inflammatoires (Berenbaum 2013).

Des protéases peuvent aussi induire la dégradation de la MEC en participant à la synthèse des MMP et des ADAMTS : les enzymes Matriptase et PACE4 respectivement. Ces protéases clivent les pro-MMP et pro-ADAMTS, protéines précurseurs des MMP et ADAMTS.

Les protéoglycanes transmembranaires peuvent aussi activer les agrécanases (Troeberg and Nagase 2012). C'est le cas, par exemple, du Syndécan IV qui par interaction avec son domaine extracellulaire active ADAMTS5.

Enfin, d'autres protéines transmembranaires peuvent réguler la dégradation des collagènes. C'est le cas du récepteur DDR (Discoïdin Domain Receptor). Lorsque ce récepteur interagit avec des fragments de collagène 2, une cascade de signalisation cellulaire active la synthèse de MMP. Ce système de régulation intervient à un stade avancé de l'arthrose puisque dans le cartilage sain aucun ColIII n'est présent dans la matrice péri-cellulaire. L'interaction entre le ColIII et le récepteur DDR n'est donc possible que lorsque la matrice péri-cellulaire est dégradée et/ou que des fragments de la dégradation du collagène 2 ont été libérés.





iii. Remodelage de l'os sous-chondral

Les macrophages activés vont produire également du TGF $\beta$ . Ce facteur de croissance va être capté par les récepteurs membranaires exprimés par les chondrocytes et les ostéoblastes de l'os sous-chondral. Lorsque la dégradation du cartilage est débutée, la structure de l'os sous-chondral est réarrangée (Figure 30C). On observe alors l'apparition de nécroses osseuses locales induites par l'obstruction de vaisseaux de la moelle osseuse favorisant une ischémie du tissu. Des cavités osseuses ou géodes vont se former dans l'os sous-chondral.

De plus des croissances osseuses apparaissent depuis l'os sous-chondral vers la zone calcifiée. Ces insertions sont de nature fibro-vasculaire. Ces pics de croissance vont s'ossifier au fur et à mesure de l'avancée de la pathologie. Dans les cas les plus graves, ces pénétrations osseuses peuvent atteindre la couche superficielle du cartilage, on parle de phénomène d'éburnation du cartilage (Wieland et al. 2005).

La formation d'ostéophytes est aussi observée. Induite par le TGF $\beta$ , l'os produit des excroissances localisées dans des zones articulaires de supportant pas de charge pendant la mobilité articulaire. L'origine et le rôle physiopathologique des ostéophytes sont encore discutés. Favorisent-ils l'induction de la dégradation du cartilage ? Stabilisent-ils l'articulation lésée ? Jouent-ils un rôle dans l'accentuation de la douleur par contact avec la membrane synoviale ?

### 3. Pistes de traitements de l'arthrose

Les traitements de l'arthrose actuels sont, pour la plupart, des soins palliatifs visant à soulager la douleur des patients atteints d'arthrose, et le plus généralement, réalisés par des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Cependant ces soins analgésiques n'ont aucun effet sur la régulation de la progression de la maladie. Aussi, dans les cas d'atteintes les plus sévères le cartilage endommagé peut être remplacé chirurgicalement par une prothèse articulaire (pour revue (M.C. Hochberg 2012)).

Dans le cas des sujets arthrosiques obèses, la perte de poids, par un régime très pauvre en calorie ou par la chirurgie (by-pass), est une première étape dans le traitement des arthroses symptomatiques. La perte de poids s'accompagne en général d'une diminution des douleurs articulaires. Le recours à des traitements non médicamenteux a aussi été étudié, comme la prise de compléments alimentaires de composés sulfatés (chondroïtine sulfate, ou glucosamine sulfate). Les résultats montrent une diminution de la douleur chez les patients souffrant d'une arthrose modérée, mais aucun effet chez les patients atteints d'arthrose sévère. Des infiltrations intra-articulaires d'acide hyaluronique ont aussi été réalisées, mais leur



efficacité à long terme est encore discutée. Face à cet écueil plusieurs pistes de traitements sont à l'étude.

i. Un traitement pharmacologique

Cette perspective de recherche vise élaborer des molécules ayant à la fois des caractéristiques chondroprotectrices et capables de réguler la progression de la maladie : on parlera alors de molécules appelées DMOADs (Disease-Modifying OA Drugs) (pour revues (Hunter 2011; Mastbergen, Saris, and Lafeber 2013)). La mise en place de telle stratégie thérapeutique doit prendre en compte plusieurs obstacles. Tout d'abord la définition stricte clinique de l'arthrose est difficile à déterminer. En effet cette pathologie induite par des facteurs de risques différents, énumérés précédemment, rend difficile la recherche d'un consensus de biomarqueurs témoignant de l'atteinte de la pathologie. Une autre difficulté majeure dans le développement des DMOADs est le manque de modèles d'étude préclinique. Il semble très compliqué de reproduire un modèle d'arthrose dont le déclenchement et la progression suive parfaitement l'arthrose chez l'Homme. De plus le suivi de la progression de la pathologie est un enjeu important. Les techniques d'imageries comme l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) sont de plus en plus utilisées et développées pour suivre l'évolution de la taille de l'espace intra-articulaire. Enfin une autre difficulté importante quant à l'utilisation de ce type de thérapie est le fait que les DMOADs sont corriger les voies métaboliques défaillantes au cours de l'arthrose mais n'ont aucun effet sur les troubles mécaniques comme le mal-alignement articulaire responsable de la maladie elle-même. A ce jour plusieurs molécules DMOADs sont étudiées en essais cliniques : la calcitonine (réduction de la dégradation de l'os sous chondral), la BMP7 (induction de l'anabolisme du cartilage arthrosique), des inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase (diminution du stress oxydant dans le cartilage arthrosique), la vitamine D (ralentissement de la progression de l'arthrose), un hydrolysat de collagène (augmentation du confort articulaire), le FGF18 (induction de l'anabolisme dans le cartilage arthrosique), des extraits de noyaux d'avocat (induction de l'anabolisme et inhibition du catabolisme du cartilage arthrosique), le ranélate de strontium (remodelage du cartilage par le ralentissement de la dégradation de l'os sous chondral) ou encore des inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$  ou de MMP. Ces deux dernières pistes semblent ne pas aboutir. En effet les inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$  possèderaient une trop grande toxicité. Enfin aucun inhibiteur de MMP, dont l'affinité pour la MMP cible soit assez grande pour être efficace, n'a encore été découvert.



ii. La thérapie cellulaire

Cette piste de recherche clinique consiste en la réparation du cartilage arthrosique dégradé par l'implantation autologue de chondrocytes sains dans ce cartilage.

En 1994, des chondrocytes non arthrosiques de patients atteints d'arthrose localisée du genou ont été extraits et cultivés et multipliés en laboratoire avant d'être réimplantés chez le patient au niveau des zones cartilagineuses lésées. Depuis cette technique n'a cessé d'évoluer tant d'un point de vue prise en charge chirurgicale (réduction du caractère invasif de l'intervention) que d'un point de vue préparation et conditionnement des chondrocytes à réimplanter. Ainsi avec le développement des connaissances et techniques de culture cellulaire, les chondrocytes à réimplanter sont mieux caractérisés afin d'optimiser les chances de réussite de l'implantation des cellules. Les nouvelles générations de thérapies cellulaires seront réalisées au cours d'un seul acte chirurgical et les cellules réimplantées seront constituées de chondrocytes différenciés et de cellules souches chondrogéniques cultivées au sein d'un biomatériau tridimensionnel adapté.

iii. Réadaptation fonctionnelle de l'articulation

Ce type de thérapie consiste en la correction du mal-alignement de l'articulation. Cette méthode est réalisée par voie chirurgicale et consiste à l'utilisation de fixateurs externes fixés au sein des os fémoral et tibial permettant de réaligner les os de l'articulation du genou. L'articulation est ainsi bloquée pendant deux à trois mois et est soulagée de toute charge.

Ces trois approches thérapeutiques ne doivent pas être considérées comme isolées. Au contraire leur développement se focalise sur une meilleure appréciation du type et du stade de l'arthrose du patient afin d'adapter le traitement du patient en combinant au mieux ces différentes approches.



## Chapitre 3 : Rôles des miARN dans la régulation génique du chondrocyte : vers de nouveaux biomarqueurs de l'état physiologique du cartilage ?

L'arthrose est un problème de santé publique mondial majeur. Il est devenu indispensable de pouvoir caractériser les causes et les conséquences biologiques de cette pathologie pour définir un diagnostic précis. De plus l'établissement d'un pronostic de l'avancée de la maladie est indispensable afin de prévoir un traitement potentiel et d'apprécier l'efficacité de ce traitement. C'est pourquoi de nombreuses recherches sont mises en œuvre afin de déterminer la signature biologique de l'arthrose au travers de la recherche de marqueurs biologiques fiables. Ces biomarqueurs se doivent de refléter une vue globale des variations dynamiques et quantitatives des altérations de l'articulation au cours de l'arthrose.

Avec l'explosion de la recherche de ces dernières années sur les miARN, de nombreux cribles de variations de profils d'expression de gènes codant les miARN ont été réalisés. Ces cribles ont mis en évidence l'implication potentielle de certains miARN dans les pathologies étudiées et l'arthrose ne déroge pas à la règle ((Shang, Liu, and Zhou 2013; McAlinden et al. 2013). Ces régulateurs de l'expression génique semblent être des candidats potentiels dans cette quête difficile de biomarqueurs efficaces et spécifiques de l'arthrose.

Dans ce chapitre nous aborderons dans un premier temps les biomarqueurs utilisés aujourd'hui pour la prospection de la pathologie arthrosique et nous discuterons de leurs limites. Dans une deuxième partie nous parlerons des miARN impliqués dans la régulation de l'expression des gènes au cours de l'arthrose et discuterons de leur fonction au cours de la perte de phénotype différencié du chondrocyte.

### **A. Les biomarqueurs de l'arthrose**

Les biomarqueurs de l'arthrose sont utilisés pour évaluer la sévérité et l'étendue d'une pathologie parmi une ou plusieurs articulations. Ils sont utilisés pour réaliser un diagnostic et surtout leur importance réside dans leur fiabilité afin d'établir des pronostiques fiables sur l'état de progression de la pathologie et sa progression.



La caractérisation de biomarqueurs d'une pathologie est une discipline délicate, d'autant plus que dans le cas de l'arthrose, plusieurs tissus sont atteints. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le cartilage, le tissu synovial mais aussi l'os sous chondral sont altérés et lésés au cours de la pathologie. La physiologie de chacun de ces tissus est donc à considérer afin de sélectionner des molécules biologiques très spécifiques de la pathologie. Il ne faudrait pas biaiser l'analyse en utilisant une molécule impliquée dans la prévalence d'autres pathologies (ex : les protéines de l'inflammation). De plus il est important de garder à l'esprit que l'expression de ces biomarqueurs est soumise à plusieurs variables telles que l'âge du patient, son sexe, son indice de masse corporelle, la survenue de la ménopause, son activité physique ou encore l'horloge circadienne. Une autre condition importante est la « zone d'échantillonnage » dans laquelle le biomarqueur est mesuré. La qualité d'un biomarqueur sera accrue s'il est facilement mesurable. Dans le cas de l'arthrose les tissus cartilagineux relarguent de nombreuses molécules candidates dans le liquide synovial. Cependant la réalisation de ponctions synoviales est un procédé invasif et non compatible avec des tests cliniques de routine. C'est pourquoi les études se concentrent sur la détection de biomarqueurs spécifiques de l'arthrose présents dans les fluides urinaire ou encore dans le sérum sanguin, et cela malgré une plus grande dilution des molécules candidates. Nous verrons que les biomarqueurs utilisés jusqu'à présent peuvent être efficaces mais possèdent leurs limites. Souvent le concours de la détection de plusieurs biomarqueurs permet de réaliser un diagnostic plus précis.

### **I. L'imagerie médicale, support de l'identification des biomarqueurs**

L'imagerie médicale est très employée pour visualiser l'atteinte de l'arthrose (Braun and Gold 2012). Plusieurs techniques d'imageries sont utilisées à commencer par la radiographie aux rayons X. Cette technique est la plus accessible mais n'est pas la plus résolutive. Elle permet d'apprécier le rétrécissement de la cavité articulaire et la présence de troubles osseux comme les ostéophytes. L'utilisation de l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) a permis d'obtenir de meilleures images plus accrues en précision. Le cartilage est très nettement observable contrairement à l'utilisation des rayons X. L'IRM permet de plus la reconstitution de l'articulation en 3 dimensions et l'intégrité du cartilage et son épaisseur sont quantifiables. L'état d'avancement de l'arthrose peut être évalué par l'utilisation de produits de contraste spécifiques des composants matriciels (ex : le sodium permet d'évaluer la présence de GAG dans le cartilage). Enfin le perfectionnement des techniques d'échographie, peu coûteuses,



permet d'avoir des images dynamiques en temps réel. La combinaison de plusieurs de ces techniques permet d'obtenir une meilleure compréhension et une meilleure estimation de l'atteinte articulaire.

## **II. Les biomarqueurs collagéniques**

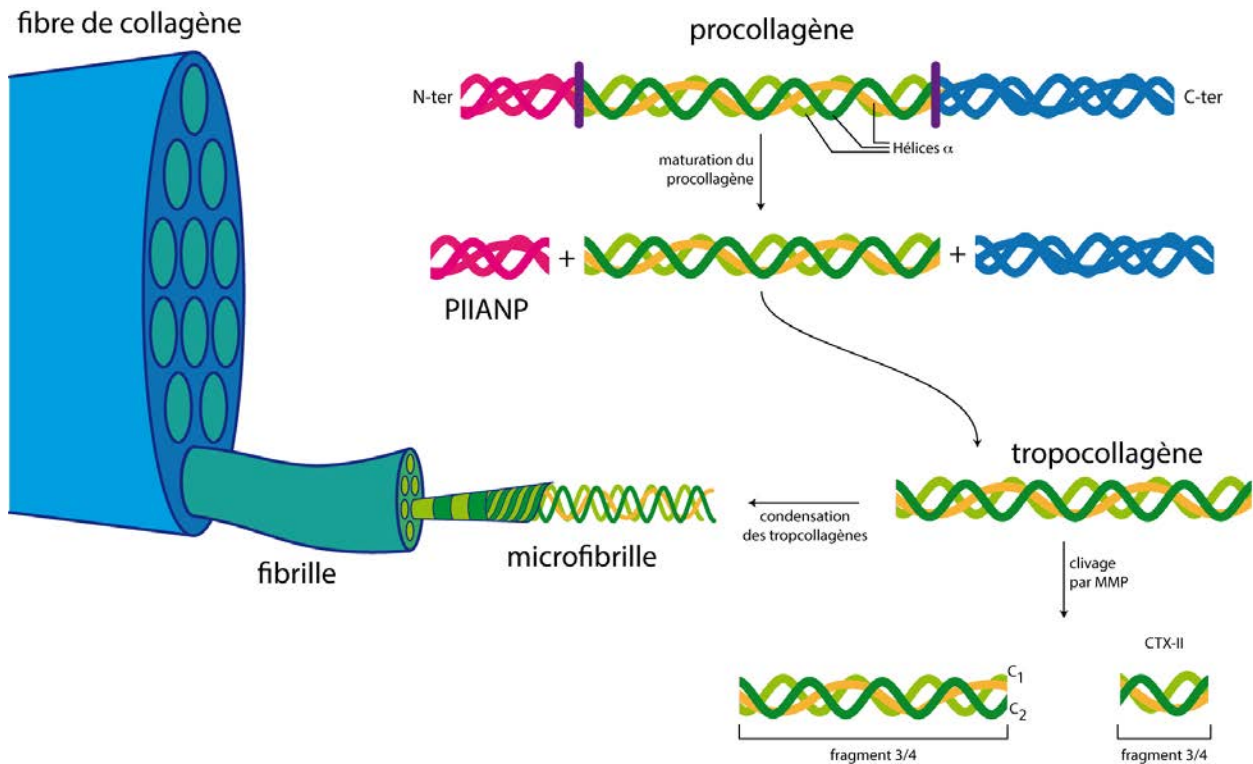
Les fibres de collagènes sont constituées d'une condensation de fibrilles (Figure 31). Ces fibrilles résultent de l'interaction de microfibrilles, elles-mêmes issues de la condensation de tropocollagènes. Dans la cellule, 3 polypeptides structurés en hélices  $\alpha$  s'assemblent par des liaisons hydrogène pour former une hélice droite : le procollagène. Ce peptide précurseur est sécrété hors de la cellule et ces deux extrémités sont clivées par des protéases. Le tropocollagène est libéré de son extrémité N-terminale, un peptide de 15 kDa, et de son extrémité C-terminale, un peptide de 30 kDa. Ce premier peptide de 15 kDa est appelé PIIANP et est utilisé comme biomarqueur.

Le collagène est dégradé par des métalloprotéases. Ces enzymes clivent les fibres de collagènes et lysant les tropocollagènes en deux morceaux de tailles différentes (3/4, 1/4). Ces deux fragments libérés sont étudiés comme des biomarqueurs potentiels de l'arthrose.

Ces biomarqueurs sont détectés par des tests immunologiques à partir de prélèvements urinaires ou sérologiques.

Des premières études réalisées *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'importance du produit de digestion du procollagène, le PIIANP pour revue (Henrotin et al. 2007). Ces travaux ont montré que la synthèse de collagène entraînait le relargage de peptides PIIANP dans le milieu de culture d'explant de cartilage bovin. Cependant la quantification de ce peptide est à considérer avec attention car elle témoigne tout aussi bien de l'augmentation de la maturation des procollagènes en tropocollagène, que de l'augmentation de la synthèse de collagène.

Un autre biomarqueur collagénique est le produit de dégradation du collagène CTX-II. Ce biomarqueur est actuellement le plus utilisé. Ce peptide arbore un site épitope reconnu par un anticorps spécifique. *In vitro* des études ont montré que par induction à l'IL-1 $\beta$ , les MMP induites dans le cartilage augmentaient la présence de CTXII (pour revue (Rousseau and Garner 2012)). Au contraire l'inhibition des MMP par leurs inhibiteurs spécifiques TIMPs (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase) engendrait la diminution de la dégradation des collagènes et de la présence du biomarqueur CTXII. En routine, la détection de CTXII dans les urines est corrélée avec l'apparition d'arthrose dite radiographique. Cependant la sécrétion



**Figure 31 : Synthèse et dégradation des fibres de collagène.**

Représentation schématique des fibres de collagène. La synthèse comme la dégradation du collagène produisent des fragments peptidiques qui sont des biomarqueurs potentiels de l'arthrose. Au cours de la maturation du procollagène, l'extrémité N-terminale du collagène est clivée libérant le peptide de 15 kDa PIIANP. La fibre de collagène est dégradée par des enzymes protéolytiques MMP. Ces MMP clivent chaque collagène de la fibre en deux fragments distincts : un fragment 3/4 et un fragment 1/4. Le fragment 3/4 arbore de sites épitopes C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> utilisés comme biomarqueur. Le fragment 1/4 est appelé CTX-II et est le biomarqueur le plus étudié et utilisé.





de CTXII n'est pas seulement causée par la dégradation des collagènes du cartilage au cours de l'arthrose. En effet l'activité des ostéoclastes de l'os sous chondral produit des CTXII. La provenance de ce peptide est donc double et pourrait perturber le signal obtenu par la détection de ce biomarqueur.

Ce biomarqueur est aussi détecté par un second anticorps. On parle alors de biomarqueur Col2CTX. Ce peptide est détecté dans les urines et sa quantification reflète bien la survenue de la dégradation du cartilage ainsi que le remodelage du cartilage minéralisé. Cependant ce biomarqueur est inefficace pour établir le suivi de la progression de l'arthrose chez des patients femmes atteintes d'obésité (pour revue (Rousseau and Garnero 2012)).

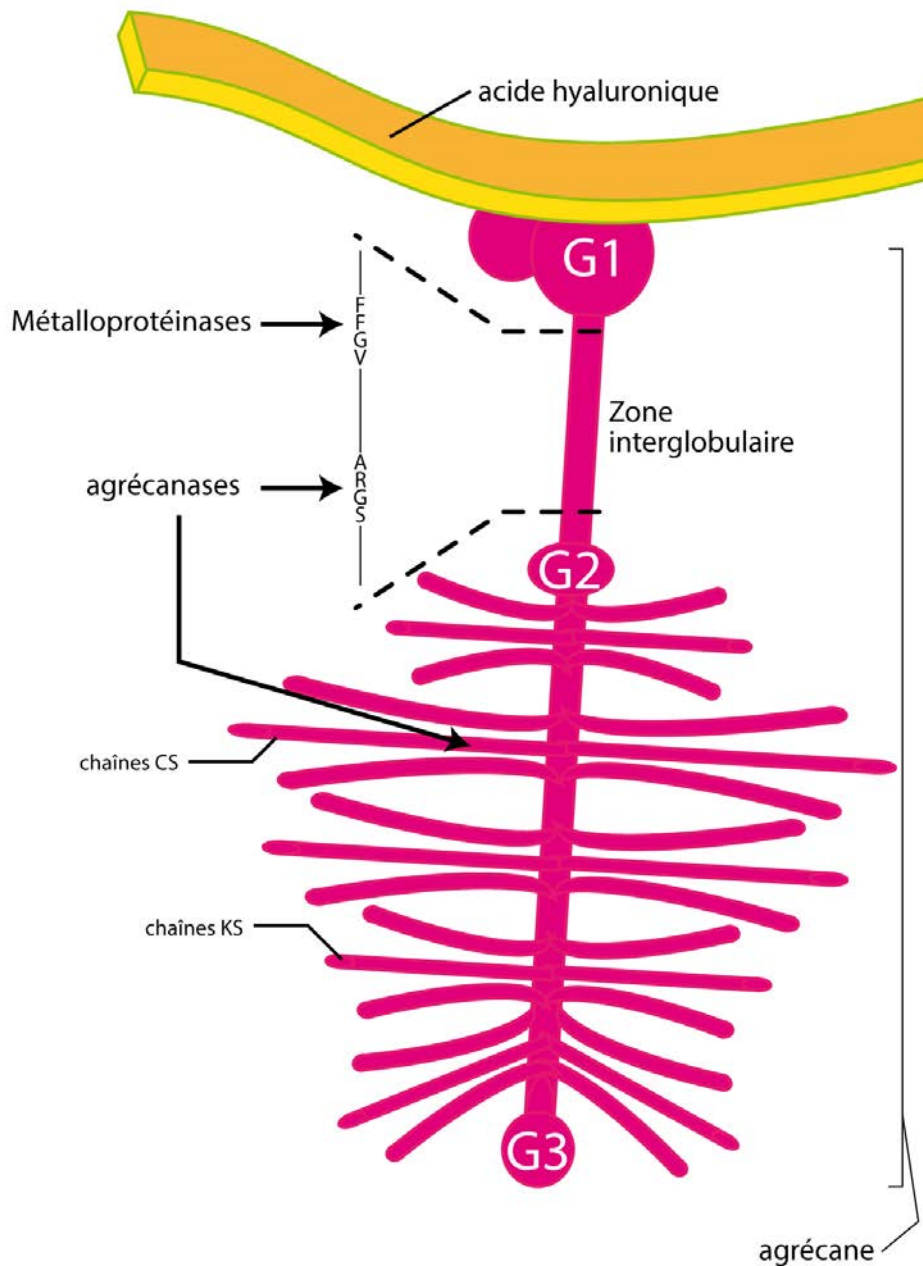
D'autres biomarqueurs collagéniques sont étudiés. Des néo-épitopes produits par le clivage de tropocollagènes sont à l'étude. En effet lors du clivage des collagènes par les MMP, les extrémités C-terminales des chaînes polypeptidiques 1 et 2 du fragment 3/4 sont reconnues par des anticorps spécifiques. On parle d'épitopes C<sub>2</sub> ou C<sub>1-2</sub>C.

Un autre candidat biomarqueur collagénique a été mis en évidence (Nemirovskiy et al. 2007). Ces chercheurs ont mis en évidence que le produit de dégradation de MMP13 était un peptide 45mer, le plus abondant dans les liquides synoviaux et urinaires. Ce néo-épitope serait efficace pour suivre l'activité des MMP au cours de l'arthrose.

Au cours de l'arthrose des médiateurs de la réponse inflammatoire sont synthétisés. Parmi eux le NO (monoxyde d'azote) est produit. Ce composant est hautement réactif et peut réagir avec les fibres de collagène et produire le Col2-1NO<sub>2</sub> (pour revue (Henrotin et al. 2007)). Cette forme de collagène forme un nouvel épitope et peut être utilisé comme biomarqueur dans des échantillons sériques. De manière remarquable ce biomarqueur est plus abondant chez les femmes n'ayant pas subi de ménopause.

### **III. Les biomarqueurs issus du métabolisme de l'agrécan**

Des biomarqueurs de l'arthrose peuvent être issus du métabolisme des agrécans et plus particulièrement de leur dégradation. L'agrécan est constitué d'une protéine comportant 3 domaines globulaires G1, G2 et G3 (Figure 32). Le domaine G1 est interagit avec l'acide hyaluronique. Les domaines G2 et G3 encadrent un domaine plus flexible capable d'interagir avec les glycosaminoglycanes (chaînes de kératane sulfate (KS) et chaînes de chondroïtine sulfate (CS)). Les enzymes ADAMTS ou agrécanases clivent les agrécans au niveau du domaine riche en chaînes CS d'une part et au niveau d'un site de reconnaissance situé entre



**Figure 32 : Dégradation des agrécanes.**

Les agrécanes sont dégradés par les métalloprotéinases MMP et les agrécánases ADAMTS (d'après (De Ceuninck, Sabatini, et Pastoureau, 2011)). Le clivage des agrécanes libère des molécules utilisables comme biomarqueurs. Les MMP et ADAMTS reconnaissent des sites spécifiques de clivage dans la zone interglobulaire des agrécanes. Les ADAMTS sont aussi capables de cliver les chaînes de chondroïtine sulfate.



les domaines G1 et G2 d'autre part. L'activité agrécanase clive le site consensus ARGS (Alanine-Arginine -Glycine-Sérine) et permet de libérer une extrémité N-terminal utilisée comme néo-épitope. Des enzymes MMP sont capables de cliver le même domaine protéique des agrécanes en reconnaissant un autre site de consensus : FFGV (Phénylalanine-Phénylalanine-Glycine-Valine). Le clivage de ce site libère un néo-épitope utilisable comme biomarqueur. De plus des études ont montré que le nombre de néo-épitopes, détectés par des tests ELISA, augmentait avec l'accroissement de la dégradation du cartilage. Cependant ces produits de dégradation ne sont pas exclusifs de l'arthrose mais sont retrouvés dans d'autres pathologies articulaires telle que l'arthrite rhumatoïde, ce qui complique d'autant plus leur utilisation en tant que biomarqueur de l'arthrose.

#### **IV. Les biomarqueurs protéiques non collagéniques**

D'autres molécules composant la matrice peuvent être utilisées comme biomarqueurs de l'arthrose. C'est le cas de la protéine COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) ou thrombospondine 5 (pour revue (De Ceuninck, Sabatini, and Pastoureau 2011)). Le liquide synovial et les urines sont enrichis en protéine COMP en parallèle de l'aggravation de la pathologie arthrosique. Cependant la fuite de la protéine COMP n'est pas exclusive à l'arthrose. Cependant en combinant la détection de la protéine COMP avec celle d'un fragment de dégradation de COMP par MMP12, la fiabilité de la détection de l'arthrose serait accrue. Aussi une autre protéine retrouvée dans les urines a été étudiée pour établir un rôle de biomarqueur fiable pour le diagnostic de l'arthrose (Henrotin et al. 2012). Des études de protéomique indiquent que des populations de patients non arthrosiques et arthrosiques peuvent être discriminées par la détection de peptides de la protéine fibuline 3. Au cours de l'arthrose la concentration en fibuline 3 dans les urines est accrue.

Une molécule produite au cours du métabolisme de la membrane synoviale pourrait être un biomarqueur potentiel (Gineyts, Garnero, and Delmas 2001). Au cours de l'arthrose le tissu synovial se dégrade. La molécule Glucosyl-Galactosyl-pyridinoline est spécifique de la dégradation du tissu synovial. Au cours de l'arthrose sa concentration urinaire est augmentée. Ainsi cette molécule serait un biomarqueur idéal qui permettrait à l'investigateur de distinguer la pathologie arthrosique de la polyarthrite rhumatoïde au cours de laquelle une hyperplasie de la synoviale est observée.

#### **V. Les marqueurs de l'inflammation synoviale**

Au cours de l'arthrose le tissu synovial subit une inflammation locale. Des cytokines sont produites par les synoviocytes, les macrophages et les cellules immunitaires recrutées. Ainsi



le  $\text{TNF}\alpha$  et l'IL-6 pourraient des indicateurs de la pathologie arthrosique. De plus la réaction inflammatoire génère une multitude d'espèces réactives de l'oxygène. Des enzymes de dégradation de ces espèces réactives sont recrutées. Parmi elles la myéloperoxydase pourrait être utilisée comme biomarqueur de l'inflammation synoviale au cours de l'arthrose (Deberg et al. 2008). Un suivi des taux sériques de collagène II et de la myéloperoxydase avant et après la mise en place d'une prothèse de cartilage a été réalisé. Le taux de myéloperoxydase chutait après l'opération. Cette enzyme serait un bon biomarqueur de suivi post-opératoire pour la réparation articulaire.

## **VI. Les marqueurs protéolytiques**

Les protéines de dégradation des collagènes pourraient servir de marqueur de l'arthrose. En effet les MMP sont inhibées par leurs inhibiteurs TIMP et le suivi de l'équilibre protéinase/inhibiteur pourrait être un biomarqueur de la pathologie (Dean et al. 1989). Un déséquilibre en faveur de la diminution des TIMP favorise la protéolyse de la MEC ce qui correspond au phénotype arthrosique.

## **B. Les miARN : biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques des pathologies articulaires**

A ce jour les profils d'expression des gènes impliqués dans la chondrogenèse et l'obtention du phénotype différencié du chondrocyte sont bien connus. Cependant les causes de dérégulations de l'expression de ces gènes aboutissant à la perte de phénotype du chondrocyte et l'apparition d'un phénotype arthrosique le sont moins. Chez la souris, des expériences de Knock-Out de la protéine Dicer, au sein du mésoderme des membres, ont été réalisées (Harfe et al. 2005). La perte de cette protéine impliquée dans le clivage des pré-miARN en miARN mature au cours de la biogenèse des miARN engendrait des défauts de formation des cartilages et squelettes chez la souris. Ces résultats indiquaient fortement l'implication des miARN dans la régulation génique du chondrocyte sain et pathologique. Les miARN sont devenus des molécules clés dans la recherche de biomarqueurs fiables et de cibles thérapeutiques potentielles de l'arthrose.

Plusieurs cribles ont été réalisés afin de recenser les miARN potentiellement impliqués dans la régulation des gènes des chondrocytes sains *versus* arthrosiques. Dans ce paragraphe nous discuterons des rôles de miARN impliqués dans la régulation de la chondrogenèse et de leur rôle au cours de l'arthrose.

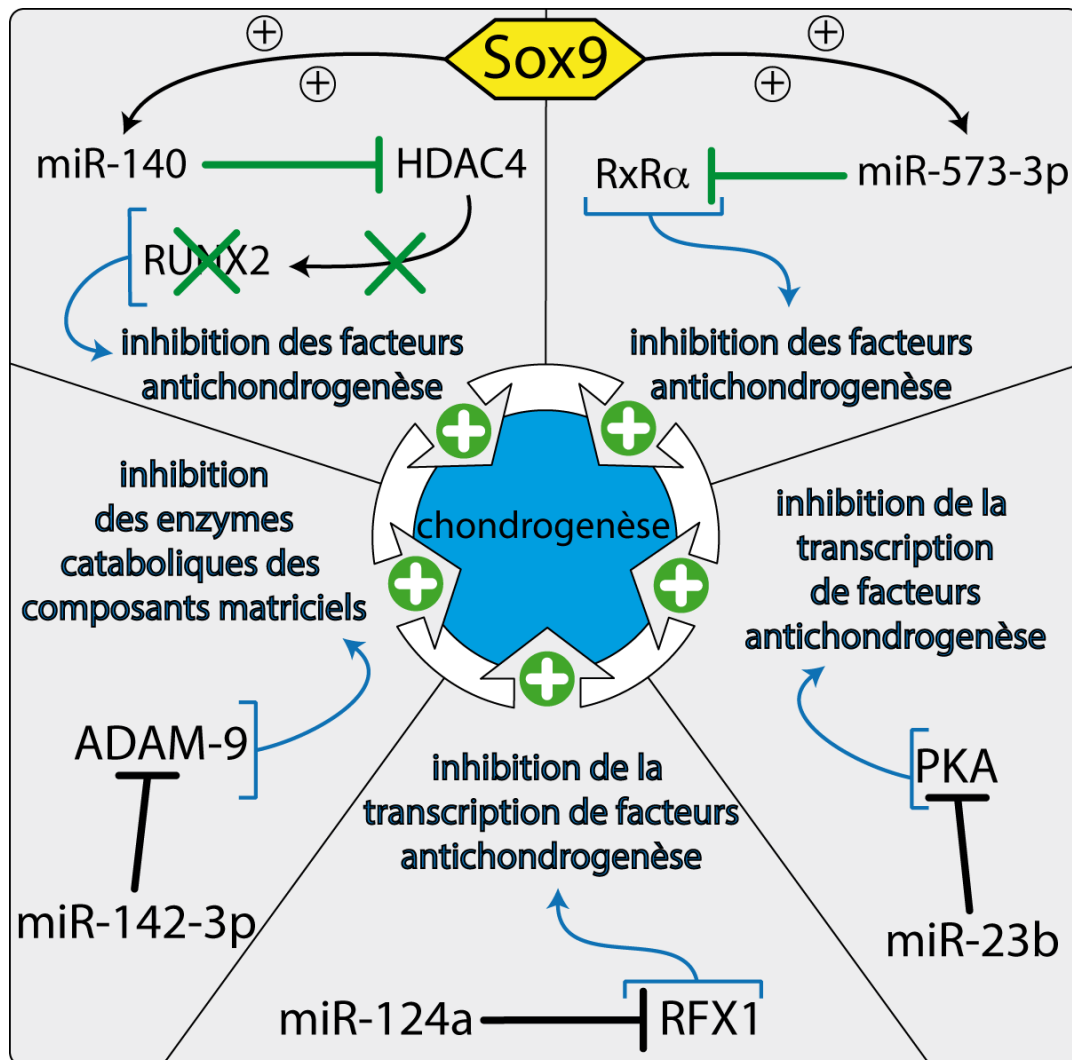


## **I. Les miARN impliqués dans la régulation génique du chondrocyte sain et pathologique**

### **1. Les miARN régulateurs de la chondrogenèse**

#### **i. Les miARN favorisant la chondrogenèse (Figure 33) :**

- Le miR-140 est aussi un acteur important dans le contrôle du phénotype du chondrocyte (Miyaki et al. 2009). Les auteurs ont montré que miR-140 est impliqué dans le maintien de la répression du facteur RUNX2 inducteur de la perte de phénotype du chondrocyte vers l'hypertrophie. Le facteur Sox9 induit l'expression de miR-140 qui cible directement l'ARNm codant l'histone déacétylase 4 HDAC4. La diminution du taux de HDAC4 entraîne la diminution de la transcription de *RUNX2*. L'action de miR-140 permet d'empêcher l'apparition d'un phénotype hypertrophique. Le rôle de miR-140 a de plus été étendu à deux autres ARNm cibles : *SMAD3* et *CXCL2* (Pais et al. 2010; Nicolas et al. 2008). La diminution des taux de ces deux ARNm permettrait le maintien du chondrocyte en différenciation.
- En 2011 une étude chez le poulet a indiqué l'implication de miR-142-3p dans la régulation de la chondrogenèse. Les auteurs ont comparé les taux de miR-142-3p dans les ailes et les pattes du poulet. Ils ont pu constater que miR-142-3p induisait la chondrogenèse en régulant négativement l'expression de *ADM9* dans le cartilage des pattes mais pas des ailes.
- Le microARN miR-124-1a a été caractérisé comme régulateur positif de la chondrogenèse (Suomi et al. 2008). En effet miR-124-1a participe à l'induction de la chondrogenèse en inhibant l'expression du gène *RFX1* (Regulator Factor X 1). La diminution du taux de *RFX1* entraîne la baisse de collagène de type 1, collagène majoritaire de la matrice des CSM.
- Une étude a montré que l'expression de miR-23b était augmentée dans le chondrocyte par rapport aux CSM (Ham et al. 2012). Cette équipe a montré que le miR-23b pouvait induire la chondrogenèse en interférant avec la voie PKA. En effet miR-23b cible l'ARNm PKA pour inhiber l'expression de son gène. Les auteurs ont montré que l'effet de miR-23b pouvait être accentué avec le concours de l'inhibiteur H89 spécifique de la PKA.
- Il a été montré récemment que la chondrogenèse pouvait être maintenue par un phénomène d'interférence avec la voie de signalisation inhibant la différenciation cellulaire et orchestrée par les récepteurs RXR $\alpha$  (Retinoïd X Receptor alpha) (Guérit et al. 2013). Sous l'induction de Sox9, miR-574-3p est surexprimé. Ce miARN cible directement RXR $\alpha$  et la diminution du taux de ce récepteur entraîne le blocage de la synthèse d'inhibiteurs de la chondrogenèse.
- Une étude a montré le rôle bivalent de miR-455-3p. Ce miARN est exprimé uniquement dans le périchondre et le cartilage des os longs. De plus il favorise la chondrogenèse en



**Figure 33 : Rôles des miARN impliqués dans l'induction de la chondrogenèse.**

Cinq miARN ont été décrits dans la littérature comme régulateurs positifs de la chondrogenèse et donc de la différenciation des CSM en chondrocytes différenciés. Les rôles de ces miARN sont schématisés dans ce diagramme. Les flèches barrées représentent le rôle inhibiteur du miARN envers son ARN cible. Les accolades et les flèches bleues indiquent les conséquences des régulations par les miARN. Les flèches et les croix vertes indiquent les conséquences indirectes des régulations de miARN.



inhibant la voie de signalisation des TGF $\beta$  par la régulation négative de *SMAD2* d'une part et l'inhibition du récepteur à l'activine (appartenant à la famille des TGF) d'autre part.

ii. Les miARN régulant l'étape de condensation des CSM (Figure 34) :

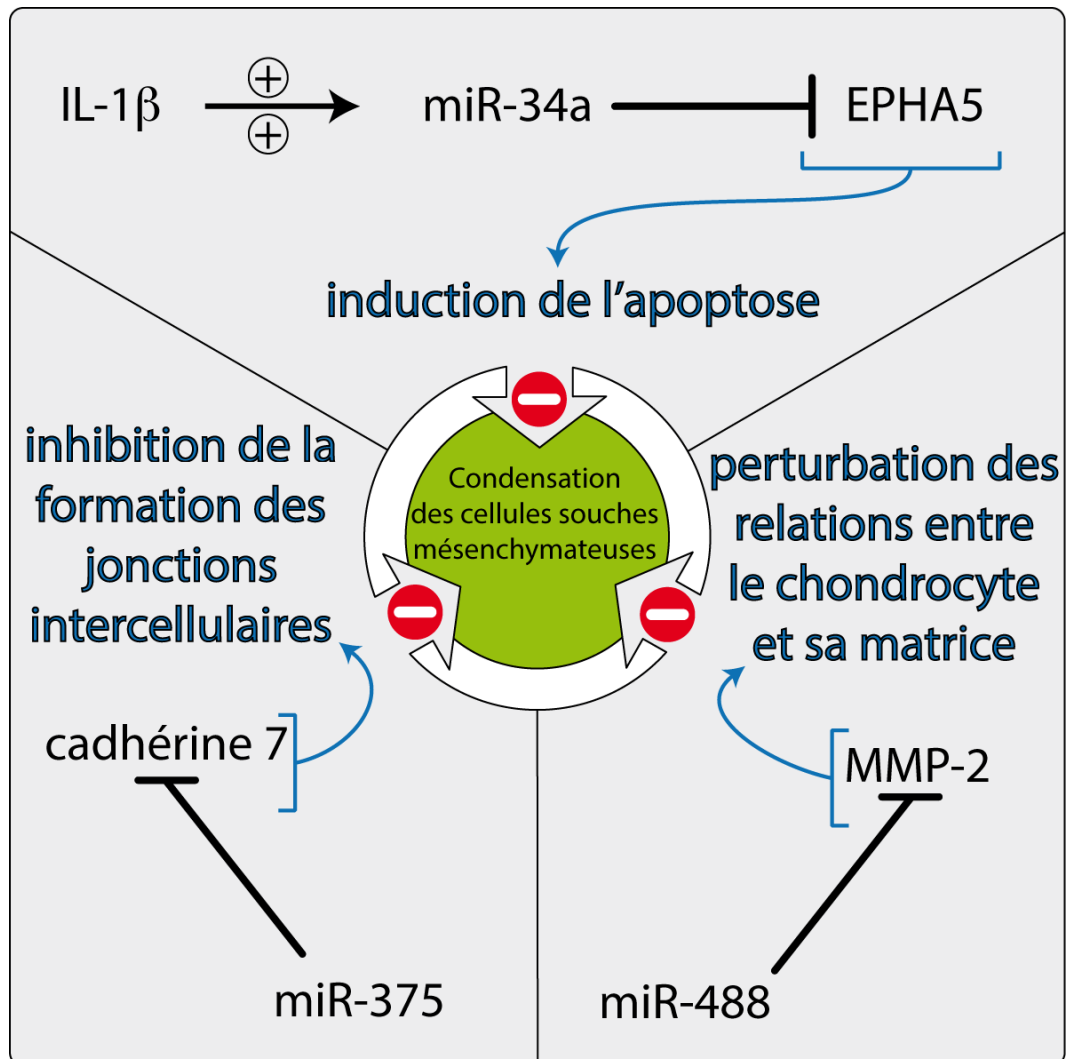
- L'étape de condensation des cellules chondroprogénitrices est importante pour la différenciation des chondrocytes (cf. Introduction, Chapitre 2). A ce jour 3 miARN ont été mis en évidence en tant que régulateur de la condensation cellulaire. Le miR-34a en ciblant la protéine EPHA5 (Ephrin Type-A receptor 5), une protéine médiant le développement tissulaire, inhibe le processus de condensation des pré-chondrocytes (D. Kim et al. 2011). L'expression de miR-34a est inducible par l'IL-1 $\beta$  et sa surexpression provoque l'apoptose. Un deuxième miARN est impliqué dans la régulation de cette étape de la différenciation du chondrocyte : le miR-375 (J. Song, Kim, et al. 2013). Cette étude a mis en évidence le rôle de régulateur négatif de miR-375 sur l'expression du gène codant la cadhérine 7. Les auteurs affirment que la suppression de la cadhérine 7 via l'expression de miR-375 suffit à inhiber cette condensation cellulaire. En effet les cadhérines sont des protéines impliquées dans la formation des jonctions intercellulaires au cours de la condensation cellulaire. L'inhibition de l'expression de miR-375 permet de retrouver une expression de cadhérine 7 et la condensation cellulaire peut s'effectuer. Enfin une étude chez le poulet a mis en évidence la possible implication de miR-488 dans l'étape de condensation cellulaire (J. Song, Kim, and Jin 2011). En effet les auteurs ont montré que miR-488 était fortement exprimé juste avant la condensation cellulaire et réprimé au cours de la prolifération et différenciation du chondrocyte. De plus les auteurs ont montré le rôle de régulateur négatif de miR-488 sur MMP-2 soulignant la régulation des interactions entre le chondroprogéniteur et la MEC.

iii. Les miARN inhibant la chondrogenèse (Figure 35) :

Plusieurs miARN ont été décrits comme régulateurs négatifs de la chondrogenèse en ciblant le même gène cible à savoir le facteur de transcription Sox5 dont le produit est favorable à l'induction de la synthèse de collagène de type II.

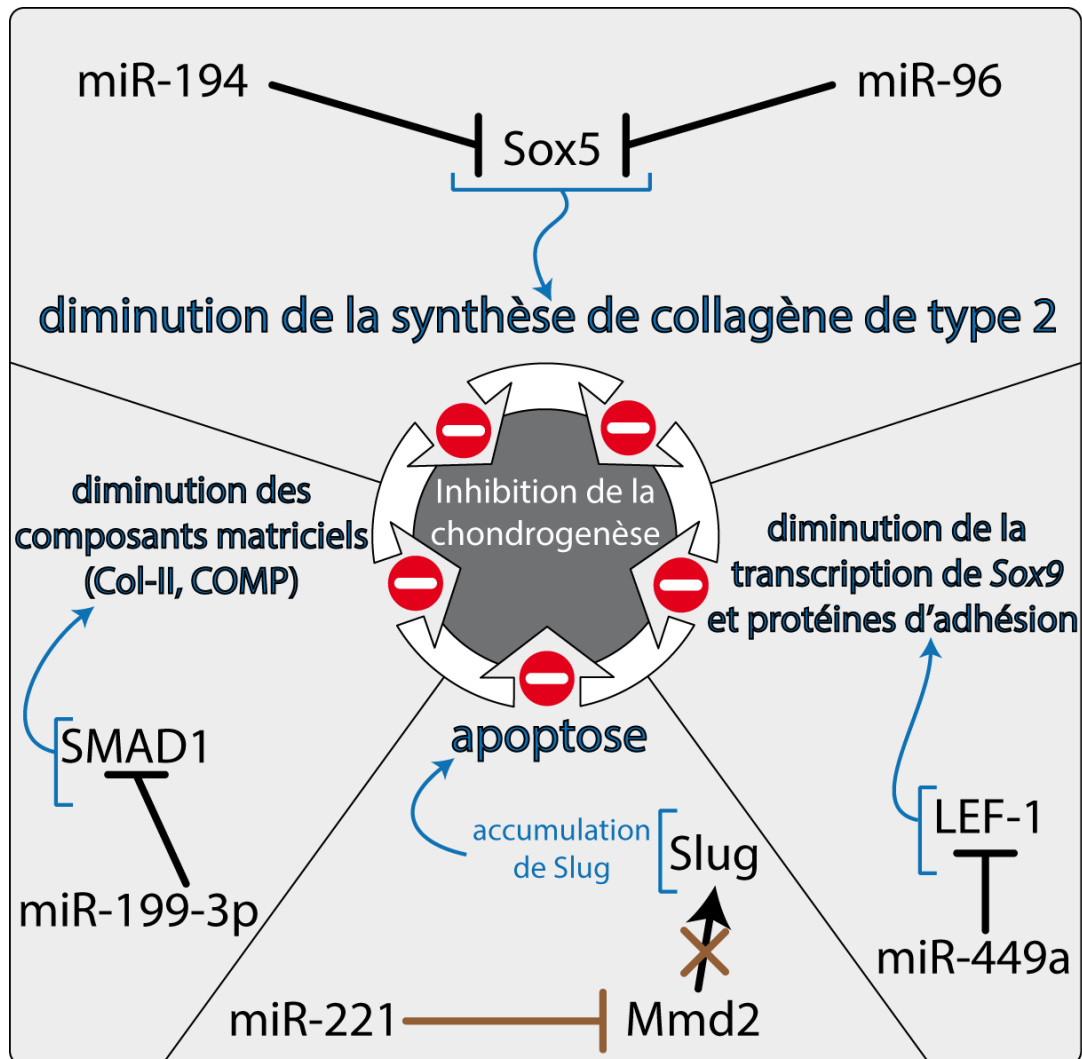
- C'est le cas de miR-194 (J. Xu et al. 2012) dont une des cibles est l'ARNm Sox5. Ce facteur de transcription est très important pour l'initiation de la chondrogenèse. Lorsque miR-194 est surexprimé, le taux de protéine Sox5 est fortement diminué, inhibant le processus de chondrogenèse.





**Figure 34 : Rôles des miARN impliqués dans la régulation de la condensation des CSM.**

Trois miARN ont été décrits dans la littérature comme régulateurs négatifs de la condensation des cellules souches mésenchymateuses CSM, étape essentielle de la différenciation des CSM en chondrocytes différenciés. Les rôles de ces miARN sont schématisés dans ce diagramme. Les flèches barrées représentent le rôle inhibiteur du miARN envers son ARN cible. Les accolades et les flèches bleues représentent les conséquences des rôles de ces miARN.



**Figure 35 : Rôle des miARN impliqués dans l'inhibition de la chondrogenèse.**

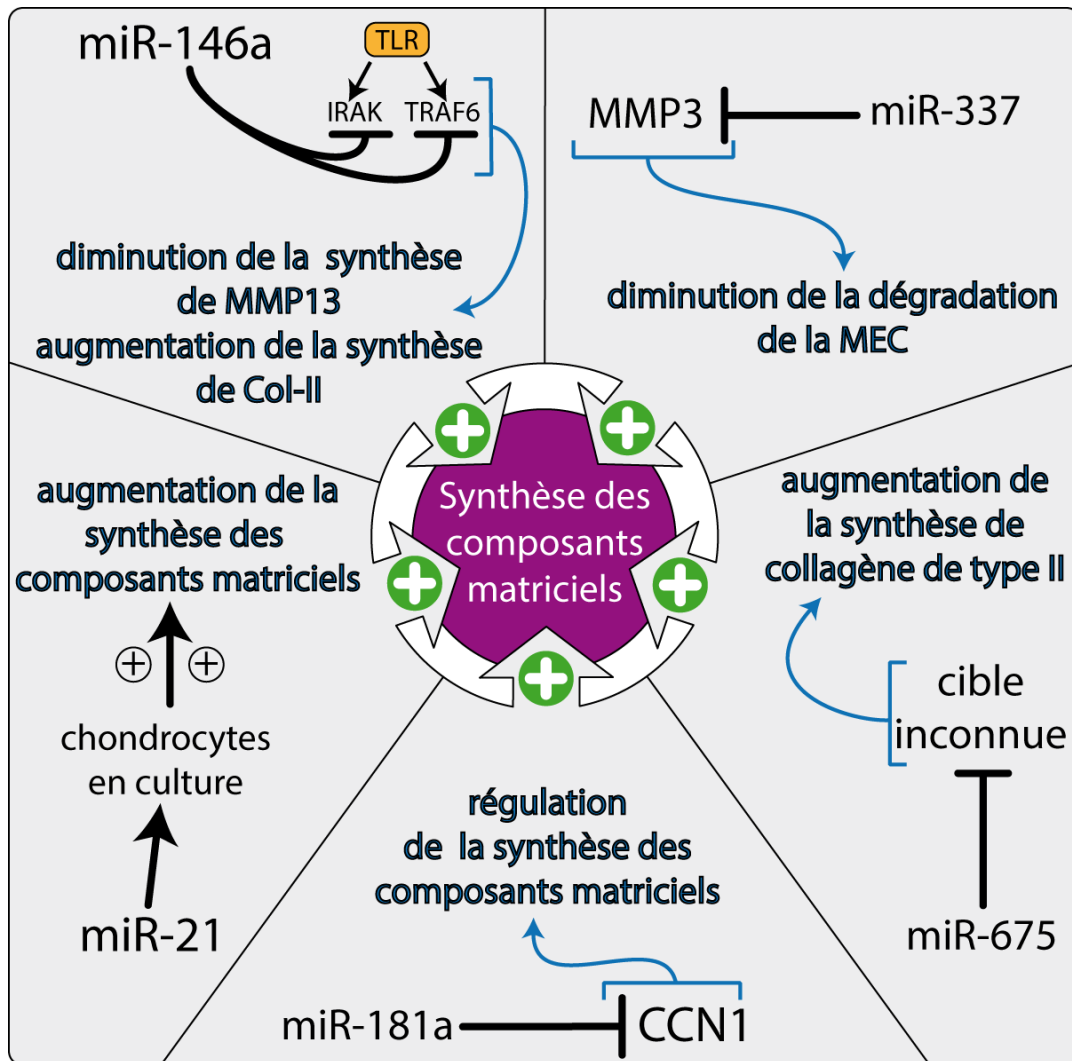
Cinq miARN ont été décrits dans la littérature comme régulateurs négatifs de la chondrogenèse et donc de la différenciation des CSM en chondrocytes différenciés. Les rôles de ces miARN sont schématisés dans ce diagramme. Les flèches barrées représentent le rôle inhibiteur du miARN envers son ARN cible. Les accolades et les flèches bleues représentent les conséquences des rôles de ces miARN. Les flèches et les croix brunes représentent les conséquences indirectes des régulations de miARN.



- Une autre étude montre l'implication de miR-96 dans la régulation négative de Sox5 (Suomi et al. 2008). miR-96 est capable de cibler la région 3'UTR de Sox5 et d'inhiber l'expression de son gène.
- Le processus de chondrogenèse est inhibé précocement après l'induction de miR-199-3p par traitement de cellules murines au BMP2 (Lin et al. 2009). Les auteurs ont montré que miR-199-3p inhibait SMAD1, résultant au final en la diminution des taux d'expression des marqueurs du chondrocyte différencié (ColIII, COMP). Cette régulation négative peut être inversée par l'utilisation d'un antagomir.
- Une étude chez le poulet fait état d'une autre voie de régulation négative de la chondrogenèse (D. Kim, Song, and Jin 2010). Au cours de la différenciation du chondrocyte, l'expression de miR-221 permet de réguler négativement l'expression du gène codant l'ubiquitine ligase Mdm2. La diminution du taux de Mdm2 dans la cellule entraîne l'accumulation de la protéine Slug, normalement dégradée après ubiquitinylation. Cet excès de protéine Slug induit alors l'apoptose.
- Le miR-449a est lui impliqué dans la régulation négative de la chondrogenèse (Paik et al. 2012). Cette étude a mis en évidence le rôle de miR-449a en tant que régulateur négatif du gène codant LEF-1. Cette protéine est un facteur de transcription indispensable à l'activation de gènes de la chondrogenèse et notamment Sox9. La diminution du taux de LEF-1 induite par miR-449a entraîne une diminution drastique de la transcription de Sox9.

iv. Les miARN régulant l'expression des composants matriciels (Figure 36) :

- miR-146a est un des miARN, dont le rôle de régulateur génique du chondrocyte, est le mieux caractérisé. L'expression de ce miARN est très importante dans les chondrocytes de la couche superficielle du cartilage (Yamasaki et al. 2009). Son rôle est de réguler la signalisation induite par l'activation des récepteurs TLR (Toll Like Receptor). En ciblant les ARNm des facteurs IRAK1 et TRAF6, miR-146a participe à la diminution importante de l'expression de MMP-13, favorisant ainsi la synthèse de collagènes matriciels.
- Une étude chez le rat a mis en évidence l'implication de miR-337 dans la régulation fine de l'expression d'un récepteur au TGFβ (Zhong et al. 2012). Les auteurs ont montré que l'augmentation de miR-337 avait un effet bénéfique sur la synthèse des composants matriciels en inhibant l'activité de la métalloprotéase MMP3.
- Une étude récente montre que miR-181a participe à l'induction de la synthèse des collagènes et agrécanes (Sumiyoshi et al. 2013). Par des tests rapporteur luciférase, les auteurs ont validé que miR-181a est capable de réguler négativement l'expression de la protéine



**Figure 36 : Rôles des miARN impliqués dans la régulation de la synthèse des composants matriciels.**

Cinq miARN ont été décrits dans la littérature comme régulateurs positifs de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire du chondrocyte. Les rôles de ces miARN sont schématisés dans ce diagramme. Les flèches barrées représentent le rôle inhibiteur du miARN envers son ARN cible. Les accolades et les flèches bleues représentent les conséquences des rôles de ces miARN.



CCN1, une protéine pro-chondrogenique. miR-181a semble exprimé de manière constante au cours de la chondrogenèse. Les auteurs expliquent ce paradoxe par le fait que ce miARN aurait un rôle dans l'homéostasie de la synthèse de collagène. Ainsi dans le chondrocyte sain, l'effet de miR-181a serait plus faible que l'induction de la synthèse de collagène.

- Une étude portant sur la réparation du cartilage a été réalisée par la mise en culture de chondrocytes dans un gel de collagènes : l'atelocollagène (Kongcharoensombat et al. 2010). En transfectant ces chondrocytes avec miR-21, les auteurs ont pu induire la prolifération cellulaire et par la même la synthèse des composants matriciels.

- Une autre étude fait état de l'implication de miR-675 dans la régulation positive de la chondrogenèse (Dudek et al. 2010). Bien que la cible de miR-675 ne soit pas encore connue, l'expression de ce miARN induit la synthèse de collagène de type II.

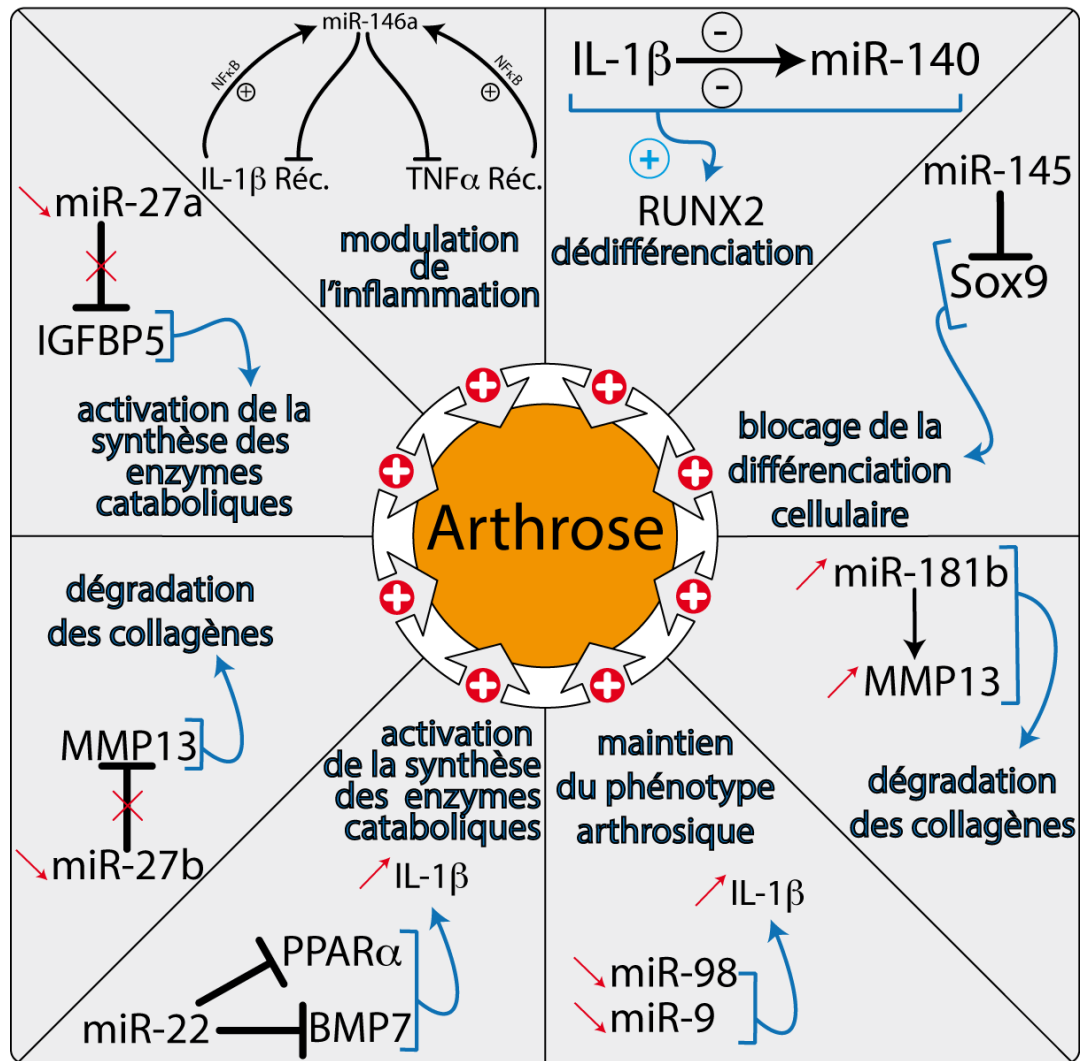
## 2. Les miARN régulateurs de l'arthrose

- Au cours de la pathologie (Figure 37) miR-146a joue aussi un rôle dans les transductions du signal des voies induites par les cytokines IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  (J. Li et al. 2012). L'activation des ces voies *via* leur récepteurs de type 1 induirait l'expression de miR-146a par une voie NF $\kappa$ -B dépendante. miR-146a pourrait effectuer un rétrocontrôle négatif en inhibant ces voies IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  par la répression des gènes codant les récepteurs à l'IL-1 $\beta$  et au TNF $\alpha$ . miR-146a serait important pour la modulation de la balance de l'inflammation entre les tissus synoviaux et cartilagineux (X. Li et al. 2011).

- Au cours de l'arthrose le profil d'expression de miR-140 est modifié (Miyaki et al. 2009). En effet il semblerait que sous l'influence d'un stimulus à l'IL-1 $\beta$ , miR-140 soit inhibé entraînant au final la dé-répression du facteur de l'hypertrophie RUNX2.

- miR-145 a aussi été très étudié. En effet la surexpression de miR-145 cause un effet délétère sur le tissu cartilagineux en favorisant la diminution des marqueurs du chondrocyte différencié à savoir ColIIa1, ColIX, ColXI, COMP ou l'agrécan (Yang et al. 2011). Les auteurs ont mis en évidence que miR-145 cible l'ARNm *Sox9*. Le taux de protéine Sox9 est fortement diminué inhibant alors la différenciation des CSM en chondrocyte.

- Le profilage de l'expression des miARN au sein de chondrocytes non arthrosiques et arthrosiques a permis de mettre en évidence l'importance de miR-181b (J. Song, Lee, et al. 2013). Les auteurs ont pu remarquer que le taux d'expression de miR-181b était fortement augmenté au cours de l'arthrose. La surexpression de miR-181b induit indirectement la surexpression de l'enzyme catabolique MMP13, dégradant principalement le collagène de type II.



**Figure 37 : Rôle des miARN impliqués dans l'apparition d'un phénotype arthrosique.**

Huit miARN ont été décrits dans la littérature comme régulateurs positifs du maintien du phénotype arthrosique. Les rôles de ces miARN sont schématisés dans ce diagramme. Les flèches barrées représentent le rôle inhibiteur du miARN envers son ARN cible. Les accolades et les flèches bleues représentent les conséquences des rôles de ces miARN. Les flèches rouges montantes représentent une augmentation de l'expression du miARN ou de l'ARNm concerné tandis que les flèches rouges descendantes schématisent la diminution de leur expression.



- Un crible de profils d'expression de miARN a été réalisé par Jones et al. Les résultats ont montré l'implication des miR-9 et miR-98 dans la pathologie arthrosique. Ainsi la surexpression de ces miARN est corrélée avec la dégradation de la matrice extracellulaire du chondrocyte (Jones et al. 2009). Par cette étude il a été mis en évidence que ces deux miARN jouaient un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire en régulant le  $TNF\alpha$ .
- Une étude de Iliopoulos et al., a mis en évidence le rôle de miR-22 dans la régulation de  $PPAR\alpha$  et BMP7 au cours de l'arthrose (Iliopoulos et al. 2008a). Cette étude démontre que miR-22 régule indirectement l'expression de ces facteurs protéiques conduisant à l'activation de l'expression d'IL1- $\beta$  [ ] [ ] [ ] au final à l'activation de MMP13, dégradant les collagènes de la MEC.
- L'implication de miR-27a dans la pathologie arthrosique (Tardif et al. 2009) a été démontrée en 2009. En effet le taux de miR-27a est diminué au cours de l'arthrose. Des recherches de cibles de miARN ont été réalisées et miR-27a semble réguler potentiellement les ARNm MMP13 et IGFBP 5 (Insulin Growth Factor-Binding Protein 5). De plus les auteurs ont montré que ces cibles potentielles étaient induites par les cytokines de l'inflammation au cours de l'arthrose. L'utilisation d'antimiR-27a a mis en évidence que miR-27a régulait l'expression des gènes codant MMP13 et IGFBP 5 au cours de l'arthrose.
- en 2010 l'implication de miR-27b en tant que régulateur de MMP13 a été validée par des tests luciférase (Akhtar et al. 2010). La régulation directe entre miR-27b et l'ARNm *MMP13* a été validée par cette équipe. Les auteurs ont alors proposé qu'au cours la pathologie l'expression de miR-27b étant diminuée, l'inhibition de l'expression du gène *MMP13* était levée, causant une augmentation du taux d'enzyme MMP13 dans la MEC du chondrocyte. Ce surcroît de MMP13 induit alors la dégradation du collagène de type II de la MEC.

## **II. Utilisation des miARN en tant que biomarqueur et/ou cibles thérapeutiques de l'arthrose ?**

Aujourd'hui le diagnostic et le pronostique de l'état d'avancement et des complications futures de l'arthrose sont des objectifs primordiaux pour envisager un traitement efficace contre cette pathologie. L'explosion de la recherche des miARN a mis en évidence leur « omniprésence » dans la régulation génique de tous les processus biologiques de la cellule et l'arthrose n'en est qu'un très bon exemple.

En effet parmi les miARN et leurs rôles dans la régulation de la chondrogenèse et de la pathologie lesquels seraient de bon biomarqueurs ou encore des cibles thérapeutiques efficaces ? Une question principale découle de cela à savoir quelle est l'importance du rôle





d'un miARN par rapport à un autre ? Le manque d'information quantitative sur la prépondérance du rôle d'un miARN par rapport à un autre est un réel écueil dans la recherche de biomarqueurs fiables.

Malgré tout l'analyse des composants des sérums de patients devient un outil de plus en plus performant dans la détermination de biomarqueurs diagnostics. En 2008 une équipe israélienne publiait un article affirmant que les miARN pouvaient être des biomarqueurs sériques prometteurs (Gilad et al. 2008). En effet de par la très grande stabilité des miARN, les auteurs ont émis l'hypothèse que des miARN pouvaient se retrouver dans tous les fluides corporels sans risquer d'être dégradés. A partir de cette hypothèse les auteurs ont eu alors l'idée par un moyen simple de tenter de détecter des miARN dans le sérum et les urines de femmes enceintes. Dans un premier temps des expériences de quantification des miARN par qPCR ont permis aux auteurs de s'assurer que leur détection était tout aussi aisée pour les miARN circulant que les miARN présents au sein d'extraits cellulaires. De plus la détection de miARN dans plusieurs liquides physiologiques comme les urines, le sérum, la salive ou encore le liquide amniotique a permis de confirmer aux auteurs que les profils des miARN reflétaient bien les profils physiologiques. Cette étude pionnière montre le potentiel très prometteur de la détection de biomarqueurs de type miARN dans les fluides corporels par une méthode simple telle que la qPCR.

A partir de ce constat des études portant sur les fluides corporels reliés aux physiopathologies articulaires ont été étudiés : le liquide synovial, le sérum ou encore le sang périphérique.

La sélection de miARN biomarqueurs de l'arthrose est compliquée. En effet ces miARN candidats sont impliqués à la fois dans la pathologie arthrosique et dans l'arthrite rhumatoïde.

Une étude réalisée en 2010 a porté sur l'analyse de miARN biomarqueurs de l'arthrose et de l'arthrite présents au sein du liquide synovial et du plasma sanguin. Ces miARN candidats étaient les miR-146a, 155 et 233.

Cette étude a porté sur la comparaison des profils de ces miARN dans le liquide synovial et le plasma. Les résultats ont montré que les profils étaient différents entre ces deux fluides corporels (Murata et al. 2010). En effet les auteurs n'ont pu identifier de corrélation entre les profils de ces miARN dans le plasma et dans le liquide synovial. Il semble qu'au contraire les profils d'expression des miARN candidats au sein du tissu synovial et du liquide synovial soient corrélés. Ceci signifie que l'analyse du liquide synovial permettrait d'obtenir une indication fiable sur l'état physiologique de l'articulation. Il semble donc que la détection des miARN comme biomarqueurs de l'arthrose dans le liquide synovial ne soit pas adéquat. Il est



aussi remarquable d'observer que les profils d'expression des miARN obtenus au cours de l'étude de l'arthrite rhumatoïde étaient plus grands que ceux observés au cours de l'arthrose. Il est bien entendu totalement utopiste de considérer comme fiable un ou plusieurs miARN, uniquement sur leur taux d'expression, permettant de discriminer une pathologie par rapport à une autre. Ainsi il reste encore à trouver le moyen de discriminer les miARN candidats les plus fiables permettant de diagnostiquer spécifiquement l'arthrose.

Une étude portant sur l'analyse des miARN dans le sang périphérique a été réalisée (Okuhara et al. 2012). En comparant l'expression de miARN candidats dans des échantillons sanguins de patients non arthrosiques et arthrosiques, les auteurs ont mis en évidence l'importance des biomarqueurs miR-146a, miR-181a et miR-223. L'étude a permis de mettre en évidence des corrélations entre l'expression des miARN candidats et des facteurs comme l'âge du patient (miR-146a), le sexe (miR-223 est plus exprimé chez les femmes) ou encore l'influence d'un traitement contre l'arthrose (miR-181a chute chez les patients traités par des anti-inflammatoires ou par des infiltrations d'acide hyaluronique).

En faisant le bilan de ces études on peut noter que le liquide synovial mais aussi le sang périphérique semblent adaptés pour la recherche de biomarqueurs de type miARN. La grande stabilité des miARN est favorable à la détection des miARN dans ces fluides corporels. Cependant l'analyse des profils d'expression des miARN au cœur de ces fluides au cours de l'arthrose est délicate. En effet les taux d'expression des miARN biomarqueurs peuvent varier selon des corrélations avec des facteurs extérieurs tels que l'âge du patient, son sexe ou encore son indice de masse corporelle.

La poursuite de l'étude des rôles et expression des miARN au sein des tissus de l'articulation mais aussi dans les fluides corporels est primordiale pour pouvoir déterminer des biomarqueurs fiables. De ces études pourra découler l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles de l'arthrose. Ainsi à partir des études décrites dans le paragraphe précédent, les rôles déterminants de plusieurs miARN dans la pathologie arthrosique ont été mis en évidence.

- L'importance de miR-146a dans la régulation des cytokines dans le chondrocyte (J. Li et al. 2012). miR-146a jouerait son rôle de modulateur de l'inflammation des tissus de l'articulation via la production d'IL-1 $\beta$ . L'inflammation est en partie responsable des douleurs articulaires et les auteurs de ces travaux ont émis l'hypothèse que la diminution de miR-146a dans l'articulation serait une bonne piste pour un traitement de la douleur au cours de l'arthrose.



- Une autre cible thérapeutique potentielle pourrait être le miR-145. Martinez-Sanchez et ses collègues ont montré que ce miARN était un des régulateurs les plus importants de l'expression négative de Sox9. Le blocage de l'inhibition de la synthèse de ce facteur pro-chondrogenèse via un traitement anti-miR-145 pourrait être envisageable.
- La chondrogenèse est inhibée à un stade précoce par miR-375 en régulant négativement la protéine cadhérine 7 impliquée dans la condensation des CSM. Un traitement dirigé contre miR-375 pourrait être envisagé pour contrer la perte de cadhérine 7 et favoriser la poursuite de la chondrogenèse.
- Enfin une autre cible thérapeutique de l'arthrose prometteuse pourrait être miR-181b. Son étude a permis de montrer que miR-181b était lié à l'arthrose de par sa forte expression au cours de la pathologie et sa capacité à favoriser la production de MMP13. En réduisant son expression dans les cellules arthrosiques les chercheurs émettent l'hypothèse de la possibilité d'induire la diminution de la production d'enzymes cataboliques de la MEC.

En conclusion l'étude des biomarqueurs et de cibles thérapeutiques de type miARN et spécifique de l'arthrose n'en est qu'à ses premiers balbutiements. Malgré tout ces premiers résultats semblent prometteurs. Plusieurs interrogations restent en suspens. L'utilisation de ce type de biomarqueur est-elle suffisante pour pouvoir établir des diagnostics et pronostics fiables ? Doit-on coupler les analyses de biomarqueurs protéiques et miARN pour accroître la fiabilité du diagnostic ? Dans quelle mesure est-il possible d'établir des profils de biomarqueurs pathologiques reflétant l'atteinte arthrosique individuelle et de les appliquer à une échelle d'une population ?

*Objectifs*





La dégénérescence du cartilage est un phénomène fréquent au cours du vieillissement. Les pathologies associées génèrent un coût important dans les budgets dédiés à la Santé dans les pays industrialisés et altèrent la qualité de vie des patients par leur caractère invalidant. L'arthrose, qui représente la forme la plus commune de ces pathologies, est encore mal soignée, d'où l'importance de trouver de nouvelles thérapies performantes.

Dans l'arthrose, une réaction inflammatoire modifie le phénotype des cellules articulaires, les chondrocytes, qui ne peuvent plus assurer la production et le maintien de la matrice du cartilage. Cette perte du phénotype différencié des chondrocytes, contribue à la destruction du cartilage, du fait d'une très faible capacité de régénération du cartilage lésé. Ce phénotype est encore mal caractérisé, en particulier, il est nécessaire d'identifier un plus grand nombre de marqueurs biochimiques associés.

Une collaboration dans le cadre d'un financement de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) « Vieillesse Ostéo-articulaire » s'est établie entre l'équipe spécialiste de la maturation des ARN de l'ex-UMR 7214 AREMS et l'équipe spécialiste des physiopathologies articulaires de l'ex-UMR 7561 PPIA, avant que ces deux unités ne fusionnent pour former le laboratoire IMoPA (UMR 7365). Comme je l'ai décrit dans l'introduction, les microARN ont été identifiés ces dernières années comme des acteurs essentiels de la différenciation cellulaire. Ainsi, leur implication a pu être observée dans la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes (Goff et al. 2008a). De plus, le taux de certains miARN varie dans un chondrocyte sain par rapport à un chondrocyte arthrosique (Iliopoulos et al. 2008b). Ces données font apparaître que les miARN pourraient représenter des biomarqueurs potentiels de la pathologie arthrosique, mais aussi de l'état phénotypique des chondrocytes sains.

Cela nécessitait l'identification précise des profils d'expression des microARN dans différents types cellulaires et chez les patients arthrosiques. Les deux équipes nancéennes se sont fixées comme objectif, d'étudier la contribution des microARN dans les modifications phénotypiques affectant les chondrocytes au cours de l'arthrose. Les travaux ont débuté par l'étude de la variation de l'expression des miARN au cours de la dé-différenciation d'un chondrocyte en chondrocyte hypertrophique non fonctionnel, par repiquages ou traitement à l'interleukine 1 $\beta$ . Des hybridations sur puces dédiées aux petits ARN ont été réalisées et ont permis d'étudier le patron d'expression des microARN dans les deux états phénotypiques. Un panel de microARN dont l'expression variait dans ces deux états a été identifié.



Ce projet de thèse s'inscrivait dans l'optique d'une analyse du mécanisme de régulation de l'expression de ces miARN candidats. Parmi ceux-ci, le profil d'expression des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1 a retenu notre attention. Il est communément proposé que les profils l'expression des miARN codés par un même cluster soient équivalents. Or ce n'est pas le cas pour les trois miARN de ce cluster. En effet au cours de la différenciation du chondrocyte, et ceci dans les deux conditions d'induction de perte de phénotype testées, les taux de miR-23b et 27b chutaient alors que celui de miR-24-1 ne changeait pas.

De plus la littérature indiquait l'implication de miR-27b dans la régulation de l'expression du gène codant la métalloprotéase MMP13 chez le chondrocyte au cours de l'OA (cf. Chapitre 3 de l'Introduction). Chez la souris, le cluster homologue miR-23b~27b~24-1 est porté par le chromosome 13 et est localisé au sein d'un gène codant la protéine aminopeptidase O murine. La caractérisation de ce cluster qui avait été réalisée en 2009 (Sun et al. 2009) montrait l'existence de 3 transcrits pri-miARN produits à partir de différents promoteurs. Ces travaux ont montré l'existence d'une production différentielle des miARN du cluster. Ces données suggèrent que chacun des miRNA du cluster serait produit à partir d'un pri-miARN différent.

La comparaison entre les clusters murin et humain permet de mettre en évidence plusieurs similitudes : les clusters sont localisés dans des ORF codant des protéines homologues, la production des miARN est différentielle, et les miARN sont impliqués dans des pathologies similaires telles que les physiopathologies articulaires (cf. Introduction Chapitres 2 et 3). Ces observations nous ont conduits à poser l'hypothèse que les microARN miR-23b, -27b et -24-1 humains, pourraient être générés à partir de pri-miARN distincts. En accord avec cette hypothèse, une publication récente décrit l'existence chez l'Homme d'une espèce ARN qui serait un précurseur à la fois du microARN miR-27b et d'un snoARN H/ACA (un ARN guide des réactions de pseudouridylation) (Ono, Scott et al. 2011). L'absence des séquences des autres miARN du cluster au sein de ce précurseur suggère qu'un ARN précurseur serait synthétisé exclusivement pour produire le miR-27b mature. Un de mes objectifs était de caractériser chez l'Homme, les différents transcrits précurseurs des microARN de ce cluster.

Chez l'Homme, des analyses bioinformatiques préliminaires ont mis en évidence que le cluster d'intérêt était localisé dans une séquence non codante de *C9orf3*, en aval des 13 exons de ce gène et en amont de la région 3'UTR de l'ORF. Cette région était excisée et n'était pas présente dans l'ARNm *C9orf3* mature.



Dans ce contexte, les objectifs liés à l'étude du cluster miR-23b~27b~24-1 humain étaient les suivants :

- *Caractérisation génomique de l'extrémité 3' du gène C9orf3 et étude de la maturation de ses transcrits*

La caractérisation génomique de l'extrémité de *C9orf3* ainsi que des transcrits ARN issus de *C9orf3* ont été réalisées par PCR et RT-PCR. De plus l'étude de la relation entre la maturation de la séquence portant le cluster et la biogenèse des miARN a été entreprise. Dans ce but, une construction portant un minigène exprimant l'extrémité 3' de cette ORF a été réalisée. Des variants de ce minigène ont été construits pour déterminer les régions et éléments *cis* essentiels à la maturation et la biogenèse des miR-23b, -27b et -24-1.

- *Etude de la production différentielle des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1*

Dans un premier temps, le profil de production différentielle des miR-23b, -27b et -24-1 a été validé au sein de plusieurs types cellulaires et dans un modèle de perte de phénotype chondrocytaire induit à l'IL-1 $\beta$ , par quantification en qPCR TaqMan. L'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle a été abordée par l'analyse des ARNm de l'ORF hôte dans le modèle de dédifférenciation chondrocytaire à l'IL-1 $\beta$  ainsi qu'au sein d'ARN totaux extraits de cartilages non arthrosique et de cartilages arthrosiques. La recherche de promoteurs alternatifs potentiellement présents au sein de la séquence du minigène a été réalisée par des tests basés sur l'expression du système rapporteur luciférase. L'implication de la machinerie d'épissage dans la régulation de cette production différentielle de miARN a été testée par des expériences de surexpression de facteurs protéiques régulant l'épissage alternatif, au sein de cellules HEK 293. Les taux de maturation de la séquence portant le cluster de miARN ainsi que les taux de maturation de chaque miARN du cluster ont été calculés à partir de données de RT-qPCR SYBR Green et TaqMan obtenues à partir des ARN totaux extraits de chaque expérience de surexpression.

Le rôle potentiel de la protéine hnRNP K a également été étudié par une approche d'ARN interférence dirigée contre l'ARNm *hnRNPK*. L'effet de la diminution du taux de protéine hnRNP K sur la production des miARN du cluster d'intérêt a été vérifié par qPCR TaqMan.

Enfin, une piste de régulation de l'expression de miR-23b *via* un ARN transcrit en antisens du gène codant miR-23b a été étudiée. A partir de données d'une banque d'EST, un transcrit antisens avait été mis en évidence. Nous avons dans un premier voulu vérifier son existence par RT-PCR et caractériser les extrémités de ce transcrit potentiel.





*- Etude du rôle de miR-29b au cours de la perte du phénotype chondrocytaire*

Parmi les données recueillies par les expériences de puces dédiées à l'analyse de l'expression des miARN dans les chondrocytes sains et hypertrophiques, un autre miARN a été étudié en détail : miR-29b.

Au cours de mon doctorat j'ai participé à la mise en place de tests de validation des prédictions de cibles miARN/ARN cibles. Dans le cas de miR-29b, les algorithmes de prédictions de cibles ont permis de mettre en évidence un site de fixation potentiel de ce microARN au sein de la région 3'UTR de l'ARNm ColIIa1. Des expériences basées sur un système gène rapporteur par test d'activité luciférase ont ainsi été réalisées pour valider ces prédictions. J'ai ainsi participé à ce projet initié par Véronique Salone et David Moulin au cours duquel le rôle de miR-29b dans la régulation de l'arthrose a été vérifié dans une série d'échantillons d'ARN totaux issus de patients arthrosiques ou non, mais aussi en utilisant un modèle cellulaire murin, les cellules ATDC5.

*- Etude la régulation des gènes codant les protéines responsables de la balance ePi/ePPi*

Enfin, j'ai pris une plus grande part dans l'étude de la régulation des gènes impliqués dans la balance de phosphate dans le cartilage par les miARN (PC1, ANK, TNAP et Pit-1). L'équilibre entre le phosphate inorganique (ePi) et le pyrophosphate inorganique (ePPi) extracellulaires est essentiel au maintien d'un phénotype chondrocytaire différencié. Le rôle de miARN potentiellement impliqués dans la régulation du phénotype chondrocytaire via la régulation de l'expression des acteurs de la balance ePi/ePPi dans le cartilage a été étudié et un panel de 4 miARN régulateurs potentiels des 4 acteurs de la balance de phosphate (miR-9, let7e, miR-188 et miR-219) a été identifié par des analyses *in silico*. L'étude a été réalisée par l'utilisation du modèle de dédifférenciation chondrocytaire induit à l'IL-1 $\beta$  afin de suivre les taux d'expression des miARN candidats au cours de la perte de phénotype du chondrocyte. Les taux d'expression des acteurs de la balance de phosphate ont été mesurés au sein d'ARN totaux de cellules ATDC5 transfectées transitoirement par les miARN d'intérêt. Les validations des prédictions de cible miARN/ARNm ont été entreprises par des tests rapporteurs luciférase.

# *Matériel & Méthodes*





# Matériels

## **A. Souches de cellules bactériennes et cellules utilisées :**

### **I. Souches bactériennes :**

La souche DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup> 80 $\Delta$  *lacZ* M15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>-</sup>*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA*) d'*Escherichia coli* utilisée pour la production et la purification des plasmides.

La souche d'*Escherichia coli* DB3.1 (F- *gyrA462 endA1 glnV44*  $\Delta$ (*sr1-recA*) *mcrB mrr hsdS20*(*r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Sm<sup>r</sup>) *xyl5  $\Delta$ leu mtl1*) a été utilisée pour la production et la purification de plasmides contenant l'ORF *ccdB* (codant un inhibiteur de l'ADN gyrase) de l'opéron *ccd*. En effet une des principales caractéristiques de cette souche est de posséder la mutation *gyrA462* qui protège de l'effet toxique provoqué par l'expression de la protéine codée par le gène *ccdB*.

### **II. Lignées cellulaires :**

#### **1. Lignées cellulaires d'origine humaine**

Les cellules **HeLa** sont issues de métastases de cancer du col de l'utérus d'une patiente et ont été immortalisées par transformation virale. La lignée **HEK 293T** est issue de cellules de rein embryonnaire et immortalisées par transformation virale.

#### **2. Lignées cellulaires d'origine murine**

La lignée chondrogénique ATDC5 est issue de cellules de tératocarcinome AT805 murin, fournie par la banque de cellules ECACC (Sigma). Selon les conditions de culture, elle permet de reproduire la différenciation chondrocytaire ayant lieu lors de l'ossification endochondrale, c'est-à-dire jusqu'au stade de différenciation terminale caractéristique des chondrocytes hypertrophiques (Shukunami et al. 1997).



### **III. Cellules humaines en culture primaire :**

Les **myoblastes** sont des cellules souches embryonnaires responsables de la formation des muscles squelettiques. Deux types de cellules tissulaires ont été employés : les **ostéoblastes** du tissu osseux et les **fibroblastes** du tissu conjonctif. Les cellules **chondrocytes** sont issues du cartilage articulaire non arthrosique ou arthrosique.

## **B. Milieux de culture :**

### **I. Cultures bactériennes :**

*Milieu riche liquide LB (Luria Bertani) :* Bactopeptone (10 g/l), Extraits de Levure (5 g/l), NaCl (5 g/l). Le pH à 7.5 avec du NaOH 10 N. Le milieu de culture est autoclavé 20 minutes à 120°C sous une pression de 1 bar.

*Milieu liquide LBA :* de l'ampicilline est ajoutée dans le milieu de culture LB à une concentration finale de 100 mg/l.

*Milieu liquide LBK :* de la kanamycine est ajoutée dans le milieu de culture LB à une concentration finale de 100 mg/l.

*Milieus solides :* de l'agar est ajouté au milieu à raison de 17 g/l de milieu liquide avant un autoclavage de 20 minutes à 120°C sous une pression de 1 bar.

### **II. Cultures de cellules humaines et murines :**

*Milieu riche liquide pour cellules humaines HEK 293T et HeLa :* DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté en sérum de veau fœtal (10%) (Life Technologies), 2 mg/ml de glutamine (Sigma) et des antibiotiques : pénicilline et streptomycine (respectivement 50 unités/ml et 50 mg/ml).

*Milieu riche liquide pour cellules murines ATDC5 :* DMEM/F12 supplémenté en sérum de veau fœtal (5%) (Life Technologies), en transferrine humaine (10 µg/ml) (Sigma), en sélénite de sodium  $3.10^{-8}$  M (Sigma) et en antibiotiques : pénicilline, streptomycine et amphotéricine B (respectivement 100 unités/ml, 100 µg/ml et 0,5 µg/ml).



## **C. Plasmides et vecteurs d'expression utilisés**

### **I. Le plasmide pCR2.1 (Life Technologies):**

Ce vecteur est fourni dans le kit « TA cloning » (Life Technologies <sup>TM</sup>) qui permet le clonage efficace de fragments d'ADN amplifiés par la réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction). Le principe de cette technique repose sur l'activité 3' mononucléotidyl terminal transférase de la DreamTaq polymérase (Thermo Scientific) qui ajoute une seule désoxyadénosine en 3' des fragments d'ADN amplifiés. Le vecteur est commercialisé sous forme linéarisée, déphosphorylée et possède des extrémités 5' protubérantes constituées d'une seule désoxythymidine. Les caractéristiques de ce plasmide sont présentées en Figure 38A.

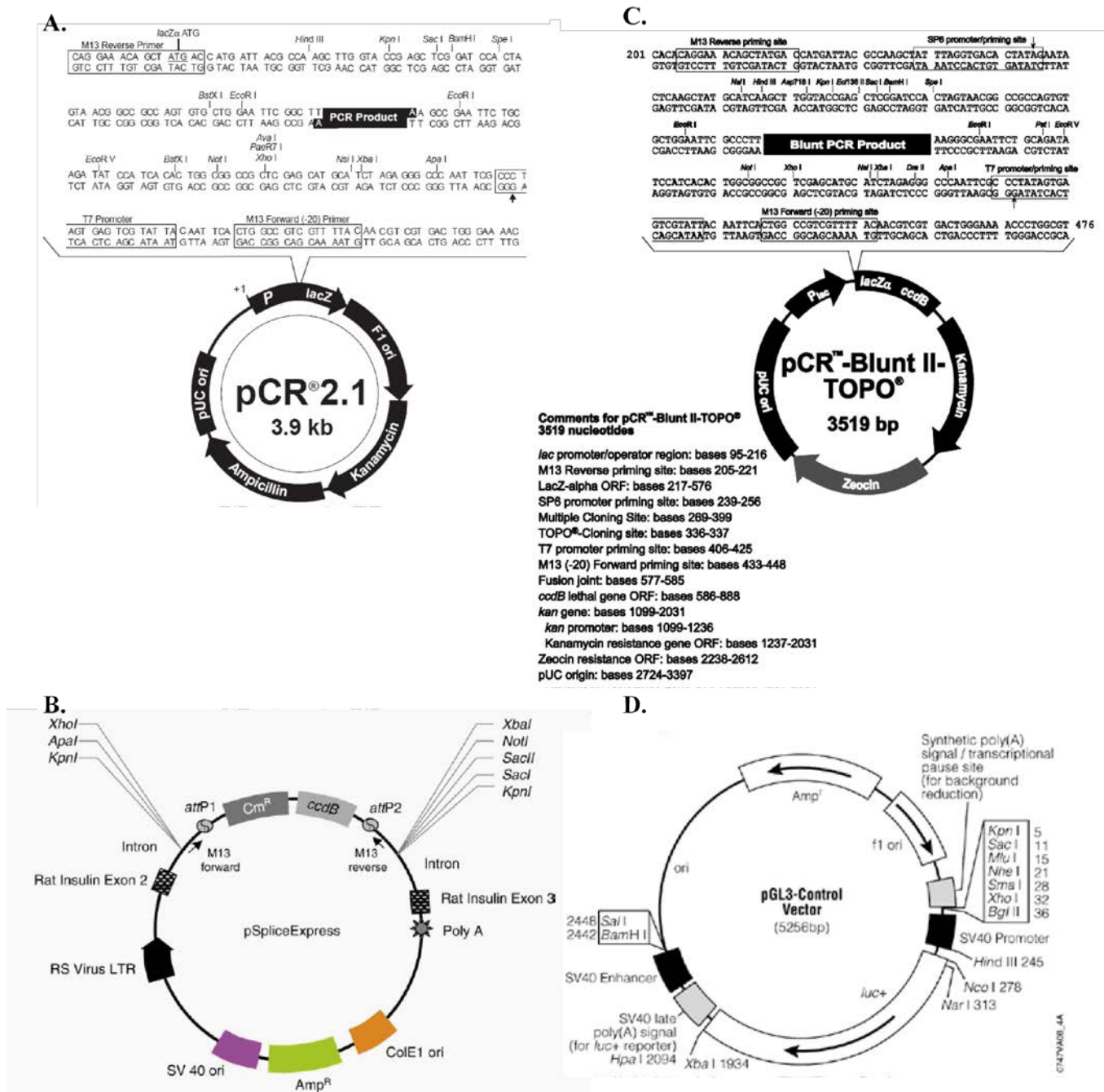
Ce plasmide contient une origine de répllication de la famille des plasmides de type pUC ainsi que les gènes permettant la résistance aux antibiotiques ampicilline et kanamycine. Une cassette de clonage est située en aval d'une portion du gène *lacZ* codant le peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase (*lacZ $\alpha$* ) et placée sous le contrôle du promoteur *Plac* de l'opéron lactose. Cette organisation génétique permet de sélectionner les vecteurs recombinants par le test de l' $\alpha$  complémentation.

### **II. Le plasmide pCR-Blunt (Life Technologies) :**

Ce plasmide est fourni dans le kit « Zero Blunt cloning kit » (Life Technologies <sup>TM</sup>) qui permet le clonage efficace de fragments d'ADN amplifiés par la réaction de PCR. Le principe de cette technique repose sur le clonage d'amplicons ADN à bouts francs. Le plasmide est linéarisé et peut être ligaturé avec des fragments d'ADN double-brin amplifiés avec des ADN polymérase qui ne possèdent pas d'activité 3' mononucléotidyl terminal transférase. Les caractéristiques de ce plasmide sont présentées en Figure 38B. Ce plasmide contient une origine de répllication de la famille des plasmides de type pUC ainsi que les gènes permettant la résistance aux antibiotiques kanamycine et zéocine. Une cassette de clonage est située en aval d'une portion du gène *lacZ* codant le peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase (*lacZ $\alpha$* ) et placée sous le contrôle du promoteur *Plac* de l'opéron lactose.

### **III. Le vecteur pSplice Express (don de Stefan Stamm)**

Ce vecteur illustré en Figure 38C. Il est classiquement utilisé dans des analyses d'évènements d'épissages alternatifs. Les exons 2 et 3 du gène de l'insuline de rat, ainsi que l'intron qui les sépare sont présents en aval du promoteur. Il m'a permis d'exprimer le minigène *C9orf3* et ses variants dans les cellules humaines. Ce vecteur navette contient l'origine de répllication





ColE1 permettant la réplication chez *E. coli* ainsi que l'origine de réplication du virus SV40 permettant la réplication dans les cellules humaines. Le gène codant la  $\beta$ -lactamase permet la sélection des bactéries recombinantes sur milieu contenant de l'ampicilline. La transcription de la séquence insérée dans la cassette de clonage est initiée par l'ARN polymérase II au promoteur RS du rétrovirus respiratoire syncytial. Une cassette de clonage portant le gène *ccdB* qui code une toxine spécifique de l'ADN gyrase bactérienne est insérée au sein de l'intron, séparant les exons 2 et 3 de l'insuline de rat, par clonage Gateway<sup>®</sup> (principe décrit en Méthodes.A.VIII. Fig. 40, page 81-1). Un signal de polyadénylation est situé en 3' de l'exon 3 du gène de l'insuline de rat (les constructions réalisées avec ce vecteur sont listées dans le tableau 3).

#### **IV. Le vecteur pGl3 control (Promega)**

Ce vecteur m'a permis d'exprimer dans des cellules humaines le gène rapporteur luciférase fusionné ou non aux région 3'UTR potentiellement ciblées par les miARN étudiés. Il contient l'origine de réplication f1 permettant la réplication chez *E. coli* ainsi que l'origine de réplication du virus SV40 permettant la réplication dans les cellules humaines. Le gène codant la  $\beta$ -lactamase permet la sélection des bactéries recombinantes sur milieu contenant de l'ampicilline. Les caractéristiques de ce plasmide sont présentées en Figure 38D. La transcription de l'ORF de la luciférase Firefly est initiée par la polymérase II au promoteur SV40. Un site de restriction *Xba*I, situé un nucléotide après le codon stop TAA de l'ORF de la luciférase (les constructions réalisées avec ce vecteur sont listées dans le tableau 4).

#### **V. Le vecteur pGl3 Basic (Promega)**

Ce vecteur correspond en tout point au pGl3 control mais ne contient aucun promoteur pour la transcription de l'ORF de la luciférase. Il permet de tester l'activité promotrice potentielle de séquences clonées entre des sites de restriction de la cassette de clonage située en amont de l'ORF de la luciférase Firefly. Dans notre étude nous avons cloné les séquences d'intérêt grâce aux sites de restriction *Kpn*I et *Bam*HI. Les caractéristiques de ce plasmide sont présentées en Figure 39A (les constructions réalisées avec ce vecteur sont listées dans le tableau 5).

#### **VI. Le vecteur pCDNA3.1 (Life Technologies)**

Ce vecteur d'expression illustré en Figure 39B a été utilisé pour surexprimer dans les cellules humaines et murines les miARN d'intérêt. Les précurseurs pré-miARN d'intérêt sont clonés





| Nom de la construction             | Description de la construction                                                                                                 |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>pSpE13-3U ou minigène WT</b>    | L'extrémité 3' de <i>C9orf3</i> a été clonée depuis les 250 derniers nt de l'intron 12 jusqu'à la fin de la région 3'UTR.      |
| <b>pSpΔCA</b>                      | Minigène WT dont la région riche en répétitions CA est tronquée                                                                |
| <b>pSpΔCAT</b>                     | Minigène WT dont les régions riches en répétitions CA et T sont tronquées                                                      |
| <b>pSpΔcluster</b>                 | Minigène WT dont le cluster miR-23b~27b~24-1 est tronqué                                                                       |
| <b>pSpΔ1</b>                       | Minigène WT dont la séquence 1 est tronquée                                                                                    |
| <b>pSpΔ3</b>                       | Minigène WT dont la séquence 3 est tronquée                                                                                    |
| <b>pSpseq1</b>                     | Variant dont seule la séquence 1 est bordée de l'exon 13 et la région 3'UTR                                                    |
| <b>pSpseq3</b>                     | Variant dont seule la séquence 3 est bordée de l'exon 13 et la région 3'UTR                                                    |
| <b>pSpseq1/seq3</b>                | Variant dont seule les séquences 1 et 3 sont bordées de l'exon 13 et la région 3'UTR                                           |
| <b>pSpseq1/seq3 seq1-105nt</b>     | Variant pSpseq1/seq3 dont la séquence 1 est raccourcie à 105nt. Les extrémités 5' et 3' sont conservées                        |
| <b>pSpseq1/seq3 seq3-105nt</b>     | Variant pSpseq1/seq3 dont la séquence 3 est raccourcie à 105nt. Les extrémités 5' et 3' sont conservées                        |
| <b>pSpseq1/seq3 seq1seq3-105nt</b> | Variant pSpseq1/seq3 dont les séquences 1 et 3 est raccourcie à 105nt. Les extrémités 5' de seq1 et 3' de seq3 sont conservées |
| <b>pSpseq1/seq3 seq1mut-3nt</b>    | Variant pSpseq1/seq3 dont 3 des nucléotides de la jonction Exon 13/pseudo intron sont mutés                                    |
| <b>pSpseq1/seq3 seq1mut-6nt</b>    | Variant pSpseq1/seq3 dont 6 des nucléotides de la jonction Exon 13/pseudo intron sont mutés                                    |
| <b>pSpseq1/seq3 seq3mut-6nt</b>    | Variant pSpseq1/seq3 dont 3 des nucléotides de l'extrémité 3' du pseudo intron sont mutés                                      |
| <b>pSpseq1/seq3 seq3mut-6nt</b>    | Variant pSpseq1/seq3 dont 6 des nucléotides de l'extrémité 3' du pseudo intron sont mutés                                      |

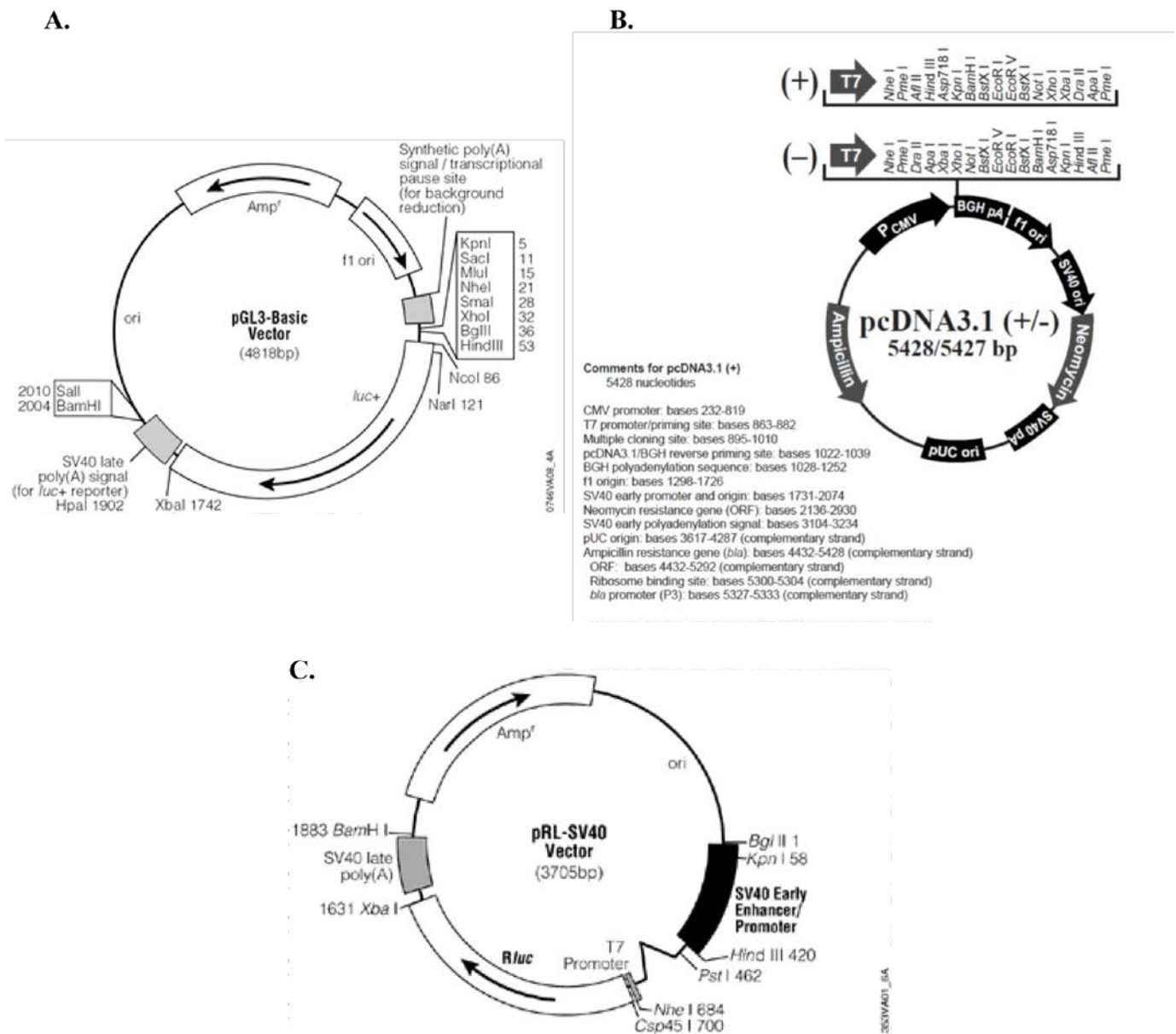
Tableau 3 : Vecteurs pSplices Express recombinants utilisés au cours de ma thèse

| Nom de la construction           | Description de la construction                                                                              |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>pGI3::ΔT-XbaI recombinant</b> | Substitution de l'exon13 par l'ORF de la luciférase dans la construction pSpseq1seq3                        |
| <b>pGI3::Col2-A1</b>             | Clonage de la 3'UTR de <i>Col2-A1</i> pleine longueur                                                       |
| <b>pGI3::Col2-A1 mutée</b>       | Clonage de la 3'UTR de <i>Col2-A1</i> mutée dans le site prédit complémentaire de la région seed de miR-29b |
| <b>pGI3::MMP13</b>               | Clonage de la 3'UTR de <i>MMP13</i> pleine longueur                                                         |
| <b>pGI3::Pit-1</b>               | Clonage de la 3'UTR de <i>Pit-1</i> pleine longueur                                                         |
| <b>pGI3::TNAP</b>                | Clonage de la 3'UTR de <i>TNAP</i> pleine longueur                                                          |
| <b>pGI3::TNAP mutée</b>          | Clonage de la 3'UTR de <i>TNAP</i> mutée dans le site prédit complémentaire de la région seed de miR-9      |

Tableau 4 : Vecteurs pGI3-control recombinants utilisés au cours de ma thèse

| Nom de la construction              | Description de la construction                                            |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>pGI3-Basic::promoteur_C9orf3</b> | Séquence du promoteur de <i>C9orf3</i> (Zhou et al., 2010)                |
| <b>pGI3-Basic::fragment_court</b>   | Clonage de la séquence du nucléotide 2926 au 3291 du minigène WT (365 pb) |
| <b>pGI3-Basic::fragment_long</b>    | Clonage de la séquence du nucléotide 436 au 3291 du minigène WT (2855 pb) |

Tableau 5 : Vecteurs pGI3-Basic recombinants utilisés au cours de ma thèse.



**Figure 39 : Représentations schématiques des plasmides utilisés (suite).**

**A.** Le plasmide pGL3-Basic a été utilisé pour tester l'activité promotrice de séquences d'ADN d'intérêt en utilisant le gène rapporteur Luciférase Firefly. **B.** Le plasmide pcDNA3.1 nous a permis d'exprimer de manière constitutive les précurseurs pré-miRNA étudiés. **C.** Le plasmide pRL-SV40 exprime un gène rapporteur codant la luciférase Rénilla et a été utilisé dans les tests de validation de cible miRNA/ARNm. L'activité de la luciférase Rénilla a été utilisée pour normaliser les données des expériences de test Luciférase.



entre les sites de restriction *KpnI* et *BamHI*. Ce vecteur contient l'origine de réplication pUC *ori* permettant la réplication chez *E. coli* ainsi que l'origine de réplication du virus SV40 permettant la réplication dans les cellules humaines. Ce plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline et le promoteur CMV permet la transcription des séquences clonées au sein du vecteur (les constructions réalisées avec ce vecteur sont listées dans le tableau 6).

## **VII. Le vecteur pRL-SV40 (Promega)**

Ce vecteur d'expression de la luciférase Rénilla a été utilisé comme normalisateur des tests rapporteurs luciférase. Il est illustré en Figure 39C. En effet l'ORF codant la Luciférase Rénilla est transcrite de manière constitutive par l'ARN polymérase II à partir du promoteur SV40. Ce vecteur porte le gène codant la  $\beta$ -lactamase permettant la résistance à l'ampicilline.

## **D. Oligodésoxynucléotides :**

(cf. tableaux 7 et 8)



| Nom de la construction   | Description de la construction                                      |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pCDNA3.1::pré-miR-27b    | La séquence de pré-miR-27b est clonée                               |
| pCDNA3.1::pré-miR-29b    | La séquence de pré-miR-29b est clonée                               |
| pCDNA3.1::pré-miR-9      | La séquence de pré-miR-9-3 est clonée                               |
| pCDNA3.1::pré-miR-9 muté | La séquence de pré-miR-9-3 dont la région seed est mutée est clonée |
| pCDNA3.1::pré-miR-let7e  | La séquence de pré-miR-let7e est clonée                             |
| pCDNA3.1::pré-miR-199    | La séquence de pré-miR-let7e est clonée                             |

**Tableau 6 : Vecteurs pCDNA3.1 recombinants utilisés au cours de ma thèse.**



| Numéro    | Séquence de 5' vers 3'                                   | Orientation | Utilisation                                                                                                                                               |                                                            |
|-----------|----------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>67</b> | <b>GTTTCCAGTCACGAC</b>                                   | <b>sens</b> | <b>Séquençage du plasmide pCR2.1. Complémentaire aux positions 389 à 404 du plasmide.</b>                                                                 | Séquençages                                                |
| 122       | CAGGAAACAGCTATGAC                                        | antisens    | Séquençage du plasmide pCR2.1. Complémentaire aux positions 205 à 221 du plasmide.                                                                        |                                                            |
| 967       | TAATACGACTCACATAGGG                                      | sens        | Séquençage du plasmide pCR2.1. Complémentaire aux positions 363 à 383 du plasmide.                                                                        |                                                            |
| 7160      | TGTAACAGCAGCGCCAGTTCAGGAAA CAGCTATGACC<br>TTTTTTNNNN     | antisens    | Amorce de transcription inverse poly-dT.                                                                                                                  | RT                                                         |
| 7145      | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGG<br>ATACGACGGTAAT   | sens        | Amorce de RT tige-boucle spécifique du miRNA 23b mature                                                                                                   | Analyse de la production des microRNA                      |
| 7152      | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGG<br>ATACGACGCAGAA   | sens        | Amorce de RT tige-boucle spécifique du miRNA 27b mature                                                                                                   |                                                            |
| 7157      | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGG<br>ATACGACCTGTTC   | sens        | Amorce de RT tige-boucle spécifique du miRNA 24-1 mature                                                                                                  |                                                            |
| 7293      | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGG<br>ATACGACTCAACA   | sens        | Amorce de RT tige-boucle spécifique du miRNA 21 mature                                                                                                    |                                                            |
| 7159      | CAGTGCAGGGTCCGAGGTATT                                    | antisens    | Analyse par PCR des produits de réaction de RT tige-boucle.                                                                                               |                                                            |
| 7292      | CGCGCGGATCACATTGCCA                                      | sens        | Analyse par PCR de l'expression du miRNA 23b. Utilisé avec l'amorce 7159                                                                                  |                                                            |
| 7229      | GGGCGCTTCACAGTGCTAAG                                     | sens        | Analyse par PCR de l'expression du miRNA 27b. Utilisé avec l'amorce 7159                                                                                  |                                                            |
| 7230      | GGCGCTGCTCAGTTCAG                                        | sens        | Analyse par PCR de l'expression du miRNA 24-1. Utilisé avec l'amorce 7159.                                                                                |                                                            |
| 7294      | GGGCGTAGCTTATCAGACTGA                                    | sens        | Analyse par PCR de l'expression du miRNA 21. Utilisé avec l'amorce 7159.                                                                                  |                                                            |
| 7149      | CAAGGTCGTGGTTGCGTGGTAA                                   | sens        | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située au sein du pré-miRNA 23b.                        |                                                            |
| 7151      | CACCTTCTCTTCAGGTGCAGAAC                                  | sens        | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située au sein du pré-miRNA 27b.                        |                                                            |
| 7158      | TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG                                   | antisens    | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située au sein du miRNA 24-1.                           |                                                            |
| 7161      | CCAGGTGGTGGCCGAATGTTATT                                  | antisens    | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située en 3' de l'exon 13.                              | Analyse de la maturation et de la terminaison 3' de C9orf3 |
| 7162      | CCAGGCTCCCATTCATCTCT                                     | sens        | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située en aval de l'exon 13.                            |                                                            |
| 7378      | GGTCCAGTCTTCAGGGTCAC                                     | antisens    | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située en amont de la séquence CA repeat.               |                                                            |
| 7379      | GCACACATGGTCTCTGACTC                                     | sens        | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située en aval de la séquence TT repeat.                |                                                            |
| 7380      | CAGTGCAGGGCTCATAATAG                                     | antisens    | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située en amont du cluster des gènes des miR d'intérêt. |                                                            |
| 7381      | CGATGGCTTATGCAGCCACAT                                    | sens        | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située en 5' de la région 3'UTR.                        |                                                            |
| 7382      | GCCCACTGGTCTCATAAGAG                                     | sens        | Analyse de l'évènement de maturation de la séquence entre l'exon 13 et la 3'UTR de C9orf3. Amorce située en 3' de la région 3'UTR.                        |                                                            |
| 7149      | CAAGGTCGTGGTTGCGTGGTAA                                   | sens        | Amplification de la séquence C9orf3 d'intérêt par PCR à partir de l'ADNg de HeLa.                                                                         |                                                            |
| 7383      | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGTGTCTGT<br>CACCAGTGAATCTGTCAGA | antisens    | Fabrication minigène. Il apporte en 5' la séquence nécessaire pour la recombinaison dans le pSplice Express.                                              |                                                            |
| 7384      | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACAAAA<br>AAAAAATCCATTACATT | sens        | Fabrication minigène. Il apporte en 3' la séquence nécessaire pour la recombinaison dans le pSplice Express.                                              | Fabrication du minigène                                    |
| 7442      | TTACCA CGCAACCCAGACCTTG                                  | antisens    | Amplification de la séquence C9orf3 d'intérêt par PCR à partir de l'ADNg de HeLa.                                                                         |                                                            |
| 7147      | TACCTCTAGGATGCCA ACTA AACG                               | antisens    | Utilisé comme amorce spécifique pour la transcription inverse du transcrit antisens au gène <i>mR23b</i> .                                                |                                                            |
| 7149      | CAAGGTCGTGGTTGCGTGGTAA                                   | sens        | Utilisé comme amorce PCR pour la détection du transcrit antisens au gène <i>mR23b</i> .                                                                   | Antisens 23b                                               |

Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.



| Número      | Séquence de 5' vers 3'                          | Orientation     | Utilisation                                                                                                                                                                              |                                                                      |
|-------------|-------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| VS45        | GTCGGGGCGGCGGCCG                                | antisens        | Amorce permettant de linéariser le plasmide pG13 Control à l'extrémité 3' de l'ORF de la luciférase. Le site XbaI est déplié.                                                            | Construction<br>hétérologue                                          |
| VS46        | TTACACGGCGATCTTTCCGC                            | sens            | Amorce permettant de linéariser le plasmide pG13 Control à l'extrémité 3' de l'ORF de la luciférase. Le site XbaI est déplié.                                                            |                                                                      |
| VS47        | aagatcgccgtgtaaCGAGGTGATTCTCTCCC                | sens            | Amorce amplifiant la séquence seq1/seq3 3'UTR apportant une séquence complémentaire de l'extrémité 3' de l'ORF de la luciférase pour une recombinaison "à façon".                        |                                                                      |
| VS48        | ggggcgccggagacTACAAAAAAAATCC                    | antisens        | Amorce amplifiant la séquence seq1/seq3 3'UTR apportant une séquence complémentaire de la séquence en aval de l'extrémité 3' de l'ORF de la luciférase pour une recombinaison "à façon". |                                                                      |
| 8900        | TAATACGACTCACTATAGGGGCCATGGGTG<br>TGTACCTCTACGG | sens            | Amorce apportant la séquence du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7, en amont de la séquence de l'exon 13 de C9orf3                                                                | Transcription<br>in vitro                                            |
| 7381        | CGATGGCTTTAGCAGCCACAT                           | antisens        | Amorce complémentaire de la région 3'UTR de C9orf3                                                                                                                                       |                                                                      |
| 7961        | CTCAGCTCAGGTGCTCTGGCTGC                         | sens            | Amorce apportant le site MluI et complémentaire de l'extrémité 5' de pré-miR-23b                                                                                                         | Recherche de<br>promoteur alternatif                                 |
| 8952        | GGGCTCGAGGGCGGGTCCAATCG                         | antisens        | Amorce apportant le site XhoI et complémentaire des nucléotides précédant le pré-miR-24-1                                                                                                |                                                                      |
| 9150        | GGGACGGGTGTGATTCTCTCCCTTTCC                     | sens            | Amorce apportant le site MluI et complémentaire de l'extrémité 5' de la séquence 1                                                                                                       |                                                                      |
| 9410        | GGGACGGGTGTGAGCTAGCAGGGTGATGTT                  | sens            | Amorce apportant le site MluI permettant le clonage du promoteur de C9orf3 humain                                                                                                        |                                                                      |
| 9411        | GGGCTCGAGACAGGGAGCGAACAGGTTA                    | antisens        | Amorce apportant le site XhoI permettant le clonage du promoteur de C9orf3 humain                                                                                                        |                                                                      |
| 7146        | GCGCATCACATGCCAGGGAATTA                         | sens            | Amorce de PCR utilisée au cours de la détection du transcrit antisens                                                                                                                    | Caractérisation d'un<br>transcrit antisens au gène<br>codant miR-23b |
| 7147        | TACCTCTAGGATGCCAATAAACG                         | antisens        | Amorce de transcription inverse et de PCR (kit GeneRacer) utilisée pour la détection du transcrit antisens.                                                                              |                                                                      |
| 7148        | CTCAGGTGCTCTGGCTGCTT                            | antisens        | Amorce de transcription inverse utilisée au cours de l'expérience de RACE PCR par circularisation des ARN                                                                                |                                                                      |
| 7149        | CAAGGTGTGGTTGCGTGTAA                            | sens            | Amorce de PCR utilisée au cours de la détection du transcrit antisens                                                                                                                    |                                                                      |
| 7442        | TTACACGCAACACGACCTTG                            | sens            | Amorce de PCR utilisée au cours de la détection du transcrit antisens                                                                                                                    |                                                                      |
| 8354        | GCCCTCACGCTGTTATGCTA                            | antisens        | Amorce de PCR utilisée au cours de la détection du transcrit antisens                                                                                                                    |                                                                      |
| 7546        | GACGGTACCACTCTCTAACAAGGTGC                      | sens            | Amorce apportant le site KpnI permettant le clonage de pré-miR-27b dans pCDNA 3.1                                                                                                        | Recherche de cibles de<br>cibles de microARN candidats               |
| 7547        | GACGGATCCCACTTCTCTCAGGTG                        | antisens        | Amorce apportant le site XhoI permettant le clonage de pré-miR-27b dans pCDNA 3.1                                                                                                        |                                                                      |
| 7550        | GACGGTACCTCTCAGGAAGCTGGT                        | sens            | Amorce apportant le site KpnI permettant le clonage de pré-miR-29b dans pCDNA 3.1                                                                                                        |                                                                      |
| 7551        | GACGGATCCCCCAAGAACACTG                          | antisens        | Amorce apportant le site XhoI permettant le clonage de pré-miR-29b dans pCDNA 3.1                                                                                                        |                                                                      |
| VS59        | GACGGTACCCCCGGGTGAGGTA                          | sens            | Amorce apportant le site KpnI permettant le clonage de pré-miR-let7e dans pCDNA 3.1                                                                                                      |                                                                      |
| VS60        | GACGGATCCCTGGGAAAGCTAGGA                        | antisens        | Amorce apportant le site XhoI permettant le clonage de pré-miR-let7e dans pCDNA 3.1                                                                                                      |                                                                      |
| VS65        | GACGGTACCGGAGGCCCTTTCTC                         | sens            | Amorce apportant le site KpnI permettant le clonage de pré-miR-9 dans pCDNA 3.1                                                                                                          |                                                                      |
| VS66        | GACGGATCCTGAGAATCACTTCTACTTTGG<br>G             | antisens        | Amorce apportant le site XhoI permettant le clonage de pré-miR-9 dans pCDNA 3.1                                                                                                          |                                                                      |
| 7663        | GACTCTAGATAACCGTATGTTCGCGTCA                    | sens            | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de MMP13 dans le pG13 control                                                                                     |                                                                      |
| 7664        | TAGTCTAGACAGACCATGTGTCCCAATTG                   | antisens        | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de MMP13 dans le pG13 control                                                                                     |                                                                      |
| 7526        | GACTCTAGAGGACCAAGTACTTTCCA                      | sens            | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de Col2a1 dans le pG13 control                                                                                    |                                                                      |
| 7527        | GGCCGTCTAGATGTACTTTCCAATAATCT                   | antisens        | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de Col2a1 dans le pG13 control                                                                                    |                                                                      |
| 9471        | AAGGGGACCCAGAATGTTTCTGTGCGG<br>CCCACTC          | sens            | Amorce permettant de muter les nucléotides de la région seed de miR-9 en leur nucléotides complémentaires                                                                                |                                                                      |
| 9472        | GAGGTGGGCGGAGAGAAACCATTCTTGG<br>GTCCCTT         | antisens        | Amorce permettant de muter les nucléotides de la région seed de miR-9 en leur nucléotides complémentaires                                                                                |                                                                      |
| 9473        | GAGGCGCGTTTCTTACCAAGTATCTAGC<br>TGATGA          | sens            | Amorce permettant de muter les nucléotides complémentaires de la région seed de miR-9, présents au sein de la région 3'UTR de TNAP, en leur nucléotides complémentaires                  |                                                                      |
| 9474        | TCATACAGCTAGATCTTTGGTAGAGAAAC<br>GGGCCTC        | antisens        | Amorce permettant de muter les nucléotides complémentaires de la région seed de miR-9, présents au sein de la région 3'UTR de TNAP, en leur nucléotides complémentaires                  |                                                                      |
| VS21        | GACTCTAGAAGCTGTTTGAGATTAA                       | sens            | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de Pit-1 dans le pG13 control                                                                                     |                                                                      |
| VS22        | TAGTCTAGAAATTTCTAAAACTGTAGGC                    | antisens        | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de Pit-1 dans le pG13 control                                                                                     |                                                                      |
| VS23        | GACTCTAGAGGGCCAGGGCCCGG                         | sens            | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de TNAP dans le pG13 control                                                                                      |                                                                      |
| VS24        | TAGTCTAGATGTCCTCGGAAATAT                        | antisens        | Amorce apportant le site XbaI permettant le clonage de la région 3'UTR de TNAP dans le pG13 control                                                                                      |                                                                      |
| 7161        | CCAGGTGGTGGCCGAAATGTTAAT                        | sens            | Amorce utilisée en RT-qPCR SYBR Green pour détecter le pré-ARNm C9orf3                                                                                                                   | PCR quantitative                                                     |
| 7887        | CTCGCTTCGGCAGCAC                                | sens            | Amorce utilisée en RT-qPCR SYBR Green pour détecter le snRNA U6                                                                                                                          |                                                                      |
| 7888        | AACGCTTCAGCAATTTGCGT                            | antisens        | Amorce utilisée en RT-qPCR SYBR Green pour détecter le snRNA U6                                                                                                                          |                                                                      |
| VS33        | AAAGGAGTATCTGGTTAGAAC                           | antisens        | Amorce utilisée en RT-qPCR SYBR Green pour détecter le pré-ARNm C9orf3                                                                                                                   |                                                                      |
| VS51        | CCATCGGTGGTGTGAATCT                             | sens            | Amorce utilisée en RT-qPCR SYBR Green pour détecter l'ARNm C9orf3 mature                                                                                                                 |                                                                      |
| VS52        | ATCAGCTCCCGTAGAGGTA                             | antisens        | Amorce utilisée en RT-qPCR SYBR Green pour détecter l'ARNm C9orf3 mature                                                                                                                 |                                                                      |
| miR-23b     | Applied Biosystem                               | sens & antisens | Utilisation des amorces de transcription inverse et d'amorces PCR de la technique RT-qPCR TaqMan                                                                                         |                                                                      |
| miR-27b     | Applied Biosystem                               | sens & antisens | Utilisation des amorces de transcription inverse et d'amorces PCR de la technique RT-qPCR TaqMan                                                                                         |                                                                      |
| miR-24      | Applied Biosystem                               | sens & antisens | Utilisation des amorces de transcription inverse et d'amorces PCR de la technique RT-qPCR TaqMan                                                                                         |                                                                      |
| pri-miR-23b | Applied Biosystem                               | sens & antisens | Utilisation des amorces de transcription inverse et d'amorces PCR de la technique RT-qPCR TaqMan                                                                                         |                                                                      |
| pri-miR-27b | Applied Biosystem                               | sens & antisens | Utilisation des amorces de transcription inverse et d'amorces PCR de la technique RT-qPCR TaqMan                                                                                         |                                                                      |
| pri-miR-24  | Applied Biosystem                               | sens & antisens | Utilisation des amorces de transcription inverse et d'amorces PCR de la technique RT-qPCR TaqMan                                                                                         |                                                                      |

Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail (suite).



# Méthodes

## **A. Méthodes de génie génétique**

### **I. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR**

La réaction d'amplification est réalisée à partir de 25-75 ng de matrice ADN dans un volume de 20 µl contenant 1,25 UE d'ADN polymérase DreamTaq (Thermo Scientific) ou 2.5 UE d'ADN polymérase Phusion (Thermo Scientific), 100 µmoles de chaque oligodésoxyribonucléotides (amorces), 0.2 mM de chacun des quatre dNTP, le tout dans le tampon commercial approprié à chacune des ADN polymérases (tampon Green<sup>®</sup> DreamTaq (Thermo Scientific) ; tampon Phusion GC + DMSO (3 % final) (Thermo Scientific).

Les réactions de PCR ont été réalisées en thermocycleur à l'aide d'un programme d'amplification comprenant : une dénaturation initiale de 5 min à 95°C suivie de 25 à 35 cycles [dénaturation 94°C, 30 sec ; hybridation à une température dépendant du T<sub>m</sub> des amorces, 30 sec ; et élongation 72°C durant un temps variant de 30 s à 10 min et dépendant de la taille du fragment à amplifier et de la capacité d'élongation de l'enzyme] suivi d'une élongation terminale de 10 min à 72°C.

### **II. Visualisation des produits PCR par électrophorèse :**

Les molécules d'ADN sont fractionnées sur gel d'agarose (concentration de 0,8 à 2%) contenant du GelRed<sup>™</sup> dans un tampon de migration (TBE 0,5X : EDTA 1mM, Tris Borate 44,5 mM pH 8,3) par application d'un champ électrique d'une tension variant entre 50 à 100 V suivant la taille du gel. La visualisation s'effectue sous exposition aux UltraViolets (UV).





### **III. Purification de produits PCR en vue d'un clonage**

Les produits PCR destinés à être clonés sont directement extraits du gel d'électrophorèse, purifiés et concentrés à l'aide du kit GeneJet (Thermo Scientific).

### **IV. Digestions enzymatiques des inserts à cloner**

L'orientation du clonage des précurseurs de miARN étudiés dans le vecteur d'expression pCDNA3.1 a été dirigée par le choix des sites de restriction. Ces précurseurs de miARN ont d'abord été amplifiés par PCR en utilisant des amorces apportant les sites de restrictions *Bam*HI et *Kpn*I. 5 µg d'amplicons ont été incubés dans un mélange réactionnel contenant 5 U d'enzyme *Bam*HI et 10 U d'enzyme *Kpn*I et le tampon *Bam*HI (composition 1X finale : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 37°C), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0.02 % Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA).

Les régions 3'UTR ont été clonées dans le vecteur d'expression pGI3-Control selon la même démarche que précédemment. Les séquences d'intérêt ont été amplifiées par PCR en utilisant des amorces apportant le site de restriction *Xba*I. 5 µg d'amplicons ont été incubés dans un mélange réactionnel contenant 5 U d'enzyme *Xba*I et le tampon Tango (composition 1X finale : 33mM Tris-acétate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Mg-acétate, 66 mM K-acétate and 0.1 mg/mL BSA).

Pour tester les activités potentiellement promotrices de la transcription de séquences d'intérêt de *C9orf3*, nous les avons clonées au sein du vecteur d'expression pGI3-Basic. Ces différentes régions de l'extrémité 3' de *C9orf3* ont été amplifiées en utilisant des amorces apportant les sites de restriction *Mlu*I et *Xho*I. 5 µg d'amplicons ont été incubés dans un mélange réactionnel contenant 5 U d'enzyme *Mlu*I et 5 U d'enzyme *Xho*I et le tampon R (composition 1X finale : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 37°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA).

Ces réactions de digestions enzymatiques ont été effectuées dans un volume final de 50 µl et incubées à 37°C pendant 2 heures.

### **V. Clonage de fragment d'ADN dirigé par des sites d'enzymes de restriction**

Au préalable, les vecteurs ont été digérés par les enzymes de restriction générant des extrémités compatibles avec les extrémités des inserts à cloner en orientation sens (pCDNA 3.1 → *Bam*HI et *Kpn*I ; pGI3 Control → *Xba*I ; pGI3 Basic → *Mlu*I et *Xho*I). Ces vecteurs digérés ont été traités par une incubation en présence d'une phosphatase alcaline FastAP



(Thermo Scientific) et du tampon approprié (composition 1X finale : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 37°C), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100 and 0,1 mg/mL BSA).

Les clonages ont été réalisés par la ligation de 30 ng de vecteur digéré et déphosphorylé avec 5 à 50 ng d'insert. Ces ligatures ont été catalysées par 1 UE de T4 ADN ligase (ThermoScientific), le tout dans le tampon de ligation (Tris-HCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM (pH 7.8 à 25°C)).

Les séquences des clones obtenus ont été vérifiées par séquençage.

## **VI. Clonage T/A d'un fragment d'ADN double brin amplifié par PCR**

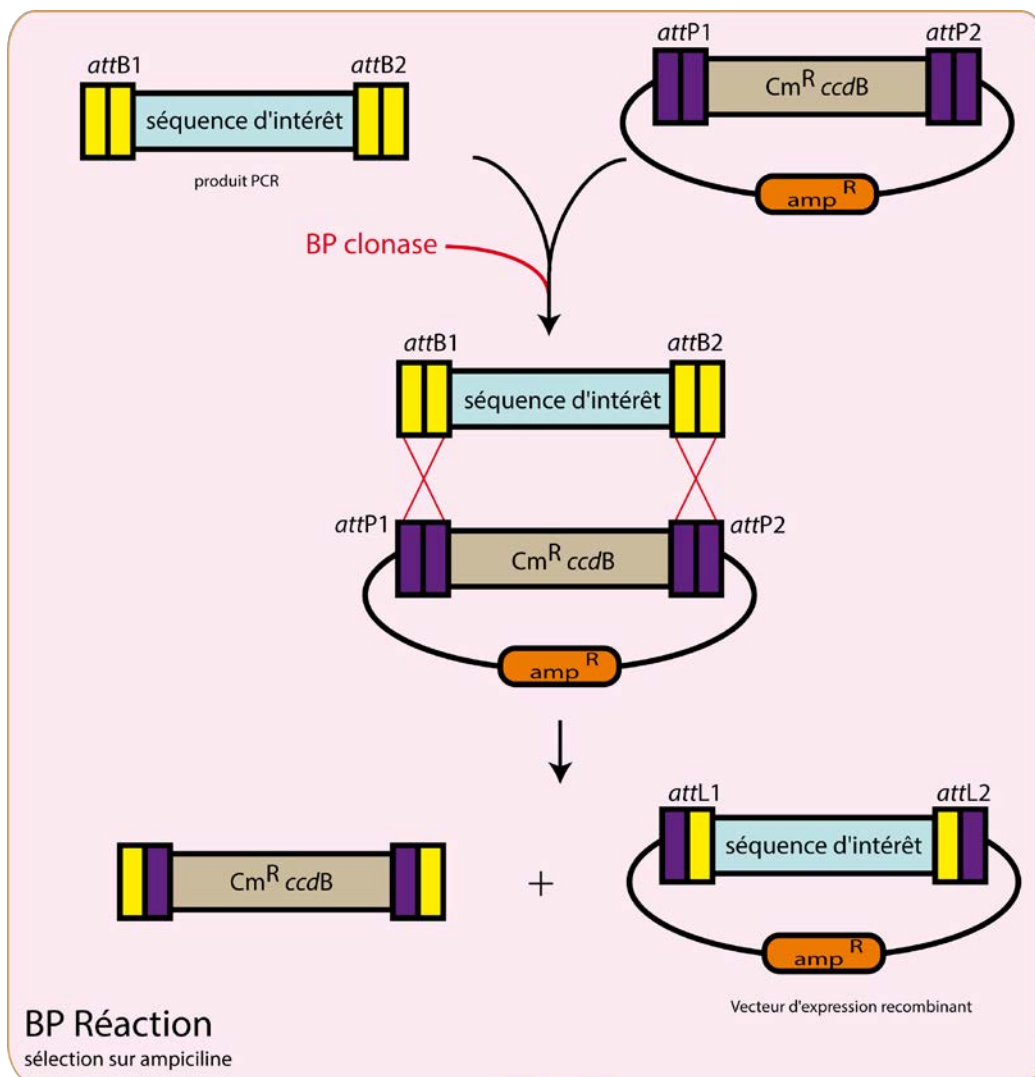
Les amplicons obtenus au cours des expériences de RT-PCR ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 en vue d'un séquençage. La ligation des produits de PCR portant à leurs extrémités 3' un résidu A protubérant suite à leur amplification par l'ADN polymérase DreamTaq sont réalisés dans le vecteur pCR2.1 par incubation une nuit à 16°C d'un mélange réactionnel de 10 µl contenant 12,5 ng de vecteur, 7,5 µl de produit du mélange réactionnel de PCR, 1 UE de T4 ADN ligase (ThermoScientific), le tout dans le tampon de ligation décrit ci-dessus. La totalité du mélange est ensuite utilisée pour transformer des cellules DH5α compétentes.

## **VII. Clonage « bout franc » d'un fragment d'ADN double brin amplifié par PCR**

Les amplicons obtenus au cours des expériences de RT-PCR ont été clonés dans le vecteur pCR-Blunt en vue d'un séquençage. La ligation des produits de PCR amplifiés par l'ADN polymérase à haute fidélité Phusion dans le vecteur pCR-Blunt est réalisée par incubation une nuit à 16°C d'un mélange réactionnel de 10 µl contenant 12,5 ng de vecteur, 7,5 µl de produit du mélange réactionnel de PCR, 1 UE de T4 ADN ligase (ThermoScientific), le tout dans le tampon de ligation (Tris-HCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM (pH 7.8 à 25°C)). La totalité du mélange est ensuite utilisée pour transformer des cellules DH5α compétentes.

## **VIII. Clonage par recombinaison par la technique Gateway<sup>TM</sup>**

Le minigène pSpmiE13-3U a été construit par clonage Gateway<sup>TM</sup> (Invitrogen) de l'extrémité 3' de l'ORF de *C9orf3* dans le vecteur d'expression pSplice Express (Figure 40). Le principe de cette technologie de clonage repose sur les réactions de recombinaison permettant l'intégration et l'excision du phage lambda dans le génome d'*E.coli*. Une



**Figure 40 : Principe du système de clonage par recombinaison Gateway®.**

Cette technique repose sur l'utilisation des séquences permettant la recombinaison spécifique du bactériophage lambda dans le génome d'*E. coli*. Celle-ci s'effectue entre les séquences des sites *attP1* et *attP2* du bactériophage lambda et les séquences des sites *attB1* et *attB2* d'*E. coli*. La réaction de recombinaison s'effectue entre une séquence d'ADN double brin bordée par les sites *attB1* et *attB2* avec un vecteur circulaire donneur contenant une cassette de recombinaison bordée par les sites *attP1* et *attP2*. Cette réaction est catalysée par un mélange d'enzymes BP Clonase® (Life Technologies).



recombinaison (dite réaction « BP ») est réalisée entre les sites *attB1* et *attB2* présents aux extrémités du produit PCR et les sites *attP1* et *attP2* du vecteur d'intérêt (pSplice Express) permettant l'élimination de l'ORF *ccdB* et le clonage directionnel du produit PCR. La recombinaison est réalisée par incubation une nuit à 25°C d'un mélange réactionnel de 5 µl contenant 150 ng de produit PCR, 150 ng de vecteur pSplice Express, 1 µl de mélange BP Clonase<sup>®</sup> enzyme et de tampon TE (Tris-EDTA pH8). La réaction est arrêtée par l'ajout de 0,5 µl de Protéinase K (20 mg / ml) et une incubation à 37°C pendant 30 minutes.

Des bactéries DH5α sont transformées par le mélange réactionnel. Seules les bactéries ayant reçu un plasmide contenant un vecteur recombinant seront sélectionnées. Les cellules DH5α ayant été transformées par le vecteur pSplice Express non recombinant ne peuvent survivre compte tenu de leur sensibilité à l'effet toxique du produit du gène *ccdB*.

### **IX. Délétion de séquences au sein d'un plasmide**

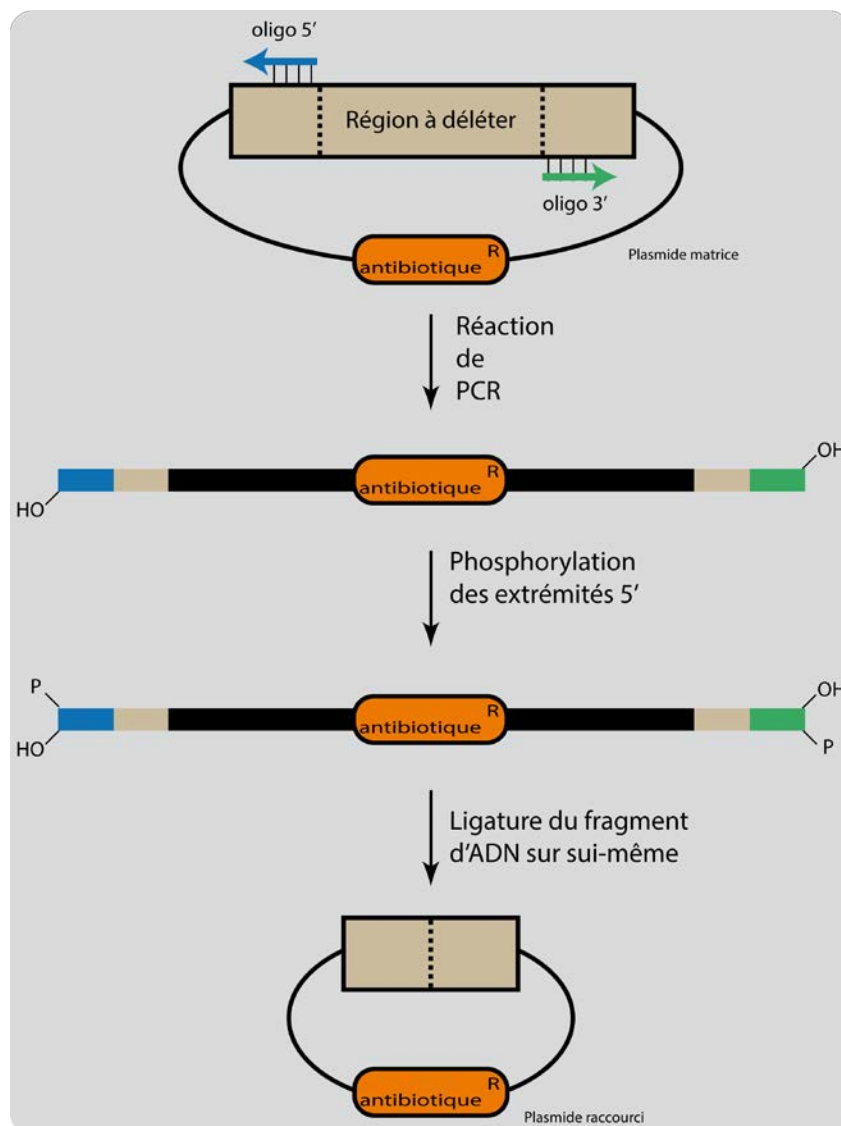
La délétion des séquences au sein des minigènes a été réalisée par PCR. Des oligonucléotides ont été choisis de sorte à border en antisens la région d'ADN à déléter (Figure 41).

Ces oligonucléotides permettent d'amorcer une réaction de PCR à partir de 200 ng d'une matrice d'ADN plasmidique. Le produit de la réaction de PCR, un fragment d'ADN double brin correspondant au plasmide raccourci linéarisé, est alors phosphorylé à ses extrémités 5' grâce à une enzyme PNK (1 U) en présence d'ATP. Les extrémités du fragment d'ADN sont alors compatibles avec une réaction de religature du plasmide sur lui même. Les mêmes conditions de ligature indiquées précédemment ont été réalisées. Des cellules DH5α compétentes ont été transformées par les plasmides ligaturés sur eux-mêmes, puis mises en culture sur milieu LB solide complémenté avec l'antibiotique adéquat. Les séquences des clones obtenus ont été vérifiées par séquençage.

### **X. Minipréparation et Maxipréparation d'ADN plasmidique**

#### **1. Minipréparation d'ADN plasmidique :**

2 ml de milieu liquide LBA sontensemencés par des cellules d'*E.coli* DH5α recombinantes. Les cultures sont agitées à 37°C sur la nuit jusqu'à une croissance à saturation. L'ADN plasmidique est extrait par la méthode de lyse alcaline (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989).



**Figure 41 : Stratégie de délétion de séquence au sein d'un plasmide d'intérêt.**

La délétion de la séquence délimitée par les traits pointillés est réalisée par PCR. Les deux amorces de PCR illustrées par les flèches bleues et vertes bordent la région à invalider et permettent son omission au cours de l'amplification du plasmide. Les oligonucléotides n'étant pas phosphorylés en leur extrémité 5', le produit d'amplification doit être phosphorylé afin de rendre compatibles ses extrémités 5' avec une réaction de ligation. Après la réaction de ligation du fragment d'ADN sur lui-même, on obtient le plasmide raccourci souhaité.



## 2. Maxipréparation d'ADN plasmidique :

Les préparations d'ADN plasmidique à plus grande échelle sont réalisées avec le kit « Plasmid Maxi Kit» (QIAGEN) selon les conditions indiquées par le fabricant à partir de 200 ml de milieu liquide sélectif (LB + antibiotique) inoculés par des cellules d'*E.coli* DH5 $\alpha$  recombinantes. Les cultures sont agitées à 37°C sur la nuit jusqu'à une croissance à saturation. *La quantité et la qualité des préparations plasmidiques obtenues sont systématiquement vérifiées par spectrométrie (mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm) et par un dépôt sur gel d'électrophorèse.*

## **XI. Séquençage des ADN plasmidique**

Le séquençage des ADN plasmidique a été effectué par une société de service : GATC (Constance-Allemagne). Il nous a permis de vérifier les séquences nucléotidiques des constructions génétiques et des produits de RT-PCR effectués.

## **B. Méthodes de cultures**

### **I. Cultures bactériennes**

Un milieu riche LB liquide est inoculé avec des bactéries. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation jusqu'à saturation. Les cellules sont culotées par centrifugation à 13200 rpm pendant 1 minute.

### **II. Transformation bactérienne**

Les cellules *E. coli* (DH5 $\alpha$  ou DB3.1) sont transformées par les plasmides pCR2.1 recombinants par choc thermique. Pour cela 50  $\mu$ l de cellules compétentes à la transformation par traitement au CaCl<sub>2</sub> 50 mM sont mises en présence de 1  $\mu$ g de plasmide d'intérêt. Le mélange est incubé 30 minutes à 4°C dans la glace avant d'être placé 45 secondes à 42°C puis replacé dans la glace pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite étalées sur milieu sélectif.

### **III. Cultures de lignées humaines**

Les cellules des lignées humaines sont cultivées dans le milieu DMEM. Les cellules sont cultivées en boîtes de 10 cm de diamètre et placées dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère humide et à 5% CO<sub>2</sub>. Une fois à confluence (70-90% environ), les cellules sont lavées avec le tampon PBS 1X (NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) puis incubées 5 minutes avec 1 ml de trypsine-EDTA (0,5%) (Invitrogen) à 37°C pour faciliter le décrochage des cellules de leur support. L'activité enzymatique de la trypsine



est arrêtée par ajout de 1 ml de milieu DMEM. Les cellules en suspension sont comptées sur cellule de Malassez (la moyenne du nombre de cellules présentes dans 3 lignes de la cellule est prise en compte).

#### **IV. Traitement de cellules à l'interleukine 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

La perte de phénotype de chondrocytes différenciés a été induite par un traitement à l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), par l'équipe 4 du laboratoire IMoPA en collaboration avec David Moulin et Meriem Koufany (Cailotto et al. 2010). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, sous une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>, pendant 48 heures.

#### **V. Différenciation de chondrocytes murins (ATDC5)**

Les cellules chondrocytaires ATDC5 ont été différenciées et menées jusqu'à l'hypertrophie et la minéralisation cellulaire, par l'équipe 4 du laboratoire IMoPA en collaboration avec Arnaud Bianchi (S.-G. Hwang et al. 2004).

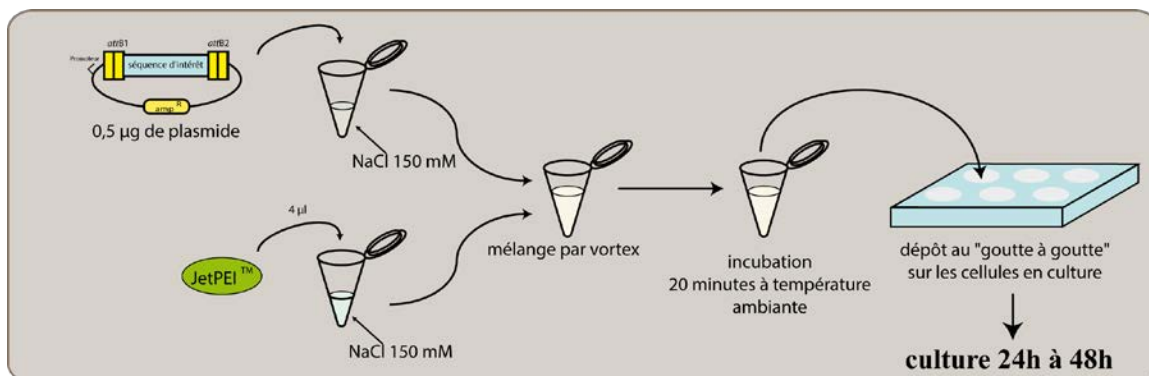
#### **VI. Transfection de cellules humaines par un plasmide au réactif JetPEI™**

Les cellules HEK 293T ou HeLa ont été transfectées par les constructions plasmidiques en utilisant l'agent de transfection JetPEI (PolyPlus Transfection) (Figure 42). 3 ml de milieu DMEM sontensemencés avec 300 000 cellules dans des plaques de 6 puits (3,5 cm de diamètre). Après 24-1 heures, les cellules sont transfectées à l'aide du kit JetPEI. Pour chaque réaction de transfection, 0,5  $\mu$ g de plasmide sont dilués dans 100  $\mu$ l de NaCl (150 mM) d'une part, et 4  $\mu$ l de JetPEI sont dilués dans 100  $\mu$ l de NaCl (150 mM) d'autre part. Ces deux dilutions sont mélangées puis incubées 20 minutes à température ambiante. Le mélange est réparti au « goutte à goutte » sur les cellules en culture. Après 48 heures de culture, les cellules sont lavées dans du tampon PBS, puis récoltées à l'aide d'une spatule stérile dans 500  $\mu$ l de PBS 1X puis culotées.

#### **VII. Transfection de cellules humaines par un siARN au phosphate de calcium**

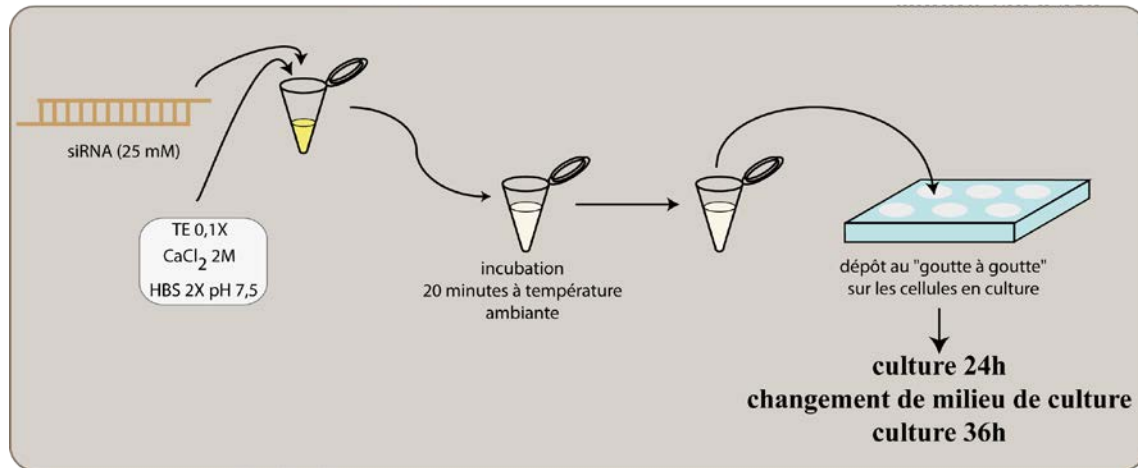
La transfection de cellules humaines par des siARN a été réalisée par la méthode du phosphate de calcium (Figure 43). 2 ml de milieu DMEM sontensemencés à raison de 200 000 cellules HeLa par puits de 3,5 cm. Les siARN sont dilués à 25 mM dans 168  $\mu$ l finaux de tampon TE 0,1X, CaCl<sub>2</sub> 2 M, HBS 2X pH7,5 (HEPES 50 mM, NaCl 0,28 M, KCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM). Le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante, avant





**Figure 42 : Méthode de transfection au JetPEI®.**

Le vecteur pSplice Express recombinant portant la séquence du minigène a été intégré dans les cellules HeLa ou HEK 293 par la technique de transfection au JetPEI®. Dans un premier temps, le vecteur et le réactif JetPEI® sont dilués séparément dans une solution de NaCl 150 mM. Ces deux dilutions sont ensuite mélangées par vortex et incubées 20 minutes à température ambiante. Le réactif JetPEI® est un polymère chargé positivement qui interagit avec les charges négatives de l'ADN plasmidique. Ce complexe facilite le passage du vecteur au travers de la membrane cytoplasmique. Le mélange est enfin déposé sur les cellules en culture. Les cellules sont cultivées 48h à 37°C puis récoltées.



**Figure 43 : Méthode de transfection au phosphate de calcium.**

25 mM de siARN sont dilués dans une solution contenant du TE 0,1X, du CaCl<sub>2</sub> 2M, HBS 2X pH 7,5. Le milieu réactionnel est incubé 20 minutes à température ambiante. Des complexes entre le siARN et les ions Ca<sup>2+</sup> se forment. La solution est ensuite déposée sur les cellules en culture et les complexes siARN/Ca<sup>2+</sup> sont intégrés dans la cellule par endocytose. Les cellules sont cultivées 24h à 37°C. Le milieu de culture est renouvelé puis les cellules sont à nouveau cultivées 36h avant leur récolte.



d'être distribué sur les cellules en culture. Après 24h de culture, le milieu de culture est remplacé par 2 ml de milieu DMEM neuf. Après 72h, les cellules sont rincées avec du tampon PBS 1X, puis récoltées à l'aide d'une spatule stérile dans 500 µl de PBS 1X.

### **VIII. Transfection transitoires des chondrocytes par un pré-miARN**

Les cellules ATDC5 non différenciées ont été transfectées par 0,5 µg de vecteur pCDNA3.1 non recombinant ou pCDNA3.1::pré-miARN à l'aide de l'agent de transfection EXGEN 500™ (Euromedex). Après 48 heures de cultures dans les conditions décrites dans la partie Matériels.B.II., les cellules sont récoltées.

### **IX. Transfections stables des chondrocytes par un pré-miARN**

Les cellules ATDC5 non différenciées sont été transfectées par 0,5 µg de vecteur pCDNA3.1 non recombinant ou pCDNA3.1::pré-miARN à l'aide de l'agent de transfection EXGEN 500™ (Euromedex). Après 48 heures de cultures dans les conditions décrites dans la partie Matériels.B.II., les cellules sont diluées 10 fois et incubée dans un milieu riche DMEM/F12 supplémenté en généticine (400 mg/ml) (GIBCO). Après deux semaines de culture, les clones résistants sont sélectionnés et à nouveau mis en culture dans les conditions de différenciation des cellules ATDC5 dans les conditions décrites dans la partie Méthodes.B.V.

## **C. Méthodes d'extraction des constituants cellulaires**

### **I. Extraction des ARN totaux et de l'ADNg de cellules humaines au Trizol®.**

Les acides nucléiques des cellules ont été extraits en utilisant le réactif Trizol®. Une suspension cellulaire est culotée à 200 g pendant 5 minutes. Les cellules sont reprises dans du Trizol® (Invitrogen) à raison de 1 ml/10<sup>6</sup> cellules. Du chloroforme est ajouté à la solution (0,2 ml /ml de Trizol®) et le mélange est agité fortement avant une étape de centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Après centrifugation, les ARN totaux présents dans la phase aqueuse supérieure sont prélevés et précipités à l'éthanol. L'ADN génomique (ADNg) est extrait simultanément à partir de la phase organique, selon les instructions du fournisseur (Chomczynski 1993).



## **II. Extraction des ARN totaux de cellules humaines et murines par un kit Exiqon :**

En vue d'une amplification des miARN RT-PCR en temps réel, les ARN totaux des cellules humaines ou murines sont extraites grâce au kit miRCurry<sup>TM</sup>-RNA isolation kit-Tissue. Cette méthode nous permet de nous affranchir d'éventuels résidus phénoliques, inhibiteurs de la fluorescence émise par la chimie TaqMan. Le kit a été utilisé selon les recommandations du fournisseur Exiqon.

*La quantité et la qualité des extraits d'ARN totaux et de l'ADNg obtenus sont systématiquement vérifiées par spectrométrie (mesure de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm) et par un dépôt sur gel d'électrophorèse (pour les extraits d'ARN totaux).*

## **III. Préparation et dosage d'extraits protéiques**

Une suspension cellulaire est culotée puis les cellules sont reprises dans 50 µl de tampon de lyse (Tris 50 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; Igepal 1%). L'ensemble est incubé 30 min dans la glace, et agité fortement régulièrement. Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines est récupéré et la concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford. La concentration en protéines des extraits protéiques, 1 ml de réactif Bradford (Life Technologies) est mélangé à 5 µl d'extraits protéiques. Après 15 min d'incubation, l'absorbance à 595 nm, est mesurée. La concentration en protéine de l'extrait est déterminée en se référant à une courbe-étalon établie à partir d'une solution d'albumine pure (Life Technologies).

## **D. Méthodes d'analyses**

### **I. Analyses *in silico***

La prédiction des cibles (région 3'UTR) ARNm des miARN candidats ont été réalisées en utilisant 3 algorithmes mathématiques : TargetScan, MiRanda et Microcosm (van Rooij 2011)(Thomas, Lieberman, and Lal 2010).

Ces algorithmes prennent en compte les séquences complémentaires des régions seed en 5' des miARN (complémentarité de  $\geq 7$  nt) ainsi que la stabilité des hétéroduplex prédits 3'UTR/miARN tout en prenant en compte les possibles structures secondaires de l'ARNm alentour du site prédit. **TargetScan** (<http://www.targetscan.org>) propose de plus une analyse qui autorise des appariements de 6 nt de la région seed (n°2 à 7) et favorise les sites prédits



situés le plus proche de l'extrémité 3' de la région 3'UTR. **MiRanda** (<http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do>) autorise des appariements non canoniques (G-U) dans la région seed et ne sélectionne que les sites prédits conservés d'un point de vue évolutif. **Microcosm** (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5>) prédit les sites conservés les plus stables et prend en compte un appariement strictement optimal de la région seed. **RegRNA** (<http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw>) recherche les sites complémentaires des régions seed des miARN au sein de séquences 3'UTR données.

## **II. Préparation des ARN à l'analyse par RACE PCR**

Nous avons entrepris la caractérisation des extrémités d'un transcrit antisens. Afin de connaître la nature des extrémités de ce transcrit, des traitements enzymatiques ont été réalisés au préalable de l'analyse par RACE PCR (soit en utilisant un kit Gene Racer soit une technique de ligature des ARN sur eux-mêmes (Couttet et al. 1997))

### **1. Elimination des coiffes triméthylées en 5' des ARN**

Afin d'éliminer les coiffes méthylées en 5' des ARN et les rendre monophosphorylés en 5', les ARN sont incubés en présence de l'enzyme TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase). 2 µg d'ARN totaux traités à la DNase RQ1 sont mis en présence de 1 U d'enzyme TAP et de tampon TAP (10X ; Life Technologies) dans un volume final de 10 µl. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 1 heure puis placé 3 min à 95°C et 5 min dans la glace avant une extraction des ARN au phénol/chloroforme.

### **2. Déphosphorylation des ARN**

Afin d'éliminer les extrémités 5' tri- ou diphosphorylées des ARN, un traitement enzymatique est effectué par une enzyme phosphatase SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). 2 µg d'ARN totaux traités à la DNase RQ1 sont mis en présence de 1 U d'enzyme SAP et de tampon TAP (10X ; Life Technologies) dans un volume final de 10 µl. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 1 heure puis placé 3 min à 95°C et 5 min dans la glace avant une extraction des ARN au phénol/chloroforme.

### **3. Phosphorylation des ARN**

Afin de monophosphoryler les extrémités 5'-OH des ARN, un traitement enzymatique est effectué par une enzyme phosphatase PNK (PolyNucléotide Kinase) en présence d'ATP. 2 µg d'ARN totaux traités à la DNase RQ1 sont mis en présence de 1 U d'enzyme PNK, de tampon



PNK (10X ; Life Technologies) et d'ATP (50 mM) dans un volume final de 10  $\mu$ l. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 1 heure puis placé 3 min à 95°C et 5 min dans la glace avant une extraction des ARN au phénol/chloroforme.

#### 4. **Ligature des ARN sur eux mêmes**

La ligature des ARN sur eux-mêmes a été entreprise pour réaliser des réactions de RACE PCR permettant la détection des extrémités 5' et 3' d'un transcrit d'intérêt. Le mélange réactionnel est composé de 2  $\mu$ g d'ARN totaux traités à la DNase RQ1 (et traités de sorte à rendre compatible à la ligature l'extrémité 5' des transcrits d'intérêts), de l'enzyme T4 RNA ligase (Life Technologies) et du tampon T4 RNA ligase (10X). La réaction est réalisée dans un volume de 400  $\mu$ l, favorisant les ligatures des molécules d'ARN sur elles-mêmes.

### III. **Epissages *in vitro***

#### 1. **Transcription d'un pré-ARNm radiomarké uniformément**

Les pré-ARNm d'intérêt sont transcrits *in vitro* dans des conditions réactionnelles permettant de les radiomarker grâce à l'incorporation d'isotope [ $\alpha^{32}$ P]-UTP par l'ARN polymérase ADN dépendante du phage T7. La matrice de transcription a été préparée par PCR en utilisant des amorces ADN apportant le promoteur T7 en amont de la séquence du pré-ARNm d'intérêt. 250 ng de matrice de transcription ont été incubées dans le mélange réactionnel de transcription (Tampon US 5X ; DTT 10mM ; RNasin® 10 U ; rATP, rCTP, rGTP, rUTP (0,5 mM, 0,5 mM, 0,2 mM, 0,1 mM respectivement) ; BSA (1mg/ml) ; SAP (1,25 mM) ; [ $\alpha^{32}$ P]-UTP ; ARN polymérase T7 (10 U) ; dans un volume final de 10  $\mu$ l). Le mélange réactionnel est incubé 2 h à 37°C.

La matrice ADN est ensuite dégradée par l'ajout de 10 U de DNase RQ1 et le mélange est ré-incubé pendant 20 min à 37°C.

Les transcrits sont ensuite purifiés sur colonnes d'exclusion de taille (mini Quick spin RNA column Roche). Le taux de radioactivité des transcrits est ensuite mesuré au compteur à scintillation et les concentrations en ARN sont ajustées à 10 fmol/ $\mu$ l.

#### 2. **Réaction d'épissage**

La réaction d'épissage *in vitro* est réalisée à partir de 10 fmol d'ARN radiomarkés uniformément. Cet ARN est incubé dans 22  $\mu$ l du mélange réactionnel suivant : MgCl<sub>2</sub> (62,5 mM) ; Créatine Phosphate (625 mM) ; ATP (25 mM) ; RNasin® (10 U) ; Poly Vynil Acétate



(13%, préchauffé 10 min à 30°C) ; Tampon D (1X); auquel sont ajoutés 8 µl d'extraits cellulaires commerciaux (nucléaire ou cytoplasmique).

Ce mélange est incubé 5 min dans la glace, puis 2 heures à 30°C.

La réaction d'épissage est stoppée par ajout de protéinase K (20 µg) et de tampon 2X (Tris HCl pH 7,5 ; NaCl 200 mM ; EDTA 2 mM ; SDS 1 %) dans un volume final de 200 µl. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 30°C.

### 3. Fractionnement des produits d'épissage par électrophorèse

Après extraction des ARN transcrits épissés, au phénol-chloroforme (v/v) suivi d'une précipitation alcoolique, les ARN sont repris dans 5 µl de bleu de formamide. La radioactivité de chaque échantillon est mesurée au compteur à scintillation et le taux de radioactivité de chaque échantillon est ajusté à 1000 cpm/µl.

Les transcrits sont fractionnés sur gel polyacrylamide 5% en conditions dénaturantes (gel de séquençage).

## IV. Western Blot

La détection et la quantification des protéines d'intérêt ont été réalisées par Western Blot. 10 µg de protéines des extraits cellulaires sont séparés sur un gel SDS-PAGE 10% en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (Biolabs) dans le tampon de migration (Tris 25 mM, Glycine 200 mM, SDS 0,1%). Après migration, les protéines sont transférées électriquement sur une membrane de nitrocellulose Trans-Blot® Transfer Medium (BIORAD) dans le tampon de transfert (Tris 25mM, Glycine 200 mM, EtOH 20%). Le transfert est effectué pendant 1 heure à un voltage constant de 100 V.

La membrane est incubée sous faible agitation dans 10 ml de solution PBS 1X-Tween 0,1% et 5% de lait en poudre demi-écrémé pendant 1 heure puis lavée 3 fois 10 min avec la solution PBS 1X-Tween 0,1%.

La membrane est incubée pendant 1 heure sous faible agitation dans 10 ml de solution PBS-Tween 0,1% contenant l'anticorps primaire utilisé dans les conditions de dilution indiquées dans le tableau 9). La membrane est de nouveau lavée 3 fois 10 min avec la solution PBS-Tween 0,1%.

La membrane est incubée pendant 45 min avec l'anticorps secondaire dans 10 ml de PBS-Tween 0,1% contenant l'anticorps secondaire dilué au 1/20 000ème. La membrane est lavée une dernière fois, 3 fois 5 min avec la solution de PBS-Tween 0,1%.

Les protéines sont révélées par grâce au kit Amersham™ ECL Prime (GE Healthcare) en suivant les indications du fournisseur.





| Anticorps                            | Classe     | Organisme | Fournisseur             | Dilution |
|--------------------------------------|------------|-----------|-------------------------|----------|
| <b>9G8</b>                           | primaire   | souris    | Euromedex               | 1/3000   |
| <b>Actine</b>                        | primaire   | souris    | Abcam                   | 1/400    |
| <b>ASF/SF2</b>                       | primaire   | souris    | Santa Cruz              | 1/2500   |
| <b><math>\beta</math>-Tubuline</b>   | primaire   | souris    | Sigma                   | 1/20000  |
| <b>DAZAP</b>                         | primaire   | souris    | Santa Cruz              | 1/1000   |
| <b>DGCR8</b>                         | primaire   | lapin     | ProteinTech Group       | 1/1500   |
| <b>hnRNP A1</b>                      | primaire   | souris    | Abcam                   | 1/40000  |
| <b>hnRNP H</b>                       | primaire   | lapin     | Abcam                   | 1/1000   |
| <b>hnRNP K</b>                       | primaire   | souris    | ImmuQuest               | 1/20000  |
| <b>PTB</b>                           | primaire   | chèvre    | Abcam                   | 1/1000   |
| <b>SC35</b>                          | primaire   | souris    | Abcam                   | 1/1250   |
| <b>Anti-chèvre couplé peroxydase</b> | secondaire | âne       | Santa Cruz              | 1/50000  |
| <b>Anti-lapin couplé peroxydase</b>  | secondaire | chèvre    | Life Technologies       | 1/50000  |
| <b>Anti-souris couplé peroxydase</b> | secondaire | chèvre    | Jackson Immuno Research | 1/50000  |

**Tableau 9 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot.**



## V. Analyse par RT-PCR

### 1. **Elimination de l'ADN contaminant des extraits d'ARN totaux**

Au préalable de chaque réaction de transcription inverse, les ARN totaux sont traités à la DNase RQ1 (Promega) suivant les instructions du fournisseur afin de digérer les acides désoxyribonucléiques éventuellement présents dans l'extrait d'ARN.

### 2. **Réaction de transcription inverse**

La synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) d'un ARN d'intérêt est effectuée soit à l'aide d'un oligonucléotide poly-dT (si l'ARN porte une queue de polyA à l'extrémité 3'), soit à l'aide d'un oligonucléotide spécifique, soit à l'aide d'une population d'oligonucléotides hexamériques de séquences aléatoires (Figure 44).

Pour ce faire : 2 µg d'ARN totaux traités à la DNase sont préalablement incubés à 65°C puis refroidis rapidement dans la glace, en présence de l'oligonucléotide poly-dT 7160 (100 mM) ou d'un oligonucléotide spécifique (100 mM) ou des oligonucléotides hexamériques 9017 (100 mM). Un mélange de chaque dNTP (25 mM), 200 U d'enzyme MMLV (Promega) et le tampon de l'enzyme (Tris HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 10 mM final) sont ensuite ajoutés.

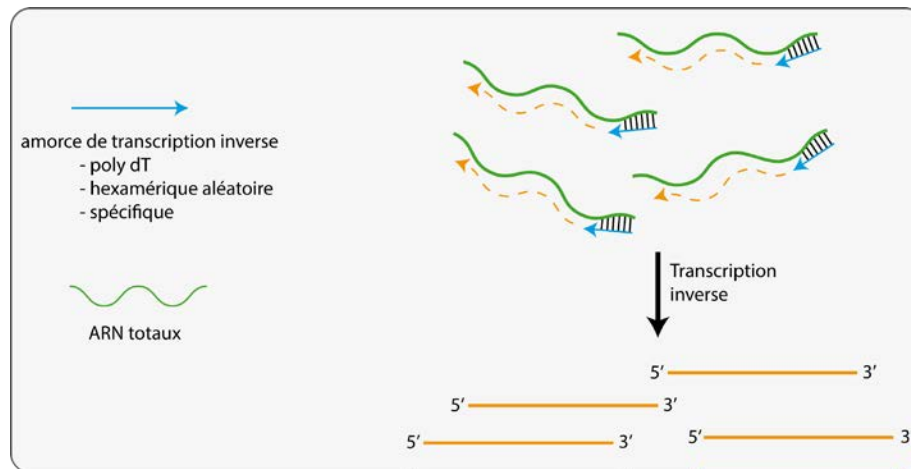
**Pour l'oligonucléotide poly-dT :** l'élongation est effectuée à 37°C pendant 10 minutes puis à 42°C pendant 50 minutes.

**Pour un oligonucléotide spécifique :** l'élongation est effectuée à 42°C pendant 60 minutes.

**Pour un oligonucléotide hexamérique de séquence aléatoire :** l'élongation est effectuée à 37°C pendant 30 minutes puis à 42°C pendant 30 minutes.

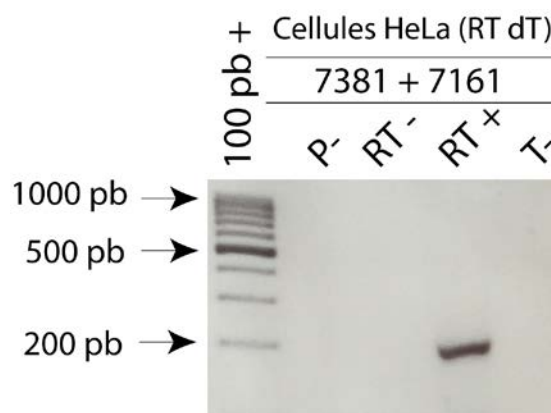
La réaction de transcription inverse est stoppée par chauffage à 95°C pendant 2 min. Les ADNc d'intérêt sont détectés par amplification par PCR classique comme décrit précédemment à l'aide d'amorces spécifiques.

Pour chaque réaction réalisée, un témoin négatif (appelé **RT-**) de transcription a été réalisé dans les mêmes conditions mais en omettant l'enzyme de transcription inverse. Cet essai permettait de vérifier que les produits obtenus après l'étape d'amplification par PCR provenaient d'ADNc issus des ARN et non pas d'une amplification à partir d'ADNg résiduel après traitement à la DNase. De plus, afin de s'assurer de la spécificité des oligonucléotides de PCR utilisés, une réaction de RT-PCR a été réalisée au cours de laquelle les oligonucléotides de la PCR ont été omis (témoin négatif appelé **P<sup>-</sup>**) (Figure 45). Ainsi du fait de l'absence de produit d'amplification, nous nous assurons qu'aucune amplification aspécifique n'avait été réalisée au cours de la réaction de PCR. Chaque couple



**Figure 44 : Illustration du principe de la réaction de transcription inverse.**

La réaction de transcription inverse peut être amorcée par un oligonucléotide poly-dT, hexamérique aléatoire ou spécifique. La réaction permet de produire des ADNc simple brin qui serviront de matrice pour la réaction de PCR en temps réel.



**Figure 45 : Expériences de validation de couple d'oligonucléotides 7381 et 7161.**

L'efficacité de chaque couple d'oligonucléotide utilisé en RT-PCR au cours de mes travaux de thèse a été testée. Une expérience de transcription inverse a été réalisée à partir d'ARN totaux de cellules HeLa et amorcée par un oligonucléotide polydT. Une réaction de transcription inverse dans laquelle l'amorce de RT a été omise (piste **P-**) et une réaction au sein de laquelle l'enzyme de RT a été omise (piste **RT-**), ont permis de valider le fait que l'amplicon observé dans la piste **RT+** est spécifique. La piste **T-** correspond à un témoin négatif de PCR (réaction sans ADNc matrice).



d'oligonucléotide de PCR a été testé au préalable de nos études et ces témoins n'apparaissent pas sur les figures de résultats.

## **VI. Analyse par RT-qPCR SYBR-Green**

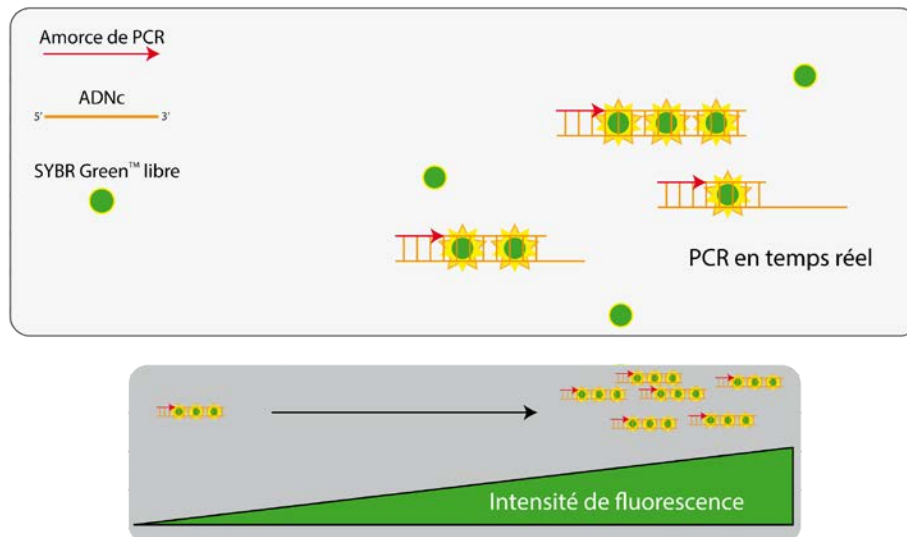
Les ADNc produits par RT-PCR sont dilués 10 fois et sont utilisés comme matrice pour une réaction de qPCR (Figure 46). Le milieu réactionnel est composé d'un couple d'oligonucléotides spécifiques (10 mM chacun) et de SYBR Green I Master mix (Roche) dans un volume final de 20  $\mu$ l. Le programme de qPCR est le suivant : une dénaturation initiale de 10 min à 95°C suivie de 40 cycles [dénaturation 95°C, 15 sec ; hybridation/élongation 60°C durant un temps variant de 30 s à 1 min, dépendant de la taille du fragment à amplifier]. Ce programme est suivi d'une étape visant à déterminer une courbe de fusion permettant de vérifier qu'un seul produit de PCR n'est amplifié : 40 cycles [dénaturation 95°C, 15 sec ; hybridation/élongation 60°C durant un temps variant de 30 s à 1 min, dénaturation 95°C].

## **VII. Détection des miARN matures et pri-miARN par RT-qPCR TaqMan**

### **1. miARN matures**

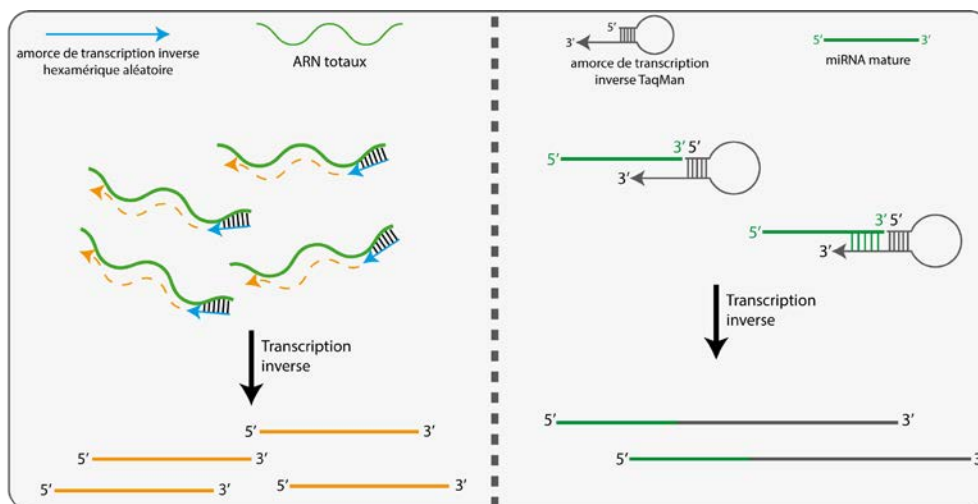
Dans le cas des miARN matures l'étape de transcription inverse est spécifique. Un oligonucléotide propre à chaque miARN étudié permet d'amorcer la réaction de transcription inverse. La difficulté majeure de la détection de miARN par RT-qPCR est la taille d'un miARN mature (environ 22 nucléotides). La méthode TaqMan consiste à utiliser une amorce de transcription inverse permettant de rallonger spécifiquement les ADNc produits à partir des miARN (Figure 47). Ainsi cette amorce d'environ 60 nucléotides se structure en tige boucle et son extrémité 3' est complémentaire de l'extrémité 3' du miARN mature étudié. La particularité de l'appariement entre l'amorce et le miARN mature permet de rendre chaque amorce extrêmement spécifique ce qui permet de différencier les miARN d'une même famille se distinguant par l'identité de leurs nucléotides en 3' (exemple : miR-23a portant un G et miR-23b portant un U).

20 ng d'extraits d'ARN totaux traités à la DNase RQ1 sont utilisés comme matrice pour une réaction de transcription inverse et sont mis en présence de l'amorce tige-boucle (5X), d'un mélange de dNTP (100 mM), d'un mélange d'enzyme MRT, de tampon de transcription inverse (10X), d'inhibiteur de RNase, dans un volume final de 7  $\mu$ l. La réaction de transcription inverse est incubée 30 min à 16°C puis 30 min à 42°C. L'enzyme est dénaturée 5 min à 80°C puis le mélange est placé dans la glace.



**Figure 46 : Illustration du principe de la réaction de PCR en temps réel SYBR Green<sup>TM</sup>.**

Au cours de la réaction de PCR en temps réel, l'intercalant SYBR Green<sup>TM</sup> est incorporé dans l'ADN double brin. A l'état libre, la molécule de SYBR Green<sup>TM</sup> n'émet pas de signal de fluorescence. Lorsque cette molécule est intercalée entre les bases de l'ADN double brin, de la fluorescence est émise. Au cours de la réaction de PCR, la fluorescence est mesurée. A chaque cycle PCR, plus l'amplification est importante et plus la fluorescence observée est grande. L'intensité de fluorescence est ensuite convertie en  $C_T$ .



**Figure 47 : Etape de transcription inverse au cours de la réaction de RT-qPCR TaqMan.**

Pour l'analyse des précurseurs de miRNA, la réaction de transcription inverse est amorcée par un oligonucléotide hexamérique aléatoire. Pour la quantification des miRNA matures, la réaction de transcription inverse est amorcée par un oligonucléotide structuré en tige-boucle et dont la séquence est exogène aux génomes humain et murin. Seuls les 6 nucléotides à l'extrémité 3' de l'amorce sont complémentaires des nucléotides à l'extrémité 5' du miRNA étudié. La spécificité de ces amorces est grande et elle permet de discriminer des miRNA matures produits à partir de gènes homologues (exemple : miR-23a et miR-23b).



Les ADNc produits sont dilués 10 fois et servent de matrice pour la réaction de qPCR (Figure 48). Le mélange réactionnel est constitué des ADNc, d'une sonde TaqMan (5X ou 20X, spécifique du miARN mature étudié) et de tampon Universal Master mix (2X), dans un volume final de 20  $\mu$ l. Le programme de qPCR est le suivant : une incubation à 50°C de 2 min puis une dénaturation initiale à 95°C de 10 min et enfin 40 cycles [dénaturation 95°C, 15 sec ; hybridation/élongation 60°C durant un temps variant de 30 sec]. Les résultats sont exprimés en  $C_T$  et sont normalisés à partir de la détection de miARN ou du snARN U6, invariants dans les conditions étudiées.

## 2. pri-miARN

Par cette méthode les précurseurs des miARN d'intérêt sont détectés et quantifiés. Le précurseur pri-miARN est détecté par des sondes TaqMan pouvant s'hybrider de part et d'autre de la séquence correspondant à la tige-boucle du pré-ARNm (Figure 49). La séquence de chaque sonde est maintenue secrète par le fournisseur Applied Biosystem. Le ou les précurseurs potentiels permettant l'expression des miR-23b, -27b, -24-1 ne sont pas caractérisés. Il pourrait s'agir d'un précurseur commun portant les séquences des trois miARN d'intérêt ou bien de plusieurs précurseurs distincts portant un seul ou plusieurs miARN. C'est pourquoi dans notre étude les trois amorces rendues disponibles par Applied Biosystem pour détecter le ou les pri-miR-23b, -27b et -24-1 ont été utilisées.

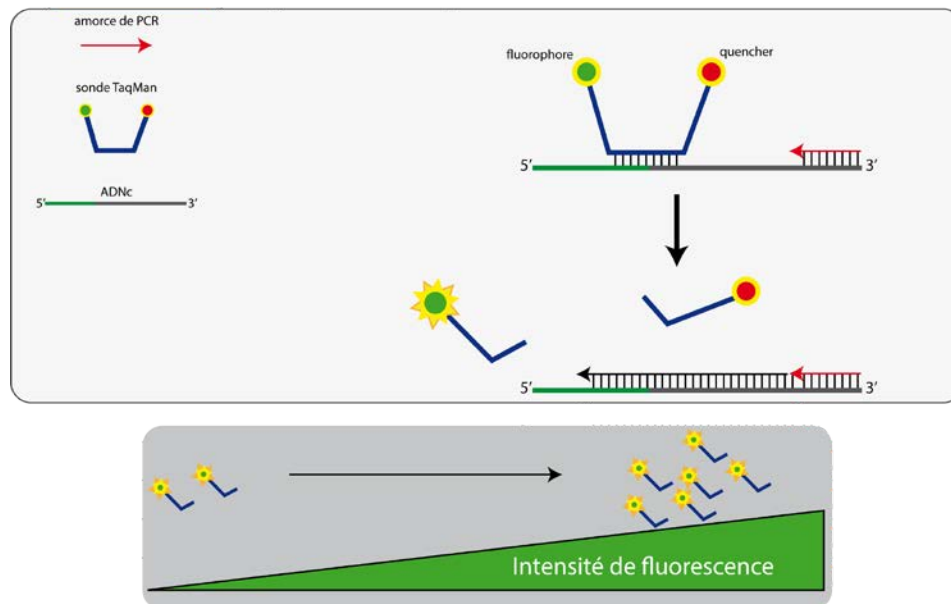
La détection des pri-miARN par RT-qPCR est initiée par une première étape de transcription inverse amorcée par des oligonucléotides issus d'un mélange aléatoire de séquences hexamériques. Les ADNc produits sont dilués 10 fois et sont utilisés comme matrice pour une réaction de qPCR TaqMan. Le mélange réactionnel est le même que pour la détection des miARN matures en utilisant cette fois-ci une sonde TaqMan spécifique du précurseur de miARN étudié. Le programme de qPCR est identique à celui pour la détection des miARN matures.

Les résultats sont exprimés en  $C_T$  (Cycle Threshold ou « cycle de seuil ») et sont normalisés à partir de la détection du snRNA U6, invariant dans les conditions étudiées.

## 3. Quantifications des résultats de qPCR et conditions de normalisation

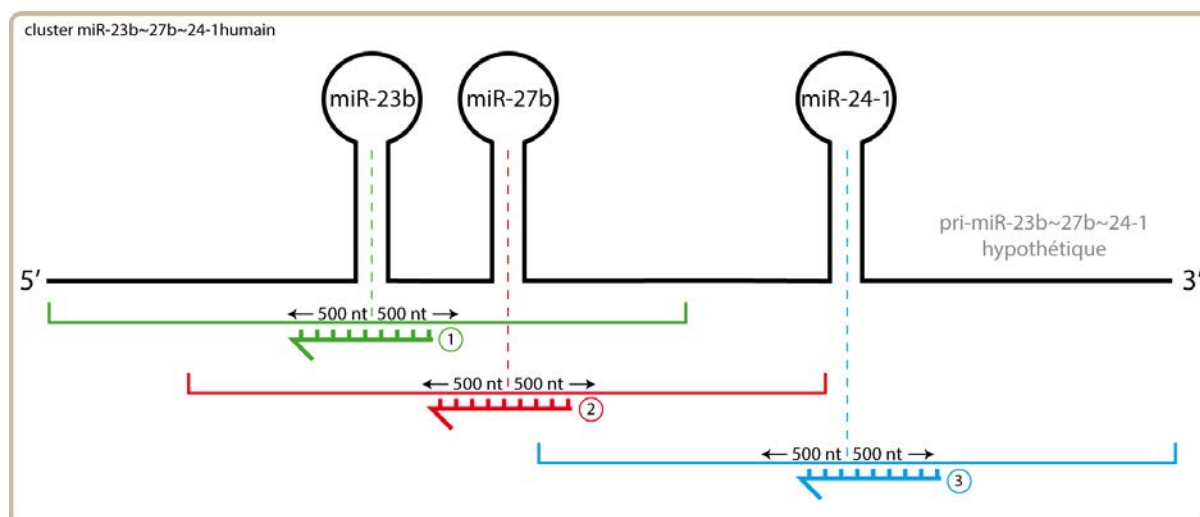
Les quantifications des données en  $C_T$  ont été calculées selon la méthode du  $-2^{\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen 2001). Les amorces de qPCR utilisées dans notre étude ont été élaborées et sélectionnées à partir d'un seuil d'efficacité de 99%. Les résultats de chaque expérience ont été normalisés par la détection d'ARN invariants dans nos conditions expérimentales :





**Figure 48 : Principe de la réaction de PCR en temps réel par la méthode TaqMan.**

Au cours de la réaction de PCR en temps réel, la sonde TaqMan spécifique s'apparie par complémentarité à la séquence du miRNA d'intérêt. Cette sonde est constituée d'un fluorophore et d'un quencher de fluorescence. Lorsque que la sonde TaqMan est intègre aucune fluorescence n'est émise. Au cours de l'élongation, la sonde TaqMan est dégradée le fluorophore est libéré du quencher : la fluorescence peut alors être détectée. Au cours de la réaction de PCR, la fluorescence est mesurée. A chaque cycle PCR, plus l'amplification est importante et plus la fluorescence observée est grande. L'intensité de fluorescence est ensuite convertie en  $C_T$ .



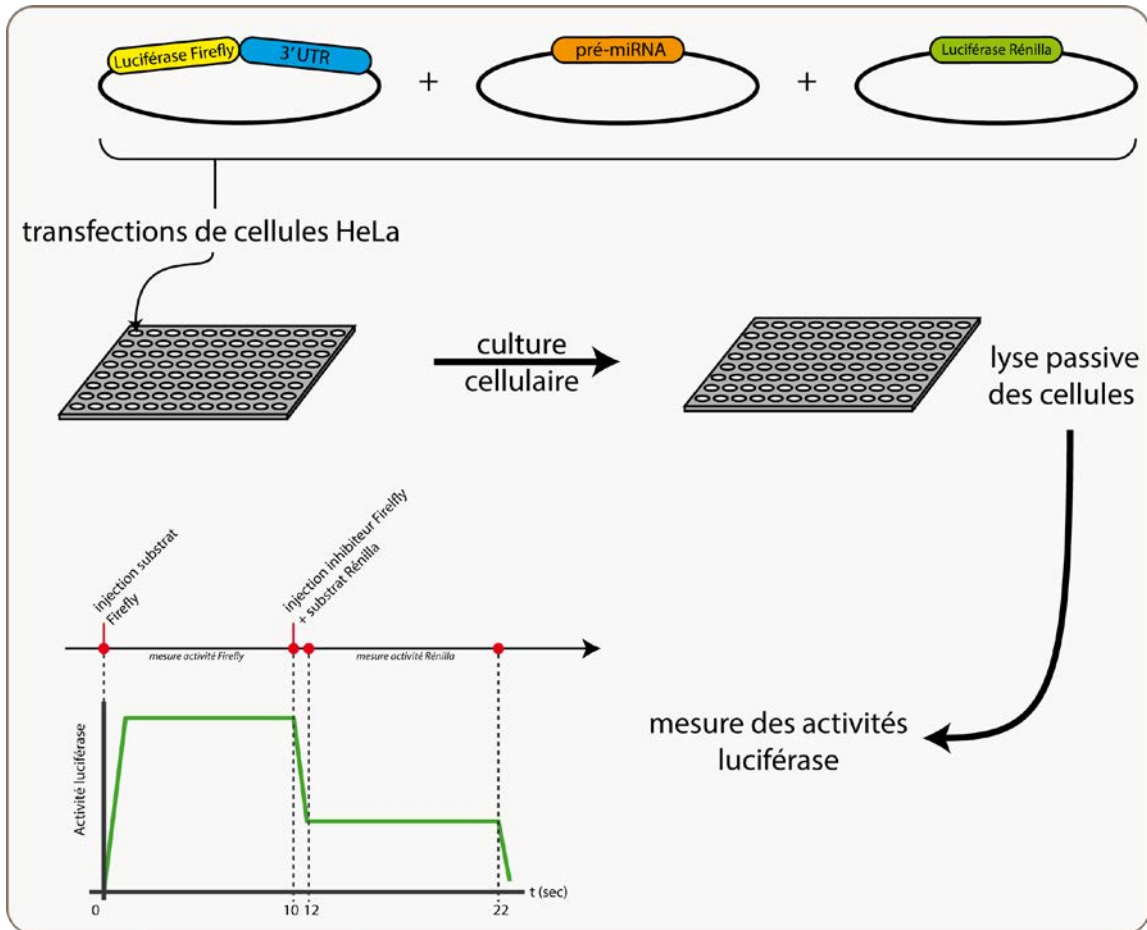
**Figure 49 : Détection d'un précurseur pri-miARN par la méthode TaqMan.**

Représentation schématique d'un précurseur pri-miARN transcrit à partir de l'ORF *C9orf3* (en noir) et portant les séquences des miR-23b, -27b et -24-1. Les sondes TaqMan utilisées sont représentées par les flèches colorées en vert (n°1) (pri-miR-23b, ref: Hs03303058-pri), en rouge (n°2) (pri-miR-27b, ref: Hs03303051-pri) et en bleu (n°3) (pri-miR-24-1, ref: Hs03303056-pri). Les parenthèses représentent l'étendue des régions de l'ADNc potentiellement ciblées par la sonde TaqMan, dont la séquence est tenue secrète par Applied Biosystem. On peut remarquer que les zones potentielles de fixation des sondes TaqMan se superposent ce qui montre que plusieurs de ces trois sondes utilisées seraient capables de détecter la même espèce précurseur de miARN.



- *RP29* (Ribosomal Protein 29), et son homologue murin *RPS29*, ont été utilisés pour normaliser la quantification des ARNm d'intérêt dans le chondrocyte. Ceux-ci sont utilisés couramment au sein de notre laboratoire (Francin et al. 2014; Poleni et al. 2007; Bianchi et al. 2005). L'invariance de ces gènes homologues est démontrée par les travaux d'Arnaud Bianchi (Bianchi et al. 2005), prenant en compte le fait qu'un gène de ménage peut varier en fonction des conditions expérimentales et des tissus étudiés (Schmittgen and Zakrajsek 2000; Livak and Schmittgen 2001). Ainsi au cours des expériences de stimulation de chondrocytes humains à l'IL-1 $\beta$  ainsi que dans nos expériences de différenciation terminale de chondrocytes murins, les taux d'expression des gènes *RPS29* humains et murins ne varient pas.
- La moyenne des taux d'expression de trois miARN (miR-21, miR-183 et miR-196b) dont la quantité reste invariante dans nos conditions expérimentales a été prise en compte pour la quantification du taux d'expression des miARN au cours des expériences de puces à miARN. Cette méthodologie basée sur le taux d'expression d'ARN non codants est employée couramment. Ainsi la quantification des ARN non codants semble plus précise en utilisant un ARN non codant invariant de la même famille, ou encore pour accroître la robustesse des mesures, la moyenne de l'invariance de plusieurs de ces ARN non codants (Galiveti et al. 2010).
- Le snRNA U6, témoin de normalisation pour la quantification des miARN d'intérêt, dont l'invariance d'expression dans nos conditions expérimentales a été vérifiée par les travaux de Véronique Salone au cours de la validation des profils d'expression de miARN d'intérêt étudiés par puce à miARN EXIQON. En effet, conscients de la difficulté d'établir un témoin de normalisation invariant compatible avec nos conditions expérimentales (Radonić et al. 2004; Peters et al. 2004; Peltier and Latham 2008), l'invariance du snARN U6 a été vérifiée puis validée par l'utilisation de l'outil BestKeeper (Pfaffl et al. 2004).

Les valeurs exprimées représentent la moyenne de trois mesures indépendantes  $\pm$  un écart type. Les différences entre les valeurs  $-2^{\Delta\Delta C_T}$  de l'échantillon et les valeurs de l'échantillon de référence ont été réalisées par l'analyse des variances (test ANOVA) suivie d'un test *t* de Fisher effectués à l'aide du logiciel Statview<sup>TM</sup> 5.0 (SAS Intitute Inc). Lorsque la valeur P est inférieure à 0,05 alors les différences entre les données ont été jugées significatives.



**Figure 50 : Représentation schématiques du principe des tests rapporteur luciférase.**

Ces expériences dites « tests luciférase » se déroulent en plusieurs étapes. Dans un premier temps des cellules HeLa sont transfectées par un mélange de plasmides permettant de surexprimer un ARNm chimérique (ARNm luciférase Firefly/3'UTR d'intérêt), le miRNA mature d'intérêt, et l'ARNm Rénilla (normalisateur de l'expérience). Après 24 heures de culture cellulaire, les cellules sont récoltées et des extraits cellulaires totaux sont préparés en utilisant un tampon de lyse passif fourni par le kit Dual Glo Luciferase assay system (Promega). Les activités luciférase Firefly et Rénilla présentes au sein de ces extraits cellulaires sont ensuite mesurées à l'aide d'un bioluminomètre à injecteurs automatiques. Les intensités lumineuses sont représentées sous forme de graphique comme illustré sur la figure et récoltées sous forme de données numériques. Le traitement des données est réalisé *in silico*.



## VIII. Validation des prédictions de cibles miARN/ARNm

**(cf. chapitre d'ouvrage en Annexes)** (Figure 50)

### 1. Clonages des miARN et des régions 3'UTR candidats

Les régions 3'UTR candidates ont été clonées au sein du vecteur pGl3 control en aval de l'ORF codant la luciférase Firefly, au site de restriction *Xba*I. Les clones recombinés avec les régions 3'UTR insérées dans l'orientation sens sont sélectionnés.

Les miARN matures candidats sont exprimés à partir du vecteur pCDNA3.1 recombiné avec les précurseurs pré-miARN d'intérêts. Le clonage orienté des pré-miARN est réalisé grâce aux sites de restriction *Kpn*I et *Bam*HI.

### 2. Transfections de cellules HeLa par les plasmides d'expression

Des cellules HeLa ont été mises en culture à J-0 dans 3 ml de milieu DMEM, à raison de 300000 cellules par puits de 3,5 cm de diamètre. A J-1, les cellules sont transfectées par un mélange de 3 plasmides (0,5 µg de vecteur pGl3 recombinant exprimant la région 3'UTR d'intérêt, 0,5 µg vecteur pCDNA3.1 recombinant exprimant le pré-miARN d'intérêt et 5 ng d'un troisième plasmide phRGB exprimant la luciférase Rénilla) grâce au réactif JetPEI (PolyPlus). Les conditions de transfections sont décrites précédemment mais diffèrent seulement par le volume de réactif JetPEI, ajusté ici à 10 µl. Afin de limiter une trop grande toxicité de la part du réactif JetPEI, le milieu de culture a été renouvelé après 2 heures de transfection. A J-2 ou J-3, soit après 24h ou 48h post-transfection les cellules sont collectées.

### 3. Tests luciférases

Les tests luciférases sont réalisés en utilisant le kit Dual Glo Luciferase assay system<sup>TM</sup> (Promega). Les cellules de chaque puits sont lysées avec le tampon de lyse (PLB 5X) pendant 15 min sous agitation. Les extraits cellulaires sont ensuite transférés dans une microplaque 96 puits et les intensités de bioluminescence sont réalisées à l'aide de l'appareil luminomètre Xenius XL<sup>TM</sup> (SAFAS). Une lecture de la bioluminescence liée à chaque activité luciférase est réalisée par puits selon le programme suivant : [injection de 100 µl de tampon LARII (substrat de la luciférase Firefly) et acquisition de la bioluminescence pendant 10 sec ; injection de tampon Stop & Glo (inhibiteur de la luciférase Firefly et substrat de la luciférase Rénilla) et acquisition de la bioluminescence pendant 10 sec].



#### 4. Quantification des données :

Pour chaque test luciférase, deux activités luciférases sont mesurées. Les données de luciférase Firefly sont normalisées par rapport aux données Rénilla (ratio activité Luciférase/activité Rénilla). Les valeurs sont ensuite quantifiées à partir de l'échantillon témoin considéré comme la valeur 100%. Les variations d'activité Luciférase relative représentent la moyenne de trois répliques biologiques (sachant qu'un réplique biologique représente la moyenne de trois répliques de mesure dit « triplicata technique »). Les analyses statistiques ont été réalisées par l'analyse des variances (test ANOVA) suivie d'un test *t* de Fisher effectués à l'aide du logiciel Statview<sup>TM</sup> 5.0 (SAS Intitute Inc). Lorsque la valeur P est inférieure à 0,05 alors les variations sont jugées significatives.

*Résultats*





## Chapitre 1 : Caractérisation de l'extrémité 3' de l'ORF *C9orf3* portant le cluster de gènes codant les miR-23b, 27b et 24-1 humains.

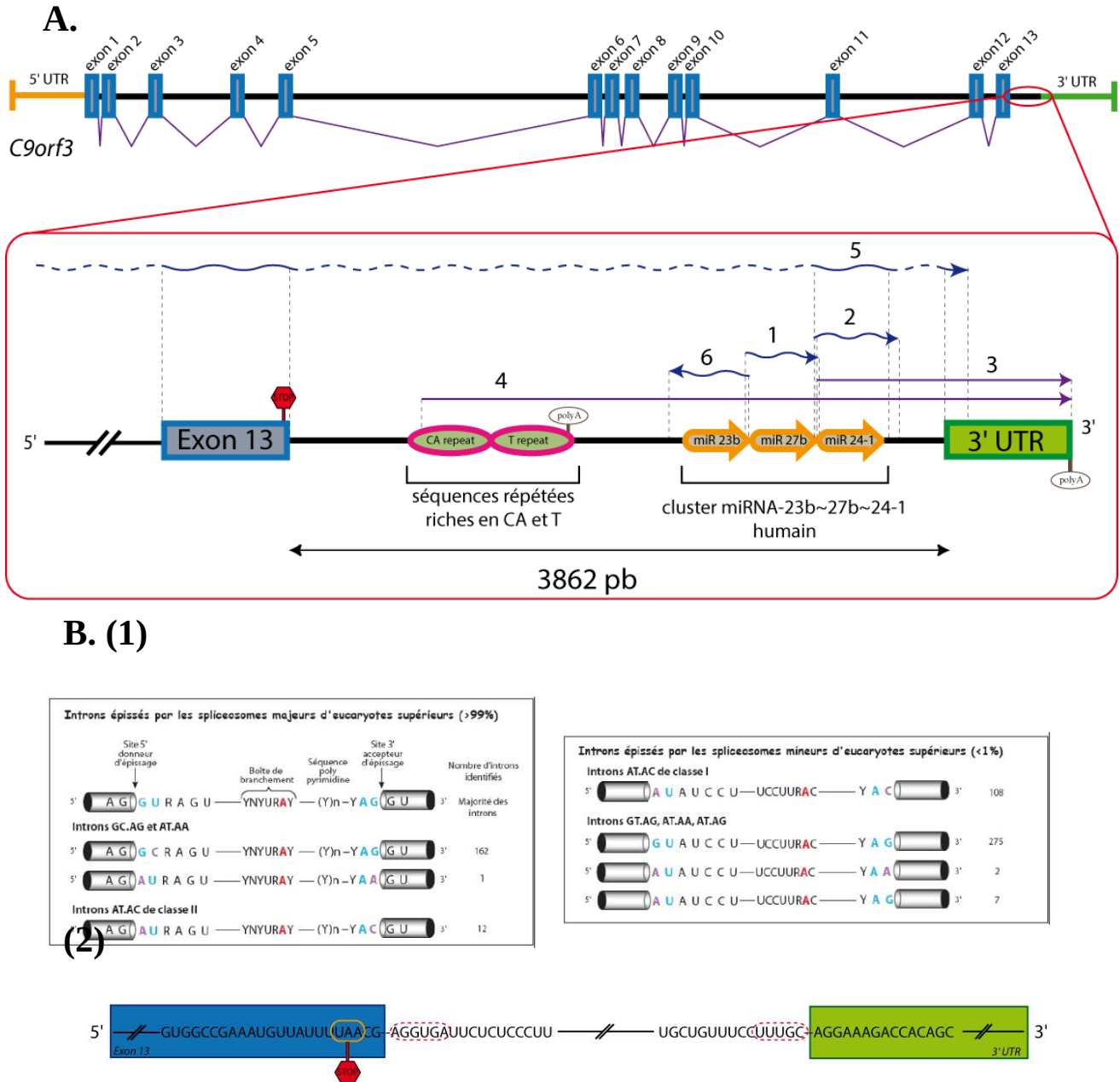
Un projet collaboratif entre les équipes 1 (co-dirigée par le Pr Bruno CHARPENTIER) et 4 (dirigée par le Pr Jean-Yves JOUZEAU), visant à identifier des miARN impliqués dans la pathologie arthrosique, avait été initié entre les deux UMR AREMS et PPIA, et poursuivi dans le cadre du laboratoire IMoPA, résultant de la fusion de ces deux UMR. Dans ce cadre, Véronique Salone, post-doctorante, a entrepris des analyses bibliographiques sur la relation entre microARN et pathologie articulaire. Ce travail a notamment montré l'existence d'au moins 30 clusters au sein desquels la production des miARN est apparue différentielle au cours de la perte de phénotype chondrocytaire.

Parmi ces clusters, celui regroupant les séquences codant les microARN miR-23b, miR-27b et miR-24-1 (cluster miR-23b~27b~24-1) a particulièrement retenu notre attention, et ce pour deux raisons : d'une part la production des microARN miR-23b et miR-27b semble diminuer au cours de la pathologie arthrosique alors que la production de miR-24-1 est maintenue constante, ce cluster présente une localisation génomique originale.

Il est situé au sein de l'ORF *C9orf3* localisée à la position 9q22.32 (Figure 51A). Cette ORF, composée de 13 exons, code une métallo-protéine à zinc appelée aminopeptidase O (Diaz-Perales et al. 2005). Cette protéine est impliquée dans le clivage de l'angiotensine III en angiotensine IV au cours de la régulation de la pression artérielle.

Le cluster miR-23b~27b~24-1 est porté par une séquence de 3862 pb située entre l'extrémité 3' du dernier exon de l'ORF et la région 3'UTR. L'analyse des banques d'EST (Express Sequence Tag) a révélé que cette séquence de 3862 pb est absente de l'ARNm *C9orf3*. Cependant une analyse de la séquence nucléotidique n'a pas permis l'identification de signaux d'épissage classiquement reconnus par les composants du spliceosome majeur ni ceux du spliceosome mineur. Au début de notre étude cette constatation suggérait que cette séquence ne correspondait pas à un intron classique (Figure 51B).





**Figure 51 : Localisation du cluster miR-23b~27b~24-1 au sein de l'ORF *C9orf3*.**

**A.** Organisation génomique de *C9orf3*. Le cluster miR-23b~27b~24-1 est localisé au sein d'une séquence non codante située entre le dernier exon de *C9orf3*, l'exon 13 qui porte le codon STOP, et la région 3' UTR. Cette séquence non codante de 3862 pb contient deux séquences répétées, l'une riche en T et l'autre en dinucléotides CA. Le cluster de miRNA est situé en aval de ces séquences répétées. Deux signaux de polyadénylation (5'-AATAAA-3') sont retrouvés aux positions 1743 et 4558 par rapport au premier nucléotide de l'exon 13.

Les données de bioinformatique font état de 6 transcrits recouvrant la séquence de l'extrémité 3' de *C9orf3*. Ainsi, 3 EST et deux ARN transcrits seraient produits en orientation sens par rapport à *C9orf3* : (1) GI:18780346, (2) GI:28141093, (3) Locus AFO43896, (4) Locus AFO43897, (5) GI:21783562. Une autre séquence EST serait transcrite en antisens de la séquence du gène codant le miR-23b : (6) GI:12445821.

**B.** La séquence non codante portant le cluster miR-23b~27b~24-1 ne présente aucun des trois éléments *cis* caractéristiques des introns : les sites donneur et accepteur d'épissage ainsi que la boîte de branchement des épissages classiques et non classiques eucaryotes. Les séquences de ces éléments sont représentées dans les tableaux (1). Les séquences des bornes 3' de l'exon 13 et 5' de la région 3' UTR sont éloignées des séquences consensus des introns épissés par le spliceosome. Les séquences nucléotidiques aux bornes 5' et 3' de la séquence du cluster sont données en (2).



Une recherche des signaux de polyadénylation au sein de cette séquence a été réalisée révélant l'existence de deux sites de polyadénylation majeurs (de séquence 5'-AATAAA-3') : l'un situé à l'extrémité 3' de la région de répétition TT (position n°1743 par rapport au premier nucléotide de l'exon 13) et l'autre situé en 3' de la région 3'UTR (position n°4557 par rapport au premier nucléotide de l'exon 13). Aucun signal de polyadénylation de classe mineure n'a été détectée. Ces observations suggèrent que les transcrits *C9orf3* pourraient présenter des tailles différentes à leur extrémité 3' résultant d'une terminaison de la transcription par l'ARNpolII à deux sites distincts (Figure 51A).

Une recherche de toutes les EST potentiellement produites à partir de cette région de 3862 pb a révélé l'existence de trois EST (GI:28141093 ; Locus AFO43896 ; EST:21783562) chevauchant la séquence du gène codant le miR-24-1 et une EST (GI:18780346) chevauchant la séquence du gène codant miR-27b. Ces EST pourraient correspondre à d'éventuels pri-miARN portant les séquences de miR-27b et miR-24-1. Par ailleurs, une EST (GI:124-145821) chevauchant la séquence du gène codant le miR-23b a été identifiée. De façon remarquable, cette dernière est en orientation antisens à la séquence du gène codant miR-23b, ce qui nous a conduit à émettre l'hypothèse que l'expression de ce transcrit pourrait potentiellement interférer avec la production de miR-23b (Figure 51A), soit à un niveau transcriptionnel, soit par une action antisens à un niveau post-transcriptionnel.

Enfin, notons que cette séquence de 3862 pb porte en amont du cluster de gènes de miARN des régions riches en séquences répétées : une séquence de 560 nucléotides riche en dinucléotide CA et une région de 550 nucléotides riche en T. Des analyses par BLAST indiquent que ces régions ne sont pas retrouvées à d'autres localisations dans le génome humain ni même au sein d'autres génomes. De ce fait ces régions sont atypiques et leur rôle reste à être identifié.

## **A. Caractérisation de l'évènement de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm *C9orf3*.**

### **I. Etude de l'organisation génomique de l'extrémité 3' de l'ORF *C9orf3* :**

L'analyse préliminaire des banques d'EST a révélé que la région de 3862 nucléotides comprise entre la fin de l'exon 13 et le début de la séquence 3'UTR est absente de l'ARNm *C9orf3* suggérant l'existence d'un évènement de maturation post-transcriptionnel. Toutefois,



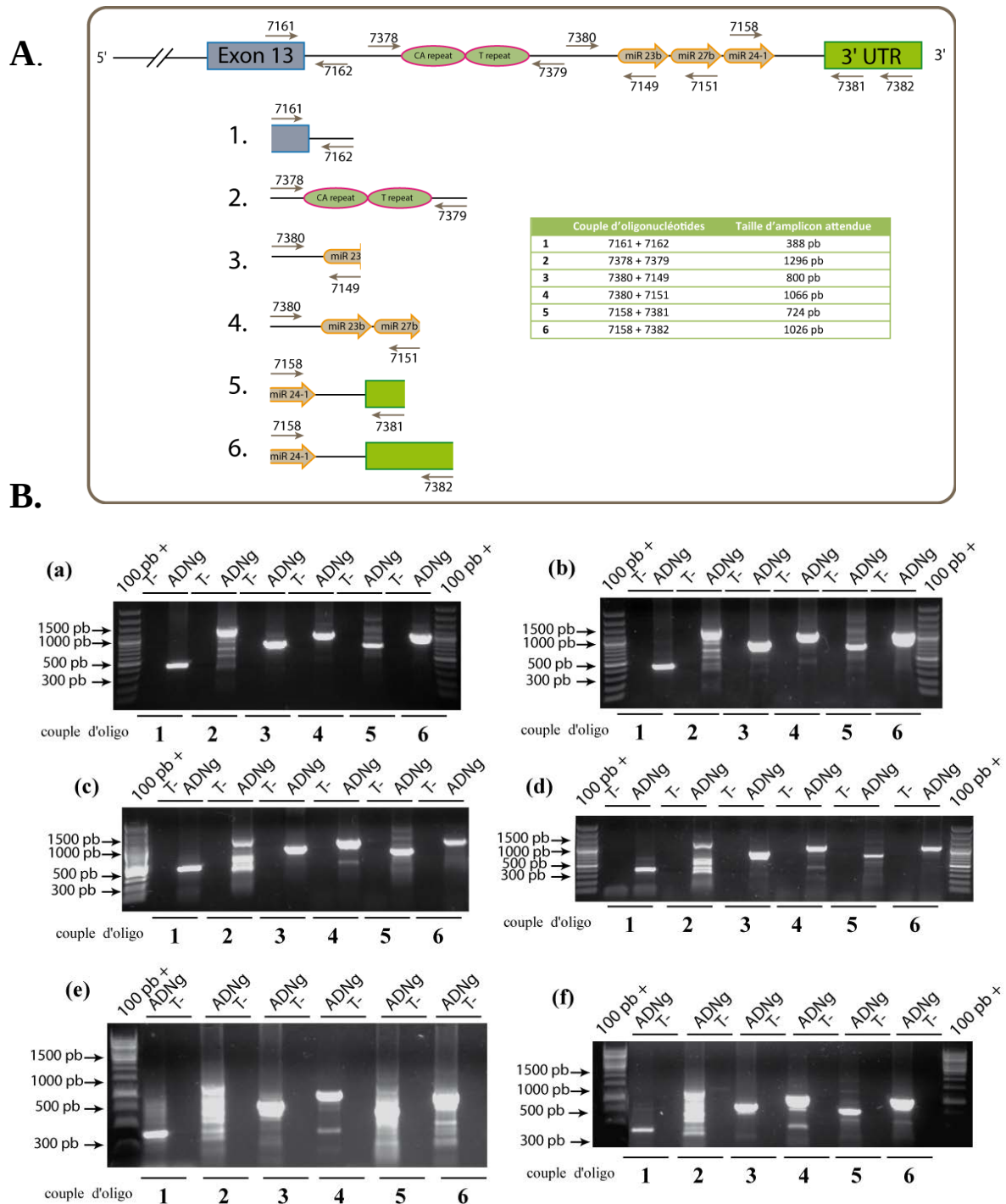
au début de cette étude, l'existence d'une erreur d'annotation du génome humain au niveau de cette région ne pouvait pas être complètement exclue. De ce fait, une analyse par PCR a été réalisée afin de vérifier la présence de la région d'intérêt dans l'ADN génomique (ADNg) de 6 lignées cellulaires humaines cultivées au laboratoire. Les ADNg des cellules des lignées HeLa et HEK 293, et les ADNg d'ostéoblastes, de myoblastes, de fibroblastes et de chondrocytes ont été extraits au Trizol® dans les conditions décrites dans la partie Matériels et Méthodes.

Au cours de cette analyse, une difficulté majeure rencontrée a résidé dans le fait qu'il n'a pas été possible d'amplifier l'intégralité de cette région génomique d'un seul tenant, malgré des conditions de PCR adaptées à l'amplification de fragments de grande taille (résultats non présentés). Nous avons opté pour une amplification par fragments permettant de couvrir la totalité de la séquence. Ainsi, 6 couples d'oligonucléotides répartis tout au long de la région d'intérêt ont été utilisés (Figure 52A). Pour chaque lignée cellulaire, des amplicons de taille attendue et correspondant aux 6 segments de la région d'intérêt ont été obtenus (Figure 52B). On peut observer que l'amplification de la région du génome contenant les deux régions riches en répétitions CA et T (amplicons obtenus avec le couple d'oligonucléotide n°2) conduit à l'obtention de plusieurs bandes après électrophorèse. Ce profil est retrouvé pour les ADNg extraits à partir de chacune des lignées cellulaires. Nous avons émis l'hypothèse que l'activité de la polymérase était influencée par la présence des répétitions CA et T sur les brins matrice. Cette analyse a permis de montrer la présence dans l'ADNg de 6 lignées cellulaires des segments d'intérêt de *C9orf3* portant les gènes codant les miR-23b, 27b et 24-1.

## **II. Détection de l'évènement de maturation de l'ARNm *C9orf3* dans 6 lignées cellulaires humaines**

### **1. Analyse de l'évènement de maturation**

Dans un premier temps nous avons souhaité vérifier les données des banques EST qui indiquaient alors que la séquence portant le cluster de miR-23b~27b~24-1 était absente de l'ARN mature *C9orf3*. Nous avons réalisé ces études au sein de 6 lignées cellulaires différentes afin de vérifier l'omniprésence d'un évènement de maturation consistant en l'excision de la séquence non codante portant le cluster miR-23b~27b~24-1 et la mise en continuité de l'exon 13 avec la région 3'UTR (Figure 53). L'ARNm produit à partir de *C9orf3* étant polyadénylé, une réaction de transcription inverse en utilisant un oligonucléotide

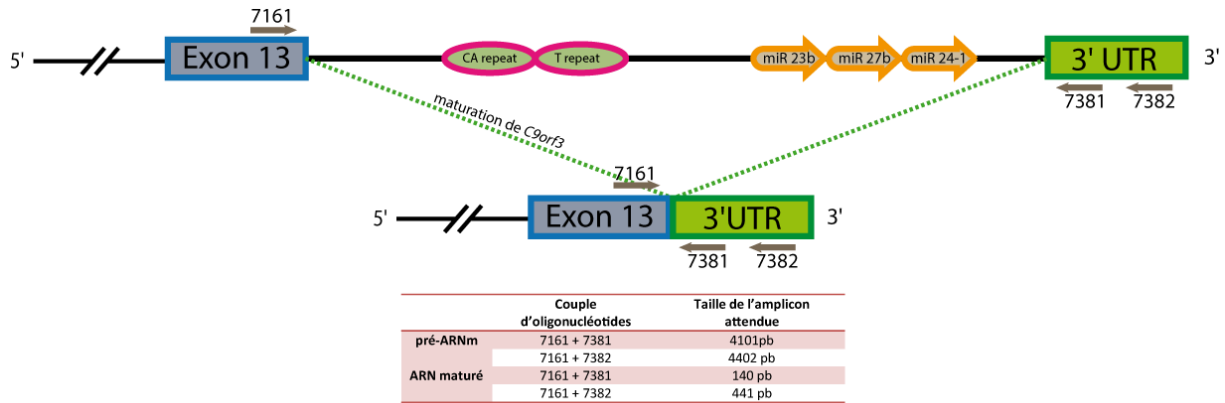


**Figure 52 : Analyse par PCR de la présence de la séquence d'intérêt de *C9orf3* au sein de plusieurs types cellulaires.**

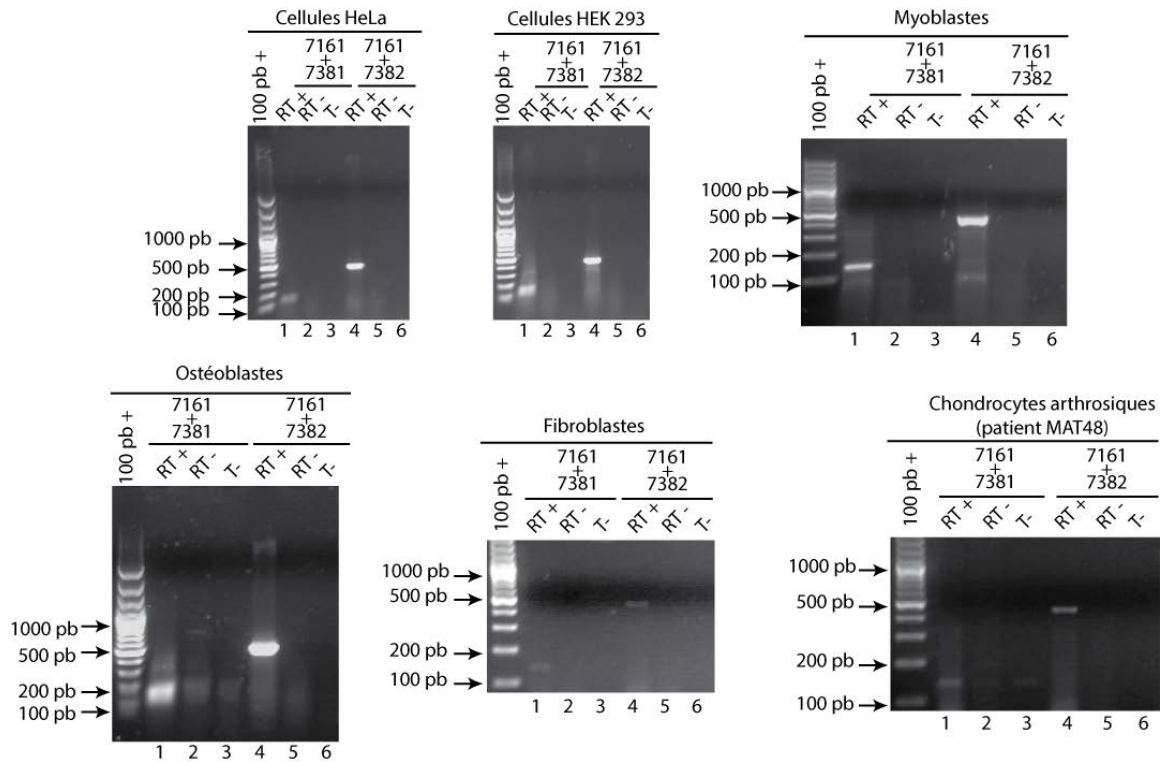
**A.** Représentation schématique de l'organisation du brin codant de la région en 3' de *C9orf3* ainsi que des produits de réaction de PCR attendus. Les éléments sont représentés avec les mêmes symboles que dans la figure 5. Les oligonucléotides sont représentés par des flèches grises.

**B.** Les produits de PCR ont été fractionnés par électrophorèse en gel d'agarose 2% en parallèle d'un marqueur de taille 100 pb Plus (Fermentas). L'ADN génomique a été extrait de chacun des types cellulaires HeLa (a), HEK 293 (b), ostéoblaste (c), myoblaste (d), fibroblaste (e) et chondrocyte (patient arthrosique MAT48) (f) comme décrit en Matériel et Méthodes, et a servi de matrice dans la réaction de PCR réalisée avec chacun des 6 couples d'oligonucléotides présentés en (A) dans les conditions décrites en Matériel et Méthodes. Pour chacun des couples d'oligonucléotides, une réaction de PCR sans matrice a été effectuée comme témoin négatif (T-).

A.



B.



**Figure 53 : Maturation de l'ARN de C9orf3 dans différentes lignées cellulaires.**

A. Représentation schématique de la position des oligonucléotides utilisés (flèches grises) au cours de l'analyse des ADNc par PCR. L'évènement de maturation est indiqué par les traits en pointillés. Les tailles des produits de PCR attendus pour le précurseur ou les produits de maturation sont indiquées.

B. Illustration des profils de migration des produits de PCR en électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Les ARN totaux des types cellulaires HeLa, HEK 293, myoblastes, ostéoblastes, fibroblastes et chondrocytes ont été analysés par RT-PCR (pistes RT+) comme indiqué en Matériel et Méthodes. Deux témoins négatifs ont été déposés en parallèle des pistes RT+ : une réaction sans matrice (pistes T-) et une réaction RT-, réalisée sans transcriptase réverse, permettant de vérifier l'absence d'ADNg dans l'échantillon d'ARN analysé. Le marqueur de taille 100 pb Plus (MBI Fermentas) permet d'estimer la taille des amplicons obtenus.



poly-dT (7160), sur des ARN totaux extraits à partir de chacune des 6 lignées cellulaires a été réalisée. Les ADNc produits ont servi de matrice à une réaction de PCR employant comme amorce l'oligonucléotide amont 7161 (complémentaire de l'exon 13) et les oligonucléotides aval 7381 ou 7382 (complémentaires de la région 3'UTR) (Figure 53A). La maturation devait conduire à l'amplification de fragments d'ADN de 140 pb avec le couple d'oligonucléotides (7161 ; 7381) et 441 pb avec le couple (7161 ; 7382). Des bandes présentant une migration avec les tailles attendues ont été observées après électrophorèse en gel d'agarose pour les 6 lignées cellulaires étudiées (pistes 1 et 4, Figure 53B). Les amplicons présents dans ces bandes ont été clonés et leur séquençage a confirmé qu'ils étaient bien les produits d'amplification d'ARNm de *C9orf3* ayant subi l'évènement de maturation. Ces résultats suggèrent que l'évènement de maturation est conservé dans les différentes lignées cellulaires humaines analysées.

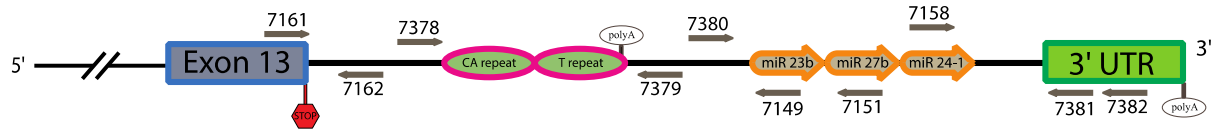
## 2. Recherche de transcrits *C9orf3* à extrémités 3' alternatives:

Les données préliminaires obtenues à partir des puces à microARN indiquaient que les miARN du cluster d'intérêt étaient produits de manière différentielle. Nous avons donc émis l'hypothèse que des transcrits alternatifs correspondant à des ARN précurseurs potentiels pouvaient être produits à partir de *C9orf3*. Comme mentionné plus haut dans la présentation de cette partie du travail, une première étape dans cette analyse a été de rechercher, par bioinformatique, la présence de sites de polyadénylation alternatifs. Cette analyse nous a permis de localiser trouver deux sites de polyadénylation potentiels : l'un situé à l'extrémité 3' de l'ORF et un site plus précoce, situé en amont du cluster de gènes de miARN, à savoir à l'extrémité 3' de la région riche en répétitions en T.

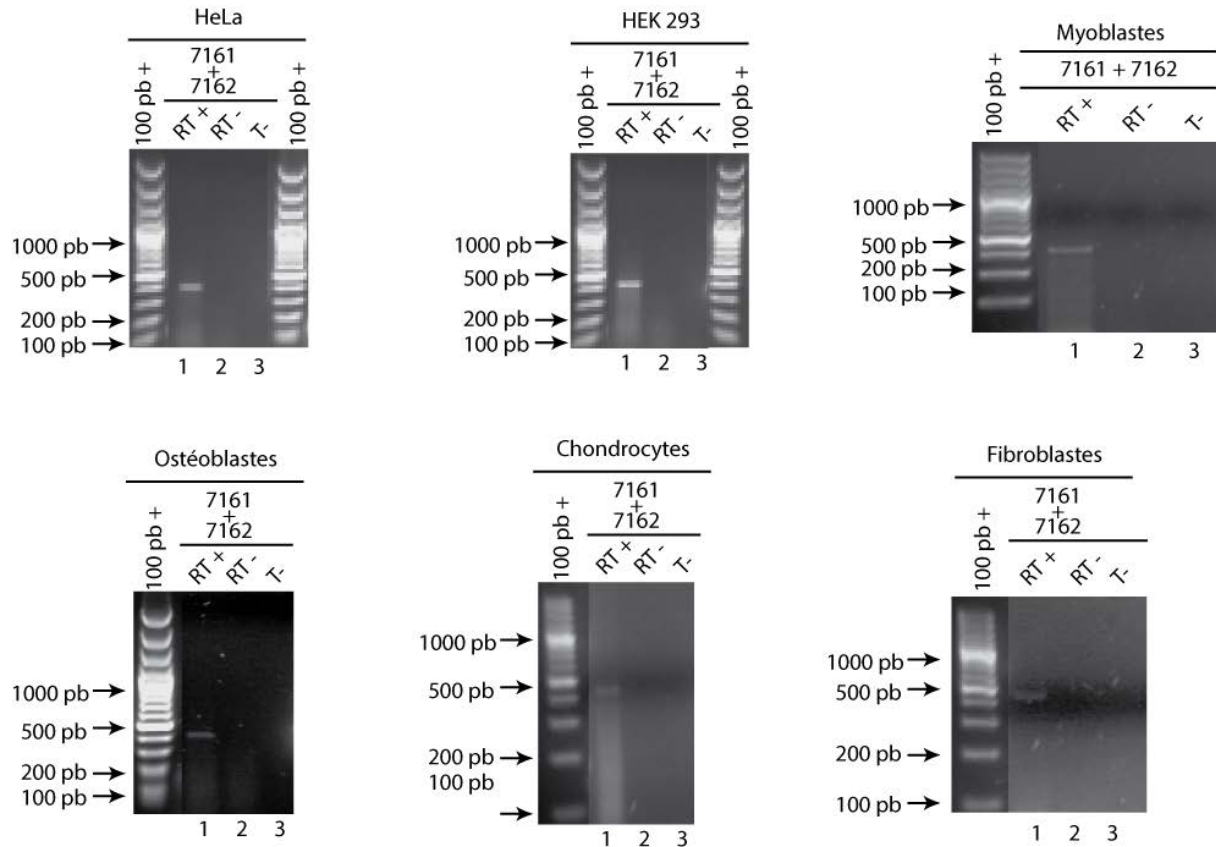
Nous avons ensuite voulu vérifier expérimentalement les données bio-informatiques en effectuant des analyses par RT-PCR. Des réactions de PCR ont été réalisées à partir des ADNc dont la synthèse a été amorcée avec un oligo poly-dT (7160), et en utilisant les 6 couples d'oligonucléotides répartis tout au long de la séquence d'intérêt comme décrit pour l'analyse des ADNg (cf. Résultats A. I.) (Figure 54A). De façon remarquable, une seule réaction de PCR réalisée avec le couple d'oligonucléotides (7161 ; 7162) (pistes 1, Figure 54B) a conduit à une amplification. Les réactions de PCR réalisées avec des oligonucléotides s'appariant à la séquence de *C9orf3* en aval de la région de répétitions de T n'ont pas permis d'amplifier un quelconque fragment (résultats non présentés). Un problème technique d'absence d'amplification liée à l'inefficacité des amorces de PCR utilisées pourrait expliquer l'absence d'amplification. Cependant cette hypothèse est contredite de par le fait que ces



A.



B.



**Figure 54 : Analyse par RT-PCR des transcrits polyadénylés de C9orf3 dans différentes lignées cellulaires.**

**A.** Représentation schématique de la position des oligonucléotides utilisés (flèches grises) au cours de l'analyse des ADNc par PCR. Les signaux de polyadénylation (5'-AATAAA-3') (polyA) sont indiqués.

**B.** Les produits de PCR réalisée avec les amorces 7161 et 7162 amplifiant un fragment de 388 pb ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. 6 lignées cellulaires ont été analysées : HeLa, HEK 293, myoblastes, ostéoblastes chondrocytes arthrosiques et fibroblastes. Comme dans la figure 52, deux témoins négatifs T- et RT- et ont été déposés en parallèle des pistes RT+. Le marqueur de taille 100 pb Plus (MBI Fermentas) permet d'estimer la taille des amplicons obtenus. Les produits PCR obtenus dans chacune des pistes 1 ont été clonés et séquencés.



couples d'oligonucléotides, déjà utilisés dans les expériences de caractérisation de l'extrémité 3' de *C9orf3*, permettaient l'amplification de fragments d'ADN attendus (cf. Figure 52).

Aussi, en prenant en compte la présence d'un signal alternatif de polyadénylation en 3' de la région de répétitions de T, les résultats obtenus sont compatibles avec la production dans les différents types cellulaires d'un transcrit polyadénylé de *C9orf3* présentant une taille réduite de sa séquence 3' UTR. Les séquences des microARN miR-23b, miR-27b et miR-24-1 ne sont pas présentes sur ce transcrit qui n'est donc pas concerné par l'évènement de maturation étudié.

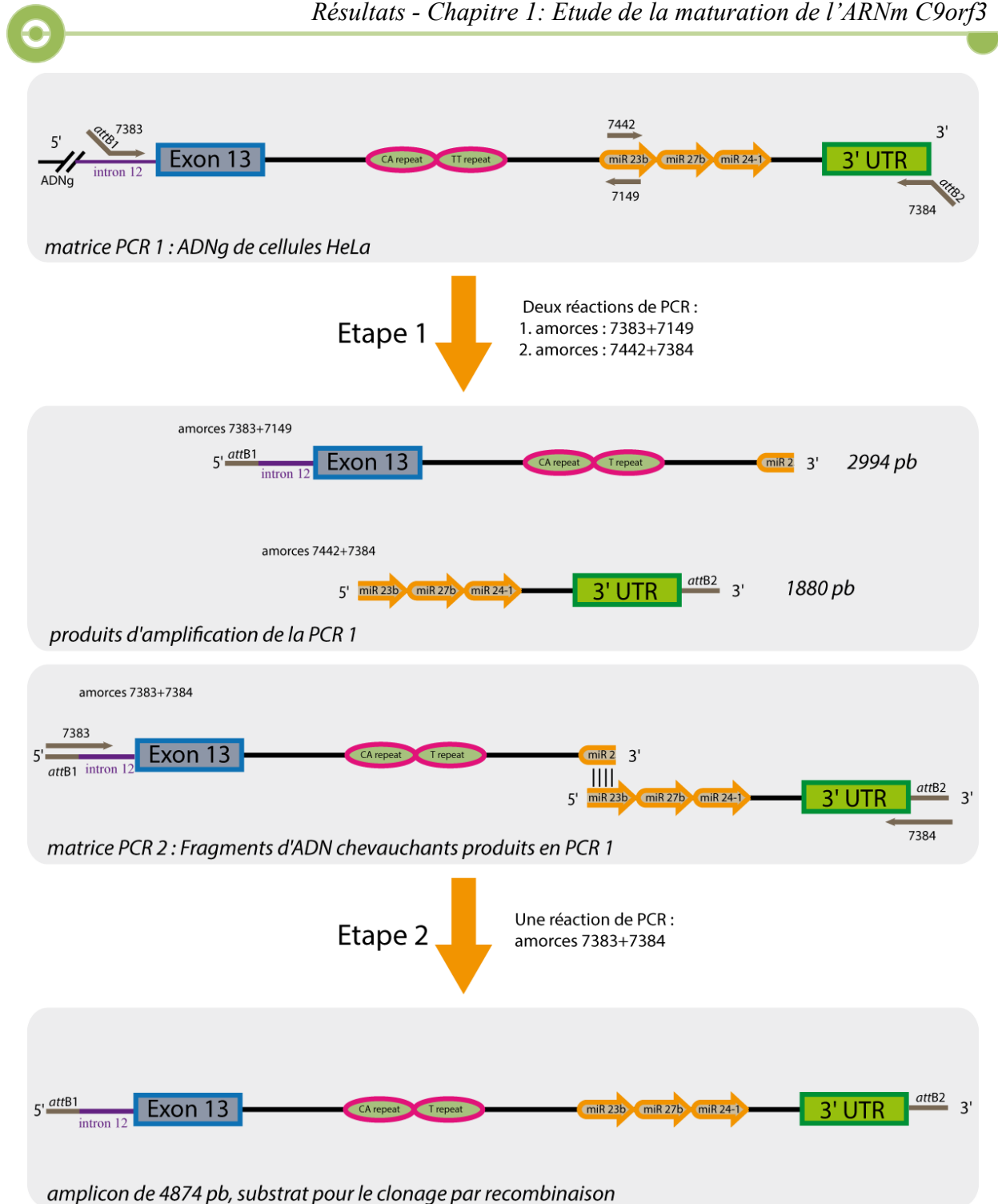
### **III. Construction d'un minigène**

#### **1. Méthodologie**

Nos premiers résultats indiquaient donc que l'étape de maturation post-transcriptionnelle de l'extrémité 3' de *C9orf3* ne semblait pas être issue d'une variabilité génique mais plutôt d'un phénomène commun à plusieurs lignées cellulaires. Afin de faciliter l'étude de ce processus et d'identifier la machinerie moléculaire impliquée, nous avons opté pour la construction d'un minigène. De plus, le second objectif de la mise en place d'une telle construction était de développer un outil pour l'étude de la biogénèse des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1 *in vivo*.

Pour ce faire, nous avons cloné un fragment d'ADN portant l'extrémité 3' de la séquence de *C9orf3* au sein du vecteur pSplice Express, utilisé pour étudier les réactions d'épissage alternatif. Ce fragment d'ADN contenant l'extrémité de *C9orf3*, depuis le milieu de l'intron 12 (afin de conserver les signaux d'épissage contenus dans cet intron) jusqu'à la fin de la région 3'UTR, a été amplifié par PCR. L'amplification de la totalité de cette séquence de 4850 pb en une seule réaction de PCR étant impossible dans plusieurs conditions testées, la séquence d'intérêt a été amplifiée en deux étapes de réactions de PCR (Figure 55). Une première étape qui a consisté à la réalisation de 2 réactions de PCR, a permis d'obtenir deux fragments d'ADN en utilisant les couples d'amorces (7383 ; 7149) et (7442 ; 7384). Les amorces 7383 et 7384 permettent d'apporter en 5' et 3' les sites de recombinaison *attB1* et *attB2* utilisés pour le clonage Gateway® présenté dans la partie Matériel et Méthodes. Les produits d'amplifications de l'étape 1 ont été utilisés comme matrice pour une deuxième étape de réaction de PCR en utilisant le couple d'amorces (7383 ; 7384). Après fractionnement par électrophorèse sur gel d'agarose nous avons obtenu un amplicon unique de 4850 pb. Celui-ci a été élué du gel et a servi de substrat pour une réaction de clonage au sein du vecteur pSplice Express, par recombinaison entre les sites *attB1* et *attB2* bordant la séquence d'intérêt de





**Figure 55 : Stratégie d'amplification de la séquence d'intérêt en vue de son clonage dans un vecteur d'expression.**

L'amplification de la séquence comprise entre le milieu de l'intron 12 et la fin de la région 3'UTR a été réalisée en deux étapes de PCR. Une première étape (PCR1) a conduit à l'amplification de 2 fragments, l'un de 2994 pb obtenu avec le couple d'oligonucléotides 7383 et 7149 et l'autre de 1880 pb obtenu avec le couple d'oligonucléotides 7442 et 7384, à partir de 50 ng d'ADNg de cellules HeLa. Les oligonucléotides 7383 et 7384 apportent les sites de recombinaison Gateway® *attB1* et *attB2*. Ces deux produits PCR ont servi de matrice (en mélange équimolaire) pour une deuxième étape (réaction de PCR2) réalisée avec les oligonucléotides 7383 et 7384. Dans cette réaction, les deux fragments d'ADN partiellement complémentaires ont permis de reconstituer un brin matrice continu de la séquence d'intérêt. Au final, un amplicon de 4874 pb a été obtenu, portant l'ensemble de la séquence d'intérêt bordée par les sites *attB1* et *attB2*.



*C9orf3* et les sites *attP1* et *attP2* du vecteur (Figure 56). La séquence du vecteur recombinant obtenu, que l'on nommera pSPminiE13-3U dans la suite de l'étude, a été vérifiée par séquençage.

## 2. Analyse de l'expression du minigène WT et de sa maturation.

Une fois le vecteur pSPminiE13-3U construit, nous avons étudié si l'évènement de maturation avait lieu sur les ARN produits par le minigène de *C9orf3*. Nous avons transfecté des cellules HeLa par le vecteur recombinant pSPminiE13-3U puis mis en place des analyses par RT-PCR dont la réaction de transcription inverse a été amorcée par l'oligonucléotide 7160. Pour discriminer les transcrits *C9orf3* endogènes des transcrits *C9orf3* issus du minigène, nous avons choisi un couple d'oligonucléotides n'amplifiant que les transcrits produits à partir des minigènes étudiés (Figure 57A). Comme attendu, les cellules transfectées par le vecteur pSplice Express non recombinant ne permettent pas d'observer un quelconque signal de maturation. Par contre, pour les cellules transfectées par le minigène WT, on obtient un amplicon correspondant au produit de maturation attendu est obtenu, confirmant en même temps l'efficacité des amorces de PCR pour discriminer les transcrits issus des minigènes (Figure 57B).

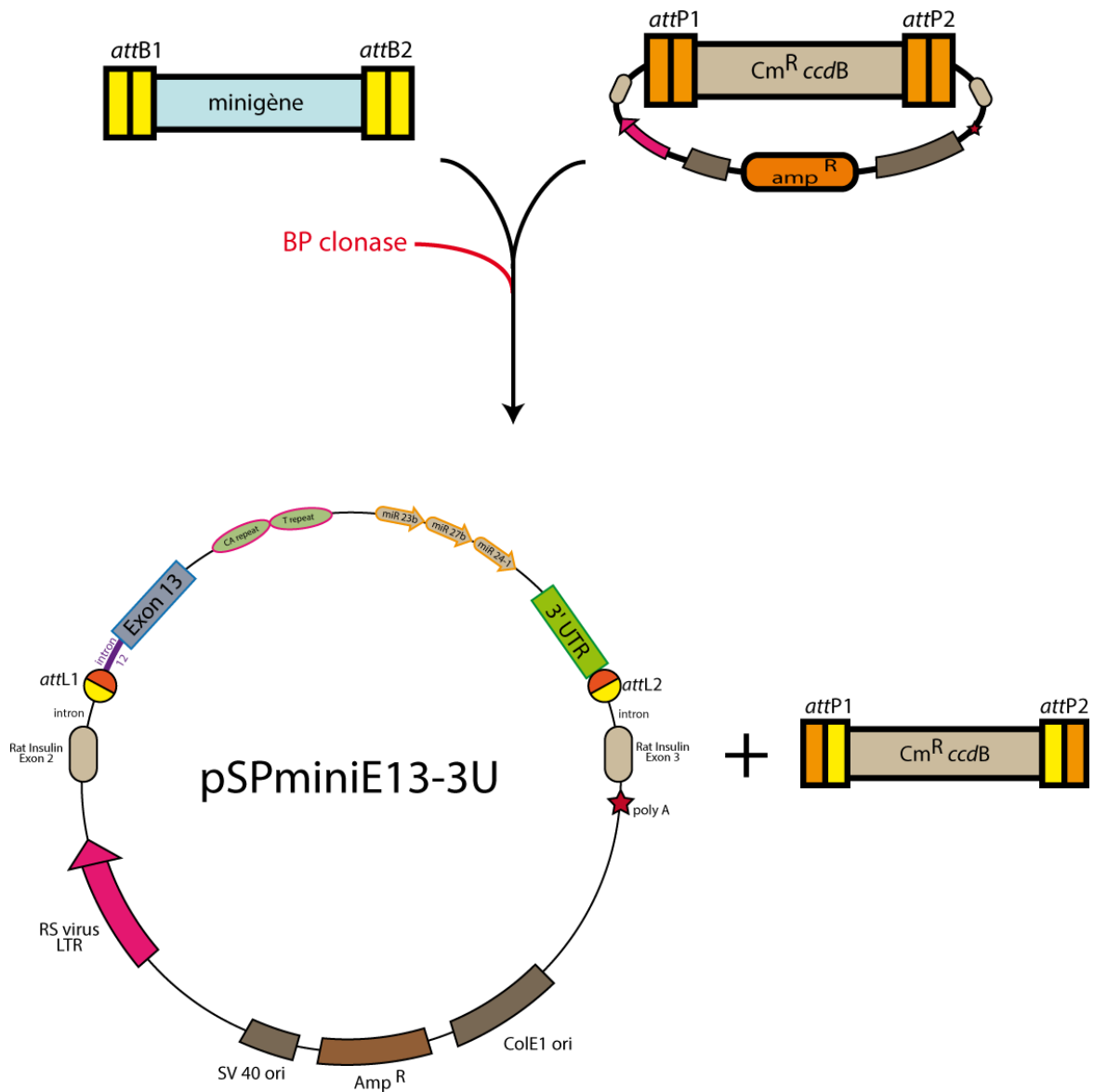
Ces résultats indiquaient que les transcrits produits à partir du minigène étaient maturés et que les déterminants de la maturation de l'extrémité 3' de *C9orf3* étaient présents dans la séquence du minigène.

## **B. Etude de la maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm**

L'étude de la maturation de l'extrémité du pré-ARNm a été poursuivie, dans le but de déterminer les éléments de séquences agissant en *cis* essentiels à cette maturation. Ainsi, l'étude de la maturation a débuté en utilisant différents variants de la construction pSPminiE13-3U portant le minigène.

### **I. Analyses de variants de délétions du minigène WT**

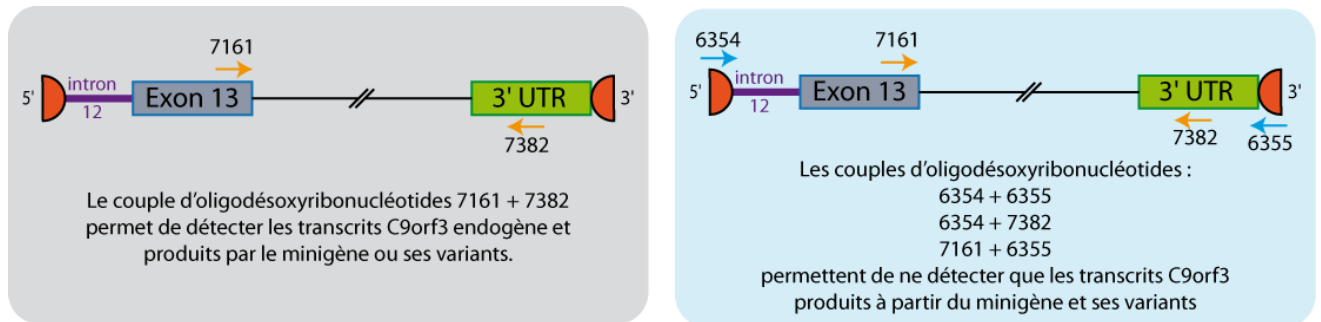
Dans un premier temps, nous avons construit des variants de délétion en délimitant des régions permettant de tester l'intégralité de la région située entre l'exon 13 et la 3'UTR de *C9orf3* (Figure 58). Chaque minigène tronqué, construit selon la technique détaillée dans la partie Matériel et Méthodes (Méthodes, A. IX.) a ensuite été transfecté au sein de cellules



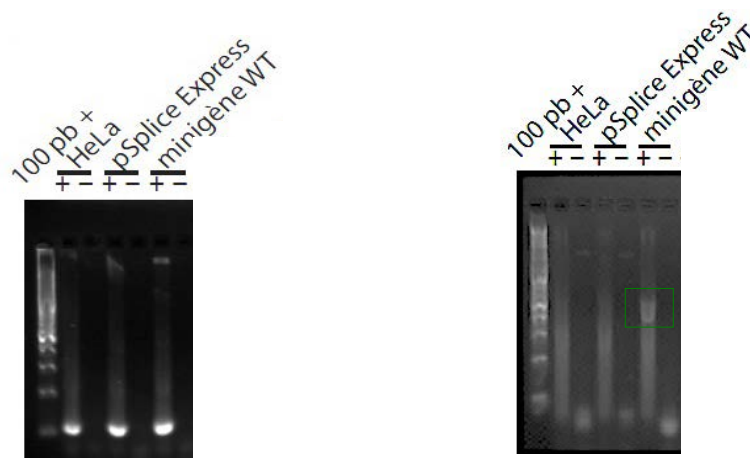
**Figure 56 : Clonage de l'amplicon de 4874 pb dans le vecteur d'expression pSplice Express.**

Le clonage de la séquence d'intérêt dans le vecteur pSplice Express a été réalisé par clonage Gateway®. La recombinaison de la séquence de 4874 pb bordée des sites *attB1* et *attB2* avec les sites *attP1* et *attP2* de la cassette de clonage du vecteur pSplice Express est catalysée par le mélange d'enzyme BP Clonase® (Invitrogen). La réaction de recombinaison permet d'obtenir deux produits, d'une part un fragment portant le gène *ccdB* et d'autre part le vecteur pSplice Express recombinant circulaire que l'on nommera pSPminiE13-3U.

A.



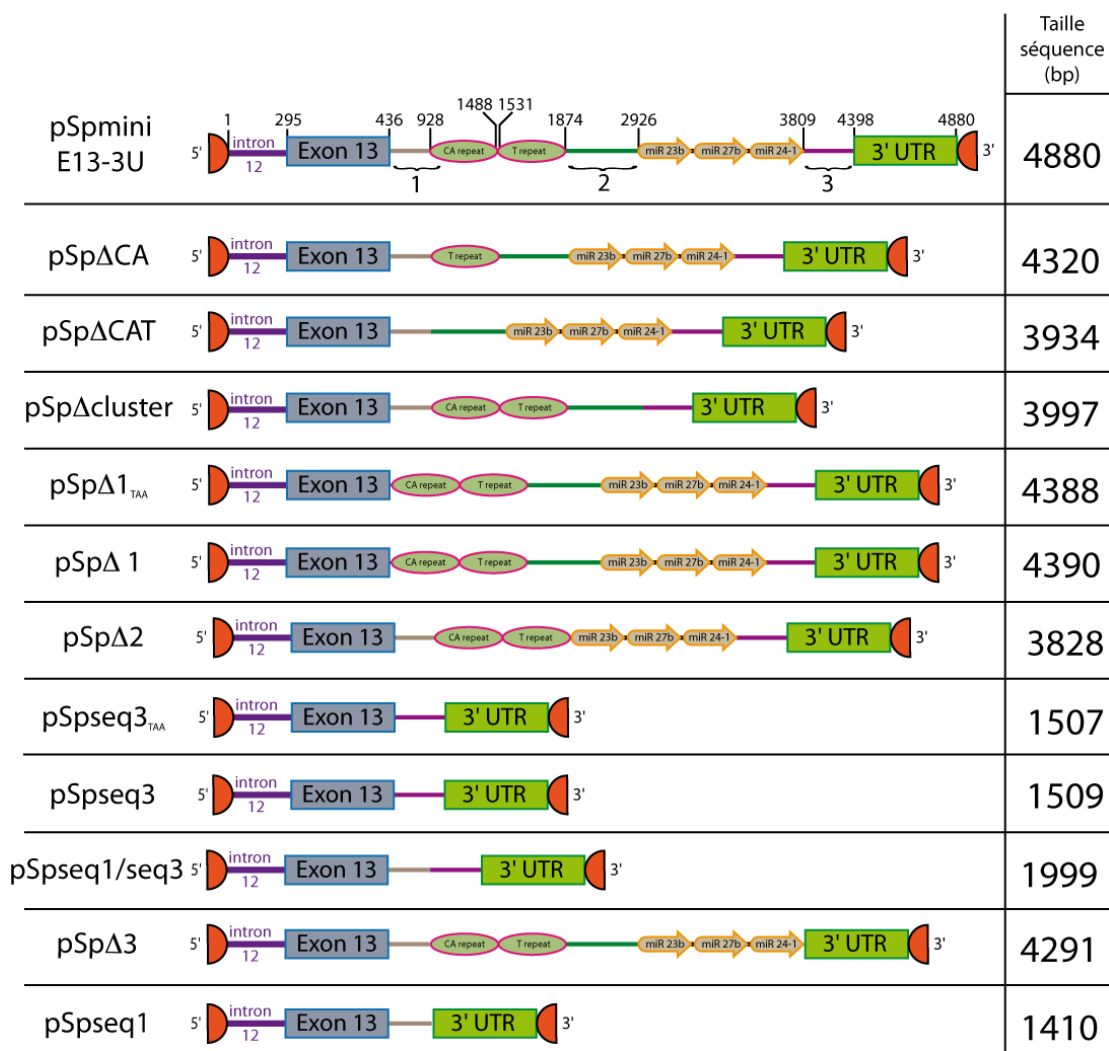
B.



**Figure 57 : Discrimination entre des transcrits issus du minigène et des transcrits endogènes.**

A. Représentations schématiques de l'hybridation des amorces de PCR sur les produits ADNc au cours de la réaction RT-PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques des séquences de recombinaison Gateway, ici représentés en demi cercles oranges, nous permettra de ne détecter que les ARN produits à partir du minigène ou de ses variants et ainsi de s'affranchir du signal endogène.

B. Les résultats de RT-PCR ont été fractionnés sur gel d'agarose 2%. A gauche, les produits amplifiés (120 nt) correspondent à la détection de l'ARNm du témoin invariant  $\beta$ -microglobuline. A droite, sont illustrés les profils de migration des différents minigènes testés. On n'observe aucun amplicon dans les pistes représentant les cellules HeLa non transfectées ainsi que les cellules HeLa transfectées avec le pSplice Express non recombinant. De plus la piste représentant le témoin positif minigène WT on observe un amplicon de taille 534 pb (encadré en vert) correspondant au produit de ligature entre l'exon 13 et la région 3'UTR.



**Figure 58 : Représentations du minigène et de ses formes variantes tronquées.**

Plusieurs variants de délétions ont été produits à partir du minigène WT (pSpminiE13-3U). Chaque région d'intérêt a été tronquée à partir de bornes déterminées arbitrairement qui sont indiquées sur le schéma représentant le minigène WT. La taille (en paires de bases) de chaque variant est indiquée dans la colonne de gauche.



HeLa et la maturation de *C9orf3* a été analysée par des expériences de RT-PCR décrites précédemment (Chapitre 1, III. b.) (Figure 59A).

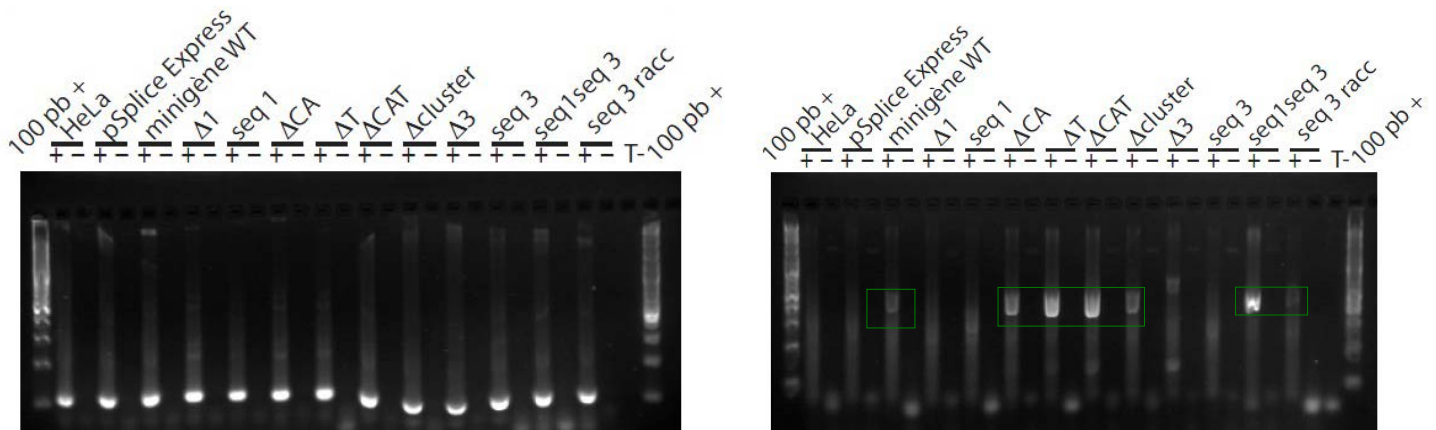
En analysant alors les profils de migration, nous avons pu observer l'importance des régions bordant la séquence excisée, à savoir les régions appelées 1 et 3. En leur présence, la maturation est visible alors qu'en leur absence cette maturation est abolie. Les délétions des autres régions plus internes à cette séquence excisée n'aboutissent pas à la perte de cette maturation. Enfin, le profil de migration de la construction ne contenant que les séquences des régions dites 1 et 3 appelée pSpseq1seq3, on pouvait remarquer qu'il est le même que celui du minigène WT. Le séquençage de l'amplicon observé dans la piste « pSpseq1seq3 » nous a permis de valider la capacité de ce variant à réaliser une maturation de type sauvage. En effet ce produit d'amplification correspondait au produit de ligation entre l'exon 13 et la région 3'UTR de *C9orf3*.

Nous pouvions conclure que les régions 1 et 3 bordant cette grande séquence sont essentielles à la maturation du pré-ARNm *C9orf3*. Cette construction a permis un raccourcissement conséquent de la taille du minigène (4880 pb pour le minigène WT à un minigène de 1999 pb pour la construction pSpseq1seq3) (Figure 59B).

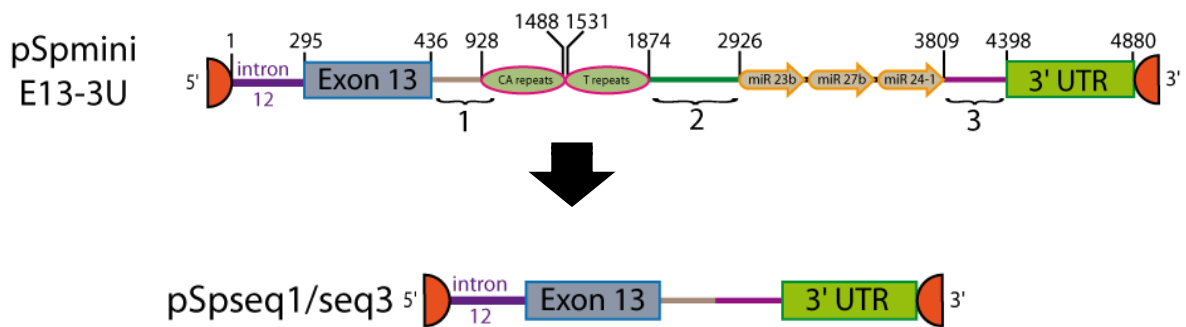
## **II. Analyses de variants de délétions du minigène pSpseq1seq3 :**

Afin de rechercher les éléments de séquence essentiels présents au sein des séquences 1 et 3 du minigène pSpseq1seq3, des variants de délétions supplémentaires ont été construits (Figure 60A). Ainsi les séquences 1 et 3 ont été réduites en taille à 105 nucléotides pour la séquence 1 et 100 nucléotides pour la séquence 3, tout en conservant les extrémités 5' et 3' de ces régions. Enfin un minigène réduit à 105 pb, comprenant les 50 premiers nucléotides de la séquence 1 et les 50 derniers nucléotides de la séquence 3, a aussi été construit. L'analyse de la maturation de chacun de ces trois variants a été réalisée comme précédemment (Figure 60B.) et nous avons observé le processus de maturation des ARN produits par chaque minigène raccourci. Nous en avons conclu alors, que les éléments *cis* recherchés étaient présents aux bornes de la région excisée, à savoir au sein des 50 premiers nucléotides de la séquence 1, ainsi qu'au sein des 50 derniers nucléotides de la séquence 3.

**A.**



**B.**

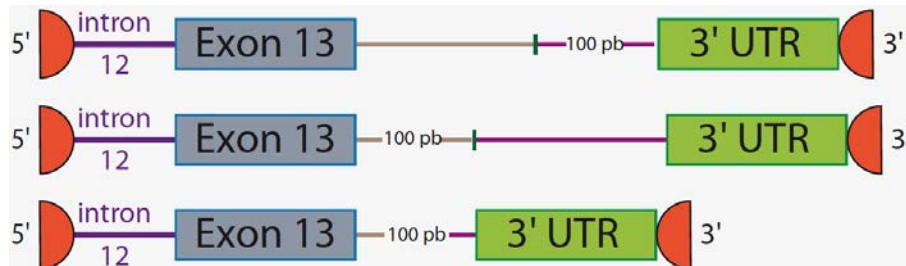


**Figure 59 : Expériences visant à la détection de la maturation du pré-ARNm de *C9orf3* par RT-PCR semi-quantitative.**

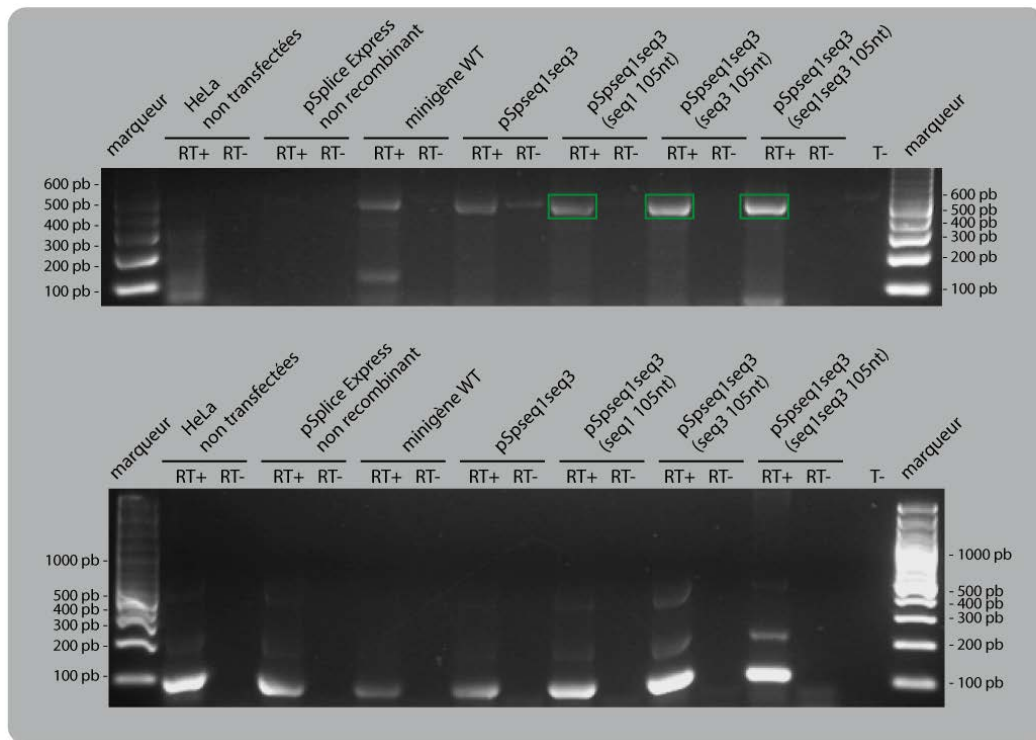
**A.** Les résultats de RT-PCR ont été fractionnés sur gel d'agarose 2%. A gauche, les produits amplifiés (120 nt) correspondent à la détection de l'ARNm du témoin invariant  $\beta$ -2-microglobuline. A droite, sont illustrés les profils de migration des différents minigènes testés. On n'observe aucun amplicon dans les pistes représentant les cellules HeLa non transfectées ainsi que les cellules HeLa transfectées avec le pSplice Express non recombinant. De plus la piste représentant le témoin positif minigène WT on observe un amplicon de taille 534 pb correspondant au produit de ligature entre l'exon 13 et la région 3'UTR. Chaque produit de maturation détecté a été vérifié par séquençage. La maturation est abolie pour tous les variants dont les séquences 1 ou 3 ont été invalidées. La maturation du variant pSpseq1seq3 est fonctionnelle.

**B.** Représentation schématique de la comparaison entre le minigène WT (pSpminiE13-3U) (4880 pb) et le variant pSpseq1seq3 (1999 pb). Ce minigène fonctionnel possède une taille réduite de 2,5 fois par rapport au minigène initial.

A.



B.



**Figure 60 : Analyse de la maturation des variants raccourcis du minigène pSpseq1seq3.**

**A.** Représentation schématique des variants de pSpseq1seq3 dont la séquence 1 ou la séquence 3 ou les deux ont été réduites en leur centre à 50 ou 55 pb.

**B.** Les ARN totaux des cellules HeLa non transfectées, ou les cellules HeLa transfectées par pSplice Express non recombinant ont servi de témoin négatif et les minigènes WT et pSpseq1seq3 ont servi de témoin positifs de maturation. Les trois variants portant les délétions (pSpseq1seq3 seq1-105nt, pSpseq1seq3 seq3-105nt, pSpseq1seq3 seq1seq3-105nt) ont été analysés par RT-PCR comme précédemment. De plus la détection de l'ARNm de la β-2-microglobuline a été réalisée.

Les trois variants testés montrent tous un profil de migration (encadrés verts) identique aux témoins positifs et la séquence des amplicons obtenus a été vérifiée par séquençage.





### **III. Analyses de variants ponctuels du minigène pSpseq1seq3 (105nt) :**

Compte tenu des informations obtenues à ce stade, nous avons produit de nouveaux variants à partir du minigène pSpseq1seq3 (105nt) (Figure 61A) Ainsi les 3 ou 6 premiers nucléotides de la région 1 et les 3 ou 6 derniers nucléotides de la région 3 ont été mutés aléatoirement.

La maturation de ces variants a été analysée comme précédemment (Figure 61B) et les produits de maturation ont été caractérisés par séquençage. Contrairement aux témoins positifs de maturation, à savoir les minigènes WT et pSpseq1seq3, les mutants de l'extrémité 5' de la séquence 1 abolissent cette maturation. De plus, dans les pistes correspondant aux produits de maturation des mutants de l'extrémité 3' de la séquence 3, un amplicon unique est observé mais de taille inférieure à celle des témoins positifs. Le séquençage de cet amplicon a permis de mettre en évidence que ces deux variants étaient incapables d'aboutir à une maturation de type WT (Figure 61C). Ainsi la mutation des 6 derniers nucléotides de la séquence 3 empêche la machinerie moléculaire impliquée de réaliser une maturation de type WT, au profit d'une maturation alternative. Cette maturation alternative utilise un site cryptique présent au sein de la région 3'UTR de *C9orf3*.

Nous avons conclu que les nucléotides des bornes de l'élément excisé étaient indispensables à la maturation de *C9orf3*.

Toutes ces informations nous laissaient fortement penser à l'implication de la machinerie d'épissage en tant qu'acteur de cette maturation, compte tenu de la localisation de ces éléments *cis*. Aussi le 1<sup>er</sup> avril 2012 la base de donnée NCBI a été mise à jour et les extrémités de l'exon 13 et de la région 3'UTR de *C9orf3* ont été affinées, faisant apparaître des sites canoniques d'épissage. Nos résultats ont donc permis de confirmer le rôle de l'épissage dans la maturation de la séquence portant le cluster de miARN d'intérêt miR-23b~27b~24-1. Ce cluster était donc présent au sein d'un intron, l'intron 13 de *C9orf3*, localisé en aval du dernier exon codant. Cependant la réalisation d'une expérience de séquençage à haut débit du gène *C9orf3* nous aurait permis d'arriver à cette conclusion plus rapidement.

Enfin, au vu des résultats obtenus pour la construction pSpΔcluster, la délétion du cluster de miRNA n'a aucun effet délétère sur l'épissage de cet intron. La question restant en suspens est de savoir s'il existe un lien entre cet épissage et la production des miRNA miR-23b, -27b et -24-1.

A.

minigène WT

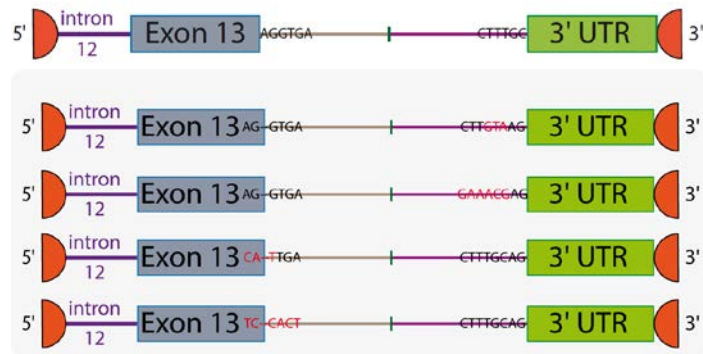
pSpseq1seq3 :

seq3 mut-3nt

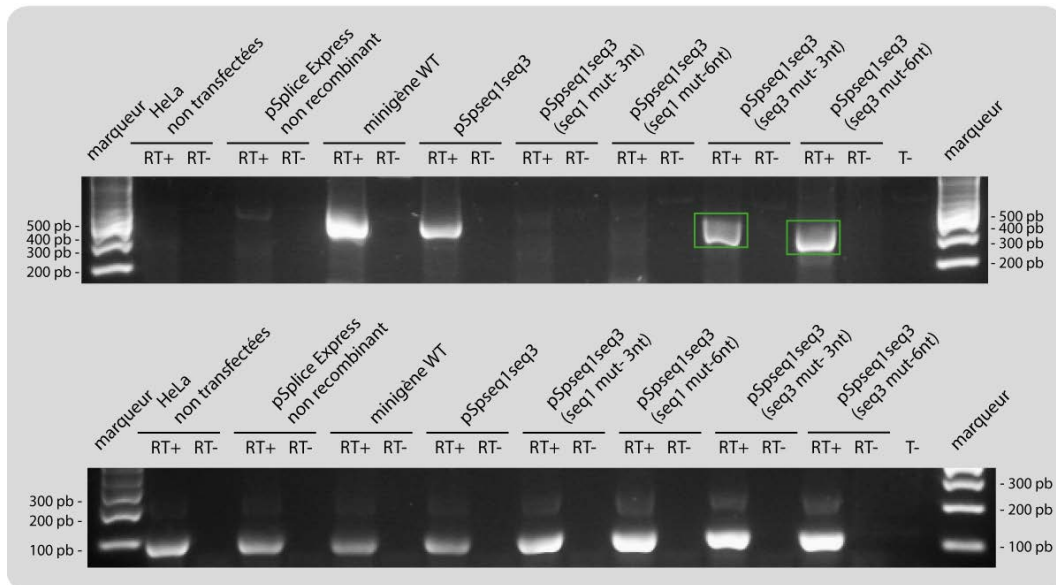
seq3 mut-6nt

seq1 mut-3nt

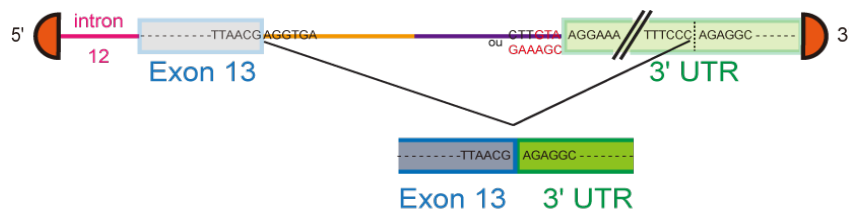
seq1 mut-6nt



B.



C.



**Figure 61 : Analyse de la maturation des variants ponctuels du minigène pSpseq1seq3.**

**A.** Schéma représentant les nucléotides bordant la région excisée du minigène WT et des 4 variants ponctuels produits par mutagenèse dirigée.

**B.** Les variants ponctuels ont été analysés dans les mêmes conditions de RT-PCR que précédemment. On remarque que la maturation est abolie pour les minigènes mutés dans la séquence 1 alors que les profils de migration des variants de la séquence 3 présentent un amplicon différent de celui de type WT (384 pb) (encadré en vert). La séquence de ces amplicons a été vérifiée par séquençage.

**C.** Les variants dont la séquence 3 est mutée permettent une maturation de *C9orf3* qui est alternative. Le site cryptique de maturation utilisé est indiqué par les pointillés verticaux.



## Chapitre 2 : Etude de la régulation de l'expression des gènes de miARN du cluster miR-23b~27b~24-1

Comme je l'ai décrit dans la partie Introduction, de nombreuses études au cours des 10 dernières années ont permis d'identifier les grandes étapes de la biogénèse des miARN, de comprendre leur mode d'action et les mécanismes permettant la régulation post-transcriptionnelle d'ARNm. Parallèlement les rôles des miARN dans des processus de différenciation cellulaire, de prolifération cellulaire ou encore d'apoptose, ont été mis en évidence. La dérégulation des mécanismes assurant la production des miARN peut alors entraîner la perturbation de ces processus cellulaires et engendrer des pathologies. Actuellement beaucoup d'études visent à identifier les miARN dont la variation de production serait en lien avec des pathologies. Enfin les « catalogues » de miARN produits dans un organisme commencent à être bien établis mais l'identification des cibles de ces miARN reste un enjeu majeur.

Cependant, il reste à ce jour beaucoup de questions à propos de la régulation de la production des miARN. En effet chacune des étapes de la biogénèse des miARN est une étape de régulation potentielle. De plus plusieurs études ont souligné l'existence de production différentielle de miARN dont les gènes appartiennent à un même cluster, suggérant l'existence de mécanismes de régulation à une étape transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. En prenant en compte cela, dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'étude de la production différentielle des miR-23b, -27b et -24-1 humains.

### **A. Mise en évidence d'une production différentielle des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1**

#### **I. Expériences de puces dédiées aux petits ARN non codants.**

Dans l'arthrose, une réaction inflammatoire synoviale modifie le phénotype des cellules du cartilage, les chondrocytes, qui ne peuvent plus assurer le maintien de la matrice du cartilage. Cette perte du phénotype différencié des chondrocytes est associée à la destruction du cartilage, du fait d'une très faible capacité de régénération du cartilage lésé. L'apparition de



ce phénotype et les déterminants initiant ces changements phénotypiques sont encore mal caractérisés. Il est nécessaire d'identifier un plus grand nombre de marqueurs biochimiques associés.

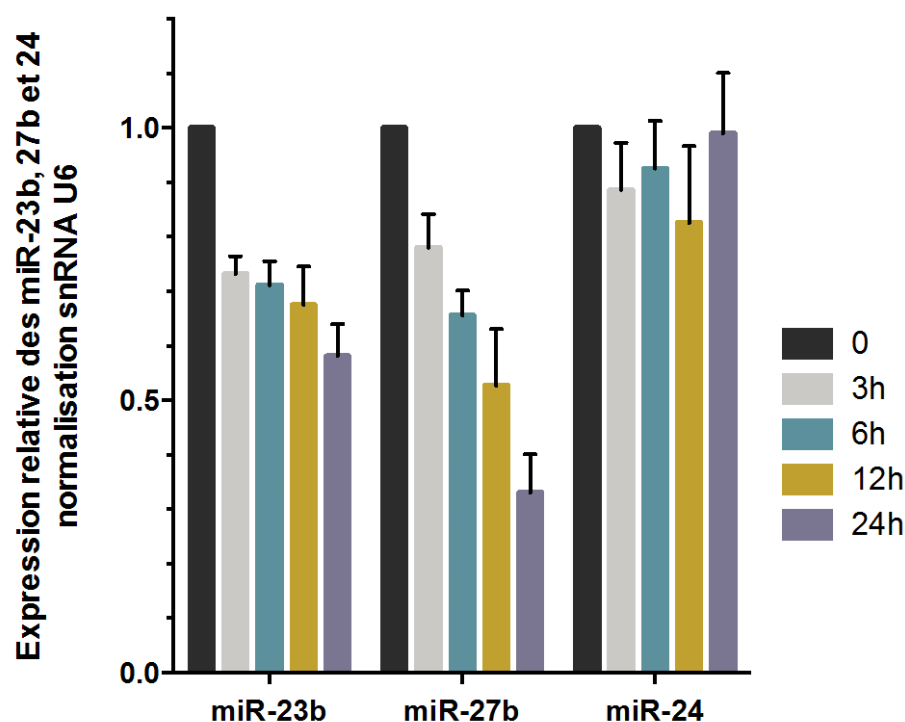
Ces dernières années les microRNA ont été identifiés comme des acteurs essentiels de la différenciation cellulaire. Ainsi, leur implication dans la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes a été observée (Goff et al. 2008b). De plus, le taux de certains miARN varie dans des chondrocytes sains par rapport à des chondrocytes issus de patients arthrosiques (Iliopoulos et al. 2008a). Ces données font apparaître que les miARN pourraient représenter des biomarqueurs potentiels de la pathologie arthrosique, mais aussi de l'état phénotypique des chondrocytes sains.

Cela nécessitait l'identification précise des profils d'expression des microARN dans différents types cellulaires et chez les patients arthrosiques. Les deux équipes 1 et 4 du laboratoire IMoPA se sont fixées comme objectif, d'étudier la contribution des microARN dans les modifications phénotypiques affectant les chondrocytes au cours de l'arthrose. Les travaux ont débuté par l'étude de la variation de l'expression des miARN dans un modèle cellulaire maîtrisé de perte du phénotype chondrocytaire. La stratégie a consisté à générer des conditions de culture conduisant à une dé-différenciation d'un chondrocyte en chondrocyte hypertrophique. Ce processus peut être déclenché soit par repiquages ou par traitement à l'interleukine 1 $\beta$ . Des hybridations sur puces dédiées aux petits ARN ont été réalisées à partir des ARN totaux de ces cellules issues de ces différentes conditions, et ont permis d'étudier le patron d'expression des microARN dans les deux états phénotypiques. Un panel de microARN dont l'expression variait dans ces deux états a été identifié.

Ces analyses, réalisées par Véronique Salone, ont permis d'obtenir les profils de variation d'expression des microARN du cluster miR-23b~27b~24-1. Il a ainsi été détecté que les miR-23b et -27b étaient sous exprimés au cours de la dédifférenciation du chondrocyte induite à l'IL-1 $\beta$ , alors que la quantité de miR-24-1 ne variait pas.

## **II. Vérification des données des puces et validation par RT-qPCR :**

Afin de valider les données des puces dédiées aux microARN nous avons traité des cellules chondrocytaires humaines à l'interleukine 1  $\beta$  afin d'induire un phénotype hypertrophique. Ce traitement a été dispensé au cours d'une cinétique de 24h. Les ARN totaux des cellules traitées ont été extraits et les profils d'expression des miR-23b, -27b et -24-1 ont été analysés par qRT-PCR (méthode TaqMan) (Figure 62). Les données obtenues ont été analysées par la



**Figure 62 : Analyse de la production des miR-23b, 27b et 24 dans le modèle de stimulation à l'interleukine 1   de t=0 à 24 heures de traitement**

Les taux de production des miR-23b, 27b et 24 ont été analysés par qPCR (méthode TaqMan) (n=3). L'expression de chaque miRNA a été normalisée à partir de l'expression invariante du témoin snRNA U6 et les quantifications ont été calculées selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak et Schmittgen, 2001). La réaction inflammatoire provoquée par la cytokine entraîne la diminution de l'expression de miR-23b et de miR-27b alors que la production de miR-24 est inchangée. Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois réplicas techniques.



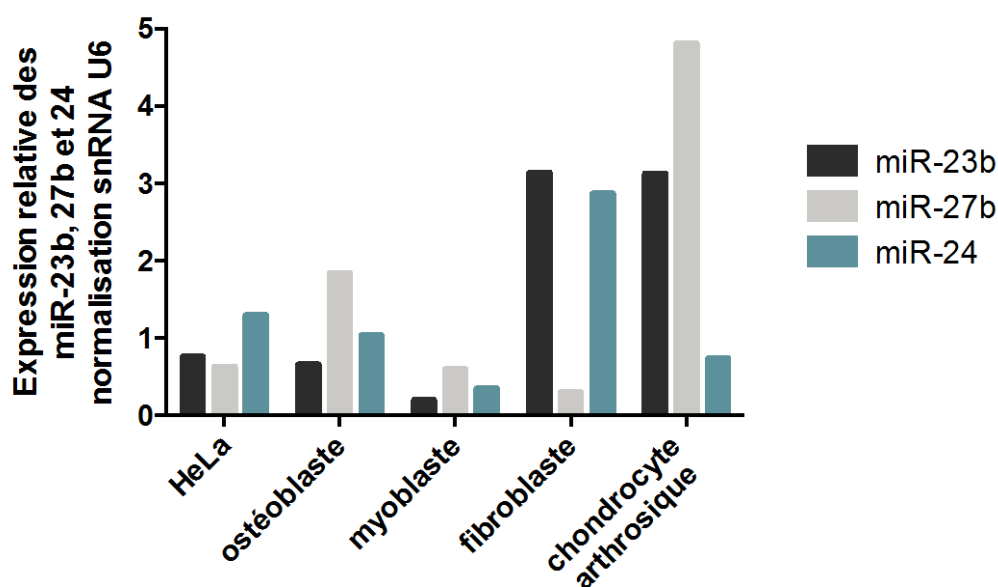
méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  et normalisées à partir d'un ARN dont le taux restait invariant le snARN U6 (Livak and Schmittgen 2001). Nous avons observé une diminution de la production de miR-23b et -27b alors que la production de miR-24-1 restait stable. Ainsi nous avons confirmé les données observées au cours des analyses de puces à microARN mais aussi validé le phénomène de production différentielle des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1 humain.

### **III. Expériences de RT-qPCR dans différents types cellulaires**

Au cours de mon stage de Master 2, des expériences préliminaires de RT-PCR spécifiques et réalisées en conditions semi-quantitatives des miARN matures, en employant comme amorce spécifique de ces espèces pour l'étape de transcription inverse des oligonuléotides structurés en tige-boucle (C. Chen et al. 2005), ont permis de montrer qu'il pouvait y avoir une production différentielle des miARN produits à partir du cluster miR-23b~27b~24-1 au sein de différents types cellulaires. Des expériences de RT-PCR en temps réel (méthode TaqMan<sup>®</sup>) ont été effectuées lors de mon travail de thèse, et j'ai quantifié le taux des miARN matures d'intérêt au sein des types cellulaires HeLa, ostéoblastes, myoblastes, fibroblastes et chondrocytes arthrosiques. Les données obtenues ont été analysées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  et normalisées comme précédemment à partir du snARN U6. Arbitrairement les cellules HeLa ont servi de référence pour quantifier le taux d'expression des miARN (Figure 63). Une production différentielle des miARN produits à partir du cluster de gène d'intérêt est retrouvée et chaque miARN possède un profil de production qui varie d'un type cellulaire à l'autre. Ces résultats suggèrent qu'il existe des mécanismes de régulations transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles spécifiques permettant ces variations dans la production des miARN matures.



|                         | miR-23b | miR-27b | miR-24 |
|-------------------------|---------|---------|--------|
| HeLa                    | 0,76    | 0,63    | 1,30   |
| ostéoblaste             | 0,66    | 1,84    | 1,04   |
| myoblaste               | 0,20    | 0,60    | 0,35   |
| fibroblaste             | 3,14    | 0,30    | 2,87   |
| chondrocyte arthrosique | 3,13    | 4,81    | 0,74   |



**Figure 63 : Analyse de la production des miR-23b, 27b et 24 dans différents types cellulaires par RT-qPCR.**

La production des miR-23b, 27b et 24 a été quantifiée au sein de 6 lignées cellulaires par RT-qPCR en utilisant des sondes TaqMan (n=1). Les valeurs relatives Ct ont été traitées par la méthode du  $-2^{\Delta\Delta Ct}$  et normalisées sur l'expression relative du snRNA U6 dont l'expression reste stable dans les différents types cellulaires. Le graphique représente la production relative des miRNA d'intérêt pour les lignées cellulaires HeLa, ostéoblaste, myoblaste, fibroblaste et chondrocyte arthrosique.



## **B. Recherche de mécanismes permettant la production différentielle des miARN d'intérêt**

### **I. La régulation de la production des miR-23b, -27b et 24-1 est-elle liée à la maturation du pré-ARNm *C9orf3* ?**

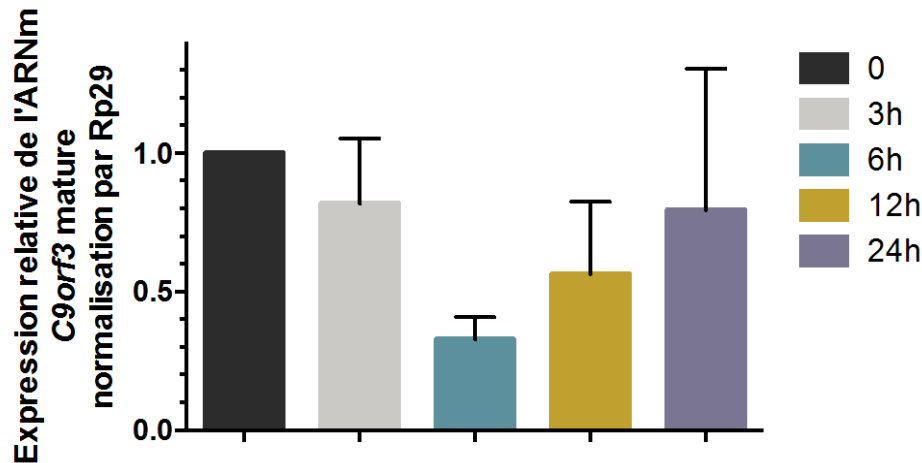
#### **1. Etude de la variation de *C9orf3* dans un modèle cellulaire d'induction à l'IL1- $\beta$ :**

Les analyses précédentes dans un modèle cellulaire d'induction à l'IL-1 $\beta$  ont montré que les miR-23b, -27b et -24-1 portés par l'ORF *C9orf3* étaient exprimés de manière différentielle. Ainsi les miR-23b et -27b ont une production diminuée au cours de la cinétique. Cette diminution est-elle causée par la diminution de l'expression de l'ORF hôte ? Pour répondre à cette question nous avons quantifié le taux de *C9orf3* au sein des ARN totaux issus des expériences de cinétique à la cytokine présentées précédemment. Des expériences de qPCR (SYBR Green) ont été réalisées en utilisant les amorces VS51 et VS52 et les résultats ont été quantifiés par l'expression de l'ARNm invariant *RP29* (Figure 64). Au cours de la cinétique on n'observe aucune variation significative de *C9orf3*. Ainsi la variation de l'expression des miARN ne peut pas être expliquée par une variation de l'expression de l'ORF hôte. Deux hypothèses restent alors en suspens. Soit la régulation de l'expression des miARN du cluster d'intérêt s'effectue à un niveau transcriptionnel, auquel cas un ou des promoteurs alternatifs permettent la production différentielle des miR-23b, -27b et -24-1. Soit la régulation de la production des miARN étudiés est post-transcriptionnelle et potentiellement liée à l'épissage de l'intron 13 de *C9orf3*.

#### **2. Etude de l'expression de l'ORF *C9orf3* au cours de la dédifférenciation du chondrocyte**

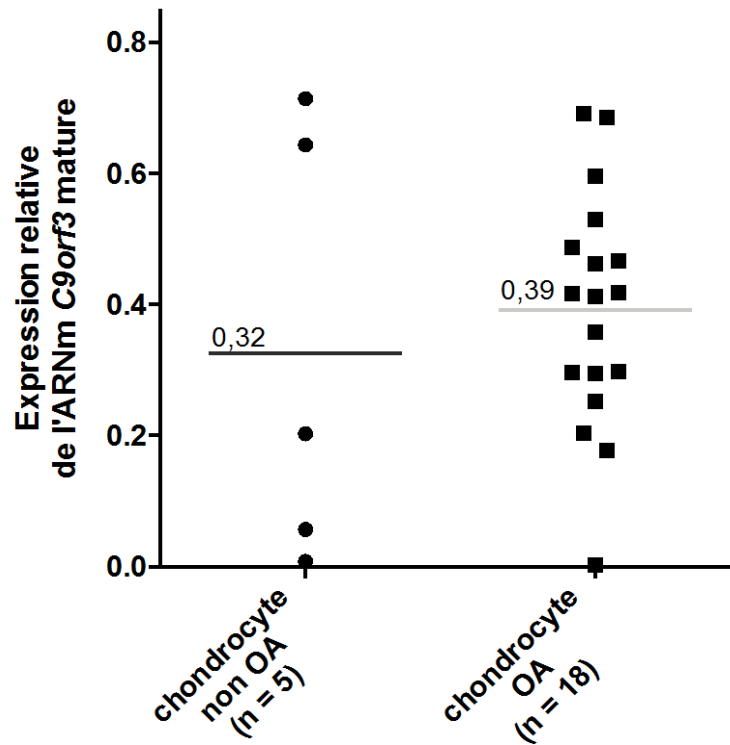
Afin de poursuivre l'étude de la compréhension de la production différentielle des miARN du cluster d'intérêt et donc de la diminution de la production des miR-23b et -27b, notre intérêt s'est porté sur l'ARNm *C9orf3* hôte. Nous avons quantifié le taux relatif d'ARNm *C9orf3* au sein d'extraits d'ARN totaux de cellules chondrocytaires non arthrosiques (5 échantillons) et des chondrocytes arthrosiques (18 échantillons) par qPCR (SYBR Green). Pour ce faire nous avons choisi un couple d'oligonucléotides VS51 et VS52, favorable aux conditions d'amplification d'une réaction de qPCR avec SYBR Green (cf. Méthodes, D. VI.), permettant d'amplifier la jonction exon13/3'UTR de l'ARNm *C9orf3* mature (Figure 65). Les données ont été normalisées à partir de l'ARNm *RP29* dont la quantité est invariante dans nos





**Figure 64 : Analyse du taux d'expression de l'ARNm *C9orf3* dans modèle de stimulation à l'interleukine 1  $\beta$  de t=0 à 24 heures de traitement.**

Les taux d'expression relative de *C9orf3* a été analysé par qPCR (SYBR Green). L'expression de l'ARNm a été normalisée à partir de l'expression du témoin invariant RP29 et les quantifications ont été calculées selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak et Schmittgen, 2001). La réaction inflammatoire provoquée par la cytokine ne provoque de modification du taux d'expression de *C9orf3*. Les barres d'erreurs représentent la moyenne de et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois répliques techniques.



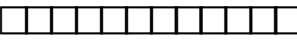
**Figure 65 : Etude de l'expression de l'ORF *C9orf3* au sein de chondrocytes arthrosiques et non arthrosiques.**

L'expression relative de l'ARNm *C9orf3* mature a été quantifiée par la détection par qPCR (méthode SYBR Green) de la jonction exon13/3'UTR de l'ARN mature au sein de populations d'échantillons. 5 lots d'ARN totaux de cellules chondrocytaires humaines de phénotype non arthrosiques (points noirs) ont été comparés à 18 lots d'ARN totaux de cellules de chondrocytes présentant un phénotype arthrosiques (carrés noirs). Les moyennes de valeur de chaque population sont indiquées par les traits horizontaux. Un test *t* ANOVA a été réalisé et les variations d'expression relative de l'ARNm *C9orf3* mature dans ces deux conditions ne sont pas significatives ( $p=0,54$ ).



conditions, et quantifiées à partir d'une gamme de concentrations de l'amplicon attendu. Les résultats indiquent d'une part que le taux d'ARNm *C9orf3* est très variable au sein des panels d'échantillons de chondrocytes sains et arthrosiques. D'autre part nous n'observons aucune distribution similaire entre les deux populations étudiées (patients non OA vs. patients OA) quant à la variation de l'expression de l'ORF en question.

Autrement dit, ces résultats semblent inexploitable. On ne peut donc passer par cette expérience si, au cours de la pathologie arthrosique, l'expression de l'ORF *C9orf3* ne varie pas et ceci contrairement aux profils d'expression des miARN miR-23b, -27b et -24-1 (cf. Figure 62).

En partant prenant en compte les résultats obtenus par notre modèle de stimulation de chondrocytes à l'IL-1 $\beta$ ,  de l'hypothèse selon laquelle les miARN du cluster miR-23b~27b~24-1 seraient considérés comme des miARN dits introniques, pouvant alors être produits à partir d'un précurseur pri-miARN qui ne serait autre que l'ARNm hôte *C9orf3*.

Les résultats de ces expériences nous permettent de déduire que la diminution de production des miR-23b et -27b ne peut pas être expliquée par la variation de la quantité d'ARNm *C9orf3* au cours de la perte de son phénotype différencié.

Ces données, ainsi que la production différentielle des miARN de ce cluster nous permettent d'émettre l'hypothèse que la régulation de la production des miARN du cluster de gène d'intérêt reposerait sur l'activation de promoteurs transcriptionnels alternatifs internes conduisant à des pri-miARN distincts du pré-ARNm *C9orf3*. L'expression différentielle peut également résulter d'un mécanisme post-transcriptionnel touchant aussi bien un pri-miARN correspondant au pré-ARNm *C9orf3* ou un pri-miARN issu d'une initiation de la transcription interne.

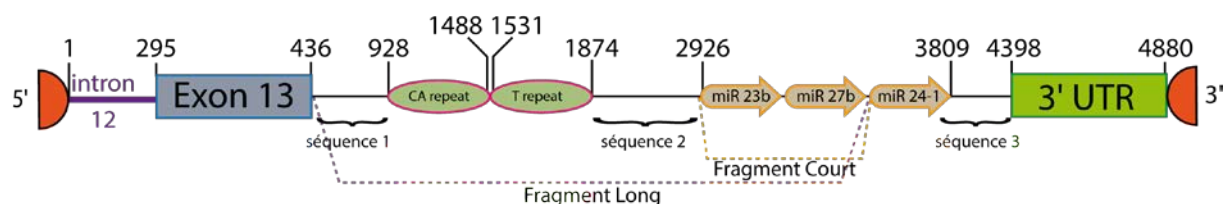
## **II. Recherche de la présence de promoteurs alternatifs au sein de l'intron 13 de *C9orf3* :**

Dans l'hypothèse que la régulation de la production différentielle des miARN serait régie par un mécanisme de régulations transcriptionnelles, nous avons souhaité rechercher la présence éventuelle de promoteur(s) alternatif(s) (Figure 66A), d'une part au sein des 3400 pb en amont du gène codant miR-24-1 (fragment dit « Long » : amplification par PCR grâce au couple d'oligonucléotides (9150 ; 8952)) et d'autre part au sein des 1200 pb en amont de

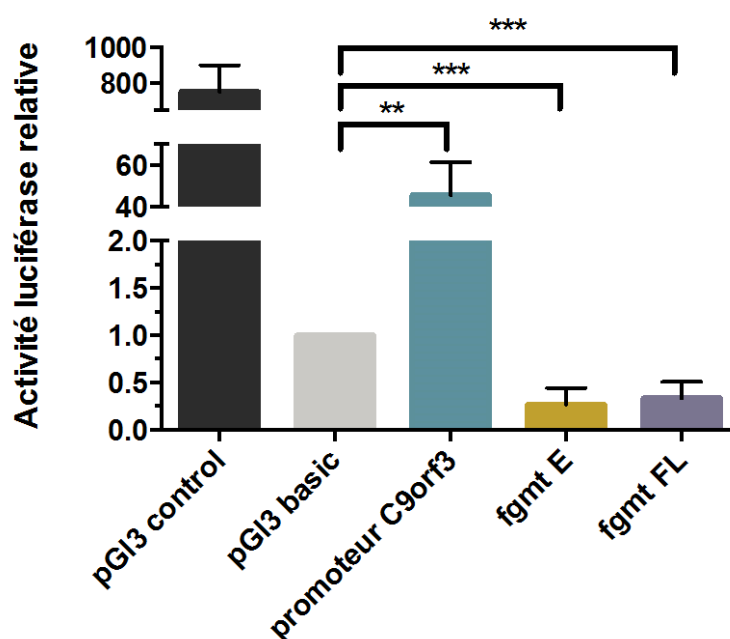


miR-24-1 (séquence comprenant la région du cluster miR-23b~27b~24-1 en amont du gène codant miR-24-1 (fragment dit « Court » amplifié par le couple d'oligonucléotides (7961 ;

A.



B.



**Figure 66 : Recherche de promoteurs alternatifs potentiels en amont du cluster de miR-23b~27b~24-1.**

**A.** Représentation schématique du minigène *C9orf3* WT. Les fragments dont l'activité potentielle de régions promotrices de transcription ont été testées sont indiquées par les parenthèses violette (fragment ADN Long) et jaune ocre (fragment ADN Court). Ces fragments d'ADN ont été clonés au sein du plasmide pGI3-Basic en amont de l'ORF codant la luciférase FireFly mais dépourvu de promoteur transcriptionnel.

**B.** L'activité de la luciférase Firefly a été mesurée au sein d'extraits cellulaires de cellules HeLa transfectées par les différentes constructions génétiques testées (n=3). Le pGI3-control ainsi que le promoteur de l'ORF *C9orf3* humaine ont servi de contrôles positifs tandis que le plasmide pGI3-Basic non recombinant a été utilisé comme témoin négatif de transcription. Les régions candidates testées : le fragment E court (histogramme jaune ocre) et le fragment long FL (histogramme violet, ne semblent pas héberger un quelconque promoteur de transcription). Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois répliques techniques. Des tests *t* statistiques ont été réalisés (\*\* = P<0,01 et \*\*\* = P<0,001).

8952)). Les couples d'amorces PCR apportent les sites de restriction *Mlu*I et *Xho*I permettant le clonage de ces fragments ADN au sein du vecteur pGl3-Basic codant l'ORF de la luciférase Firefly. Ainsi, si une activité promotrice de transcription est présente au sein des séquences testées alors l'ORF de la luciférase sera exprimée et une activité de bioluminescence Firefly pourra être mesurée. De plus le promoteur de l'ORF *C9orf3* comme décrit par une équipe américaine (Zhou et al. 2010) a été cloné (amplification par le couple d'oligonucléotides (9410 ; 9411)) dont l'activité promotrice a été utilisée comme contrôle positif.

Des cellules HeLa ont été transfectées par ces différentes constructions génétiques et les expériences ont été réalisées en triplicats biologiques, dont chaque monoplicat est la moyenne de trois répétitions expérimentales.

Les résultats des mesures d'activité luciférase Firefly ont été représentés sous forme d'histogramme (Figure 66B). Comme attendu, la construction pGl3-Basic + Promoteur *C9orf3* permettent la production de luciférase, ce qui n'est pas le cas du vecteur pGl3-Basic. Quant aux fragments testés, aucune activité promotrice de la transcription n'est observée. Nous avons pu en conclure qu'aucun promoteur alternatif ne semble être contenu dans la séquence de l'intron 13 de *C9orf3*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats, la plus plausible serait que le promoteur alternatif recherché pourrait être localisé plus en amont des bornes des séquences testées, au sein de *C9orf3*.

Alternativement, il reste possible que la régulation de l'expression des miARN soit réalisée à un niveau post-transcriptionnel.

### **C. Etude du rôle de protéines régulatrices d'épissage dans la maturation des miARN d'intérêt :**

Nous avons souhaité étudier l'effet du mécanisme d'épissage de l'intron 13 de *C9orf3* sur la production des miARN. En effet, comme indiqué en introduction, compte tenu du nombre croissant d'études sur le sujet, il semble qu'il existe une relation étroite entre l'épissage d'un intron et la production des miARN portés par cet intron. D'autre part, plusieurs protéines de régulation de l'épissage ont été retrouvées associées aux précurseurs des microARN et influençaient leur maturation (Guil and Caceres 2007).

Ainsi nous avons entrepris de surexprimer des facteurs protéiques de type protéines SR et protéines hnRNP connues pour réguler l'épissage des introns et étudier l'effet de cette surexpression sur le taux des microARN du cluster miR-23b~27b~24-1.



## **I. Surexpression de protéines SR et hnRNP en cellules HEK 293T**

Au laboratoire, des facteurs protéiques de régulation de l'épissage étaient déjà étudiés. Les séquences codant les protéines 9G8, ASF/SF2, SC35, DAZAP, PTB, hnRNP A1, hnRNP K et hnRNP H ont été clonées au sein du plasmide d'expression pXJ-41.

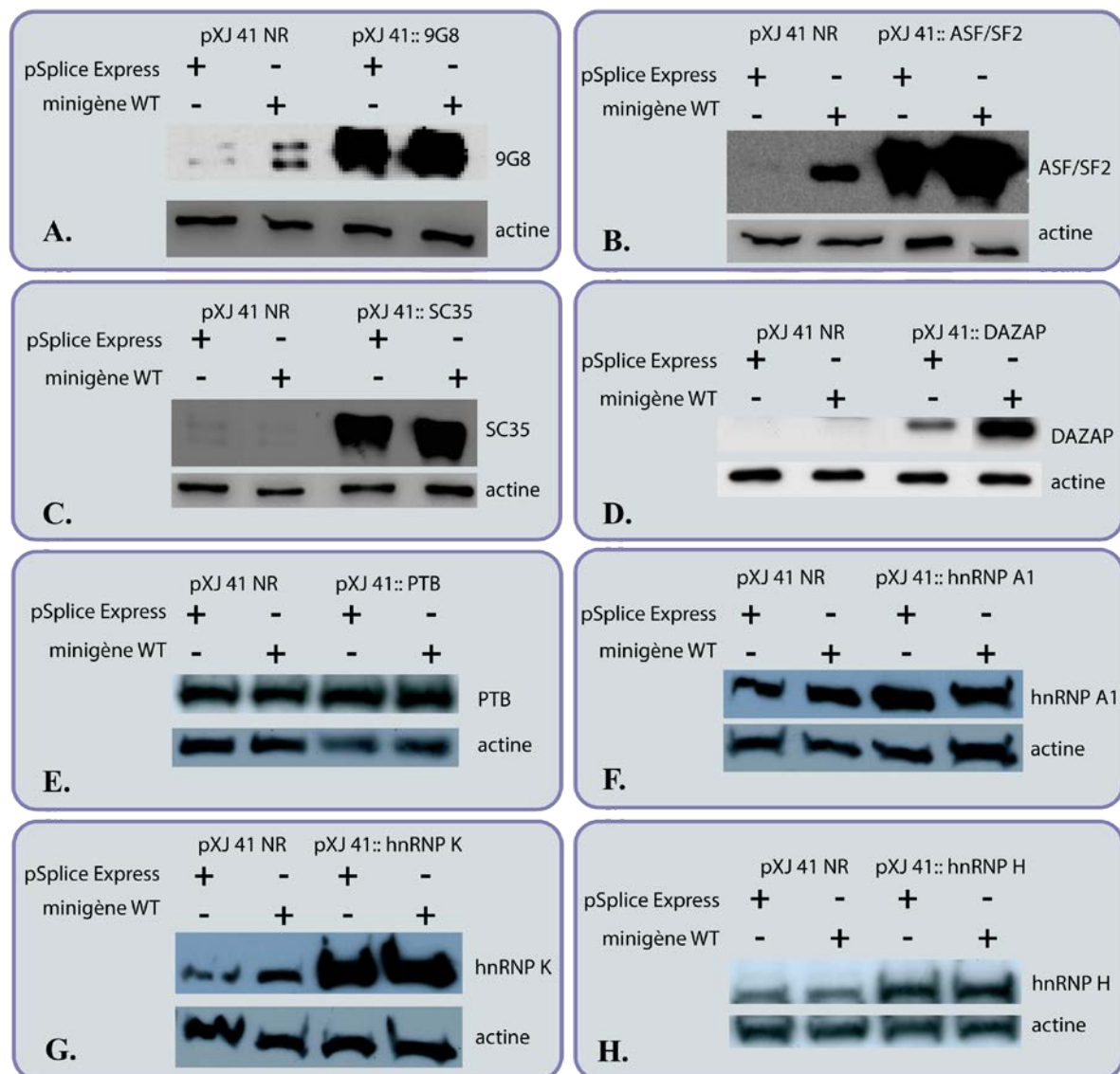
J'ai transfecté des cellules HEK 293T avec 0,5 µg de chaque plasmide recombinant et le vecteur exprimant le minigène WT. Des contrôles ont été effectués avec des co-transfections réalisées avec des vecteurs non recombinants. La surexpression de chacune des protéines a été vérifiée par Western Blot (Figure 67). Les ARN totaux de chaque test ont été extraits pour être analysés par RT-qPCR.

### **1. Quantification des taux de pré-ARNm et ARNm *C9orf3* dans un contexte de surexpression de protéine SR et hnRNP**

Pour chaque expérience de surexpression de facteur d'épissage, les taux de pré-ARNm et ARNm *C9orf3* ont été quantifiés par RT-qPCR SYBR Green. Les ADNc ont été produits en utilisant une amorce de transcription inverse de séquence hexamérique aléatoire. La quantification du taux de pré-ARNm *C9orf3* a été réalisée par l'amplification de la jonction exon13-intron13 de *C9orf3* (couple d'amorces (7161 ; VS33)) et la quantification de l'ARNm *C9orf3* mature a été réalisée par l'amplification de la jonction exon13/3'UTR de *C9orf3* (couple d'amorces (7161 ; 7381)). Les taux des ARNm d'intérêts ont été normalisés par la détection de l'ARN snRNA U6 (couple d'amorces (7887 ; 7886)). Les résultats des analyses des ARN endogènes et ceux représentant les ARN endogènes et les transcrits issus du minigène sont illustrés en Figure 68.

Dans le cas de la détection du pré-ARNm *C9orf3* endogène (Figure 68A) on observe que la surexpression des protéines 9G8, ASF/SF2 et DAZAP entraîneraient la diminution d'un facteur ~2 du profil d'expression du pré-ARNm. En revanche la surexpression des autres protéines ne semble pas modifier les profils d'expression du pré-ARNm *C9orf3* compte tenu des profils très importants des écart-types.

De la même façon le taux d'ARNm *C9orf3* a été mesuré. La surexpression des protéines 9G8, ASF/SF2 et hnRNP H semblent entraîner la diminution du taux d'ARNm *C9orf3*. Les protéines SC35, DAZAP et hnRNP K ne modifieraient pas l'expression de *C9orf3* et les protéines PTB et hnRNP A1 augmenteraient le taux d'expression de *C9orf3*. Enfin les grandes valeurs d'écart-types calculées semblent rendre ininterprétables toutes ces données observées.



**Figure 67 : Résultats des surexpressions des protéines SR et hnRNP.**

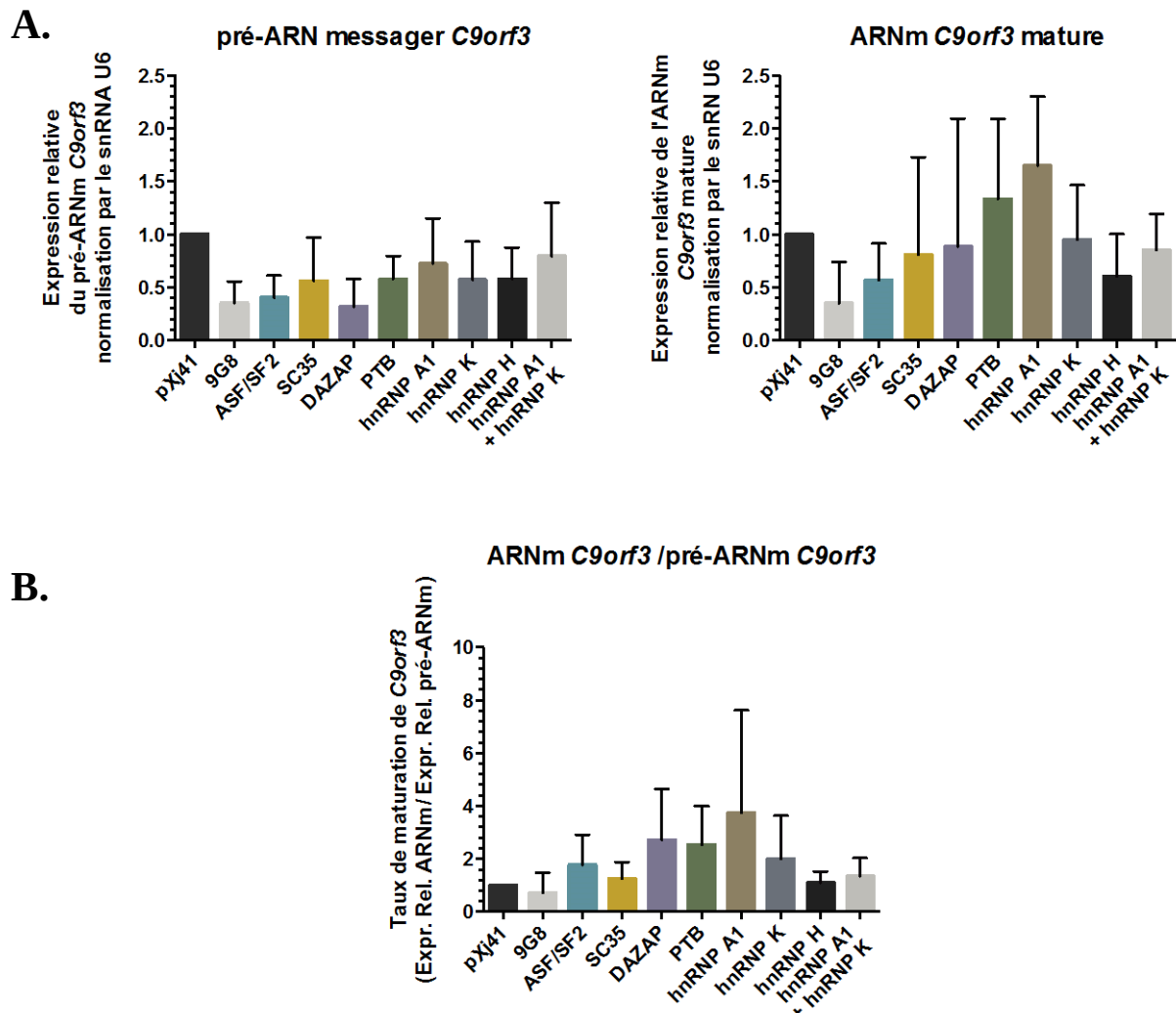
Les résultats des expériences de Western Blot permettant de valider les surexpressions des différentes protéines sont représentés dans les rectangles A. à H.

Les cellules HEK 293T ont été co-transfectées par des couples de plasmides : le vecteur d'expression de protéine non recombinant (pXJ41 NR) ou le vecteur pXJ41 recombinant exprimant la protéine testée ± le vecteur pSplice Express non recombinant (pSplice Express) ou le vecteur pSplice Express exprimant le minigène WT (minigène WT).

10 µg d'extraits protéiques totaux ont été déposés sur un gel SDS PAGE 10% et les profils de migration ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose. La détection de la protéine invariante actine humaine a été utilisée comme contrôle.

Chacune des protéines testées a été surexprimée : 9G8 (A.), ASF/SF2 (B.), SC35 (C.), DAZAP (D.), PTB (E.), hnRNP A1 (F.), hnRNP K (G.), hnRNP H (H.).





**Figure 68 : Analyses de l'influence de la surexpression de protéines régulatrices de l'épissage de type SR et hnRNP sur la production de l'ORF *C9orf3* humaine.**

Les pré-ARNm et ARNm de *C9orf3* ont été quantifiés par RT-qPCR SYBR Green à partir d'ARN totaux extraits de cellules au sein desquelles des facteurs d'épissage ont été surexprimés. La détection de snRNA U6, dont le taux d'expression est stable, a permis de normaliser les données mesurées.

**A.** Les taux de pré-ARNm (à gauche) et d'ARNm (à droite) *C9orf3* endogènes ont été quantifiés. Les taux de pré-ARNm (à gauche) et d'ARNm (à droite) *C9orf3* endogènes et produits à partir du minigène *C9orf3* WT ont été quantifiés. **C.** Les taux d'épissage de l'intron 13 de *C9orf3* ont été calculés ( $\frac{\text{Expression relative ARNm}}{\text{Expression relative pré-ARNm}}$ ) et sont représentés sous forme d'histogrammes. Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois répliques techniques.



Le rapport entre les taux ARNm *C9orf3*/pré-ARNm *C9orf3* permet d'obtenir le taux d'épissage de l'intron 13 (Figure 68B). Les résultats présentés ne permettent pas non plus d'émettre une conclusion ferme quant aux rôles des protéines SR et hnRNP testées, sur la régulation de l'intron 13 de *C9orf3* portant les gènes codant les miARN du cluster miR-23b, -27b et -24-1.

Dans les mêmes conditions, le profil des taux d'épissage de *C9orf3* dans des cellules transfectées par le minigène pSpminiE13-3U ont été analysés. Ainsi ces échantillons ARN totaux au sein desquels coexistent les ARN endogènes et les ARN produits à partir du minigène présentent des résultats similaires dont les écart-types importants ne permettent pas de conclure à propos des données observées (résultats non présentés).

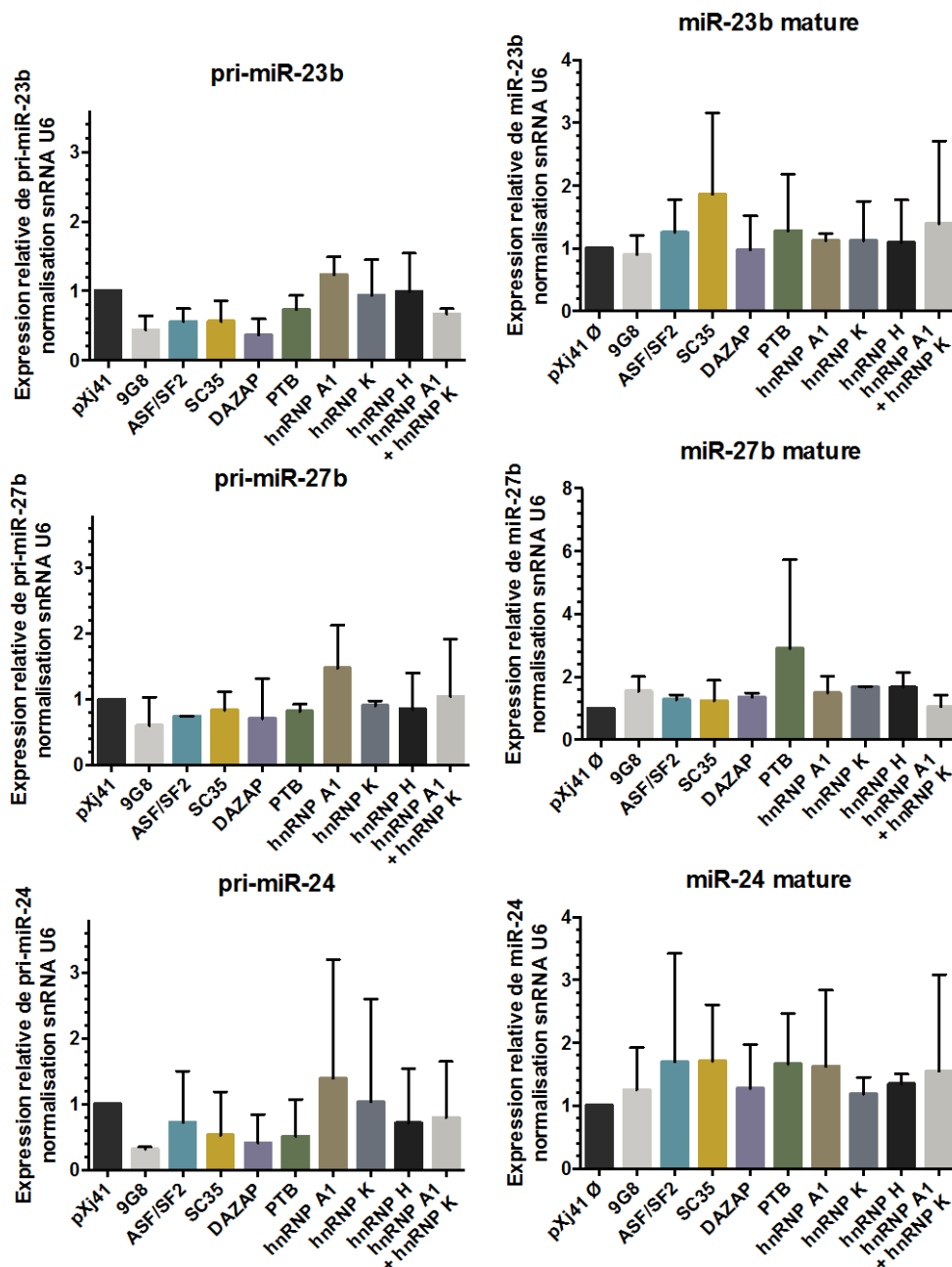
## **2. Quantification des pri-miARN et des miARN matures du cluster d'intérêt dans un contexte de surexpression de protéine SR et hnRNP**

Les mêmes échantillons d'ARN que précédemment ont été analysés afin de quantifier par RT-qPCR TaqMan le taux des précurseurs pri-miR-23b, -27b et -24-1 (conditions décrites en Matériel et Méthodes). Aussi le pri-miARN commun ou les éventuels pri-miARN distincts qui permettent la synthèse des miR-23b, -27b et -24-1 n'étant pas identifiés, des sondes TaqMan permettant la détection de chaque pri-miARN individuel pour chacun des miARN d'intérêt ont été utilisées.

Dans ces expériences, la synthèse d'ADNc a été amorcée par un mélange d'oligonucléotides hexamériques de séquence aléatoire. Ces ADNc ont servi de matrice pour une réaction de qPCR TaqMan et les précurseurs pri-miARN tels qu'ils ont été décrits dans la base de données miRBase, ont été quantifiés. Une normalisation a été effectuée sur la base du taux invariant du snRNA U6 (Figure 69). Dans le cas de pri-miR-23b, il apparaît que la surexpression des protéines 9G8, ASF/SF2 SC35 et DAZAP entraîne sa diminution d'expression. Les autres protéines ne montrent aucune variation du profil d'expression de pri-miR-23b. De plus aucune protéine testée ne semble avoir un quelconque effet sur le taux d'expression du pri-miR-27b. Enfin le taux d'expression pri-miR-24 ne semble affecté que par la surexpression de la protéine 9G8.

Les taux de production des miARN matures du cluster d'intérêt ont aussi été quantifiés par RT-qPCR TaqMan comme décrit précédemment (Chapitre 2 II.1) en effectuant une normalisation sur la base du taux invariant du snARN U6 (Figure 69).

Pour chacun des trois miARN matures et aucune protéine surexprimée ne semble influencer le taux de miARN mature.



**Figure 69 : Analyses de l'influence de la surexpression de protéines régulatrices de l'épissage sur la production des miRNA miR-23b, -27b et -24-1.**

Les précurseurs pri-miRNA (*pri-miRNA* Applied Biosystem) et les miRNA matures produits à partir des gène du cluster d'intérêt ont été quantifiés par RT-qPCR TaqMan à partir d'ARN totaux extraits de cellules au sein desquelles des protéines SR et hnRNP ont été surexprimées. Le snRNA U6 a servi de normalisateur.

**A.** Les taux de pri-miRNA-23b, -27b et -24 (à gauche) et de miR-23b, -27b, -24-1 matures (à droite) issus de *C9orf3* endogènes ont été quantifiés. Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois réplicas techniques.



Le taux de production des miARN a été calculé en réalisant le rapport entre le taux relatifs des miARN mature sur les taux relatifs des pri-miARN (Figure 70). Les résultats indiqueraient que le taux de production de miR-23b soit doublé en présence d'un excès des protéines 9G8 et ASF/SF2. Un effet similaire semble être observé pour la protéine hnRNP K sur la production de miR-27b.

De la même façon que pour l'ARNm *C9orf3* ces expériences ont aussi été réalisées en présence du minigène pSpmiE13-3U (données non montrées). Il est important de noter que ce minigène porte la séquence des gènes codant les miARN du cluster d'intérêt. La transfection des cellules HeLa par cette construction génétique leur permettra de surexprimer encore plus les miARN du cluster d'intérêt. Cependant les taux de production des miARN quantifiés à partir des échantillons exprimant le minigène WT et donc des copies supplémentaires de gènes codant les miR-23b, -27b et -24-1, ne se superposent pas à ceux des miARN endogènes. Il semble que l'apport d'un excès de copies supplémentaires de précurseurs de miARN dans la cellule par le minigène WT perturbe la voie de biogénèse des miARN miR-23b, -27b et -24-1. Une autre hypothèse pouvant expliquer ce phénomène serait que les précurseurs de miARN produits à partir du minigène WT seraient différents des précurseurs endogènes. Cette différence pourrait alors entraîner une prise en charge différente de ces « pseudo-précurseurs » par le microprocessor ou le complexe protéique constitué de Dicer.

## **II. Autres pistes de régulation potentielle de l'expression des miARN du cluster d'intérêt**

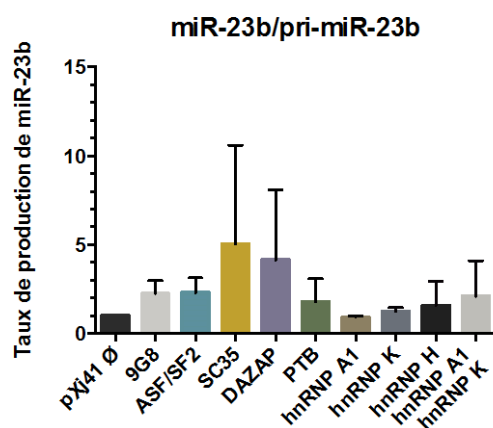
Pour mieux comprendre et expliquer ce phénomène de production différentielle, deux autres pistes de recherches avaient aussi été envisagées, d'une part l'implication de la protéine hnRNP K et d'autre part le rôle d'un ARN antisens non codant.

### **1. Rôle potentiel de la protéine hnRNP K :**

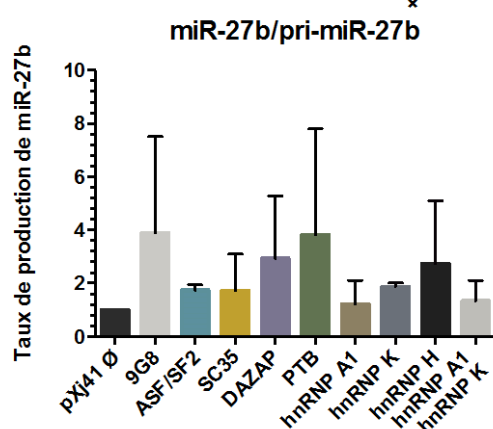
Comme mentionné au début du chapitre C, des protéines hnRNP ont été décrites comme participant à la régulation de la maturation des miARN. En effet la protéine hnRNP A1 humaine favorise la maturation de pré-miR-18a chez l'Homme (Guil and Caceres 2007). De plus nos résultats, présentés ci-dessus, de surexpressions des protéines de l'épissage avaient mis en exergue l'implication possible des protéines hnRNP K et H dans la régulation des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1. *In silico*, des sites consensus de fixation de la protéine hnRNP K ont été repérés alentour des gènes codant les miARN d'intérêt (Figure 71). Nous



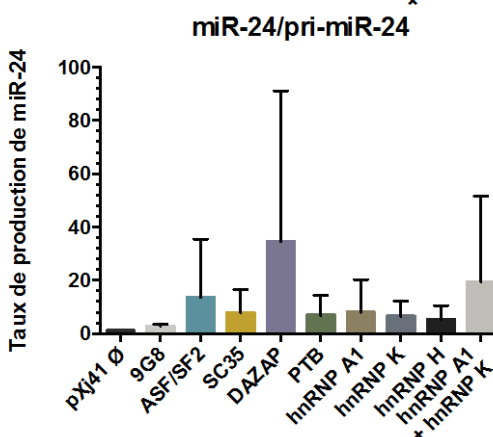
A.



B.



C.

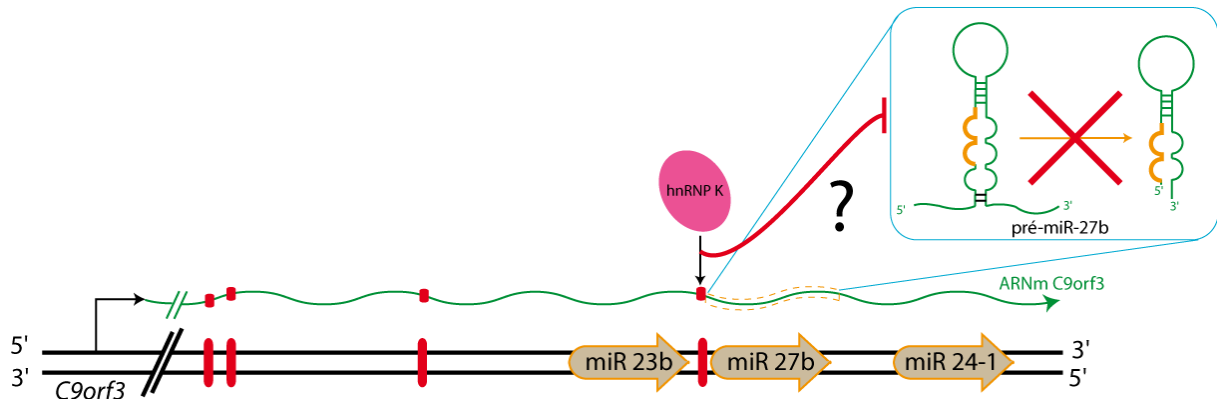


**Figure 70 : Influence de la surexpression de protéines régulatrice de l'épissage sur les taux de production des miRNA d'intérêt.**

Les taux de production des miRNA miR-23b, -27b et -24-1 de *C9orf3* ont été calculés ( $\frac{\text{Expression relative pri-miRNA}}{\text{Expression relative miRNA}}$ ) et sont représentés sous forme d'histogrammes.

Les taux de production de microARN endogènes sont représentés.

**A.** microARN miR-23b ; **B.** microARN miR-27b ; **C.** microARN miR-24. Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois répliques techniques.



**Figure 71 : Modèle de régulation potentielle de la production des miRNA du cluster miR-23b~27b~24-1 par la protéine hnRNP K.**

Dans ce modèle hypothétique, la protéine hnRNP K pourrait réprimer de manière post-transcriptionnelle la production de miR-27b. La protéine hnRNP K reconnaîtrait un site consensus dont la séquence (5'-UCCCUU-3') est retrouvée 4 fois au sein du cluster de miRNA (en rouge). 3 sites se situent en amont du gène codant miR-23b et un site se situe en amont du gène codant miR-27b. La fixation de la protéine hnRNP K sur ces sites pourrait inhiber la reconnaissance du pri-miRNA par le « microprocessor » et inhiber sa maturation.



avons donc émis l'hypothèse que la protéine hnRNP K pouvait participer à la régulation de la production différentielle de ces miARN.

Afin d'étudier l'implication de la protéine hnRNP K nous avons souhaité réduire son expression dans les cellules par des expériences d'interférence à l'ARN en employant des siARN dirigés contre l'ARNm codant hnRNP K. Des cellules HeLa ont été transfectées par des siARN adaptés et des extraits protéiques ainsi que des extraits d'ARN totaux ont été préparés. La diminution de 71 % du taux de protéine d'intérêt a été vérifiée et validée par Western Blot (Figure 72A). Nous avons ensuite analysé le taux de production des miARN d'intérêt par RT-qPCR par la méthode TaqMan<sup>®</sup> comme précédemment (Figure 72B). Les résultats indiquaient que le traitement par le siARN dirigé contre hnRNP K ne semblait pas affecter significativement la production des miR-23b, -27b et -24-1. Sur la base de ces résultats, il apparaît que la protéine hnRNP K n'est pas impliquée dans la production des miARN d'intérêt.

## **2. Caractérisation d'un transcrit antisens au gène codant le microARN miR-23b et étude de son rôle fonctionnel :**

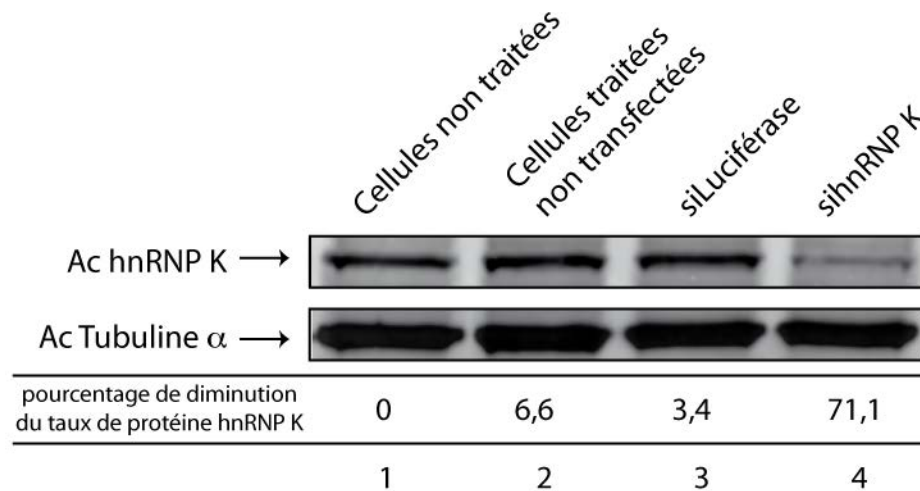
L'analyse des banques EST a révélé l'existence dans les cellules placentaires d'un transcrit antisens (GI :124-45821) au gène codant miR-23b. Nous avons alors émis l'hypothèse que ce transcrit antisens s'il était effectivement produit pouvait interférer avec la production des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1 et en particulier celle de miR-23b (Figure 73). Cette régulation pourrait soit être transcriptionnelle : la transcription de ce transcrit antisens pourrait perturber voire abolir la transcription du pri-miARN produisant miR-23b ; ou encore être post-transcriptionnelle : ce transcrit pourrait interférer par appariement avec l'ARN sens complémentaire à savoir le pri- ou le pré-miR-23b et perturber la production de miR-23b mature. Nous avons entrepris de tester ces deux hypothèses.

Nous avons dans un premier temps utilisé la technique de RT-PCR pour rechercher la présence de cet ARN antisens dans un type cellulaire autre que le placenta. Nous avons ensuite entrepris la caractérisation des extrémités de cette espèce d'ARN par des expériences de RACE PCR en utilisant en parallèle deux techniques différentes. Enfin le rôle fonctionnel potentiel de cet ARN a été évalué dans un modèle d'induction à l'IL-1 $\beta$ .

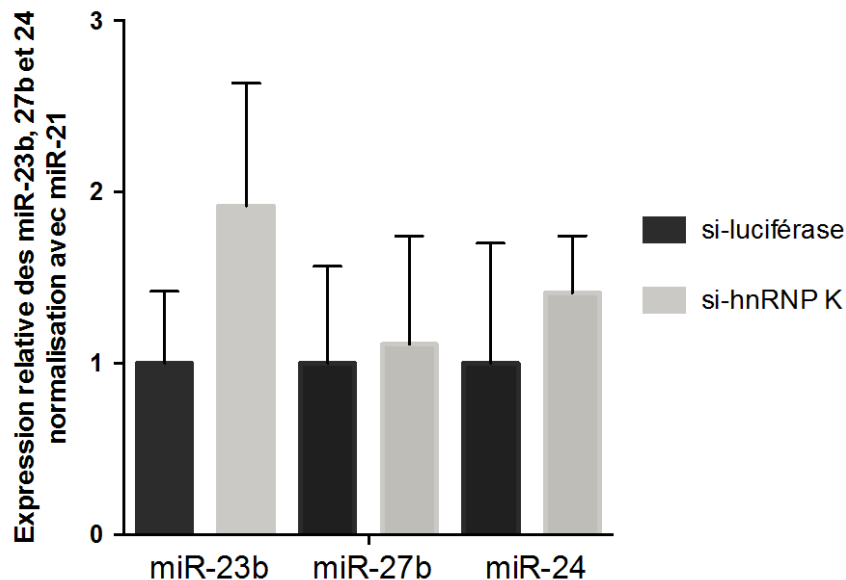
### **i. Détection du transcrit antisens par RT-PCR ?**

Dans un premier temps, un ARN transcrit à partir du locus du cluster miR-23b~27b~24-1 a été détecté par RT-PCR au sein des cellules HEK 293T transfectées par le vecteur pSPminiE13-3U codant le minigène grâce à une réaction de transcription inverse amorcée par

A.



B.

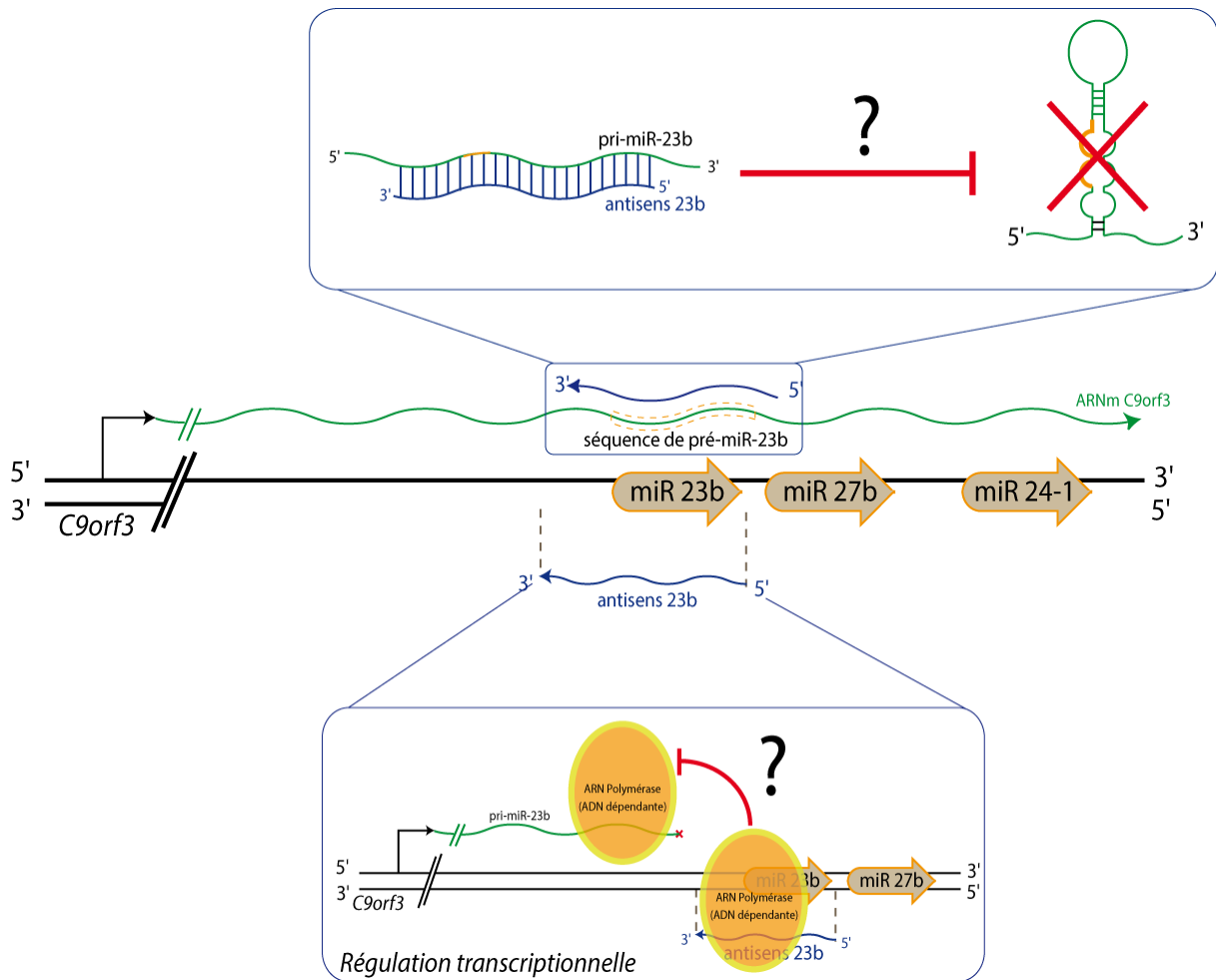


**Figure 72 : Etude de l'influence de la protéine hnRNP K sur la production des miR-23b, 27b et 24-1.**

**A.** L'effet du siARN dirigé contre l'ARNm hnRNP K et donc le taux de diminution de la protéine hnRNP K a été analysé par Western Blot. Cette diminution, quantifiée par rapport au témoin invariant correspondant à la protéine  $\alpha$  tubuline, a été estimée à 71 %. La protéine hnRNP K est donc encore présente à un taux résiduel de 29 %.

**B.** Le taux des miR-23b, -27b et -24-1 ont été quantifiés par RT-qPCR par la méthode TaqMan. Les ARN totaux des cellules HeLa traitées ou non par le siARN dirigé contre hnRNP K ont servi d'échantillons et les valeurs de  $C_T$  obtenues ont été quantifiées en employant la méthode dite de  $\Delta\Delta C_T$ . Le taux de chaque miRNA d'intérêt a été normalisé à partir du taux de miR-21. On peut observer que pour chacun des miRNA étudiés la diminution du taux de protéine hnRNP K ne semble pas influencer de façon significative la production des miR-23b miR-27b ou miR-24. Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois répliques techniques.





**Figure 73 : Hypothèse du rôle de régulateur négatif du transcrit antisens au gène codant miR-23b sur la production de miR-23b.**

Représentation schématique de notre hypothèse. La transcription du transcrit antisens pourrait inhiber la transcription du gène codant miR-23b :

- soit par un phénomène d'inhibition de l'activité de l'ARN polymérase en cours de transcription par la transcription du transcrit antisens,
- soit par une action du transcrit antisens sur le précurseur de miR-23b.

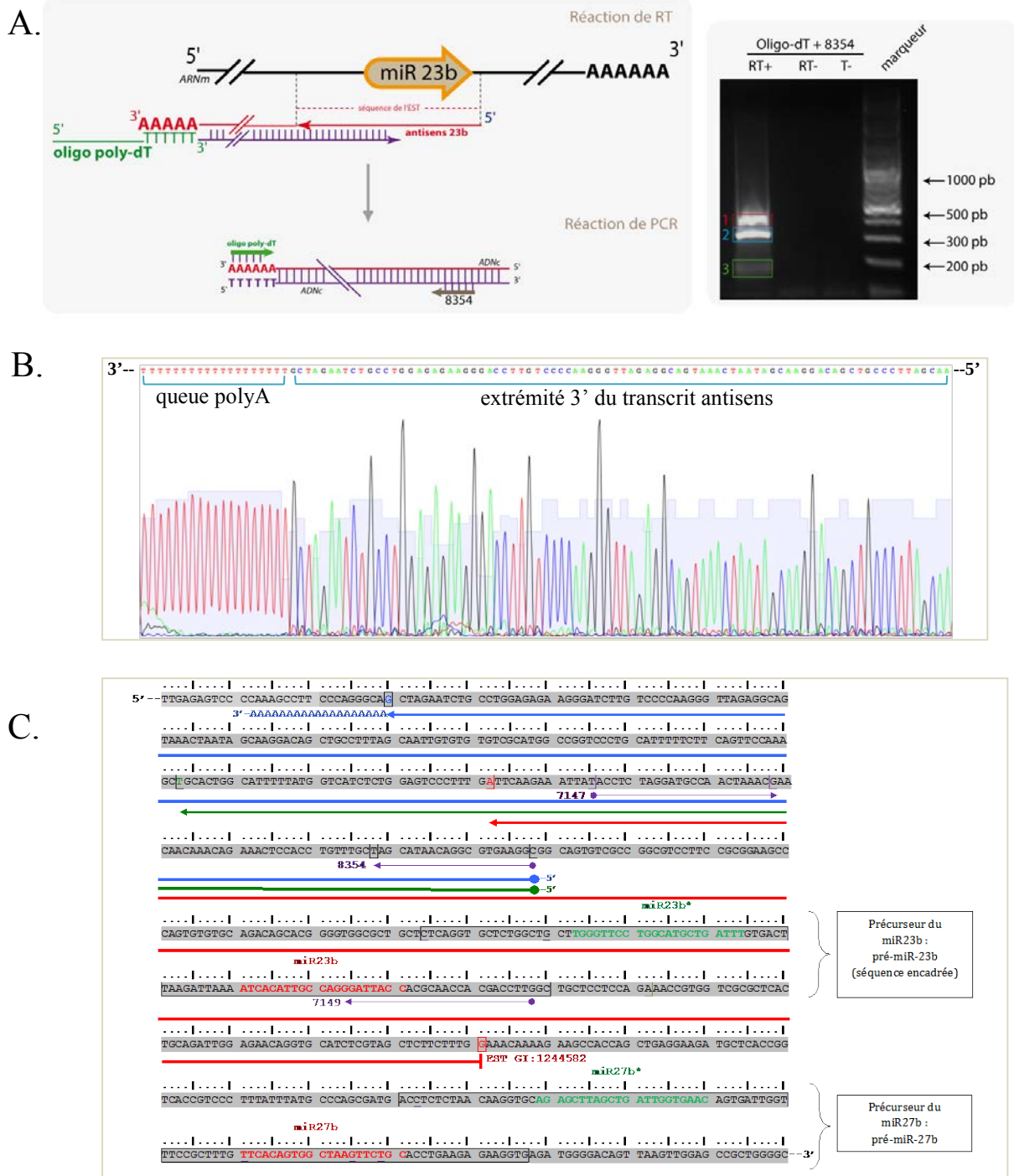


un oligonucléotide spécifique (n°7147) de la séquence de cet ARN antisens potentiel décrite dans la banque d'EST, suivie d'une amplification par PCR employant le couple d'oligonucléotides 7147 et 7149 (Figure 74). Un contrôle négatif RT- validant l'absence d'ADNg résiduel pouvant servir de matrice pour la réaction de PCR a été effectué (cf. Matériel et Méthodes, Méthodes, D.V.2.). La séquence, amplifiée par PCR à partir de l'ADNc (piste 6 Figure 74B) et vérifiée par séquençage, correspondait à la séquence décrite dans la banque d'EST.

Nous avons également réalisé des réactions de RT-PCR à partir d'un ADNc amorcé par l'oligonucléotide 7160. Il s'agit d'un oligonucléotide poly(dT) qui a la particularité de posséder une extrémité 5' dont la séquence est exogène au génome humain et qui consiste en la succession de deux séquences complémentaires aux amorces universelles n°67 et n°122 (voir tableau 7 et 8 des oligonucléotides dans le Matériel & Méthodes). Nous souhaitions réaliser une réaction de PCR nichée employant soit l'amorce n°67 ou n°122 associée à une amorce spécifique du transcrit d'intérêt (par exemple l'amorce n°8354). Cependant cette réaction de PCR nichée n'a pas fonctionné, sous entendant, soit un problème technique comme un problème d'inefficacité d'hybridation des amorces PCR utilisées, soit tout simplement l'inexistence du transcrit antisens recherché, ce qui allait à l'encontre de la réaction de RT-PCR amorcée par l'oligonucléotide 7147 décrite ci-dessus.

Nous avons toutefois réalisé une amplification par PCR de ces ADNc en utilisant l'oligonucléotide poly dT 7160 et un oligonucléotide (n°8354) complémentaire de la séquence du transcrit d'intérêt présent dans la banque d'EST (Figure 75A, à gauche). Deux produits de PCR ont été observés après fractionnement sur gel d'agarose 2% (Figure 75A, à droite). Les bandes correspondant aux amplicons obtenus ont été purifiées, les fragments ADN clonés puis séquencés. Les résultats de séquençage ont permis d'identifier que l'amplicon n°1 était une amplification aspécifique : cette contamination correspondait à la détection d'un ARN transcrit à partir de l'ORF *C15orf65*. Au contraire les amplicons 2 et 3 correspondaient à la détection de la séquence d'un transcrit produit à partir du locus génomique étudié. Dans l'hypothèse où il s'agirait de la détection d'un transcrit antisens, le séquençage de l'amplicon 2 permettrait d'identifier une extrémité 3' alternative à celle présente dans la banque EST (chromatogramme en Figure 75B), à savoir une extrémité prolongée de 152 nucléotides portant une queue polyadénylée (Figure 75C, flèche bleue). Aussi la séquence de l'extrémité 3' de ce transcrit potentiel pourrait résulter d'un événement de terminaison de la transcription et d'une polyadénylation médiée par un signal de polyadénylation non canonique (Beaudoing et al. 2000).





**Figure 75 : Caractérisation de l'extrémité 3' du transcrit antisens au gène codant miR-23b.**

**A.** La stratégie de caractérisation est illustrée à droite. Les ADNc ont été produits en utilisant pour la réaction RT une amorce poly-dT. Les produits de RT-PCR ont été fractionnés sur gel d'agarose 2% et les amplicons ont été clonés puis séquencés. Le produit 1 (encadré en rouge) correspond à une amplification non spécifique (ARNm *C15orf65*), le produit 2 (encadré en bleu) correspond à la séquence du transcrit antisens dont l'extrémité 3' est polyadénylée et le produit 3 correspond à la séquence du transcrit antisens dont l'extrémité 3' est intermédiaire entre celle de l'EST GI:1244582 et du produit 2. **B.** Le chromatogramme du séquençage de l'extrémité 3' du transcrit antisens polyadénylée est présenté. **C.** Un extrait de la séquence sens du cluster miR-23b~27b~24-1 humain est illustré. Le transcrit antisens présent dans la banque d'EST est représenté par la flèche rouge et les produits de RT-PCR sont représentés par les flèches verte (amplicon 2) et bleue (amplicon 3).

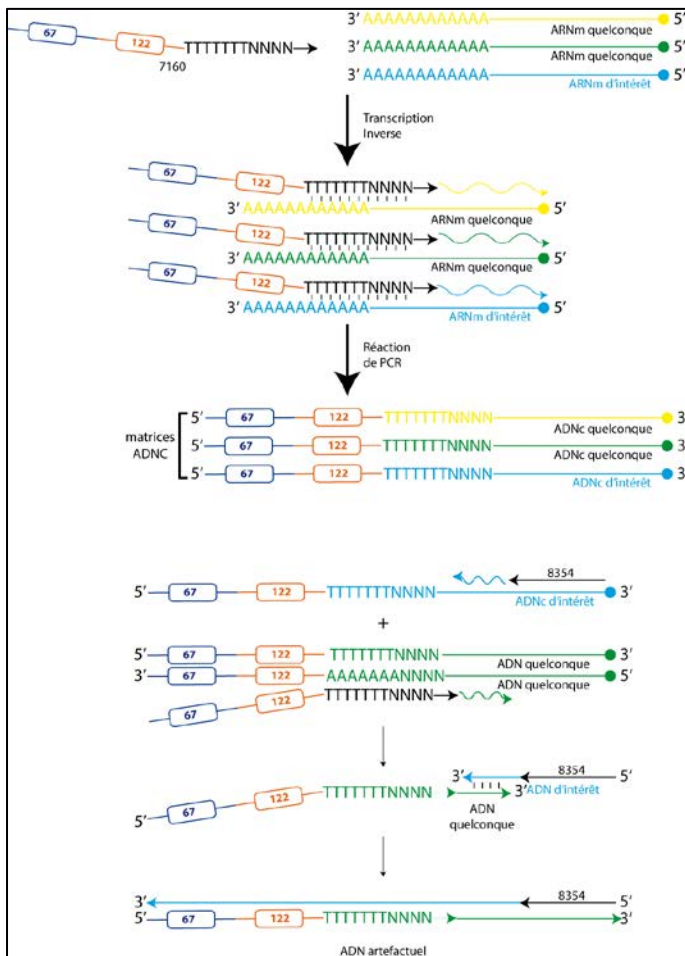


Cependant, ces résultats pourraient être contredits par des biais techniques. Dans un premier scénario, le produit d'amplification dont la séquence est illustrée dans le chromatogramme, pourrait être un produit non spécifique issu de la réaction de PCR (Figure 76A). Sa production pourrait être causée par une trop grande différence de température de fusion des deux oligonucléotides de PCR (7160 : 78°C et 8354 : 61°C) abaissant le taux d'efficacité de ce couple d'amorce de PCR. L'oligonucléotide 7160 utilisé au cours de la réaction de RT possédant une séquence de 7 T est capable d'amorcer la transcription à partir de tout ARN polyadénylé. La matrice d'ADNc utilisée au cours de la PCR est donc constituée d'une population d'ADNc représentant un mélange hétérogène d'ARN polyadénylés différents. L'utilisation de l'oligonucléotide 7160 au cours de la PCR permet d'amplifier chacun des ADNc de cette population, tandis que l'oligonucléotide 8354 sera spécifique des ADNc représentant la séquence antisens recherchée. Ainsi au cours de la réaction de PCR des brins d'ADN néosynthétisés artéfactuels pourraient être produits par la fusion de brins d'ADN ne correspondant pas l'extrémité 3' de l'ARN antisens recherché, amplifié par l'oligonucléotide 7160, et de brins d'ADN spécifiques de l'ARN antisens recherché grâce à l'oligonucléotide 8354. Cette fusion pourrait être permise par la complémentarité de seulement quelques nucléotides pour créer un fragment ADN artificiel. Cet ADN correspondrait à un ARN dont l'extrémité 5' serait complémentaire du locus du gène *miR-23b* mais dont l'extrémité 3' polyadénylée pourrait provenir d'un autre ARN que celui étudié. Il est ainsi possible que l'extrémité 3' de l'ARN antisens, s'il existe, ne soit pas polyadénylée.

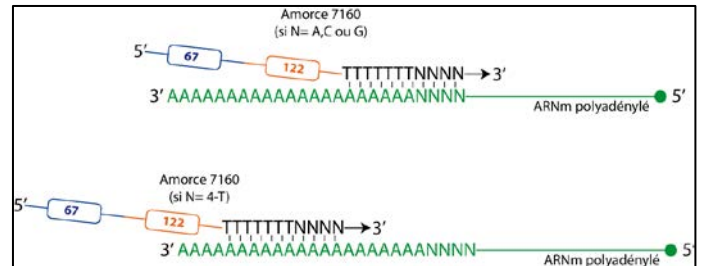
Une autre possibilité reposerait sur la nature de l'extrémité 5' de l'amorce de RT-PCR 7160. Ainsi en aval du 7mer de T, 4 nucléotides aléatoires ont été ajoutés. Cette extrémité de nucléotides aléatoire permet donc de rétro-transcrire les ARN au pied de leur jonction queue polyA/extrémité 3' (Figure 76B). Cependant dans notre expérience, le fragment d'ADN séquencé montre une extrémité 3' allongée d'au moins 17 T ce qui signifierait que l'ARN observé possède une extrémité 3' polyadénylée. Aussi il semble assez peu probable d'obtenir un tel résultat en utilisant cette amorce 7160.

Enfin, comme rappelé ci-dessus, l'amorce 7160 a été conçue pour réaliser des expériences de PCR nichée avec les amorces universelles 67 et 122. Dans notre expérience, le fragment ADN amplifié a été cloné dans le vecteur pCR2.1 au préalable du séquençage. Ainsi le résultat de séquençage devrait faire apparaître la jonction ADN plasmidique/ADN insert (Figure 76C). Or ce n'est pas le cas de notre séquençage où la lecture du début de la séquence n'atteint pas le seuil critique de fiabilité de séquençage établie par la société de service. Ce problème pourrait être dû à l'amorce de séquençage utilisée à savoir l'amorce universelle n°122. Ainsi

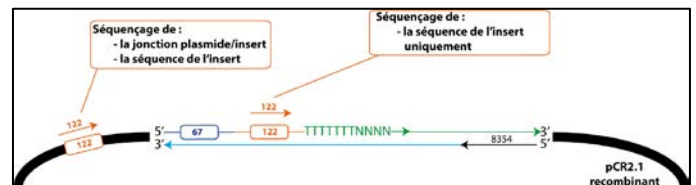
A.



B.



C.



**Figure 76 : Illustration des biais techniques potentiels rencontrés au cours de la caractérisation d'un transcrit antisens.**

**A.** La séquence obtenue au cours du séquençage pourrait être un produit d'amplification artificiel créé par la réaction de PCR.

**B.** Représentation schématique des possibilités d'hybridation de l'amorce 7160 au cours de la transcription inverse en fonction de la nature des nucléotides N aléatoires présents à son extrémité 3'.

**C.** Schéma représentant les possibilités d'appariement de l'amorce universelle n°122 utilisée au cours du séquençage du plasmide pCR2.1 recombinant.



dans notre cas deux sites complémentaires coexistent au sein du plasmide recombinant d'intérêt. Ce problème pourrait alors causer une perturbation du séquençage et créer une hétérogénéité de séquences issues d'un amorçage à partir des deux sites complémentaires de l'amorce 122. Ici la lecture du séquençage est correcte hormis le fait que la jonction ADN plasmidique/ADN insert n'est pas lisible. Ce problème pourrait être dû au fait que notre séquençage soit amorcé uniquement à partir du site complémentaire à l'oligo 122 présent au sein de l'insert et non pas celui présent dans le plasmide en amont de l'insert d'intérêt.

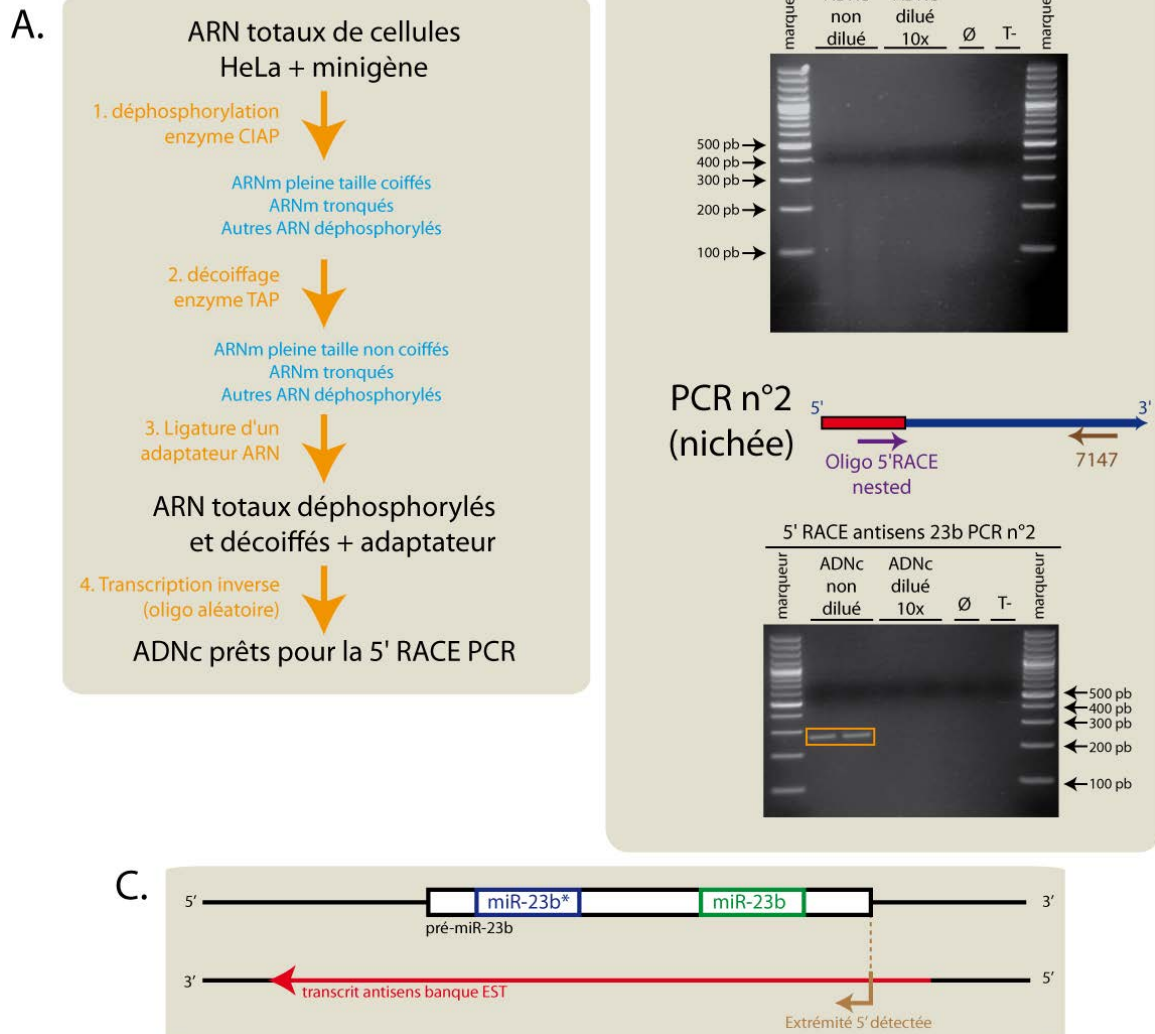
ii. Identification des extrémités de l'ARN antisens potentiel par des expériences de RACE PCR:

Nous avons toutefois entrepris de préciser la nature des extrémités 5' et 3' de ce transcrit du locus miR-23b par des expériences de RACE PCR en utilisant un kit proposé par la société Invitrogen. Cette approche nous a permis de caractériser l'extrémité 5' de ce transcrit. Cependant la caractérisation de l'extrémité 3' de ce transcrit a échoué avec ce kit et nous avons alors utilisé en parallèle une autre méthode de RACE PCR, développée par l'équipe du Pr Grange (Couttet et al. 1997), et basée sur la circularisation des ARN permettant de caractériser dans une même expérience les extrémités 5' et 3'.

Caractérisation de l'extrémité 5' du transcrit d'intérêt par RACE PCR (utilisation du kit Gene RACER (Life Technologies™))

Des ARN totaux de cellules HeLa transfectées par le vecteur pSpE13-3U, exprimant le minigène de type WT ont subi en plus d'un traitement à la DNase RQ1, deux traitements successifs, afin d'éliminer les extrémités phosphates ou les extrémités coiffées (Figure 77A). Ces traitements ont rendu possible la ligature entre l'extrémité 3'-OH d'une séquence adaptatrice, de type ARN apportant des sites de fixation d'amorces de PCR spécifiques, et l'extrémité 5'-P de l'ARN d'intérêt. Une réaction de transcription inverse à l'aide d'amorces aléatoires a permis d'obtenir des ADNc utilisés alors comme matrice pour une suite de réactions d'amplification par PCR dites nichées (Figure 77B) en employant des amorces spécifiques de l'adaptateur (oligo 5'RACE et 5'RACE nested) et de l'ARN d'intérêt (oligonucléotide n°7147, Figure 75C). Les produits d'amplification obtenus ont été clonés et vérifiés par séquençage (Figure 78). De cette façon nous avons identifié une extrémité 5' de ce transcrit d'intérêt correspondant au nucléotide complémentaire de l'extrémité 3' de la séquence du pré-miR-23b (Figure 77C). La localisation à ce site de l'extrémité 5' de l'ARN d'intérêt semble surprenante puisqu'elle se situe en aval de l'extrémité 5' présente et décrite dans la banque d'EST (Figure 78). Il semblerait que plusieurs formes du transcrit d'intérêt





**Figure 77 : Expérience de RACE PCR (kit Invitrogen).**

**A.** Traitements appliqués aux ARN totaux extraits à partir de cellules HeLa transfectées par le vecteur pSpminiE13-3U, exprimant le minigène WT.

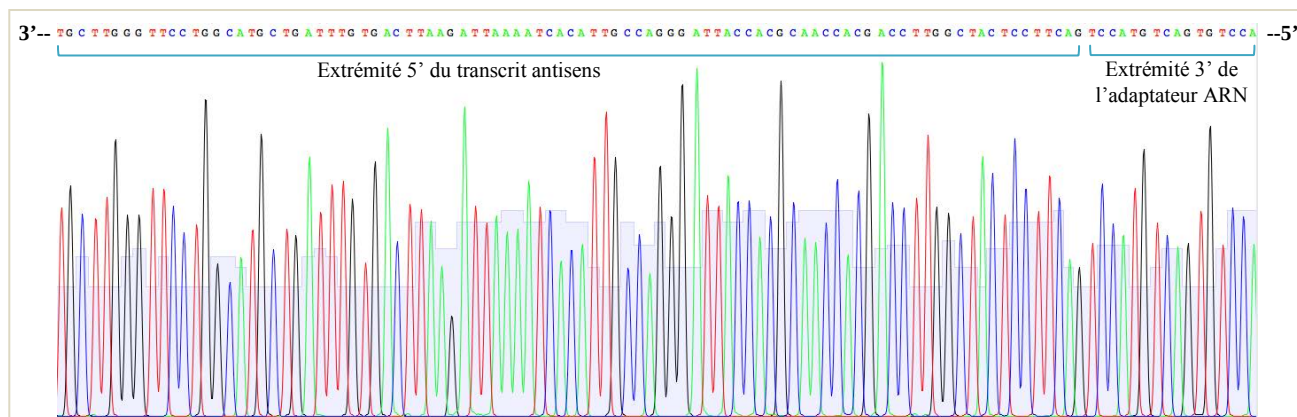
**B.** Une série de deux PCR a été réalisée. La réaction de PCR n°1 a été effectuée en utilisant les ADNc produits en (A) comme matrice. Deux quantités d'ADNc ont été testées, la piste Ø représente le témoin négatif de la réaction de transcription et la piste T- le témoin sans matrice de la PCR. Les produits PCR ont été fractionnés sur gel d'agarose 2% et on observe un « smear » dans les pistes correspondant à la réaction de PCR réalisée avec les ADNc non dilués. Une deuxième réaction de PCR dite nichée a été réalisée avec comme matrice les produits de la PCR n°1 dilués au 1/100. Les mêmes conditions de fractionnement et les mêmes témoins ont été réalisés. On observe un amplicon d'environ 260 pb, encadré en orange. Celui-ci a été extrait sur gel puis cloné pour être séquencé.

**C.** Le séquençage a permis d'obtenir une extrémité 5' alternative, schématisée en brun, à celle présente au sein de la banque d'EST, représentée en rouge, à savoir débutant au dernier nucléotide à l'extrémité 3' du pré-miR-23b.

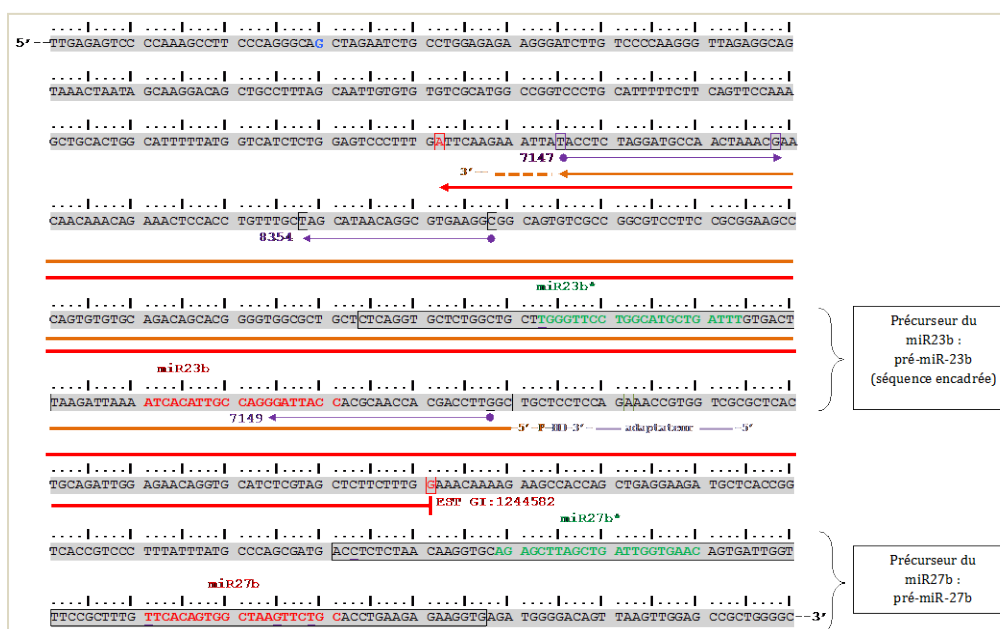




A.



B.

**Figure 78 : Caractérisation de l'extrémité 5' du transcrit antisens au gène codant miR-23b.**

**A.** Chromatogramme du séquençage de l'extrémité 5' du transcrit antisens d'intérêt, obtenu à partir des expériences de 5' RACE par l'utilisation du kit Gene Racer (Invitrogen) (cf. Figure 75B). La séquence de l'extrémité 3' de l'adaptateur ARN est lisible dans le séquençage.

**B.** Un extrait de la séquence sens du cluster miR-23b~27b~24-1 humain est illustré. Le transcrit antisens présent dans la banque d'EST est représenté par la flèche rouge et le produit de PCR 5' RACE est représenté par la flèche orange.



existent ce qui permet de poser l'hypothèse que le transcrit que nous avons caractérisé pourrait être produit à partir d'un ARN précurseur plus long.

Cependant nous n'avons pas pu confirmer la nature polyadénylée de l'extrémité 3' de cet ARN d'intérêt par une approche 3' RACE. En effet, nous avons été confrontés à des problèmes de spécificité de la réaction de PCR conduisant à l'amplification d'une séquence de l'ARN ribosomique 18S.

#### Caractérisation de l'extrémité 5' du transcrit d'intérêt par RACE PCR (par des expériences de circularisation des ARN)

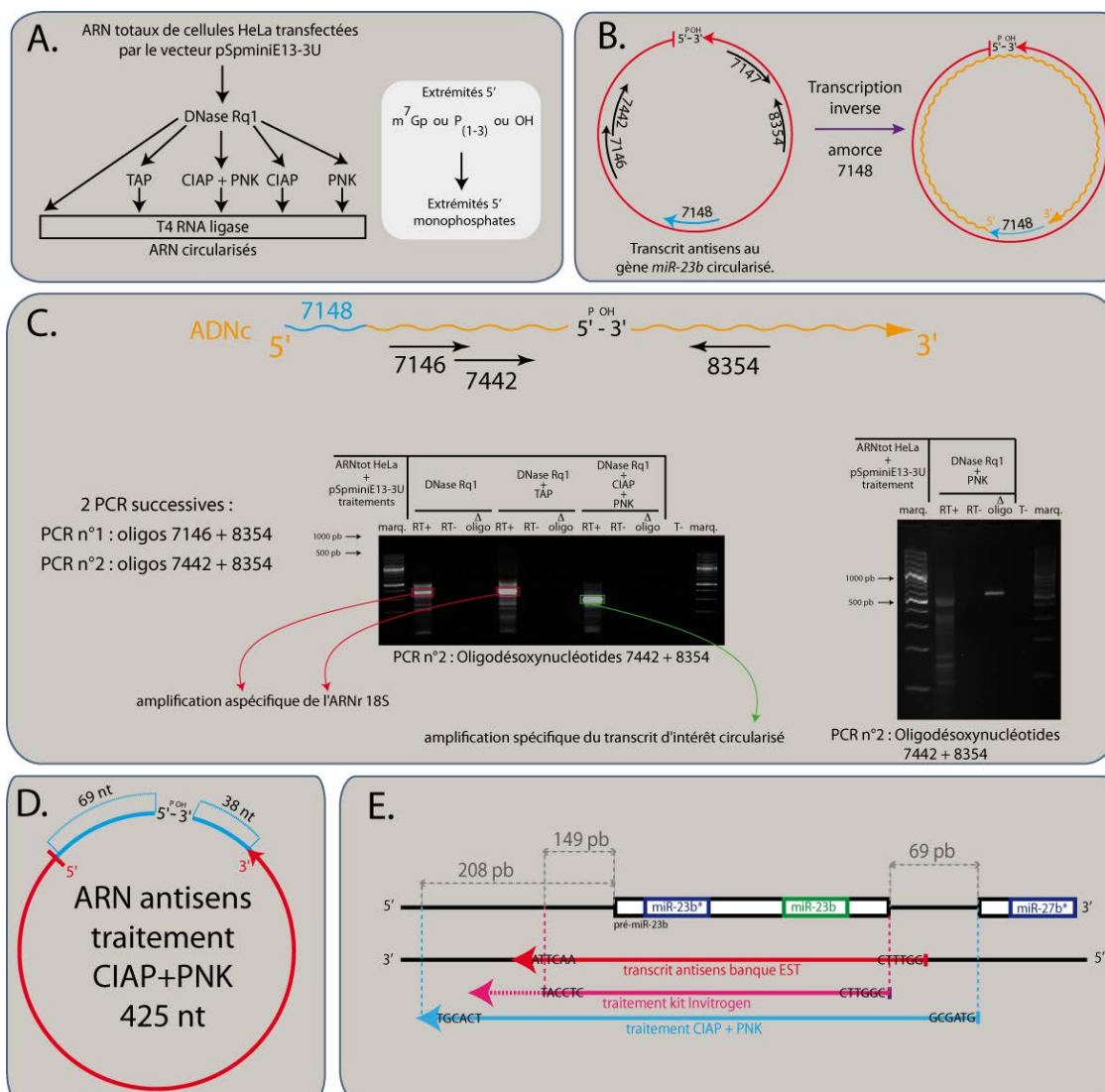
Les mêmes préparations d'ARN totaux employées précédemment ont été utilisées pour cette technique de RACE PCR. Au préalable les molécules d'ADN résiduelles ont été éliminées par un traitement à la DNase RQ1. Puis les échantillons d'ARN ont été traités afin de rendre leurs extrémités 5' compatibles pour une réaction *in vitro* de ligature intramoléculaire (extrémité 5'monophosphate (Figure 79A). Ils ont subi soit :

- un traitement par l'enzyme TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) qui permet d'éliminer les coiffes triméthylées et de libérer des extrémités 5' monophosphorylées,
- un traitement par l'enzyme SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) suivi d'une incubation avec la PNK (PolyNucleotide Kinase) en présence d'ATP permettant de déphosphoryler les extrémités 5'phosphorylées, di- ou tri- phosphorylées et ensuite de les monophosphoryler,
- un traitement directement par l'enzyme PNK en présence d'ATP qui permet de phosphoryler les extrémités 5'-OH pour obtenir des extrémités 5' monophosphorylées.

Enfin un traitement à la SAP permet de libérer des extrémités 5' déphosphorylées et sert de témoin négatif de ligature.

Après chacun de ces traitements, les ARN totaux ont été incubés en présence de l'enzyme T4 RNA ligase dans un très grand volume réactionnel, conditions favorisant la ligature des ARN sur eux-mêmes.

Les ARN ayant subi la réaction de ligature ont servi de substrat dans des réactions de transcription inverse, en utilisant une amorce spécifique du transcrit antisens (oligonucléotide n°7148, Figure 79B). Les ADNc obtenus ont servi de matrice pour une réaction de PCR dont les amorces ont été choisies pour amplifier une séquence comprenant la jonction entre l'extrémité 5'P et l'extrémité 3'OH de l'antisens circularisé. Une deuxième réaction de PCR, dite nichée, a été réalisée (Figure 79C). Les amplicons détectés après électrophorèse ont été clonés puis séquencés.



**Figure 79 : Expérience de RACE PCR par circularisation des ARN.**

**A.** Schéma représentant les différents traitements enzymatiques réalisés sur des ARN totaux extraits de cellules HeLa transfectées par le vecteur pSpminiE13-3U.

**B.** Schématisation de la réaction de transcription inverse de l'ARN antisens circularisé. L'ARN matrice est indiqué sous la forme d'une flèche circulaire rouge, l'amorce de transcription est représentée en bleu et l'ADNc synthétisé est représenté en orange.

**C.** Représentation de l'appariement des amorces de PCR sur l'ADNc d'intérêt. Les produits de PCR ont été fractionnés sur gel d'agarose 2%. Les réactions PCR n°1 ont été réalisées en employant comme matrice les ADNc produits au cours de l'étape de transcription inverse, et les réactions PCR n°2 ont été réalisées en utilisant comme matrice les produits de PCR n°1 dilués au 1/100. Les pistes RT- et Δoligo représentent les témoins négatifs de la réaction de transcription inverse et les pistes T- représentent les témoins sans matrice pour la réaction de PCR. Les amplicons encadrés ont été clonés puis séquencés. Seul le traitement aux enzymes CIAP+PNK ont permis de détecter l'ARN antisens.

**D.** Représentation schématique de l'espèce d'ARN antisens circularisé détecté. La séquence de l'antisens présente dans la banque de donnée EST est représentée en rouge et les extrémités 5' et 3' découvertes par cette expérience de RACE PCR sont représentées en bleu.

**E.** Les deux formes de l'ARN antisens sont représentées en gardant les mêmes codes couleurs qu'en (D). Les distances des extrémités de l'antisens par rapport aux bornes du pré-miR-23b sont indiquées en gris.



Les traitements SAP + PNK ont permis d'obtenir une séquence correspondant à un transcrit antisens au locus d'intérêt de 425 nt dont les extrémités 5' et 3' se situent respectivement 57 nt en amont et 116 nt en aval des extrémités de l'ARN antisens présent dans la banque d'EST (Figure 79D).

Le traitement à l'enzyme PNK seul n'a pas permis d'obtenir les mêmes produits PCR suggérant que l'extrémité 5' du transcrit soit de nature 5' monophosphate. Ce type d'extrémité est classique des mécanismes de maturation par clivage endonucléolytique. On peut donc émettre l'hypothèse que cet ARN antisens pourrait être produit à partir d'un processus de maturation d'un plus grand précurseur ARN ou encore correspondre à un produit de dégradation d'un ARN de plus grande taille.

Cette conclusion est renforcée par les résultats obtenus suite au traitement à l'enzyme TAP qui ne permet pas l'amplification du transcrit d'intérêt. Ces données signifient que ce traitement ne permet pas de générer des extrémités adaptées à une réaction de ligation. En corolaire, son amplification n'est possible que lorsque les ARN sont circularisés suite à un traitement à la SAP puis à la PNK.

Ces observations suggèrent qu'un transcrit serait bien produit à partir du brin complémentaire au miARN, qu'il ne porterait pas de coiffe et serait généré suite à une maturation d'un transcrit précurseur.

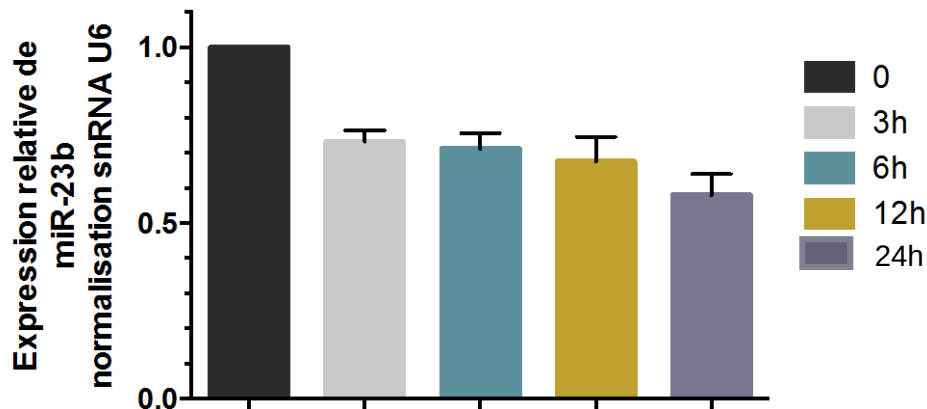
### **3. Etude du rôle fonctionnel de ce transcrit antisens potentiel sur la production de miR-23b :**

Notre hypothèse était que le transcrit antisens, compte tenu de sa séquence, pourrait réguler négativement la production de miR-23b (Figure 73). Comme je l'ai décrit précédemment, nous avons utilisé un modèle d'induction à l'IL-1 $\beta$  pour provoquer la perte de phénotype chondrocytaire. Cette perte de phénotype était accompagnée de la diminution du taux de miR-23b (Figure 80A). Au cours d'une analyse cinétique de l'induction, une diminution de la production de miR-23b de plus de 40 % est observée. Lorsque l'on analyse la production du transcrit antisens au gène codant miR-23b dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 80B), on observe également une diminution, de près de 80 %.

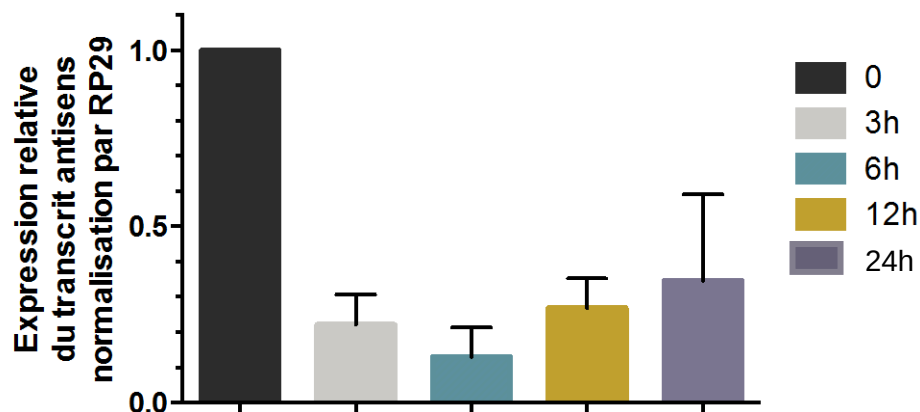
Nous en avons alors conclu que le transcrit antisens ne semble pas directement réguler la production de miR-23b par les mécanismes précédemment évoqués. Nous n'avons pas obtenus plus de données sur le rôle fonctionnel de cet ARN, au cours de mon doctorat.



A.



B.



**Figure 80 : Etude du rôle fonctionnel du transcrit antisens au gène codant miR-23b.**

Des chondrocytes humains ont été traités à l'interleukine 1- $\beta$  et leurs ARN totaux ont été extraits après 3h, 6h, 12h et 24h de traitement.

**A.** Le taux de production de miR-23b a été analysé par qPCR (méthode TaqMan). L'expression de miR-23b a été normalisée à partir de l'expression du témoin invariant snRNA U6 et les quantifications ont été calculées selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak et Schmittgen). La réaction inflammatoire provoquée par la cytokine entraîne la diminution de l'expression de miR-23b d'environ 40 %.

**B.** Le taux du transcrit antisens quantifié par qPCR à partir du taux d'expression du gène RP29 invariant dans nos conditions expérimentales. La réaction inflammatoire provoquée par la cytokine entraîne la diminution de l'expression du transcrit antisens au gène codant miR-23b d'environ 80 %.

Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois réplicas techniques.



Bilan de cette étude de la régulation de l'expression des gènes de miARN du cluster miR-23b~27b~24-1

- Mes travaux ont permis de confirmer les résultats préliminaires obtenus par puces à miARN : l'existence d'une production différentielle des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1. Des expériences de perte de phénotype chondrocytaire par induction à l'IL-1 $\beta$  montrent une réduction de l'expression de miR-23b et -27b, alors que le profil d'expression de miR-24-1 ne change pas.

- Afin de comprendre cette variation d'expression, le taux d'expression de l'ORF hôte a été analysé par qPCR. L'expression de l'ARNm de *C9orf3* ne varie pas dans les mêmes conditions d'induction à l'IL1- $\beta$ . De plus les taux d'expression de *C9orf3* dans des ARN extraits de chondrocytes prélevés de sujets arthrosiques (n=18) et non arthrosiques (n=5) sont comparables.

La production différentielle des miARN d'intérêt ne semble donc pas liée à la variation de la transcription de *C9orf3*.

- Nous avons ensuite recherché la présence d'un promoteur alternatif au sein de la séquence du minigène. Par des tests basés sur la mesure de l'activité luciférase dont le gène a été placé sous le contrôle de fragments du gène *C9orf3*, nous n'avons détecté aucun promoteur dans la région testée.

- L'étude du rôle de protéines de fixation à l'ARN a été effectuée. Nous avons testé l'effet d'une surexpression des protéines SR et hnRNP sur les taux d'épissage de l'intron portant le cluster de gènes de miARN d'intérêt ainsi que sur les quantités des microARN miR-23b, -27b et -24-1. Les résultats obtenus n'ont pas permis d'établir une relation claire et précise entre l'épissage de l'intron 13 de *C9orf3* et la production des miR-23b, -27b et -24-1 matures.

- Une autre hypothèse concernant la régulation de la production différentielle de miR-27b est l'implication de la protéine hnRNP K. Des séquences consensus de fixation de hnRNP K au niveau du gène codant miR-27b ont été retrouvées. L'interférence à l'ARN par des siARN dirigés contre l'ARNm *hnRNP K* n'entraîne pas de variation de la production de miR-27b mature.

- La vérification de l'existence d'un transcrit antisens au gène codant miR-23b, initialement observé dans le placenta (banque d'EST), a été réalisée dans les cellules HEK et HeLa. La caractérisation des extrémités de ce transcrit antisens par RACE PCR laisse penser qu'il s'agirait d'un produit de maturation. Cependant son implication en tant que régulateur négatif



potentiel de la biogenèse de miR-23b n'a pas été validée dans nos conditions expérimentales de traitement à l'IL-1 $\beta$ .





## Chapitre 3 : Etude du rôle de miR-29b dans la régulation génique du chondrocyte dédifférencié

En parallèle de l'étude du cluster miR-23b~27b~24-1, j'ai pu participer à la mise au point de tests basés sur le gène rapporteur de la luciférase dans une étude menée de front par Véronique Salone, David Moulin et Mériem Koufany, portant sur l'étude du rôle de miR-29b, un autre miARN du panel établi en début de projet. En effet l'expression de miR-29b était augmentée au cours de la perte du phénotype différencié du chondrocyte provoquée par un stress cytokinique. Des prédictions de cibles *in silico* suggéraient que miR-29b pouvait réguler négativement l'expression du gène *Col-IIa1*. Des expériences de qPCR TaqMan ont permis de quantifier la quantité de miR-29b au cours de la perte de phénotype différencié du chondrocyte induite par l'interleukine-1 et au sein d'ARN totaux extraits de chondrocytes provenant de patients arthrosiques ou non arthrosiques.

Le modèle murin de lignée chondrogénique ATDC5 a été employé afin d'accréditer notre hypothèse de départ. Ainsi des cellules ATDC5 transfectées ou non par miR-29b ont été cultivées en culots et les taux de collagène ont été mesurés par RT-qPCR et par des tests colorimétriques. Enfin des tests rapporteurs luciférase ont confirmé les prédictions de cible pour miR-29b, à savoir qu'au cours de la perte de phénotype différencié, miR-29b est un régulateur négatif du collagène de type 2. Ces travaux ont permis la rédaction d'un article en cours de soumission pour lequel je suis en 4<sup>ème</sup> auteur. « **MicroRNA-29b limits the expression of type II collagen in human osteoarthritic and dedifferentiated articular chondrocytes** », Salone *et al.* (en préparation).

### **A. Crible de variations de profils d'expression de miARN**

#### **I. Utilisation de micropuces dédiées aux microARN**

Notre étude a débuté par la détermination de miARN dont les profils expression variaient au cours de la perte de phénotype du chondrocyte par l'utilisation de puces dédiées aux miARN (EXIQON). La perte de phénotype différencié de chondrocytes humains a été réalisée de deux façons : une stimulation des chondrocytes à l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml pendant 48h) et des repiquages cellulaires successifs en monocouche. Des cellules non induites et non repiquées ont été





utilisées comme contrôle négatifs de dédifférenciation. Pour chaque condition les ARN totaux des chondrocytes ont été extraits et préparés pour les expériences de puces à ARN. Le traitement des données des puces a été réalisé par Véronique Salone et a consisté en la quantification des profils de miARN présents dans les extraits d'ARN de chondrocytes différenciés par rapport aux chondrocytes dédifférenciés. Les résultats ont été normalisés par la moyenne de profils d'expression de plusieurs miARN invariants dans nos conditions expérimentales (cf. Matériel & Méthodes, Méthodes.D.VII.3.).

Les miARN dont les variations d'expression se situaient à l'extérieur de l'intervalle de variation  $]x_{0,8} - x_{1,2}[$  ont été retenus.

## **II. Etablissement d'un panel de miARN candidats**

Plusieurs miARN candidats ont été sélectionnés à partir des résultats des puces et les profils de variation d'expression ont été validés par des expériences de qPCR TaqMan. De plus la perte de phénotype chondrocytaire a été appréciée par la quantification par qPCR SYBR Green de la diminution des taux des ARNm codant l'agrécan, le collagène IIa et MMP13. Ces validations ont permis de dégager un panel de 10 miARN surexprimés (miR-146a :  $x_{3,16}$  ; miR-155 :  $x_{2,38}$  ; miR-147b :  $x_{1,83}$  ; miR-183 :  $x_{1,73}$  ; miR-146b-5p :  $x_{1,71}$  ; let7i :  $x_{1,44}$  ; miR-29b :  $x_{1,39}$  ; miR-888-5p :  $x_{1,37}$  ; miR-568 :  $x_{1,32}$  ; miR-495 :  $x_{1,24-1}$ ) et de 9 miARN sous exprimés (miR-23a :  $x_{0,58}$  ; miR-140-5p :  $x_{0,75}$  ; miR-455-3p :  $x_{0,75}$  ; miR-140-3p :  $x_{0,76}$  ; miR-199a-5p :  $x_{0,76}$  ; miR-455-5p :  $x_{0,77}$  ; miR-602 :  $x_{0,79}$  ; miR-1184 :  $x_{0,79}$  ; miR-199a-3p :  $x_{0,8}$ ) au cours de la dédifférenciation du chondrocyte.

## **B. Validation des profils de miARN candidats**

### **I. Prédictions *in silico* des cibles de miARN candidats**

Afin d'identifier les cibles potentielles des miARN du panel, Véronique Salone a réalisé des prédictions *in silico* en utilisant les algorithmes MicroCosm, TargetScan et PicTar. Les régions 3'UTR potentielles ont été sélectionnées selon deux conditions : l'ARNm correspondant devait être exprimé dans le chondrocyte et les prédictions devaient être redondantes par au moins deux des trois algorithmes utilisés. Selon ces conditions nous avons pu mettre en évidence qu'au sein de la région 3'UTR de l'ARNm *Col1a1* se trouvait un site de reconnaissance potentiel pour miR-29b.



## **II. Quantification des profils d'expression de miR-29b et Col-IIa1**

### **1. Au cours de l'arthrose :**

Les profils d'expression de miR-29b et de l'ARNm *ColIIIa1* ont été mesurés par RT-qPCR au sein d'ARN totaux de chondrocytes humains issus de patients arthrosiques (n=18) ou non arthrosiques (n=5). Il en résulte qu'au cours de l'arthrose l'expression de miR-29b est accrue de 5,8 fois. Ces résultats surpassent ceux obtenus au cours des expériences d'induction à l'IL-1 $\beta$  ou repiquage et renforcent l'hypothèse de l'importance du rôle de miR-29b en tant que régulateur génique du chondrocyte au cours de l'arthrose. Le taux d'expression de l'ARNm *ColIIIa1* chutait dans les mêmes conditions expérimentales.

### **2. Dans un modèle murin de différenciation chondrocytaire**

Les séquences de miR-29b et de l'ARNm *ColIIIa1* étant conservées chez la souris nous avons pu utiliser le modèle cellulaire murin ATDC5. Ces cellules transfectées ou non par un plasmide exprimant le pré-miR-29b murin ont été cultivées soit en culot soit en monocouche. Les cellules cultivées en culot ont été colorées au rouge sirius, colorant ayant une affinité pour les collagènes et leurs précurseurs. Les cellules surexprimant miR-29b montraient une diminution de la coloration rouge, par rapport aux cellules non transfectées, témoignant de la diminution de la synthèse de collagène.

Afin de déterminer le type de collagène qui diminuait sous l'effet de la surexpression de miR-29b, des ARN totaux ont été extraits de cellules ATDC5 cultivées en monocouche et transfectées comme décrit précédemment. Des expériences de RT-qPCR ont mis alors en évidence que seul le taux d'ARNm *ColIIIa1* variait sous l'influence de la surexpression de miR-29b. Aussi le taux d'ARNm *ColIIIa1* augmentait au cours de cette expérience. De manière remarquable ce résultat allait à l'encontre de notre hypothèse à savoir que miR-29b, en tant que régulateur négatif de l'expression du gène *ColIIIa1*, induisait la dégradation de l'ARNm *ColIIIa1*.

## **III. Validation des prédictions de cible de miR-29b par tests luciférase**

J'ai pu participer à la réalisation des expériences de validation fonctionnelle des prédictions de cibles de miARN. Ainsi des tests basés sur le rapporteur luciférase ont été mis en place afin de valider la prédiction du couple miR-29b/*ColIIIa1* selon les conditions expliquées en matériel et méthodes et en annexe (Chapitre d'ouvrage méthodologique). Une construction génétique permettant la transcription d'un ARNm chimérique constitué de la séquence de l'ORF codant la luciférase *Firefly* et de la région 3'UTR du *ColIIIa1* a été utilisée. La



surexpression de miR-29b dans les cellules exprimant l'ARNm chimérique sus-décrit entraînait la diminution de la détection de la bioluminescence en comparaison avec les cellules n'exprimant pas miR-29b. De plus la mutation de la séquence complémentaire de la région « seed » de miR-29b prédite au sein de la région 3'UTR de *Col1a1* permettait d'abolir l'action régulatrice de miR-29b. Par ces expériences nous avons pu montrer qu'au cours de la différenciation du chondrocyte miR-29b pouvait être surexprimé et entraîner la diminution de la synthèse du collagène Col1a1 dans la matrice extracellulaire.

Ainsi la surexpression de miR-29b dans les cellules ATDC5 entraîne l'augmentation du taux de l'ARNm *Col1a1* mais conduit tout de même à la répression du taux de protéines collagéniques et donc à la dégradation de la matrice extracellulaire du chondrocyte murin.

A première vue, il semblerait donc que le mode d'action de miR-29b sur cet ARNm cible serait une répression de la traduction de l'ARNm *Col1a1* et non la dégradation de celui-ci.

On pourrait de plus émettre l'hypothèse que l'augmentation du taux d'ARNm *Col1a1* pourrait être régulée, sous l'influence de miR-29b, à un niveau transcriptionnel. Ainsi l'accumulation de l'ARNm *Col1a1* pourrait être induite par la levée de la répression de l'expression de son gène jusqu'alors inhibée par un facteur de transcription non identifié. Ainsi la surexpression de miR-29b pourrait dans ce cas entraîner la dégradation de ce répresseur transcriptionnel et causer une augmentation de la transcription du gène *Col1a1*, et par conséquent, son taux de transcrit. Aussi, miR-29b pourrait induire l'expression d'un activateur transcriptionnel spécifique du gène *Col1a1*, soit de manière indirecte par une levée de la répression de celui-ci, soit de manière directe par l'accumulation de miR-29b dans le noyau et l'induction de l'expression du gène *Col1a1* selon les hypothèses énoncées par les travaux des équipes de Mendell ou de Vasudevan (H.-W. Hwang, Wentzel, and Mendell 2007; Vasudevan, Tong, and Steitz 2007).

D'autre part, l'accumulation de l'ARNm *Col1a1* pourrait également être régulée à un niveau post-transcriptionnel. En effet l'inhibition de la traduction de l'ARNm *Col1a1* induite par miR-29b pourrait entraîner son accumulation dans le cytoplasme du chondrocyte pathologique. Enfin, l'accumulation de miR-29b pourrait causer des défauts physiologiques cellulaires et impacter les processus de dégradation des ARNm cellulaires.

Cependant, cette hypothèse semble mise à mal par notre expérience de validation fonctionnelle par test rapporteur luciférase. En effet, au cours de nos expérimentations la surexpression de miR-29b entraînait la chute de la bioluminescence du gène rapporteur et la



mutation de la séquence cible prédite au sein de la région 3'UTR de *Col3a1* abolissait cette répression.

On pourrait aussi réfléchir quant à la stratégie expérimentale employée. Nous avons opté pour des conditions de cultures se rapprochant au mieux des conditions normales de différenciation du chondrocyte murin (Shukunami et al. 1997), à savoir cultiver nos cellules jusqu'à 14 jours de différenciation cellulaire. En 2011, une équipe a mis en évidence l'implication de miR-29b murin dans la dégradation de l'ARNm *Col3a1* (Yan et al. 2011). Cependant ces expériences ont été réalisées après seulement deux jours de culture des cellules ATDC5, loin de conduire ces chondrocytes murins dans un état de différenciation terminale comme observé au cours du déclenchement de l'arthrose. Il semble donc que le degré de différenciation des cellules pourrait jouer un rôle déterminant dans l'impact de miR-29b sur la régulation de l'ARNm de *Col3a1*. L'utilisation du vecteur d'expression pCDNA3.1 pourrait également contribuer à cette différence d'effet, de par la force de son promoteur transcriptionnel, qui pourrait surexprimer beaucoup trop fortement le miR-29b dans nos conditions expérimentales. Enfin, en faisant un parallèle avec une étude publiée en 2007 montrant l'accumulation de miR-29b en phase mitotique (H.-W. Hwang, Wentzel, and Mendell 2007), il est possible que nos conditions expérimentales (expression du pré-miR-29b et non de miR-29b comme dans les travaux de Yan *et al.* 2011) entraînent une accumulation non physiologique de miR-29b dans un compartiment cellulaire comme le noyau par exemple. Cette modification de concentration de miR-29b pourrait provoquer des variations de voies métaboliques cellulaires inattendues, mais aussi masquer ou au contraire exacerber des phénomènes moléculaires physiopathologiques attendus. Ainsi l'effet observé de miR-29b sur l'expression du gène *Col3a1* pourrait être sur- ou, au contraire, sous-évalué dans notre étude.

De plus, la surexpression de miR-29b pourrait perturber des voies de régulations cellulaires conduisant par exemple à l'accumulation l'ARNm *Col3a1* dans la cellule. Nous pourrions vérifier cette possibilité en réalisant des expériences de stimulation de chondrocytes humains surexprimant ou non miR-29b par l'IL-1 $\beta$  pour mesurer le taux de l'ARNm *Col3a1*. Si, dans ces conditions, le taux de l'ARNm *Col3a1* était augmenté, alors nous pourrions confirmer le mode d'action de miR-29b en tant que répresseur de la traduction de l'ARNm *Col3a1*. Si, au contraire, ce modèle cellulaire confirmait la diminution du taux de l'ARNm *Col3a1*, alors nous pourrions remettre en cause nos conditions expérimentales basées sur la culture de cellules murines ATDC5.

# *Premier Article*





# MicroRNA-29b limits the expression of type II collagen in human osteoarthritic and dedifferentiated articular chondrocytes

AVéronique Salone<sup>1\*</sup>, David Moulin<sup>1\*</sup>, Meriem Koufany<sup>1</sup>, Thomas Clément<sup>1</sup>, Isabelle Behm-Ansmant<sup>1</sup>, Christiane Branlant<sup>1</sup>, Bruno Charpentier<sup>1</sup>, Jean-Yves Jouzeau<sup>1†</sup>

\* Equal contribution to this work

1-Laboratoire IMOPA, UMR 7365 Université de Lorraine-CNRS, Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Santé - Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt Haye, BP 184, Vandœuvre-lès-Nancy cedex, 54505, France.

† Corresponding author: Jean-Yves.Jouzeau@univ-lorraine.fr

## **Abstract:**

### OBJECTIVE:

Osteoarthritic (OA) cartilage is thought to be associated with the occurrence of chondrocytes having lost their differentiated phenotype. We planned to identify microRNAs (miRNAs) contributing to deregulation of the chondrocyte phenotype by screening cytokine-stimulated chondrocytes and validating their functional relevance in the chondrogenic ATDC5 cell line and in osteoarthritic chondrocytes.

### METHODS:

Variations of miRNA expression levels following *in vitro* treatment of human chondrocytes from healthy controls with IL-1 $\beta$  were investigated using miRNA dedicated-microarrays. Variations in cytokine-stimulated cells and chondrocytes from 18 OA patients were quantified by quantitative RT-PCR. The miRNA targets were predicted by computer analysis and selected for their expected relevance for joint pathology. 3'UTR-luciferase reporter assays and stable overexpression of miRNAs in ATDC5 chondrogenic cell line were used to validate miRNA mRNA targets.

### RESULTS:

In response to IL-1 $\beta$ , 10 miRNAs including miR-146a were overexpressed, whereas 9 miRNAs including miR-140 and -455 were down-regulated outside the [0.8; 1.2] -fold change interval. Bioinformatics search for putative miRNA targets provided the highest probability score for miR-29b against the 3'-UTR of the COL2A1 gene encoding collagen type II. RT-PCR analysis showed a 2.7-fold increase of miR-29b level in IL-1 $\beta$  stimulated chondrocytes and a 5.8-fold increase in chondrocytes from OA *versus* non-OA patients. Direct regulation of COL2A1 expression by miR-29b was demonstrated by the reduced 3'UTR-luciferase reporter activity and its reversion by mutation in the miR-29b target site. Furthermore, ATDC5 cells overexpressing miR-29b displayed a reduced expression of collagen proteins, but not of the COL2A1 mRNA.

### CONCLUSIONS:

miR-29b is a negative post-transcriptional regulator of COL2A1 expression in chondrocytes. Its increased level may contribute to the altered chondrocyte phenotype reported in OA.

**Keywords:** cartilage, chondrocyte phenotype, osteoarthritis, microRNA-29b, collagens

## **Introduction:**

MicroRNAs (miRNAs) are a family of small (20- to 22-nt) endogenous noncoding RNAs. Since their discovery in *Cænorhabditiselegans*, hundreds of potential miRNAs have been discovered in animals. However, we are just in the process to establish their precise roles in biological mechanisms [1]. Expression of mammalian miRNAs includes several steps. They are most frequently produced from long precursors (pri-miRNAs) by the sequential action of two RNase III-like enzymes: in nuclei, Drosha produces ~70-nucleotides pre-miRNA hairpin precursors, that are exported to the cytosol by exportin 5, where they are converted into miRNA:miRNA\* duplexes by the Dicer RNase. The duplexes are then taken in charge by the RNA-induced Silencing Complex (RISC) [2], allowing their association with their partner sequences in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of targeted messenger RNAs (mRNAs). As a consequence, either translation of the targeted mRNA is repressed or it is degraded (reviewed in [4]). Such regulation by miRNAs is expected to concern one third of mammalian mRNAs [6]. Furthermore, the expression patterns of miRNAs are cell, tissue and development-stage specific [5], so that miRNAs play a key role in cell differentiation and development, as exemplified by studies on skeletal development [3]. Accordingly, microarray technology and deep-sequencing approaches have revealed correlation between deregulation of miRNA expression and several pathological conditions [7] as well as disease progression. Nevertheless, further studies are needed to identify miRNA variations which are specifically associated with pathological conditions in order to demonstrate whether miRNAs can be used as disease biomarkers [9] and/or as modulators of pathologies [10].

Osteoarthritis is a highly prevalent joint disease [11] characterized by a progressive destruction of the extracellular matrix (ECM) of articular cartilage, and contributions by synovium, subchondral bone and other joint tissues to disease onset are now well established [8]. During OA, chondrocytes, which are the only functional cell type of cartilage, become unable to maintain the dynamic equilibrium between synthesis of cartilage-specific components and their enzymatic degradation. The main consequences are altered cell-matrix interactions favouring occurrence of an abnormal chondrocyte phenotype and concomitant cartilage destruction [12]. As a consequence, OA cartilage is characterized by a decreased expression of cartilage-specific genes and occurrence of biomarkers accounting for loss of differentiated phenotype or switch towards hypertrophy [13]. In this line, miRNA expression profile may be useful to better define and/or understand the control of chondrocyte phenotype. Previous profiling studies identified chondrocytes miRNAs that were expressed differentially in human OA cartilage [14-16], some of which being shown to regulate matrix degradation such as miR-27b, miR-140, and miR-199a [17-20]. However, the overlap of miRNA patterns between studies was quite low [14-16], which may be linked to different disease durations and severities, cartilage regions studied or demographic features of healthy controls [23]. To circumvent these possible drawbacks, we looked for variations of the miRNA profile in controlled cellular models of human chondrocyte phenotype loss, and we searched for putative cartilage specific mRNA targets of miRNAs showing significant variations. Then, we focused our study on miR-29b, which can target the major biomarker of the chondrocyte phenotype, COL2A1 mRNA. We examined its differential expression in a panel of OA patients and validated COL2A1 as a phenotype-related target of miR29b in chondrogenic cells. Our data strongly supports a contribution of miR-29b up-regulation to the altered chondrocyte phenotype reported in OA cartilage.

## **Patients and Methods:**

### **Patients**



This study was approved by our local Research Institution review board (registration number UF 9757 - CPRC 2004 - Cellules souches et chondrogénèse). Cartilage samples were obtained from patients undergoing knee or hip arthroplasty in conformity with the declaration of Helsinki principles and after procurement of a written informed consent (see Table S1). All OA patients (n=18) were evaluated by an orthopedic surgeon and fulfilled the clinical and radiological criteria of the American College of Rheumatology for knee [24-1] or hip [25] OA. OA lesions corresponded to the grade III or IV of the Kellgren/Laurence radiographic criteria for assessment of OA. Non-OA chondrocytes were obtained from 5 age-, sex- BMI- and anatomical site-matched patients with joint break or in the context of multi-organ procurements (Table S1).

### **Isolation and culture of human chondrocytes**

Chondrocytes were obtained from human cartilage samples as described elsewhere [26].

### **Cytokine-induced loss of articular chondrocyte phenotype**

The loss of differentiated chondrocyte phenotype was induced by IL-1 $\beta$  challenge [28]. For that goal, chondrocytes from non-OA donors were stimulated for 48h with 10 ng/ml of hrIL-1 $\beta$  (R&D Systems) and changes in phenotype biomarker expression, *i.e.* aggrecan, collagen type II and MMP-13, were evaluated by RT-qPCR.

### **miRNA (miR) profiling**

Total RNAs were isolated from cell monolayers with the miRCURY RNA Isolation kit™ (Exiqon), before treatment with the *RQ1* RNase-Free *DNase* (Promega) according to the manufacturer's protocol. After tests for RNA quality and the presence of small RNAs with a 2100 chip bio-analyzer™ (Agilent technologies), the samples were labelled and hybridized with miRCURY™ LNA Arrays (v.11.0 *hsa*, *mmu* and *rno*) coated with probes for 1376 human miRs (Exiqon). Microarray data will be available on the Gene Expression Omnibus (GEO) data repository.

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

To quantify mRNA expression of target genes, RT-PCR analysis were performed as previously described [29], using specific set of primers (Table S2). The mRNA level of each gene of interest and of the ribosomal protein RPS29, chosen as a housekeeping gene in chondrocyte [30], was determined three times. Quantifications of gene expression were performed using standard curves of purified PCR products with concentrations ranging from 10<sup>-3</sup> to 10<sup>-9</sup> ng/ml. Results were expressed as the ratio between the mRNA level of the gene of interest and that of the *RPS29* gene.

TaqMan™ MicroRNA assays (Applied Biosystems), performed according to manufacturer's protocols, were used for real-time quantitative PCR evaluation of the miR-29b level. Each experiment was run in triplicate. Quantification of relative miRNA expression levels was determined by the 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  method [31]. Using BestKeeper software [32], microRNAs with a low expression variance in chondrocytes and ATDC5 cells were identified and used as endogenous controls.

### **Constructs for Luciferase reporter assay and microRNA-29b expression**

The pGL3-Luc::COL2A1 plasmid was built by cloning a 400 bp DNA corresponding to the human COL2A1 mRNA 3'-UTR into the pGL3 Luciferase Reporter Vector (Promega). The 3'UTR was amplified from HeLa cell genomic DNA using GACTCTAGAGGACCCAAGTACTTTCCA (Forward) and GGCCGTCTAGATGTACTTTCCAATAATCT (Reverse) primers. Amplified DNA



fragments were purified using the NucleoSpin™ Extract II Kit (Macherey-Nagel), and digested overnight at 37°C with *Xba*I restriction endonuclease (Fermentas) in the Tango buffer 10X. Digested DNA fragments were gel purified and ligated into the *Xba*I-digested pGL3 vector to generate pGL3-Luc::COL2A1 plasmid (reporter plasmid). The pGL3-Luc::COL2A1-mutant plasmid containing the miR-29b seed sequence in a reverse orientation was produced by PCR-directed mutagenesis.

The pcDNA3.1-pre-miR-29b and pcDNA3.1-pre-miR-199a plasmids were used to express miR-29b and miR-199a from their human precursors, hsa-pre-miR-29B1 (81 bp sequence, referred as MI0000105 in miRbase v17) and hsa-pre-miR-199a-1 (71 pb sequence, referred as MI000024-12 in miRbase v17), respectively. The hsa-pre-miR-29B1 and hsa-pre-miR199a-1 DNA sequences were amplified from HeLa cell genomic DNA using the GACGGTACCCTTCAGGAAGCTGGT (Forward) and GACGGATCCCCCAAGAACACTG (Reverse) and the GACGGATCCGCCTAACCAATGT (Forward) and GACGGTACCGCCAACCCAGTGTT (Reverse) primer pairs, respectively. Amplified DNAs were purified and digested for one hour at 37°C with *Kpn*I and *Bam*HI restriction endonucleases (Fermentas) in the Tango buffer 1X. Digested DNAs were gel-purified and inserted in the pcDNA 3.1 vector (Invitrogen) cleaved by *Kpn*I and *Bam*H.

#### **Transfection of HeLa cells for luciferase reporter assay**

HeLa cells were transfected with 500 ng of pGL3-Luc::COL2A1 plasmid and 500 ng of pcDNA3.1-pre-miR-29b or pcDNA3.1-pre-miR199a or empty pcDNA3.1 and 5ng of the pRL plasmid encoding *Renilla* luciferase (Promega) using EXGEN500™ (Euromedex) in 12-well plates. Triplicate measures of the luciferase activity were performed 24-1 h after transfection, using the Dual-Luciferase Reporter Assay System™ (Promega) and Xenius XL™ luminometer (SAFAS) equipped with double injectors. The *Firefly* luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity. Each experiment was repeated at least 5 times.

#### **Culture of ATDC5 cells in monolayer and micromass**

ATDC5 cells were supplied by the ECACC Cell Bank (Sigma). Undifferentiated cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in T25 flasks filled with DMEM/F12 medium supplemented with 10 µg/ml human transferrin (Sigma),  $3 \times 10^{-8}$  M sodium selenite (Sigma), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.5 µg/ml amphotericin B and 5% fetal bovine serum (Invitrogen). After reaching 70% of confluence, monolayers were trypsinized and cells were replated in 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well before chondrogenic differentiation by insulin supplementation according to [33]. In some experiments, ATDC5 cells were cultured in micromass as described by [34] with cell differentiation promoted as described above.

#### **Generation of microRNA-29b overexpressing ATDC5 stable transfectants**

Undifferentiated ATDC5 cells were transfected with 500 ng of empty pcDNA3.1 or pcDNA3.1-pre-miR-29b using EXGEN 500™ (Euromedex). Two days later, cells were diluted 10-fold then incubated in complete DMEM/F12 medium supplemented with 400 mg/ml geneticin (GIBCO BRL). After 2 weeks, drug-resistant clones were picked-up and expanded. Cells were then plated in 12-well plates or cultured in micromass in the chondrogenic conditions described above. Five experiments were performed on independent pools of clones (both in monolayer and micromass).

### **Sirius red staining of ATDC5 cells**

ATDC5 cells that had been cultured for 14 days in 6-well plates were washed twice with PBS and fixed with 95% ethanol for 30 min. The fixed cells were stained with 1% Sirius red (Sigma, [35]) for 5 min before two washings with H<sub>2</sub>O.

### **Statistical analysis.**

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM and were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher PLSD *post hoc* test. Differences were considered as significant if *p* value was less than 0.05.

## **Results :**

### **Microarray screening of miRNAs in human IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes**

As shown in Table 1, the challenge of non-OA chondrocytes with IL-1 $\beta$  modified significantly the miRNA expression profile in the ]0.8 ; 1.2[ fold changes interval (Table 1). Ten miRs were up-regulated with the highest level seen for miR-146a (Table 1A). In contrast, 9 miRs were down-regulated with the lowest expression level observed for miR-199a (Table 1B). In favour of the relevance of our cellular model to OA disease, the levels of several miRs previously reported to be modified in OA chondrocytes, *i.e.* miR-146a, miR-140, miR-455 and miR-199a, displayed significant variations in our assays. Furthermore, seven miRs varied similarly upon serial culturing of chondrocytes as compared to IL-1 $\beta$  treatment (data not shown). As expected, mRNA quantifications indicated the reduced expression of the extracellular matrix components (aggrecan and collagen type IIA) and an increased expression of the matrix metalloproteinase MMP-13 in IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes (supplementary Figure S1).

### **Identification of putative mRNA targets of miRNAs showing level variations**

Target mRNAs were selected from miRNA-mRNA target pairs predicted by at least 2 of the 3 MicroCosm Targets, TargetScan and PicTar algorithms. Amongst the 3'-UTRs of mRNAs known to be expressed in human chondrocytes [36-38], the 3 algorithms identified the 3'-UTR of human COL2A1 mRNA (collagen, type II, alpha 1) as a possible target of the miR-29b seed sequence. The probability score was very high (free energy -21.6 kcal/mol) (Figure 1A). Moreover, miR-29b was shown recently to target directly COL2A1 mRNA in the mouse [48] and the sequence targeted by mouse miR-29b is phylogenetically conserved (Figure 1B). As the level of miR-29b was enhanced in our models, we hypothesized that miR-29b might contribute to the down-regulation of human COL2A1 expression.

### **Increased expression of miR-29b in human OA chondrocytes**

First, for a more precise estimation of the miR-29b level in our cell models, we used quantitative RT-PCR and found averaged 2.7- and 1.7-fold increased levels after IL-1 $\beta$  challenge (Figure 2A) and serial culturing (data not shown), respectively. Very interestingly, a significant increase of miR-29b level (averaged 5.8-fold) was also observed in chondrocytes obtained from OA patients (Table S1), compared to non-OA donors (Figure 2B). Altogether, our data were consistent with miR-29b up-regulation being associated with an overall loss of the dedifferentiated chondrocyte phenotype.

### **Direct targeting of the 3'-UTR of human COL2A1 mRNA by miR-29b**

Then, we checked for the direct interaction of human miR-29b with the 3'-UTR of human COL2A1 in HeLa cells, using a 3'-UTR luciferase-based reporter assay (Figure 3A). This cell type was chosen because of its low level of expression of both miR-29b and COL2A1 (data not

shown). A 2.6-fold decrease of the luciferase activity was detected in cells overexpressing miR-29b (Figure 3C), whereas no effect was observed in cells overexpressing miR-199a (Figure 3B) chosen as an IL-1 $\beta$ -inducible control[17]. When the co-transfection assay was repeated with a pGL3-Lucplasmid, mutated in the COL2A1 putative target sequence of miR-29b (Figure 3A), no significant loss of luciferase activity was detected upon miR-29b expression (Figure 3B). Interestingly, no significant decrease of the mRNA level of the chimeric transcript Luc::COL2A1 was detected upon miR-29b overexpression (figure 3D). Taken together, these data strongly suggested that miR-29b interacted directly with the 3'UTR of human COL2A1 mRNA and acted as a translation repressor.

### **Translational inhibition of collagens expression in a chondrogenic cell line stably overexpressing miR-29b**

Recombinant plasmids encoding either the human pre-miR-29b (pcDNA3.1-pre-miR-29b), or the pcDNA3.1-Empty vector as a negative control, were used to generate stably transformed chondrogenic ATDC5 cell lines. These transformed cells were grown during 14 days in monolayers or in micromass. As shown in figure 4A, ATDC5 cells overexpressing miR-29b exhibited a decreased Sirius red staining compared to controls, whatever the culture system used during chondrogenic differentiation (Figure 4A). A control experiment confirmed that miR-29b expression was doubled in the stably transfected cells (Figure 4B). However, instead of the reduced COL2A1 mRNA level reported in ATDC5 cells transfected with a plasmid encoding mature mouse miR-29b [48], a 5-fold increase of COL2A1 mRNA level was observed in the transformed cells (Figure 4C). Note that the plasmid encoded the human pre-miR-29b and that growth conditions were different. The data show that in the conditions we used doubling miR-29b level is sufficient to miss-regulate collagen synthesis in ATDC5 cells and that deregulation concerns the translational step rather than the transcriptional step or mRNA stability.

### **Discussion**

Depending on cartilage layer and disease severity, OA chondrocytes have been reported to display enhanced apoptosis, insufficient anabolic activity, increased production of matrix degrading enzymes and alteration of the chondrocyte phenotype [40]. A differentiated articular chondrocyte phenotype is classically defined by the ability to synthesize cartilage-specific molecules, especially aggrecan and some collagen subtypes [41]. Amongst them, collagen type II is highly expressed in activated functional chondrocytes and is a hallmark of phenotype maintenance [42]. Nonetheless, the expression of these well-established extracellular matrix biomarkers varies with cartilage depth [43], biomechanical constraints [44] and during age-related focal cartilage lesions [45]. As a consequence, any scientist characterizing primary chondrocyte population obtained from OA patients has to face varied phenotypes with heterogeneity originating both from cartilage samples and patient history. Such heterogeneity may hamper identification of disease-related gene expression patterns and comparative analysis of miRNA profiles in large-scale studies on primary OA chondrocytes [14-16][36]. Therefore, we took advantage of well-established models of chondrocyte differentiated phenotype loss, which have relevance to several the OA-related phenotypic changes [28], to identify some relevant miRNA changes that might be used as phenotypic characteristic of OA. By challenging chondrocytes through a common injuring stimulus, these models were expected to avoid the heterogeneity problems encountered with primary cell cultures. Using this approach, we report here a strong increase of miR-146a and a significant decrease of miR-140, miR-199a and miR-455 which are in good agreement with previous studies in OA chondrocytes [17-20, 46, 47]. These results validated the fact that our screening approach was relevant for identifying miR changes associated with an OA-like cell

phenotype. This led us to investigate the putative pathophysiological relevance of other miRs with a significant variation in our experimental system.

We focus further studies on one of these varying miRs, miR-29b, since in our bioinformatics search for miR targets, the highest probability score was obtained for the miR-29b-COL2A1 pair. *In silico* analysis therefore suggested that miR-29b might regulate the expression of the major phenotype biomarker in articular chondrocytes, namely collagen type II. Interestingly, the increased expression of miR-29b found in both models of chondrocytes phenotype loss was confirmed by our RT-qPCR analysis in OA chondrocytes. We paid a special attention to the pairing of OA samples to non OA controls in terms of cartilage source, age and BMI. Indeed, the expression of some miRs was demonstrated to be enhanced in response to mechanical stimulation [21, 22], while expression of other ones was suggested to be correlated with BMI [15], indicating that joint loading and obesity may influence the chondrocyte miR profile. Ageing is another major OA risk factor and cartilage exhibits remarkable age-related changes including chondrocytes senescence. A recent up-regulation of miR-29 was reported in fibroblasts from ageing and progeroid mice, supporting the idea that tissue miR profile may be also partly age-dependent [49]. Taken together, this huge source of variability of miR expression in chondrocytes from OA patients may explain why miR-29b variations were not detected in previous miR profiling studies [14-16].

MiR-29b belongs to the miRNA-29 family which members are highly conserved between human, mouse and rat [50]. The identity of their seed regions suggests large overlapping of their mRNA target sites. However, a differential expression of miR-29 members was reported [51]. It is explained transcription of their precursors from two distinct genomic *loci* and variable post-transcriptional degradation [52]. Members of the miR-29 family have been reported to target extracellular matrix-related genes [50], in particular collagens [51, 53]. The silencing of miR-29 members [51] or their down-regulation by TGF- $\beta$  [53, 54] is thought to contribute to the development of fibrosis in many soft tissues, as well as during systemic sclerosis [53]. In good accordance with their major role in the control of collagens synthesis, a Sox9-dependent down-regulation of miR-29a and b was recently reported during chondrogenesis in a murine mesenchymal stem cell line [48]. Here, we demonstrate a regulatory role of miR-29b but in the opposite *scenario*: by targeting the 3'-UTRs of both human and mouse COL2a1 mRNAs, miR-29b decreased collagen type II synthesis during the chondrocyte loss of differentiated phenotype. We assume that this inhibitory effect on COL2A1 was restricted to the 29b paralogue, since no significant variations of miR-29a or c were detected in our miRNA profiling studies. This observation is in good agreement with previous miRNA profiling studies performed on OA chondrocytes, since a limited down-regulation of miR-29a was reported in only one of the three experiments described [15]. Together with the previous work of Yan et al [48], our data strongly support a negative regulatory role of miR-29b on collagen type II expression in chondrocytes. Mir-29b is therefore expected to control at least in part chondrocyte phenotype, since its level decreases during chondrogenesis and increases during loss of the differentiated phenotype. Noteworthy, our observation of a significant increase of miR-29b in human OA chondrocytes identifies miR-29b as a possible new player in OA pathogenesis. Interestingly, an increase of miR-29b level was also reported to promote osteoblast differentiation [55] and is thought to maintain the differentiated phenotype and favor mineral deposition in cells achieving terminal differentiation [56]. This observation reinforces the idea of a pathological role of miR-29b in the OA joint, since suppression of collagens synthesis may be beneficial for bone development while being deleterious for cartilage homeostasis. In addition, one cannot exclude the possibility that miR-29b disrupts joint physiology by promoting cellular

senescence [57], in accordance with IL-1 $\beta$ 's potency to induce features of premature senescence in chondrocyte [58].

As a consequence of the general inhibitory effect of miRNAs on mRNA translation about 80% of the targeted mRNAs are subjected to an accelerated degradation process which explains the observed decreased mRNA level [59]. However, about 20% of the mRNA can be translationally inhibited by miRNAs without significant degradation [59]. Although miR-29b was shown to down-regulate mRNAs for COL2A1 in mouse chondrocytes [48], for HDAC4, TGF- $\beta$ 3 and COL1A1 in MC3T3 osteoblasts [55] and for COL1A1 and COL3A1 in human aortic smooth muscle and adventitial fibroblasts [60], we report an increased level of COL2A1 mRNA in ATCD5 cells overexpressing miR-29b. This increase contrasted with the reduced pro-collagens synthesis shown by Sirius red staining. Yan *et al.* [48] reported that COL2A1 mRNA level decreased in mouse chondrocytes transiently transfected with a miR-29a/b mimic, while it increases in ATDC5 cells transiently transfected with miR-29a/b inhibitors [48]. Such discrepancy may be, at least in part, due to differences in the experimental conditions used. Firstly, we performed a stable transfection leading to pre-miR-29b production, instead of a transient one with a miR-29-a/b mimic. A major consequence is that the miR29-a/b mimic was probably mainly located in the cytoplasm, whereas the overproduced pre-miR-29b recapitulates the physiological processing of miR-29b from the nucleus. Therefore, the subcellular localization and availability of mature miR-29b into the chondrocyte might greatly differ between both techniques with a subsequent impact on the probability of miR-29b-COL2A1 mRNA pairing. Secondly, we allowed ATDC5 cells to differentiate for 14 days, in accordance with the differentiation process reported by Shukunami *et al* [33], whereas ATDC5 cells were placed for only 2 days into chondrogenic medium in the study of Yan *et al* [48]. This short-term exposure may be sufficient to stimulate expression of phenotype markers, but timely more consistent with activation of growth factors signaling pathways. Therefore the amount of COL2A1 to be targeted by miR-29b was likely much higher in our stably transfected ATDC5 cells than in the transiently transfected cells of Yan *et al.* (ref) As a whole, our data bring evidence in favor of a down-regulation of the translation efficiency of collagen type II mRNA by miR-29b. Further studies will be required to identify the underlying mechanisms. We suggest that miR-29b could contribute, in conjunction with miR-675 [61], to a miR regulatory balance of COL2A1 expression, whose deregulation would contribute to the disruption of the differentiated phenotype in OA cartilage.

In conclusion, this work demonstrates, for the first time, that miR-29b is overexpressed in OA chondrocytes in close relation with a loss of the differentiated articular phenotype. Our data identify miR-29b as a post-transcriptional regulator of COL2A1 expression and its up-regulation may contribute to the disruption of cartilage homeostasis.

### **Acknowledgements and Affiliations**

The authors thank Pr Didier Mainard (Department of orthopedic surgery, Nancy university hospital) for providing cartilage samples and Sébastien Hupont for imaging (PTIBC IBISA (Nancy) – FR3209 CNRS – PPIA UMR7561 CNRS UL). The authors also will to thank the national French grant “Vieillessement ostéo-articulaire” from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM), the PRST IMTS of “Région Lorraine” the “Communauté Urbaine du Grand-Nancy” (CUGN), and CNRS and Lorraine University for their financial support.



### **Table 1:**

Micro-array screening of miRNAs in human IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes. Total RNAs were isolated from “non OA” human chondrocytes in primary culture challenged or not with 10 ng/ml of human recombinant interleukin-1 $\beta$  (hrIL1- $\beta$ ) for 48 h. Micro-array analysis of miRNAs was performed with the miRCURY™ LNA Array 11.0 (Exiqon). Data are expressed as the ratio of chondrocyte miRNA levels measured in IL1- $\beta$  over basal conditions. A/ miRs being up-regulated by more than 1.2-fold; B/ miRs being down-regulated by a factor lower than 0.8-fold. Values for miRNA levels are the median of 4 raw signal intensities.

### **Figure n°1:**

Putative sequence targeted by the miR-29b seed sequence in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of human COL2A1 mRNA. A/ Predicted duplex formation between miR-29b and 3'-UTR by the TargetScan algorithm. B/ Cross-species conservation of the targeted sequence in the 3'-UTR of COL2A1 mRNA.

### **Figure n°2:**

Changes of miR-29b level in human chondrocytes with an altered phenotype. A/ Chondrocytes stimulated with 10 ng/ml of hrIL-1 $\beta$  for 48 h (n=5). B/ Chondrocytes from OA patients undergoing joint arthroplasty (n=18). Quantification was performed by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method using the invariant expression of miR-103, miR-423-3p, and miR-191 as endogenous controls. Data are presented as relative levels with references to controls arbitrary considered as having a value of 1. Bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$  versus unstimulated chondrocytes, # =  $P < 0.05$  versus chondrocytes from healthy controls (n=5).

### **Figure n°3:**

Study of miR-29b-COL2A1 mRNA interaction with luciferase reporter assay. A/ Schematic constructs of pGL3-COL2A1 reporter. SV40: SV40 promoter, PA: polyadenylation signal, WT: wild type; the sequence predicted to be targeted by the seed sequence of miR-29b in the 3'UTR of human COL2A1 mRNA and the corresponding 8 bps mutated construct are highlighted. B/ Luciferase activities in HeLa cells co-transfected either with pcDNA3.1-pre-miR-29b or pcDNA3.1-pre-miR-199a, or a negative control (pcDNA3.1-empty), and the internal control plasmid encoding *Renilla* luciferase (RLuc), and either pGL3-Luc::COL2A1 or pGL3-Luc::COL2A1-mutant. Data are shown as relative luciferase activity, taking the luciferase activity measured in HeLa cells transfected with plasmid pcDNA3.1-empty as the reference 100% value. C/ miR-29b level determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method as described in figure 2. D/ Luciferase mRNA level determined by quantitative PCR and normalized to RPS29 mRNA chosen as a housekeeping gene. Data are expressed as relative levels, taking the mRNA level in HeLa cells transfected with plasmid pcDNA3.1-empty as the reference value 1. In all experiments, bars show the mean values  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments, each being run in triplicate. \* =  $P < 0.05$  versus control.

### **Figure n°4:**

Effect of a stable miR-29b overexpression on the chondrogenic phenotype of ATDC5 cells. Undifferentiated cells were transfected with pcDNA3.1-pre-miR-29b or a negative control (pcDNA3.1 empty) and then cultured for 14 days in chondrogenic conditions. A/ Representative pictures of Sirius red staining of monolayer (upper) or micromass (middle and lower) cultures. B/ Expression of miR-29b mRNA relative to miR-21 (invariant endogenous control) determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. C/ Col2A1 mRNA level normalized on RPS29 mRNA determined by quantitative PCR. Data are presented as relative levels where control



cells were allocated arbitrarily the value 1. Bars show the mean value  $\pm$  SEM of 5 independent experiments, each of them being run in triplicate. \* =  $P < 0.05$  versus control.

### Figure S1:

Changes of phenotype biomarker levels in cytokine-stimulated human chondrocytes. Primary cultures of chondrocytes from non OA patients (n=5) were challenged for 48h with 10 ng/ml of rhIL-1 $\beta$  before assessment of *AGGRECAN*, *COL2A1*, and *MMP13* mRNA levels by quantitative PCR. The mRNA levels are normalized over the invariant *RPS29* gene and data are expressed as fold-changes in comparison to unstimulated chondrocytes to which the value 1 has been allocated arbitrarily for each gene of interest. Scale is logarithmic. Bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$ .

### Table S1: Demographic features of patients

### Table S2: Primers used for the RT-QPCR experiments

### Figures

Table 1

A

| miRNA       | IL1- $\beta$ stimulated chondrocytes (fold-change) | Unstimulated chondrocytes (fold-change) | Ratio IL1- $\beta$ stimulated / unstimulated |
|-------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|
| miR-146a    | 1,64                                               | 0,52                                    | 3,16                                         |
| miR-155     | 1,36                                               | 0,57                                    | 2,38                                         |
| miR-147b    | 1,22                                               | 0,67                                    | 1,83                                         |
| miR-183     | 1,59                                               | 0,91                                    | 1,73                                         |
| miR-146b-5p | 1,32                                               | 0,77                                    | 1,71                                         |
| miR-let7i   | 1,14                                               | 0,79                                    | 1,44                                         |
| miR-29b     | 1,39                                               | 1,00                                    | 1,39                                         |
| miR-886-5p  | 0,73                                               | 0,53                                    | 1,37                                         |
| miR-568     | 1,14                                               | 0,87                                    | 1,32                                         |
| miR-495     | 1,00                                               | 0,81                                    | 1,24                                         |

B

| miRNA       | IL1- $\beta$ stimulated chondrocytes (fold-change) | Unstimulated chondrocytes (fold-change) | Ratio IL1- $\beta$ stimulated / unstimulated |
|-------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|
| miR-23a     | 0,69                                               | 1,19                                    | 0,58                                         |
| miR-140-5p  | 1,07                                               | 1,42                                    | 0,75                                         |
| miR-455-3p  | 1,12                                               | 1,48                                    | 0,75                                         |
| miR-140-3p  | 1,11                                               | 1,47                                    | 0,76                                         |
| miR-199a-5p | 0,94                                               | 1,24                                    | 0,76                                         |
| miR-455-5p  | 1,05                                               | 1,36                                    | 0,77                                         |
| miR-602     | 0,97                                               | 1,24                                    | 0,79                                         |
| miR-1184    | 0,98                                               | 1,25                                    | 0,79                                         |
| miR-199a-3p | 1,14                                               | 1,42                                    | 0,80                                         |

A

B

A

B



Figure 3

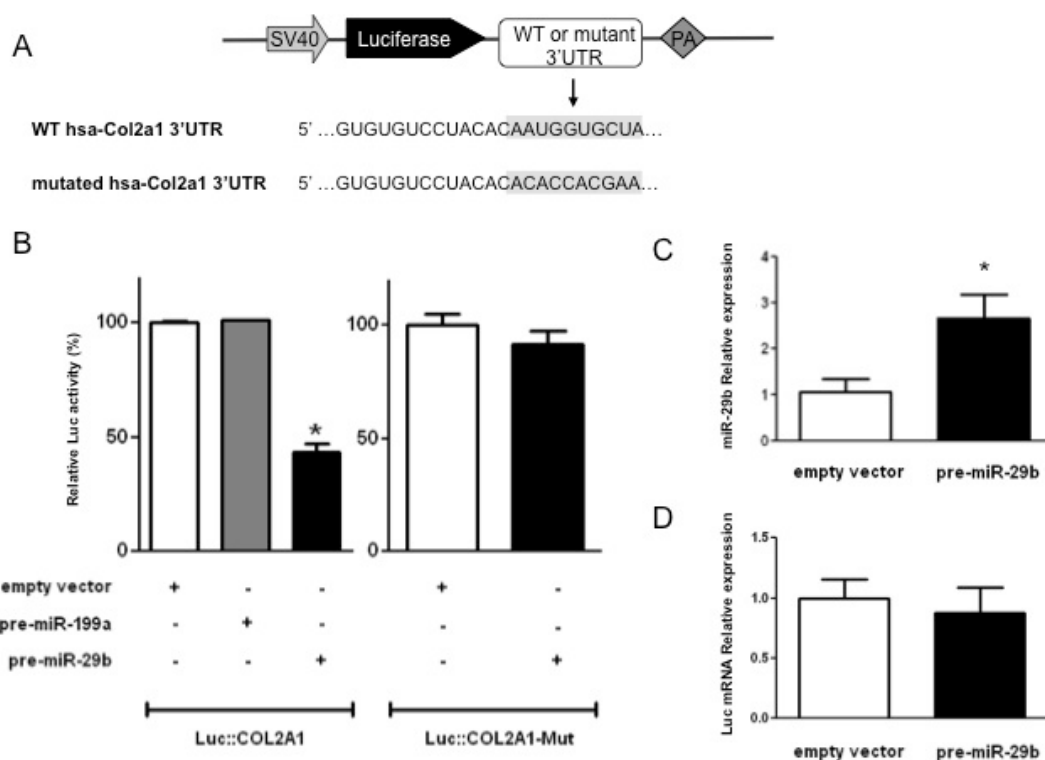


Figure 4

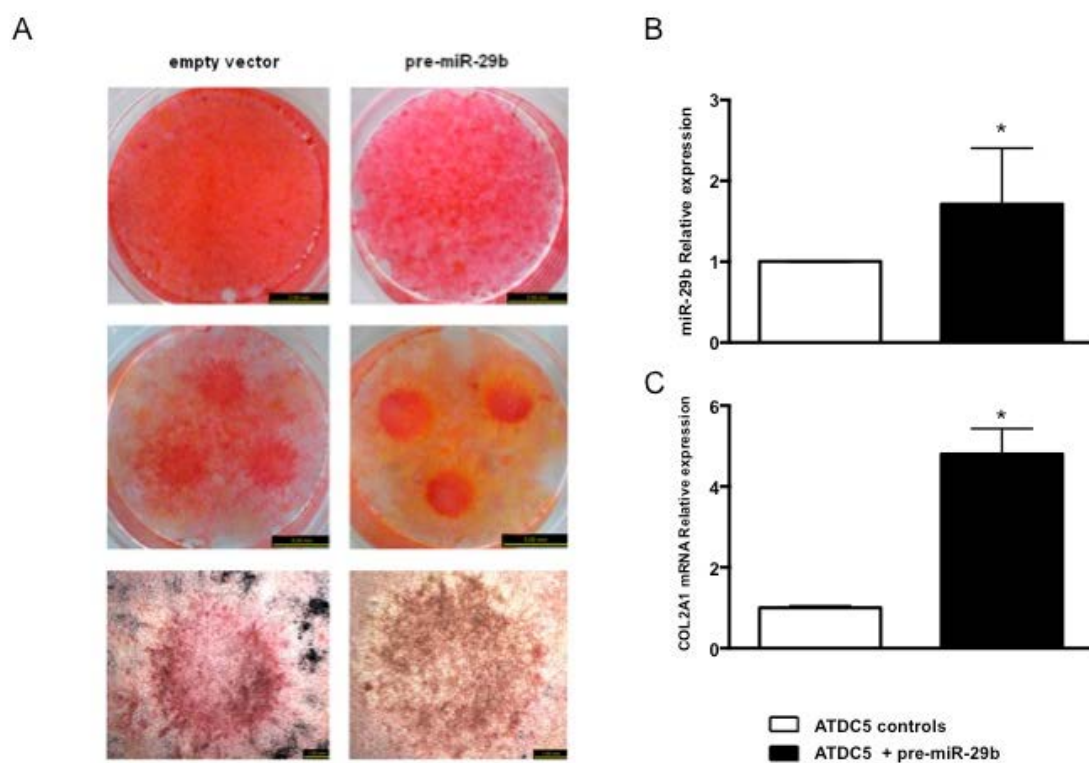




Figure S1

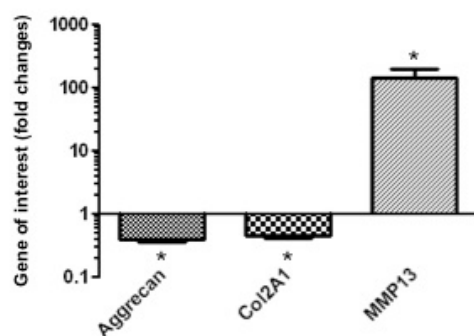


Table S1

| Patients   | Category | Age (years) | Gender   | BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | Cartilage source |
|------------|----------|-------------|----------|--------------------------|------------------|
| 1          | Control  | 38          | M        | 31                       | Knee             |
| 2          | Control  | 39          | M        | 27                       | Hip              |
| 3          | Control  | 78          | F        | 28                       | Knee             |
| 4          | Control  | 83          | F        | 18                       | Hip              |
| 5          | Control  | 75          | M        | 34                       | Hip              |
| Mean/group | -        | 62.6        | 2 F/3 M  | 27.4                     | 2 Knee/3 Hip     |
| 6          | OA       | 62          | F        | 29                       | Knee             |
| 7          | OA       | 68          | F        | 23                       | Knee             |
| 8          | OA       | 63          | F        | 25                       | Knee             |
| 9          | OA       | 64          | F        | 28                       | Hip              |
| 10         | OA       | 69          | F        | 29                       | Hip              |
| 11         | OA       | 60          | F        | 27                       | Hip              |
| 12         | OA       | 62          | F        | 23                       | Hip              |
| 13         | OA       | 56          | F        | 28                       | Hip              |
| 14         | OA       | 79          | F        | 24                       | Hip              |
| 15         | OA       | 63          | F        | 28                       | Hip              |
| 16         | OA       | 60          | M        | 26                       | Knee             |
| 17         | OA       | 55          | M        | 26                       | Knee             |
| 18         | OA       | 69          | M        | 29                       | Hip              |
| 19         | OA       | 69          | M        | 24                       | Hip              |
| 20         | OA       | 57          | M        | 21                       | Hip              |
| 21         | OA       | 63          | M        | 25                       | Hip              |
| 22         | OA       | 54          | M        | 30                       | Hip              |
| 23         | OA       | 54          | M        | 29                       | Hip              |
| Mean/group | -        | 62.5        | 10 F/8 M | 26.5                     | 5 Knee/13 Hip    |



Table S2

| Gene   | Primer Sequence                       | Size (bp) | Tm (°C) |
|--------|---------------------------------------|-----------|---------|
| ACAN   | Sens: 5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3'         | 84        | 63      |
|        | Antisens: 5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA   |           |         |
| COL2A1 | Sens: 5'-GGCCAGGATGTCCAGGAGGC-3'      | 197       | 60      |
|        | Antisens: 5'-GGGCAGATGGGGCAGCACTC-3'  |           |         |
| MMP13  | Sens: 5'-TGGTGGTGATGAAGATGATTG-3'     | 161       | 57      |
|        | Antisens: 5'-TCTAAGCCGAAGAAAGACTGC-3' |           |         |
| RPS29  | Sens: 5'-CAGACACGACAAGAGCGAGA-3'      | 69        | 63      |
|        | Antisens: 5'-GGGTCACCAGCAGCTGTACT-3'  |           |         |

### **List of abbreviations**

COL2A1 : alpha 1 type II collagen ; ECM : Extra Cellular Matrix ; IL-1 $\beta$  : Interleukin 1 beta ; mRNA : messenger Ribonucleic Acid ; miRNA : micro Ribonucleic Acid ; OA : Osteoarthritis ; RT-PCR : Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction ; UTR : Untranslated Region.

### **Competing interests section**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

VS carried out the micro-arrays analyses, the *in silico* predictions, worked at molecular genetic studies, achieved qPCR experiences, participated to luciferase gene reporter tests and drafted the manuscript. DM carried out cells cultures, achieved chondrocyte phenotype characterization experiences and drafted the manuscript. MK carried out the chondrocyte phenotype characterization, participated to cells cultures and luciferase gene reporter tests. TC participated to molecular genetic studies and helped to drafted the manuscript. IBA participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. CB, BC and JYJ conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript.

### **References**

1. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. 431(7006): p. 350-5.
2. Davis-Dusenbery, B.N. and A. Hata, *Mechanisms of control of microRNA biogenesis*. J Biochem, 2010. 148(4): p. 381-92.
3. Kobayashi, T., et al., *Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(6): p. 1949-54.
4. Wu, L. and J.G. Belasco, *Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2008. 29(1): p. 1-7.
5. Wienholds, E., et al., *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. Science, 2005. 309(5732): p. 310-1.

6. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. 120(1): p. 15-20.
7. Alvarez-Garcia, I. and E.A. Miska, *MicroRNA functions in animal development and human disease*. Development, 2005. 132(21): p. 4653-62.
8. Goldring, M.B. and K.B. Marcu, *Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis*. Trends Mol Med, 2012. 18(2): p. 109-18.
9. Alevizos, I. and G.G. Illei, *MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2010. 6(7): p. 391-8.
10. Yu, C., W.P. Chen, and X.H. Wang, *MicroRNA in osteoarthritis*. J Int Med Res, 2011. 39(1): p. 1-9.
11. Busija, L., et al., *Osteoarthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010. 24-1(6): p. 757-68.
12. Aigner, T. and L. McKenna, *Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage*. Cell Mol Life Sci, 2002. 59(1): p. 5-18.
13. Lorenz, H. and W. Richter, *Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage*. Prog Histochem Cytochem, 2006. 40(3): p. 135-63.
14. Diaz-Prado, S., et al., *Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes*. BMC Musculoskelet Disord, 2012. 13(1): p. 144.
15. Iliopoulos, D., et al., *Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks*. PLoS One, 2008. 3(11): p. e3740.
16. Jones, S.W., et al., *The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. 17(4): p. 464-72.
17. Akhtar, N. and T.M. Haqqi, *MicroRNA-199a\* regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes*. Ann Rheum Dis, 2012. 71(6): p. 1073-80.
18. Akhtar, N., et al., *MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2010. 62(5): p. 1361-71.
19. Miyaki, S., et al., *MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses*. Arthritis Rheum, 2009. 60(9): p. 2723-30.
20. Miyaki, S., et al., *MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis*. Genes Dev, 2010. 24-1(11): p. 1173-85.
21. Dunn, W., G. DuRaine, and A.H. Reddi, *Profiling microRNA expression in bovine articular cartilage and implications for mechanotransduction*. Arthritis Rheum, 2009. 60(8): p. 2333-9.
22. Guan, Y.J., et al., *MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4*. FASEB J, 2011. 25(12): p. 4457-66.
23. Miyaki, S. and H. Asahara, *Macro view of microRNA function in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. 8(9): p. 543-52.
- 24-1. Altman, R., et al., *Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association*. Arthritis Rheum, 1986. 29(8): p. 1039-49.

25. Altman, R., et al., *The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip*. Arthritis Rheum, 1991. 34(5): p. 505-14.
26. Kuettner, K.E., et al., *Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology*. J Cell Biol, 1982. 93(3): p. 743-50.
27. Hwang, S.G., et al., *Regulation of beta-catenin signaling and maintenance of chondrocyte differentiation by ubiquitin-independent proteasomal degradation of alpha-catenin*. J Biol Chem, 2005. 280(13): p. 12758-65.
28. Ryu, J.H., et al., *Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin*. Development, 2002. 129(23): p. 5541-50.
29. Cailotto, F., et al., *Calcium input potentiates the transforming growth factor (TGF)-beta1-dependent signaling to promote the export of inorganic pyrophosphate by articular chondrocyte*. J Biol Chem, 2008. 286(22): p. 19215-28.
30. Bianchi, A., et al., *Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14prostaglandin J2*. Arthritis Res Ther, 2005. 7(6): p. R1325-37.
31. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
32. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pairwise correlations*. Biotechnol Lett, 2004. 26(6): p. 509-15.
33. Shukunami, C., et al., *Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro*. J Bone Miner Res, 1997. 12(8): p. 1174-88.
34. Greco, K.V., et al., *High density micromass cultures of a human chondrocyte cell line: a reliable assay system to reveal the modulatory functions of pharmacological agents*. Biochem Pharmacol, 2011. 82(12): p. 1919-29.
35. Dapson, R.W., et al., *Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80)*. Biotech Histochem, 2011. 86(3): p. 133-9.
36. Aigner, T., et al., *Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2006. 54(11): p. 3533-44.
37. Appleton, C.T., et al., *Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2007. 9(1): p. R13.
38. Lin, L., et al., *Assessment of the profiling microRNA expression of differentiated and dedifferentiated human adult articular chondrocytes*. J Orthop Res, 2011. 29(10): p. 1578-84.
39. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. Arthritis Rheum, 2012. 64(6): p. 1697-707.
40. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis*. Arthritis Res, 2001. 3(2): p. 107-13.
41. von der Mark, K. and H. von der Mark, *The role of three genetically distinct collagen types in endochondral ossification and calcification of cartilage*. J Bone Joint Surg Br, 1977. 59-B(4): p. 458-64.
42. Hoffman, B. and D.A. Liebermann, *Gadd45 modulation of intrinsic and extrinsic stress responses in myeloid cells*. J Cell Physiol, 2009. 218(1): p. 26-31.



43. Lahm, A., et al., *Semiquantitative analysis of ECM molecules in the different cartilage layers in early and advanced osteoarthritis of the knee joint*. *Histol Histopathol*, 2012. 27(5): p. 609-15.
44. Fitzgerald, J.B., et al., *Shear- and compression-induced chondrocyte transcription requires MAPK activation in cartilage explants*. *J Biol Chem*, 2008. 283(11): p. 6735-43.
45. Squires, G.R., et al., *The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(5): p. 1261-70.
46. Li, J., et al., *miR-146a, an IL-1beta responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4*. *Arthritis Res Ther*, 2012. 14(2): p. R75.
47. Yamasaki, K., et al., *Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage*. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(4): p. 1035-41.
48. Yan, C., et al., *MicroRNA regulation associated chondrogenesis of mouse MSCs grown on polyhydroxyalkanoates*. *Biomaterials*, 2011. 32(27): p. 6435-44.
49. Ugalde, A.P., et al., *Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53*. *EMBO J*, 2011. 30(11): p. 2219-32.
50. Kriegel, A.J., et al., *The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury*. *Physiol Genomics*, 2012. 44(4): p. 237-44.
51. Liu, Y., et al., *Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes*. *Hypertension*, 2010. 55(4): p. 974-82.
52. Zhang, Z., et al., *Uracils at nucleotide position 9-11 are required for the rapid turnover of miR-29 family*. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(10): p. 4387-95.
53. Maurer, B., et al., *MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis*. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(6): p. 1733-43.
54. Qin, W., et al., *TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. 22(8): p. 1462-74.
55. Li, Z., et al., *Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation*. *J Biol Chem*, 2009. 284(23): p. 15676-84.
56. Kapinas, K. and A.M. Delany, *MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling*. *Arthritis Res Ther*, 2011. 13(3): p. 220.
57. Martinez, I., et al., *miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(2): p. 522-7.
58. Dai, S.M., et al., *Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(3): p. 818-31.
59. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. *Nature*, 2010. 466(7308): p. 835-40.
60. Maegdefessel, L., et al., *Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development*. *J Clin Invest*. 122(2): p. 497-506.
61. Steck, E., et al., *Regulation of H19 and its encoded microRNA-675 in osteoarthritis and under anabolic and catabolic in vitro conditions*. *J Mol Med (Berl)*, 2012. 90(10): p. 1185-95.



## **IV. Discussion complémentaire**

### **1. Choix du seuil de variation de l'expression des miARN**

Nous avons déterminé un panel de miARN candidats à la régulation génique du chondrocyte sain ou pathologique. Ceci a été réalisé en faisant une analyse comparative des taux d'expression de ces miARN dans ces 2 populations cellulaires, par des expériences de puces à miARN. Véronique Salone a réalisé une analyse quantitative des données fournies par EXIQON. Ainsi, pour établir le panel de miARN candidats, il a été décidé de retenir comme significatif un seuil de variations d'expression compris en dehors de l'intervalle  $]x0,8-x1,2[$ .

Aussi la réalisation d'un criblage d'expression de miARN par puce doit s'accompagner d'une étude statistique permettant de ne sélectionner que les gènes dont les variations d'expression sont significatives. En effet il est essentiel de s'assurer que les données recueillies suivent une loi Normale afin de pouvoir calculer les « p-values » nous permettant d'établir un diagramme de type Volcano Plot. Au cours de cette étude statistique, l'utilisation d'un tel diagramme de dispersion est primordiale pour sélectionner un seuil significatif de variations d'expressions de gènes de miARN dans nos conditions expérimentales. Cependant cette étude statistique a été compromise dans notre étude par le fait que nous ne disposions pas des données brutes pour chaque monoplicat biologique, mais de la moyenne des trois réplicats biologiques analysés par EXIQON. Ceci ne nous permettait donc pas de calculer des « p-values » et de réaliser cette étude statistique.

Ainsi notre choix de seuil de variation d'expression basé uniquement sur les valeurs de taux d'expression des gènes candidats, apporte un certain biais à notre étude, puisque l'absence de cette analyse statistique peut causer la sélection de gènes de miARN qui peuvent correspondre en réalité à de faux positifs dont l'expression varie très peu.

De plus, on considère généralement comme biologiquement significatives, des variations d'expression de miARN d'au moins 2 fois. Il faut cependant remarquer que seuls 2 miARN satisfont ce critère dans nos conditions expérimentales alors qu'une variation d'expression de l'ordre de 25% avait déjà été observée pour des miARN, décrits comme des régulateurs de l'expression génique du chondrocyte, tels que miR-140 ou encore miR-455 (Tardif et al. 2009; Miyaki et al. 2009; Swingler et al. 2012).

Les variations d'expression des miARN de ce panel ont donc été vérifiées par quantification par RT-qPCR. Il s'avère que les taux de variation observés étaient amplifiés et significatifs avec, par exemple, une augmentation du taux de miR-29b de 5,8 fois au sein du chondrocyte arthrosique (cf. Figure 2 et Tableau S1 de la publication précédente).





Il est important de souligner la grande hétérogénéité des transcrits utilisés pour la normalisation des taux d'expression des miARN dans les différentes études publiées sur des chondrocytes (pour exemples : snARN U6 (J. Li et al. 2012) ; le snoARN U18 (Miyaki et al. 2009) ; la moyenne des taux d'expression des snoARN à boîtes C/D SNORD44, SNORD47, SNORD48 et snARN U6 (Akhtar et al. 2010) ; ou encore le snoARN à boîtes H/ACA RNU19 (Ham et al. 2012)). Dans notre étude le snARN U6 était invariant dans nos conditions expérimentales et les quantifications d'expression des gènes de miARN par RT-qPCR ont été normalisées à partir du gène codant snARN U6.

## 2. Choix de la méthode de prédiction de cible des miARN candidats

Dans notre étude, la prédiction de cible de miARN a été effectuée en utilisant plusieurs algorithmes de prédictions : Microcosm, TargetScan et PicTar. Nous avons choisi de ne sélectionner que les cibles de miARN communes à ces trois algorithmes, et dont les ARNm cibles étaient potentiellement impliqués dans la régulation génique du chondrocyte sain ou pathologique. Il s'avère que cette stratégie de sélection n'est peut-être pas, en réalité, la meilleure. En effet, d'après une étude publiée peu après ce travail (Ritchie, Flamant, and Rasko 2009), il a été montré que l'établissement d'un panel d'ARNm cibles candidats prédits à partir de deux algorithmes, n'est que très peu reproductible en utilisant deux autres algorithmes différents. Par conséquent, l'utilisation des trois algorithmes mentionnés auparavant a pu augmenter la probabilité de sélectionner un bon candidat mais, à l'inverse, a également pu limiter le nombre d'ARNm candidats potentiels identifiés. Bien que notre stratégie de prédiction ait pu ne pas sélectionner un ou plusieurs ARNm intéressants dans notre contexte d'étude, nous avons pu mettre en évidence une nouvelle voie de régulation négative du gène codant la protéine Col11a1, composant essentiel de la matrice extracellulaire du cartilage et biomarqueur spécifique du phénotype chondrocytaire différencié (cf. Chapitre 2 de l'Introduction).

## 3. Utilisation des gènes de ménages *RP29* et *RPS29*

Au cours de nos expériences de quantification du taux des ARNm d'intérêt, nous avons normalisé nos données à partir du taux d'expression du gène invariant *RP29* (Ribosomal Protein 29) et son homologue murin (*RPS29*). Les résultats d'expériences comme celles-ci sont intimement dépendants du choix du gène de normalisation qui doit, par définition (gène de ménage) être invariant dans les conditions expérimentales. Aussi, une variation même infime de ce gène « normalisateur », peut entraîner des erreurs de quantification relative et générer des résultats biaisés ne reflétant pas les variations d'expression des ARNm étudiés



dans les conditions expérimentales dites saines et pathologiques. De plus, le choix du gène de ménage est délicat puisque l'expression d'un ARNm, bien qu'invariant au sein d'un tissu particulier, peut au contraire varier fortement dans un autre tissu, ou encore varier au cours d'un changement de contexte cellulaire sain vers un contexte pathologique. Dans notre cas il a été déterminé et validé par les travaux de plusieurs équipes du laboratoire que les gènes *RP29* et *RPS29* sont invariants, tant dans des chondrocytes soumis à un stress cytokinique (Bianchi et al. 2005; Khair et al. 2013) que dans du cartilage arthrosique humain (Venkatesan et al. 2012; Francin et al. 2014).



## Chapitre 4 : Etude de l'implication des miARN dans la régulation de la balance ePi/ePPi dans la matrice du cartilage

### **A. Plan de l'étude**

Le chondrocyte, seul type cellulaire du cartilage, est responsable de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire. Ces cellules sont réparties de manière homogène dans le cartilage. Le chondrocyte est garant de l'homéostasie du cartilage c'est à dire du maintien de la balance entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire de plus il participe au maintien de l'équilibre entre le phosphate inorganique (ePi) et le pyrophosphate inorganique (ePPi). Cet équilibre est régulé par 4 acteurs protéiques principaux (cf. Chapitre 2, Figure 29). Ces protéines sont toutes transmembranaires et se répartissent en deux groupes : 2 transporteurs de phosphate (Pit-1 exporte le PPI intracellulaire ; ANK importe le Pi extracellulaire) et 2 enzymes phosphatases (PC1 produit l'ePPi à partir de NTP libres ; TNAP déphosphoryle l'ePPi pour former l'ePi).

Au cours d'un changement de phénotype du chondrocyte vers une tendance hypertrophique, les gènes responsables de la balance du phosphate extracellulaire sont dérégulés (Cailotto et al. 2011) en faveur de l'accumulation de ePPi. Une trop forte concentration en ePPi cause la formation de microcristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD) dans la matrice extracellulaire. L'accumulation de ces cristaux au sein de la cavité articulaire résulte en l'apparition de physiopathologies articulaires telles que l'arthrose ou les pathologies microcristallines.

Dans ce travail nous avons souhaité identifier des miARN impliqués dans la régulation des gènes scodant les acteurs protéiques principaux de la balnce ePi/ePPi dans le cartilage.

### **B. Résultats**

#### **I. Prédictions de cibles de miARN *in silico***

Au laboratoire des expériences préliminaires ont été réalisées par Véronique Salone. Dans un premier temps, comme pour l'étude qui porte sur miR-29b régulant l'expression du collagène 2 (cf. Résultats-Chapitre 3), l'étude a débuté par des analyses bio-informatiques. Ainsi les



séquences des régions 3'UTR des ARNm des gènes codant les 4 protéines régulant la balance phosphate ont été soumises à un algorithme de prédiction de cibles de miARN (TargetScan v6.2). Cette analyse a permis d'identifier une centaine de miARN pouvant cibler ces ARNm de ces 4 acteurs. Parmi ceux-ci, les miARN pouvant cibler plusieurs de ces ARNm ont retenu notre intérêt :

- miR-9 a été prédit pour cibler les 3'UTR de PC-1, ANK et TNAP
- let7e a été prédit pour cibler les 3'UTR de ANK et Pit-1
- les miR-188 et miR-219 ont été prédits pour cibler les 3'UTR des 4 ARNm d'intérêt.

## **II. Etude de l'expression des miARN candidats dans un modèle de perte de phénotype chondrocytaire**

Des chondrocytes extraits de cartilages de patients arthrosiques mis en culture ont été stimulés par de l'IL-1 $\beta$  dans le but d'induire la perte du phénotype différencié du chondrocyte (Ryu et al. 2002). Cette perte de phénotype a été vérifiée par la quantification par RT-qPCR SYBR Green de l'ARNm *Col2a1* (biomarqueur spécifique du phénotype différencié du chondrocyte) et de l'ARNm *mPGES-1* (marqueur de l'inflammation). Comme attendu dans ce modèle, la diminution du taux de *Col2a1* (Tan et al. 2003) et l'augmentation de *mPGES-1* (Kojima et al. 2004) ont confirmé le phénomène de perte du phénotype différencié du chondrocyte. Dans ces conditions, les taux des 4 miARN candidats ont été quantifiés par RT-qPCR TaqMan. Nous avons pu observer une augmentation significative des miARN let7e, miR-9 et miR-188, ainsi qu'aucune variation significative n'a été observée pour miR-219 au cours de la perte du phénotype différencié du chondrocyte. Ce miARN a donc été écarté de la suite de l'étude.

## **III. Validation fonctionnelle des prédictions**

Afin de valider les prédictions de cibles de miARN candidats au sein des séquences des régions 3'UTR des ARNm *ANK*, *PC-1*, *Pit-1* et *TNAP*, nous avons réalisé des analyses fonctionnelles par des tests rapporteur luciférase. Les précurseurs codant les microARN let7e, miR-9 et miR-188 ont été clonés dans le vecteur pCDNA3.1 et les régions 3'UTR d'intérêt ont été clonées dans le vecteur pGL3-control en aval du gène rapporteur codant la luciférase Firefly. Le principe de ces tests est décrit dans la partie Matériel et Méthodes et dans le Chapitre d'ouvrage en Annexes. Les oligonucléotides utilisés pour réaliser ces clonages sont décrits dans le tableau 1 de l'article scientifique présenté après ce chapitre de résultats. Enfin pour réaliser ces expériences nous avons utilisé des cellules HeLa car elles n'exprimaient, que faiblement les ARNm candidats, dans nos conditions expérimentales. Ainsi nous souhaitons



nous affranchir d'une titration potentielle des miARN synthétiques par les ARNm endogènes cibles potentiels, risquant de masquer les effets possibles sur nos transcrits ARN chimériques (ORFluciférase-3'UTR d'intérêt).

Dans un premier temps, des cellules HeLa ont été transfectées par les vecteurs pCDNA3.1 exprimant les pré-miRNA d'intérêt. Des expériences de RT-qPCR réalisées à partir des ARN totaux de ces cellules transfectées ont été réalisées ce qui nous a permis de vérifier que dans nos conditions expérimentales les miARN matures d'intérêt étaient surexprimés.

Au cours de ces tests luciférase nous avons testé toutes les combinaisons miARN/ARNm candidats possibles, et le couple miR-27b/*MMP13* (Akhtar et al. 2010) nous a servi de contrôle positif dans ces expériences. Nos résultats ont montré que la surexpression de let7e et miR-188 ne provoquait aucune diminution, ni augmentation de la bioluminescence en présence des séquences des 3'UTR de *ANK*, *PC-1*, *Pit-1* et *TNAP*.

Cependant la mise en présence de miR-9 et des régions 3'UTR des ARNm *Pit-1* et *TNAP* entraînait la diminution de la bioluminescence observée d'environ 15%. Ces résultats semblaient surprenants en ce qui concerne le couple miR-9/*Pit-1* car les prédictions *in silico* n'indiquaient pas l'ARNm *Pit-1* comme cible potentielle de miR-9.

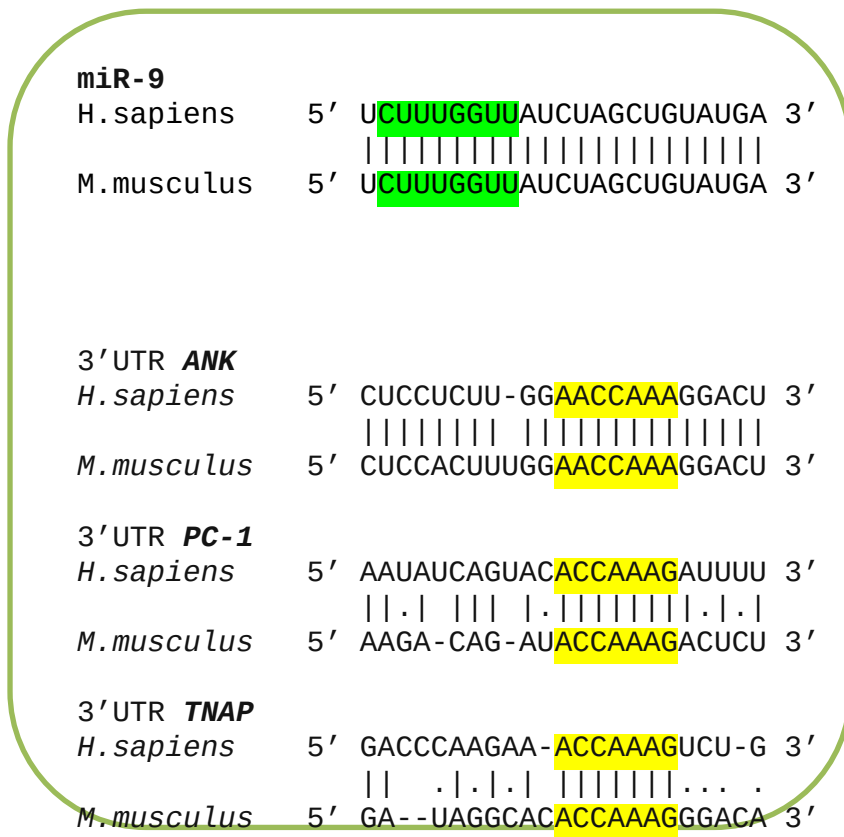
Toutes ces expériences ont donc permis de mettre en évidence le rôle de régulateur négatif de miR-9 sur les ARNm *Pit-1* et *TNAP*.

#### **IV. Surexpression transitoire de miR-9 en cellules ATDC5**

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de la surexpression de miR-9 dans les chondrocytes, nous avons utilisé le modèle de lignée chondrogénique murine ATDC5. Les séquences de hsa-miR-9 ainsi que les sites prédits, complémentaires de la région graine de miR-9, au sein des régions 3'UTR des ARNm candidats étant conservées de l'Homme à la souris, nous avons pu transfecter transitoirement des cellules ATDC5 par miR-9 (Figure 81). A partir des ARN totaux extraits de ces cellules, une expérience de RT-qPCR TaqMan a permis de valider la surexpression de miR-9 dans les cellules ATDC5. Les taux des ARNm *ANK*, *Pit-1*, *PC-1* et *TNAP* ont été quantifiés par RT-qPCR SYBR Green.

Les résultats ont montré que la surexpression transitoire de miR-9 confirme le rôle de régulateur négatif des ARNm *Pit-1* et *TNAP*, comme observé au cours des tests luciférase. De plus le taux de l'ARNm *PC-1* diminuait aussi dans ces conditions expérimentales, contrairement à l'ARNm *ANK* dont aucune variation n'a été observée.

Tous les résultats de l'étude sont détaillés dans l'article suivant.



**Figure 81 : Conservation des séquences de miR-9 et des sites prédits de l'Homme à la souris.**

Les séquences de miR- 9 chez l'Homme et la souris sont parfaitement conservées. De plus les séquences complémentaires de la région graine de miR-9 prédits au sein des régions 3'UTR des ARNm *ANK*, *PC-1* et *TNAP* sont aussi conservés chez l'Homme et la souris. La séquence de la région graine est surlignée en vert et les séquences complémentaires de la région graine sont surlignées en jaune.

# *Deuxième Article*





## Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes

T. Clement\*, V. Salone\*, B. Charpentier, J.-Y. Jouzeau and A. Bianchi\*\*

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, IMoPA: Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire, Vandœuvre-lès-Nancy, France

**Abstract.** Osteoarthritis (OA) is a whole-joint disease characterized by cartilage degradation and mineralization associated with chondrocyte phenotype changes, subchondral bone sclerosis and mild synovial inflammation. The extracellular levels of inorganic phosphate (ePi) and pyrophosphate (ePPi) are major regulators of the mineralization process but also play a role in the maintenance of the differentiated chondrocyte phenotype. Four membrane proteins control the balance between ePi and ePPi: the transporters ANK (exporting PPi outside the cells) and Pit-1 (importing ePi into the cells), and the enzymes PC-1 (generating ePPi from nucleotides) and Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP, hydrolyzing ePPi into ePi). In the present work, we investigated the ability of specific microRNAs (miR) to modulate activity and level of the mRNA coding for the regulatory proteins of the ePi/ePPi balance in chondrocytes. The 4 following microRNAs, let7e, miR-9, miR-188 and miR-219, were selected by bioinformatics for their ability to putatively target the mRNA 3'UTRs of these regulators. In IL-1 $\beta$ -stimulated human chondrocytes, chosen as a model of differentiated phenotype loss implicating the PPi transporter ANK, miR-9, miR-188 and let7e levels increased. However, luciferase reporter assays and transient miR overexpression in the ATDC5 chondrogenic cell line only support that miR-9 was a negative post-transcriptional regulator of PC-1, Pit-1 and TNAP mRNAs. This suggests that miR-9 could contribute to the acquirement of an altered chondrocyte phenotype by disrupting the ePi/ePPi balance.

**Keywords:** Cartilage, phosphate, mineralization, OA, miR-9, Pit-1, TNAP

### 1. Introduction and objectives of the study

Osteoarthritis (OA) is a whole-joint disease characterized by cartilage degradation and mineralization associated with chondrocyte phenotype changes, subchondral bone sclerosis and mild synovial inflammation. During OA, chondrocytes are unable to maintain the equilibrium between the synthesis of cartilage components and their enzymatic degradation (such as collagens and aggrecans), resulting in severe extracellular matrix loss in late OA [1]. Therefore, OA cartilage is characterized by a decreased expression of cartilage-specific genes and occurrence of biomarkers indicating a progressive loss of the differentiated chondrocyte phenotype (see review [2]).

Amongst other joints diseases, several microcrystalline arthropathies are mostly characterized by inflammation induced by the deposition of calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD), or basic calcium phosphate (BCP) crystals into the joint tissues [3]. Crystal deposition results from the disequilibrium be-

\*Equal contribution to this work.

\*\* Address for correspondence: A. Bianchi, Laboratoire IMoPA, Campus Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, CS50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 54 04; E-mail: arnaud.bianchi@univ-lorraine.fr.

tween the extracellular levels of inorganic phosphate (ePi), a promoter of mineralization, and inorganic pyrophosphate (ePPi), an inhibitor of the mineralization process [4]. Numerous membrane proteins regulate the balance between ePi and ePPi. Thus ePPi level is controlled by three ectoenzymes: plasma-cell-membrane glycoprotein 1 (PC-1) [5], which hydrolyses nucleotides triphosphate into PPi, the transporter ankylosis (ANK) [6], which exports PPi through the cell membrane, and the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP or ALP) [7], which hydrolyses PPi into 2Pi. The ePi level is controlled both by its production by TNAP in the extracellular medium and by its cellular uptake by the Pi transporter Pit-1 [8]. Very interestingly, in addition to be a major regulator of the mineralization process, ePPi was shown recently to contribute to the maintenance of the differentiated chondrocyte phenotype [9]. Therefore, the ePi/ePPi balance may link abnormal cartilage mineralization to chondrocyte phenotype changes during OA.

MicroRNAs (miRNAs) are small (20- to 22-nt) endogenous noncoding RNAs. The study on miRNAs has exploded in the last decade and today their biogenesis is well understood [10]. They are most frequently produced from long precursors (pre-miRNAs) by successive cleavages by two RNase III-like enzymes. First, Drosha produces ~70-nucleotides pre-miRNA hairpin precursors in nuclei [11]. Then, these hairpins are exported into the cytosol by exportin 5 [12] where pre-miRNAs are converted into miRNA/miRNA\* duplexes by cleavage of the apical loop by Dicer. The duplexes are then charged by the RNA-induced Silencing Complex (RISC) [13], guiding the association of one of either strand with their partner sequences in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of targeted messenger RNAs (mRNAs). As a consequence, either translation of the targeted mRNA is repressed or it is degraded (see review [14]).

Recent studies showed that some miRNAs expression profiles vary during OA (see review [15]). The search for reliable biomarkers and potential therapeutic targets, such as miRNAs, to improve OA diagnosis, prognosis and evaluate efficacy of therapeutic options is underway. Moreover, the discovery of miRNAs contributing to the regulation of the chondrocyte phenotype is an important issue, both for cartilage engineering and for understanding the pathological process of OA [16].

The present preliminary study aimed to identify miRNA targeting regulatory genes of ePi/ePPi metabolism in human chondrocytes that could be associated with chondrocyte phenotype changes, such as loss of the differentiated articular phenotype.

## 2. Methods

### 2.1. MicroRNA target site predictions algorithms

The miRNA target site predictions were performed using TargetScan v6.2 (<http://www.targetscan.org>).

### 2.2. Isolation and culture of human chondrocytes and murine ATDC5

Briefly, human articular cartilage samples were obtained from the knee joints of OA patients undergoing total knee replacement surgery (with permission from the local ethics committee). Cartilage samples were collected from the joint areas with a normal macroscopic aspect (i.e., no major change in color and no fibrillation). Cells were obtained by sequential digestion with pronase and collagenase, then washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and cultured to confluence in 75-cm<sup>2</sup> flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> as previously described [17]. Human chondrocytes were cultured in DMEM/Ham's F12 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (50 units/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin) (Life Technologies). Cells were seeded in

monolayer until confluence, then trypsinized and used immediately in order to prevent dedifferentiation induced by repeated subculturing [18].

ATDC5 cells were supplied by the ECACC Cell Bank (Sigma). Undifferentiated cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in T25 flasks filled with DMEM/F12 medium supplemented with 10 µg/ml human transferrin (Sigma), 3 × 10<sup>-8</sup> M sodium selenite (Sigma), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.5 µg/ml amphotericin B and 5% fetal bovine serum (Life Technologies). After reaching 70% of confluence, monolayers were trypsinized and cells were passaged in 12-well plates at a density of 2 × 10<sup>4</sup> cells/well before chondrogenic differentiation by insulin supplementation according to [19].

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

To quantify mRNA expression of target genes, RT-qPCR analyses were performed as previously described [20]. The mRNA level of each gene of interest and of the ribosomal protein RPS 29, chosen as a housekeeping gene in chondrocyte [17], was determined in triplicates. Quantifications of gene expression were performed using standard curves of purified PCR products with concentrations ranging from 10<sup>-3</sup> to 10<sup>-9</sup> ng/ml. Results were expressed as the ratio between the mRNA levels of the gene of interest over the RPS 29 gene.

Real-time quantitative PCRs for the miRNAs let7e, miR-9, 188 and 219 were performed using TaqMan<sup>TM</sup> MicroRNA assays (Applied Biosystems), according to the manufacturer's protocols. Each experiment was performed in triplicate. Quantification of miRNA levels was determined by the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method using the snRNA U6 as endogenous control [21].

### 2.4. Constructs for microRNA-let7e, -9, -188 and -219 expression and Luciferase reporter assays

The pcDNA3.1-pre-let7e, pcDNA3.1-pre-miR-9, pcDNA3.1-pre-miR-188 and pcDNA3.1-pre-miR-219 plasmids were used to express let7e, miR-9, miR-188 and miR-219 respectively from their human precursors, hsa-pre-let7e (79 pb sequence, referred as MI0000066 in miRBase v20), hsa-pre-miR-9-3 (90 pb sequence, referred as MI0000468 in miRBase v20), hsa-pre-miR-188 (86 pb sequence, referred as MI0000484 in miRBase v20) and hsa-pre-miR-219-2 (97 pb sequence, referred as MI0000740 in miRBase v20). The hsa-pre-miR-9-3, 188, 219-2 and let7e DNA sequences were amplified from HeLa cell genomic DNA using the primer pairs described in Table 1. Amplified DNAs were purified and digested for one hour at 37°C with *Kpn*I and *Bam*HI restriction endonucleases (Thermo Scientific) in the Tango buffer 1X. Digested DNAs were gel-purified and inserted in the pcDNA 3.1 vector (Life Technologies) linearized by *Kpn*I and *Bam*HI.

The pGL3-Luc::TNAP plasmid was built by cloning the human TNAP mRNA 3'-UTR into the pGL3 Luciferase Reporter Vector (Promega). In the same manner, the pGL3-Luc::Pit-1, pGL3-Luc::ANK and pGL3-Luc::PCI plasmids were built by cloning the human Pit-1, ANK or PCI mRNA 3'-UTR into the pGL3 Luciferase Reporter Vector. The 3'-UTRs were amplified from HeLa cell genomic DNA using the corresponding primer pairs described in Table 1. Amplified DNA fragments were purified using the GeneJet gel extraction kit (Thermo Scientific), and digested overnight at 37°C with *Xba*I restriction endonuclease (Thermo Scientific) in the Tango buffer 10X. Digested DNA fragments were gel purified and ligated into the *Xba*I-digested pGL3 vector to generate pGL3-Luc::TNAP and pGL3-Luc::Pit-1 plasmid (reporter plasmid).



S6 T. Clement et al. / Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/Ppi balance in chondrocytes

Table 1  
Primer sequences

| Amplified sequences | Primer direction | Primer sequences                      |
|---------------------|------------------|---------------------------------------|
| pre-let7e           | Forward          | GACGGTACCCCGGGCTGAGGTA                |
|                     | Reverse          | GACGGATCCCCTGGGAAAGCTAGGA             |
| pre-miR-9           | Forward          | GACGGTACCGGAGGCCGTTTCTC               |
|                     | Reverse          | GACGGATCCTGAGAATCATTCTACTTTCGG        |
| pre-miR-9-mutant    | Forward          | AAGGGGACCCCAAGAATGGTTTCTCTGCCGCCACCTC |
|                     | Reverse          | GAGGTGGGCGGCAGAGAAACCAATCTTGGGTCCCCTT |
| pre-miR-27b         | Forward          | GACGGTACCACCTCTCTAACAAGGTGC           |
|                     | Reverse          | GACGGATCCCACCTTCTCTCAGGTG             |
| pre-miR-188         | Forward          | GACGGTACCTGCTCCCTCTCTCACAT            |
|                     | Reverse          | GACGGATCCGGCTCGCCATCCT                |
| pre-miR-219         | Forward          | GACGGTACCACTCAGGGGCTTCGC              |
|                     | Reverse          | GACGGATCCCCCGGAGCTCAG                 |
| ANK 3'-UTR          | Forward          | GACTCTAGAGGCACGGGACGCCAT              |
|                     | Reverse          | TAGTCTAGATTGTATGCCAAGTGTT             |
| PC-1 3'-UTR         | Forward          | GACTCTAGATATGTTTTATCCCC               |
|                     | Reverse          | TAGTCTAGATTCTGTACGTATGTTTATTT         |
| MMP13 3'-UTR        | Forward          | GACTCTAGATAACCGTATTGTTTCGCGTCA        |
|                     | Reverse          | TAGTCTAGACAGACCATGTGTCCCATTTG         |
| Pit-1 3'-UTR        | Forward          | GACTCTAGAAGCTGTTTGAGATTAAA            |
|                     | Reverse          | TAGTCTAGAAATTTCTAAAACTGTAGGC          |
| TNAP 3'-UTR         | Forward          | GACTCTAGAGGGCCAGGGCCCGG               |
|                     | Reverse          | TAGTCTAGATGTCTCGGAAATAT               |
| TNAP 3'-UTR mutant  | Forward          | GAGGCCCGTTTCTCTACCAAAGTATCTAGCTGTATGA |
|                     | Reverse          | TCATACAGCTAGATACTTTGGTAGAGAAACGGGCCTC |

Note: The sequences of the primers used in this study are described in this table.

The pGL3-Luc::TNAP-mutant and pcDNA3.1-pre-miR-9-mutant plasmids containing the miR-9 seed sequence in a reverse orientation was produced by PCR-directed mutagenesis using adequate primers (see Table 1).

The known interaction between miR-27b and MMP13-3'-UTR was used as positive control for the luciferase tests [22].

## 2.5. Transfection of HeLa cells for luciferase reporter assays

HeLa cells were co-transfected with 500 ng of either pGL3-Luc::Pit-1, pGL3-Luc::TNAP pGL3-Luc::ANK or pGL3-Luc::PC1 plasmid and 500 ng of either pcDNA3.1-pre-let7e, pcDNA3.1-pre-miR-9, pcDNA3.1-pre-miR-188 or empty pcDNA3.1, as well as 5 ng of the pRL plasmid encoding *Renilla* luciferase (Promega) using JetPEI® (Polyplus transfection™) in 12-well plates. The luciferase activity was measured 24 hours after transfection, using the Dual-Luciferase Reporter Assay System™ (Promega) and Xenius XL™ luminometer (Safas) equipped with double injectors. *Firefly* luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity. Each experiment was performed at least 5 times in triplicate.

## 2.6. Transient overexpression of miR-9 in ATDC5 cells

Undifferentiated ATDC5 cells were transfected with 500 ng of either empty pcDNA3.1 or pcDNA3.1-pre-miR-9 using EXGEN 500™ (Euromedex) in 12-well plates.

### 2.7. Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  S.D. ( $n = 3-15$ ). Comparisons were made by analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's *t post-hoc* test using the Statview<sup>TM</sup> 5.0 software (SAS Institute Inc). A value of *p* less than 0.05 was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. In silico miRNAs target site predictions

We used the TargetScan<sup>TM</sup> prediction algorithm to identify putative miRNAs that could regulate *PC-I*, *ANK*, *TNAP* and *Pit-1* genes. A panel of 4 miRNAs, namely let7e, miR-9, miR-188 and miR-219, was selected for its putative ability to target the 3'-UTRs of several mRNAs of interest (Table 2).

### 3.2. Expression of let7e, miR-9, miR-188 and miR-219 in a model of human chondrocyte phenotype loss

The loss of differentiated chondrocyte phenotype was induced by IL-1 $\beta$  challenge, as described elsewhere [23]. For that goal, chondrocytes from OA donors were stimulated for 48 h with 10 ng/ml of rhIL-1 $\beta$  (R&D Systems). The changes of phenotype biomarkers expression were checked by real-time PCR quantification of mRNA levels of collagen type 2 (Col2a1, chosen as a cartilage-specific biomarker of the phenotype) and membrane prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1, chosen as biomarker of inflammation). A decrease of Col2a1 mRNA level [24] and an increase in mPGES-1 mRNA level were observed [25], in good accordance with an altered chondrocyte phenotype (Fig. 1(a)). Using TaqMan RT-qPCR system, we observed a significant increase in let7e ( $X 8.6 \pm 1.2$ ), miR-9 ( $X 3.0 \pm 0.3$ ) and miR-188 ( $X 3.5 \pm 0.9$ ) levels, whereas no significant change was noted for miR-219 (Fig. 1(b)). These data indicated that let7e, miR-9 and miR-188 may be linked to the regulation of the chondrocyte phenotype. As miR-219 expression failed to be affected during chondrocyte phenotype loss, this miRNA was not further explored in the present study.

### 3.3. Functional targeting of human 3'-UTR mRNAs by selected miRNAs

The direct interaction between the seed sequences of our selected miRNAs candidates (let7e, miR-9 and miR-188) and putative target sequences in the 3'-UTRs of *ANK*, *PC-I*, *Pit-1* and *TNAP* mRNAs was investigated in HeLa cells reporter assays. This cell type was chosen due to its low endogenous levels of *ANK*, *PC-I*, *Pit-1* and *TNAP* (data not shown). All the possible combinations of miRNAs/mRNA

Table 2  
Localization of predicted miRNAs target sites

| miRNA target sites predictions |              |              |              |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| miR-9                          | miR-188      | miR-219      | let7e        |
| <i>PC-I</i>                    | <i>PC-I</i>  | <i>PC-I</i>  | <i>ANK</i>   |
| <i>ANK</i>                     | <i>ANK</i>   | <i>ANK</i>   | <i>Pit-1</i> |
| <i>TNAP</i>                    | <i>TNAP</i>  | <i>TNAP</i>  |              |
|                                | <i>Pit-1</i> | <i>Pit-1</i> |              |

Note: The target sites and their localization in the corresponding 3'UTR of miRNA of interest are indicated in this table.

S8 T. Clement et al. / Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/Pi balance in chondrocytes

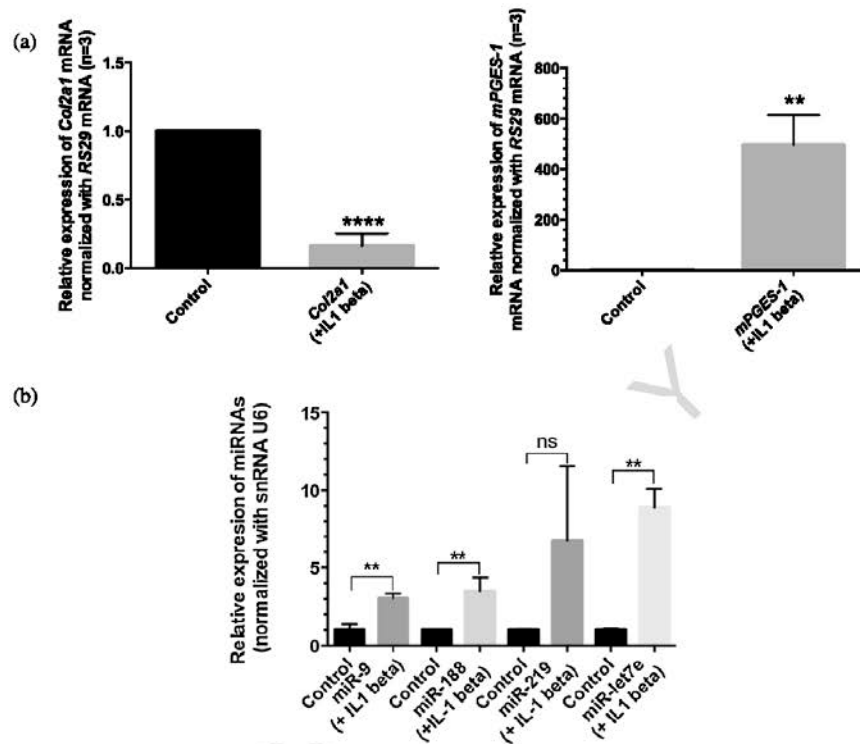


Fig. 1. Expression profiles of miRNAs of interest during chondrocyte IL-1 $\beta$  challenge. (a) The chondrocyte were challenged or not (control) with IL-1 $\beta$  during 48 h to induce the loss of differentiated phenotype. Phenotype lost has been verified by quantifying change in *Col2a1* and *mPGES-1* expression level. (b) Expression rates of miR-9, miR-188, miR-219 and let7e have been quantified by RT-qPCR TaqMan. miR-9, miR-188 and let7e expression levels were increased significantly, whereas no significant change was observed for miR-219 expression level. Bars show the mean  $\pm$  SEM results of 3 independent experiments, each of which being run in triplicate. ANOVA tests were performed (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ ; ns – not significant).

putative targets have been tested and the already published interaction between miR-27b and MMP13 3'-UTR [22] was used as a positive control.

Amongst the combinations studied, no significant reduction of luciferase activity was observed when 3'-UTR constructs for ANK, PC-1, Pit-1 or TNAP were expressed in the presence of let7e or miR-188 (data not shown). In contrast, in cells overexpressing miR-9, a 15% decrease of the luciferase activity was obtained for the chimeric constructs containing *TNAP* or *Pit-1* 3'-UTR placed downstream of the Firefly luciferase reporter gene (Fig. 2(a)). Noteworthy, bioinformatics predicted a putative interaction between the seed sequence of miR-9 and a target sequence in the 3'-UTR of *TNAP* but not in the 3'-UTR of *Pit-1* (Table 2). The "positive control" combination showed a 40% decrease of MMP-13's 3'-UTR-dependent bioluminescence in the presence of miR-27b (Fig. 2(b)), suggesting a weak control of *TNAP* and *Pit-1* 3'-UTRs by miR-9. However, when HeLa cells were co-transfected with miR-9 and a pGL3-Luc plasmid,

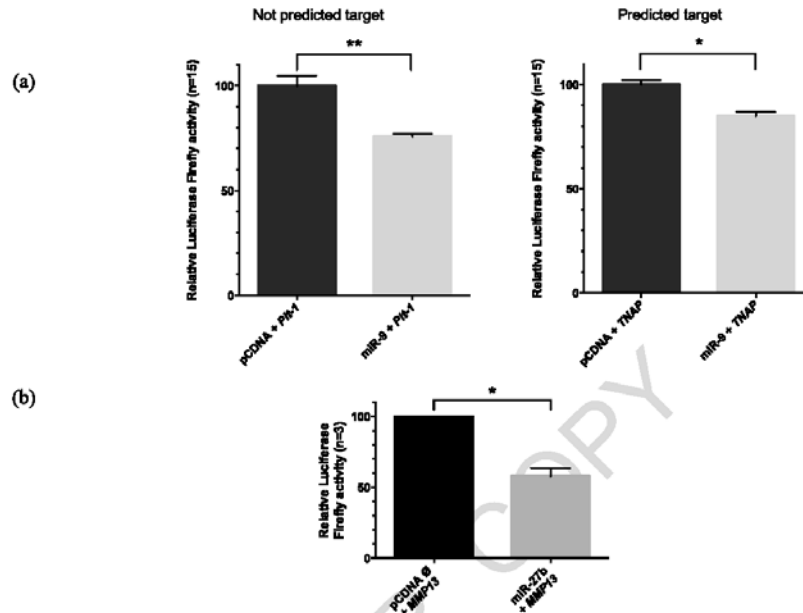


Fig. 2. Study of miR-9/*TNAP* mRNA interaction and miR-9/*Pit-1* mRNA interaction with luciferase reporter assay. (a) Luciferase activity in HeLa cells co-transfected either with pcDNA3.1::pre-miR-9 wild type or a negative control (pcDNA3.1-empty), and the internal control plasmid encoding Renilla luciferase (RLuc), and either pGL3-Luc::*Pit-1* or pGL3-Luc::*TNAP* are depicted. (b) Luciferase reporter assays with, miR-27b/*MMP13* mRNA pairs for which interaction was already identify [22] and used as a positive control interaction. (c) Schematic representation of the WT and mutated sequences of 3'-UTR regions of mRNA *TNAP* and miR-9. The putative target site of miR-9 in *TNAP* 3'-UTR sequence is indicated in bold. The sequence of seed region of miR-9 is indicated in bold and italic. The match between *TNAP* 3'-UTR region and miR-9 is showed and the mutation of the sequence of 3'-UTR region of *TNAP* abolished it. (d) Luciferase activity in HeLa cells co-transfected either with pcDNA3.1::pre-miR-9 wild type or mutant or a negative control (pcDNA3.1-empty), and the internal control plasmid encoding Renilla luciferase (RLuc), and either pGL3-Luc::*TNAP* or pGL3-Luc::*TNAP*-mutant are depicted. Data are shown as the relative luciferase activity, where activity measured in HeLa cells transfected with pcDNA3.1-empty is set as 100%. In all experiments, bars show the mean  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments, each being run in triplicate. ANOVA tests were performed (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns – not significant).

mutated in the expected target sequence of miR-9 within the *TNAP* 3'-UTR (Fig. 2(c)), no significant loss of luciferase activity was noted (Fig. 2(d)). Conversely, no significant loss of luciferase activity was also observed when HeLa cells were co-transfected with miR-9 carrying a mutated seed region (Fig. 2(c)) and pGL3 chimeric construct containing the wild-type *TNAP* 3'-UTR (Fig. 2(d)). Mutation of the miR-9 seed sequence targeting an unknown sequence of the 3'-UTR of *Pit-1* also reversed the decrease of the luciferase activity (data not shown). The inhibitory effect of miR-9 on *TNAP* (Fig. 3(b)) and *Pit-1* (Fig. 3(c)) 3'-UTR luciferase activity was not amplified when cells were co-transfected with let7e. Taken together, these data demonstrated that only miR-9 interacted directly with the 3'-UTR of the *TNAP* (predicted) and *Pit-1* (not predicted) mRNAs to act as a repressor.



S10 T. Clement et al. / Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/Pi balance in chondrocytes

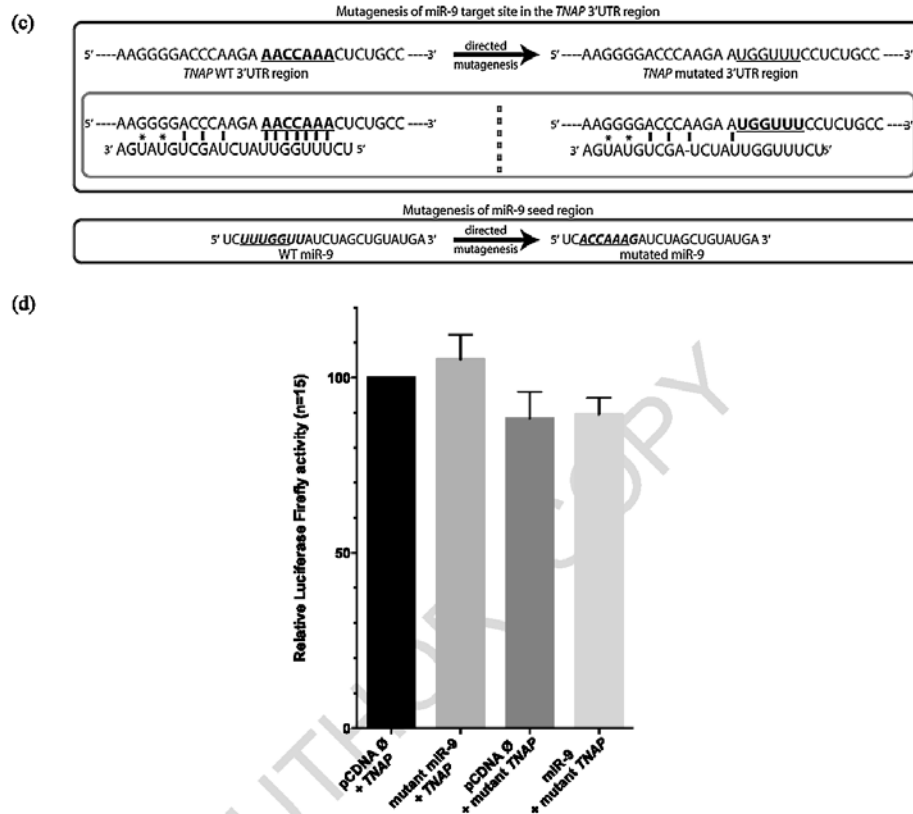


Fig. 2. (Continued).

### 3.4. Effect of miR-9 overexpression on *ANK*, *PC-1*, *Pit-1* and *TNAP* mRNA levels in ATDC5 chondrogenic cells

In order to check for functional consequences of any change of miR-9 level in joint cells, a transient miR-9 overexpression was performed in the murine ATDC5 chondrogenic cell line and mRNA levels of *ANK*, *PC-1*, *Pit-1* and *TNAP* were assessed by RT-qPCR. Of note, bioinformatics search confirmed that its putative target sequences in the 3'-UTR of *ANK*, *PC-1*, *Pit-1* and *TNAP* were conserved between mice and human.

As shown in Fig. 4(a), a 36-fold ( $X 36.3 \pm 3.7$ ) increase of miR-9 level was obtained 48 h after transfection. In ATDC5 cells, miR-9 overexpression significantly reduced *PC-1* (Fig. 4(c)), *Pit-1* (Fig. 4(d)) and *TNAP* (Fig. 4(e)) mRNA levels without affecting *ANK* (Fig. 4(b)) expression.

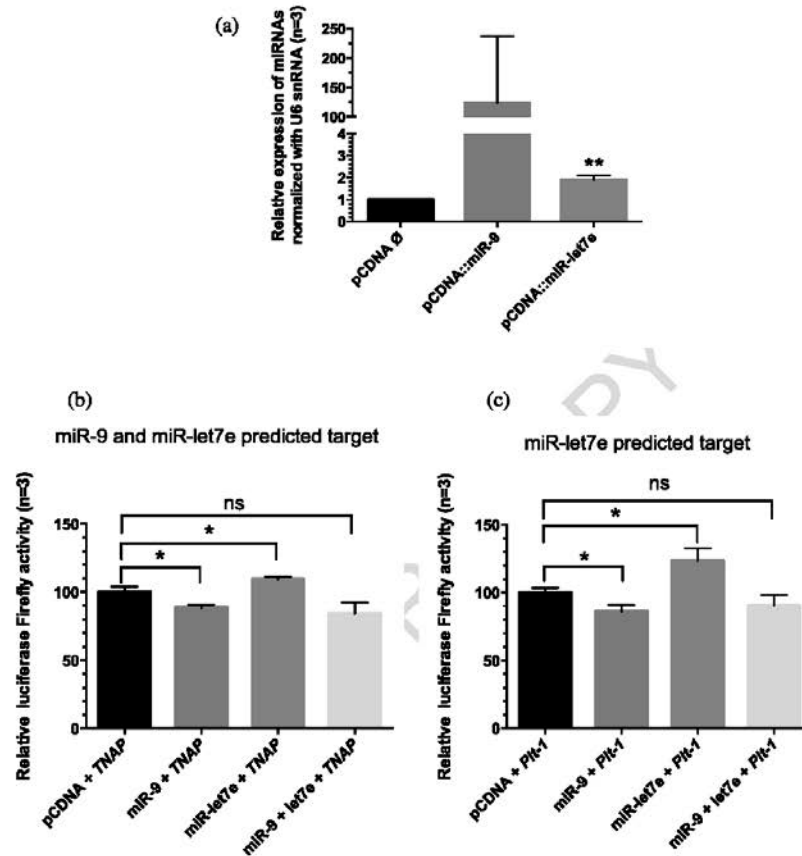


Fig. 3. Effect of let7e overexpression on the potency of miR-9 to modulate *TNAP* and *Pit-1* 3' UTRs luciferase activities. (a) Expression of miR-9 and let7e in HeLa cells transiently transfected with pCDNA3.1::pre-miR-9 or pCDNA3.1::pre-let7e or a negative control (pCDNA3.1-empty). miRNA levels were determined by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method using the snRNA U6 as invariant endogenous control. (b) Luciferase activity in HeLa cells co-transfected with pCDNA3.1::pre-miR-9 or pCDNA3.1::pre-let7e, alone or in combination, or a negative control (pCDNA3.1-empty) and pGL3-Luc::TNAP in the presence of a control plasmid encoding Renilla luciferase (Rluc). Data are expressed as the relative luciferase activity, where activity measured in cells transfected with pCDNA3.1-empty is set at 100%. In all experiments, bars show the mean  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments, each being run in triplicate. ANOVA tests were performed (\* $p < 0.05$ ; ns – not significant). (c) Luciferase activity in HeLa cells co-transfected with pCDNA3.1::pre-miR-9 or pCDNA3.1::pre-let7e, alone or in combination, or a negative control (pCDNA3.1-empty) and pGL3-Luc::Pit-1 in the presence of a control plasmid encoding Renilla luciferase (Rluc). Data are expressed as the relative luciferase activity, where activity measured in cells transfected with pCDNA3.1-empty is set at 100%. In all experiments, bars show the mean  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments, each being run in triplicate. ANOVA tests were performed (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; ns – not significant).

S12 T. Clement et al. / Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PiPi balance in chondrocytes

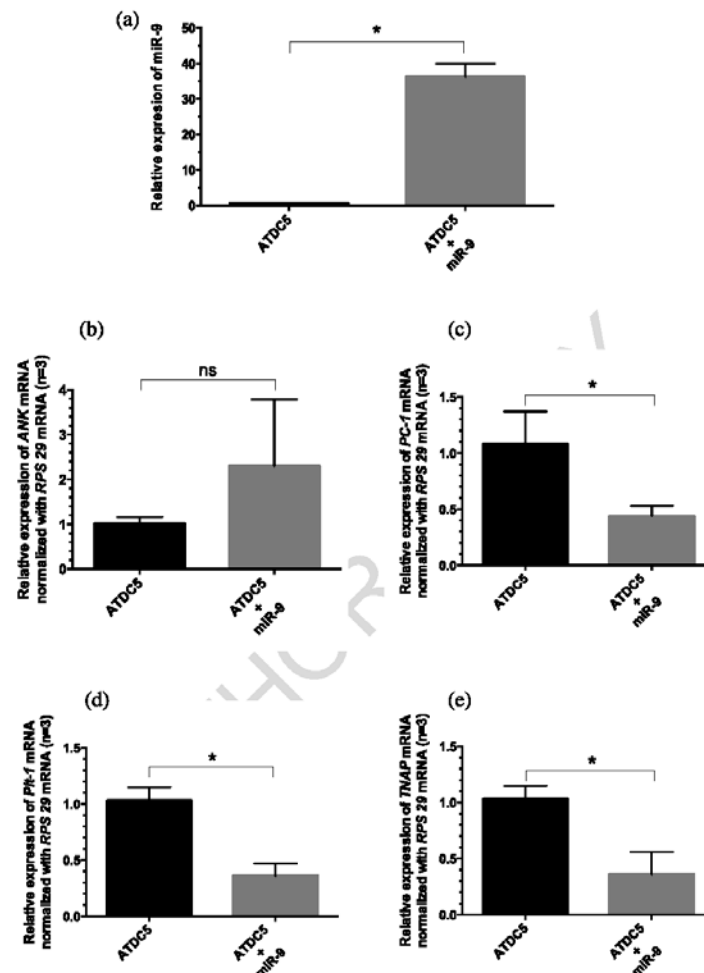


Fig. 4. Effect of a miR-9 overexpression on ePi/ePpi regulators in murine ATDC5 cell line. (a) miR-9, miR-188 and let7e expression in murine ATDC5 chondrocytes transiently transfected with pcDNA3.1-pre-miR-9, or a negative control (pcDNA3.1 empty). The miR-9 expression was determined by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method using the snRNA U6 as invariant endogenous control. (b, c, d, e) mRNA levels for ANK (b), PC-1 (c), Pit-1 (d) and TNAP (e) normalized on RPS29 gene determined by quantitative PCR in ATDC5 cells overexpressing miR-9. Bars show the mean  $\pm$  SEM results of 3 independent experiments, each of which being run in triplicate. ANOVA tests were performed (\*  $p < 0.05$ ; ns – not significant).

Altogether, these data support that miR-9 down-regulates the mRNA level of 3 major regulators of the PPi/Pi balance, namely *PC-I*, *Pit-I* and *TNAP*, via a direct or indirect interaction on their 3'-UTRs.

#### 4. Discussion and conclusions

OA is the major prevalent articular disease. This pathology occurs when chondrocyte undergoes phenotype changes resulting both from cartilage damages, local inflammation of synovium or subchondral bone modifications and is responsible for loss of extracellular matrix [1]. Indeed, depending on cartilage layer and disease severity, OA chondrocytes have been reported to display enhanced apoptosis, insufficient anabolic activity, increased production of matrix degrading enzymes and alteration of the chondrocytic phenotype [26]. A perfect knowledge of chondrocyte cellular pathways and genes regulations is essential to appreciate this pathology and identify reliable biomarkers and potential targets for new therapeutic options [2]. As recalled before, the ePi/ePPi balance is finely regulated by the *PC-I*, *ANK*, *TNAP* and *Pit-I* genes, and its control is crucial for crystal formation and mineralization but also for maintenance of the differentiated chondrocyte phenotype [9]. Since the demonstration that mice with a cartilage-specific deletion of the RNase Dicer displayed skeletal growth defects secondary to decreased chondrocyte proliferation and accelerated switch towards hypertrophy in the growth plate [27], miRNAs are likely to play a regulatory role on the chondrocyte phenotype. As several miRNAs were demonstrated to play a functional role in stem cells differentiation and OA chondrocytes [16], we hypothesized that miRNAs could be a regulatory link between the Pi/PPi balance and chondrocytes phenotype changes. For that goal, we developed a step by step strategy ranging from bioinformatics search for putative target sequences of miRNAs in the 3'-UTR of the four mRNAs of interest, to the control of mRNA levels in chondrogenic cells, through the functional screening of miRs in reporter assays.

Bioinformatics suggested that four miRs, namely let7e, miR-9, miR-188 and -219, were prone to target both ePi and ePPi regulatory genes. However, whereas miR-188 and miR-219 targeted all the genes in theory, miR-9 targeted the ePPi regulatory genes *ANK* and *PC-I* plus *TNAP*, and let7e only the transporters *ANK* and *Pit-I* genes. It is important to underline that, amongst them, only miR-9 was previously reported to be variably expressed in chondrocytes from OA patients [28,29] and let7e to have an increased expression in chondrocytes from non-OA patients dedifferentiated by a repeated subculture [30]. To our knowledge, neither changes in miR-188 nor in miR-219 have been associated with changes of the chondrocyte phenotype even in large profiling studies [30–33]. Although being a very useful initial step, this bioinformatics prediction of miR targets suffers from two main limitations. Firstly, as 2 of the 4 selected miRs were not previously reported in chondrocytes with an altered phenotype, one must verify if their expression really varies in an experimental model of differentiated chondrocyte phenotype loss. Secondly, as all prediction programs are based on the ability of the seven nucleotides miR seed sequence to form perfect or, most commonly, imperfect heteroduplexes with target sequences in the 3'-UTRs of target mRNAs, the number of predicted combinations is very high. As a consequence, their relevance has to be confirmed with miRNA target validation techniques, which led us to develop functional assays in which the target 3'-UTR sequences were linked to a luciferase reporter [34].

We first verified that all predicted miRs were really expressed in articular chondrocytes and investigated if their expression was affected in a model of differentiated phenotype loss induced by IL-1 $\beta$  challenge [23]. This model has some relevance to OA-related phenotypic changes since IL-1 down-regulates the expression of several cartilage-specific extracellular matrix genes, such as collagen type II and aggrecan [35]. In addition, IL-1 $\beta$  is a well-known inducer of inducible enzymes of the arachidonic acid cascade in chondrocytes [17,36], through mechanisms implicating activation of NF- $\kappa$ B [17]



or p38-MAPK [36] signaling pathways and a regulatory role of miR-199a [36]. We demonstrated, here for the first time, that let7e, miR-9 and miR-188 levels increased in chondrocytes in response to IL-1 $\beta$  challenge. Noteworthy, a significant down-regulation of miR-188 was reported previously in airway smooth muscle cells exposed to IL-1 $\beta$  [37], supporting a possible cell-specific variation of this miR in response to cytokine challenge. Taken together, these data suggest that the variation of miRs expression profile was rather related to chondrocyte phenotype changes than to inflammatory cell response.

Using luciferase reporter assays, we further tested the functional regulatory role of let7e, miR-9 and miR-188 on the 3'-UTRs of *ANK*, *PC-1*, *Pit-1* and *TNAP*. Experimental data showed that none of the predicted mRNA targeting was confirmed for let7e on *ANK* and *Pit-1* and for miR-188 on *ANK*, *PC-1*, *Pit-1* and *TNAP*. As mentioned before, these data highlight the poor predicting value of bioinformatics algorithms, all the more that miR-9 was found to down-regulate the non-predicted target *Pit-1* while leaving unaffected the predicted target *PC-1*. The inhibitory effect of miR-9 on *PC-1* and *TNAP* 3'-UTR luciferase activities was not potentiated by co-expression of let7e supporting that no miRNA:miRNA synergistic network occurred in our experimental conditions [38].

However, we also demonstrated that, as expected, miR-9 was a negative regulator of *TNAP* mRNA's 3'-UTR. As the reduction of activity remained moderate when compared to the miR-27b:MMP-13 control [22] in our luciferase assay, we checked for the specificity of miR-9 effect on *TNAP*. Interestingly, the inhibitory effect of miR-9 on *TNAP* 3'-UTR was suppressed when it was mutated in its seed sequence or when the target sequence in the 3'-UTR was mutated. These data demonstrated that the repressive effect of miR-9 on *TNAP* was direct and mainly supported by the predicted mRNA target sequence.

To investigate if the functional targeting of 3'-UTRs by miR-9 had relevance to changes in mRNAs expression, we next studied the impact of miR-9 overexpression on the mRNA levels of the 4 ePi/ePPi balance regulators in the chondrogenic ATDC5 cell line. Indeed, even if miRs have been discovered by their ability to regulate protein level by controlling mRNA translation, it is estimated that up to 80% of the changes in protein levels might be attributable to changes in mRNA expression [39]. We demonstrated that overexpression of miR-9 decreased the expression rates of *PC-1*, *Pit-1* and *TNAP* mRNAs by more than 50%, in good accordance with the RNA interference phenomenon. The decreased expression of *Pit-1* and *TNAP* mRNAs was expected since we found a negative regulatory role of miR-9 on their 3'-UTRs in the luciferase assay. The decrease of *PC-1* mRNA was more surprising since neither a predicted target sequence nor any reduction of luciferase activity were found in our preliminary experiments. This result suggests that miR-9 modifies *PC-1* mRNA level by an unknown mechanism that could include interference with the JNK signaling pathway [29]. Very interestingly, miR-9 has already been shown to control chondrocyte function. Thus, Jones and collaborators provided evidence that miR-9 decreased IL-1 $\beta$ -induced secretion of TNF $\alpha$  and MMP-13 by human chondrocytes [28]. As a consequence, the 4-fold increase of miR-9 expression they reported in OA cartilage could have a protective effect towards extracellular matrix degradation. More recently miR-9 was described as a negative regulator of protogenin (PRTG) in chondroblasts and chondrocytes [29]. PRTG plays a pivotal role in chondrogenesis during endochondral ossification and its increased levels in OA chondrocytes was shown to be associated with enhanced chondrocyte apoptosis. In contrast to Jones and collaborators, the authors reported a decreased expression of miR-9 in OA cartilage that correlated with the severity of the lesions. Therefore, even if its expression profile remains controversial in OA chondrocytes, any change of miR-9 level has a dramatic effect on chondrocyte environment or survival. Although further studies are required to assess the consequence of its overexpression on ePi or ePPi levels and on chondrocyte phenotype biomarkers, our preliminary data further support that miR-9 may play an important regulatory role in chondrocyte. From this point of view, the ongoing studies of its expression during differentiation

of ATDC5 cells towards hypertrophy and on the impact of its stable overexpression on this process will be very important.

### Acknowledgements

The authors thank the national French grant “Vieillessement ostéo-articulaire” from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM), the “Communauté Urbaine du Grand-Nancy” (CUGN), Nancy University Hospital (CHU), the FR3209, the CNRS and Lorraine University for their financial support. Thomas Clement was supported by a grant from CNRS and “Région Lorraine”.

### References

- [1] N.E. Lane, K. Brandt, G. Hawker, E. Peeva, E. Schreyer, W. Tsuji and M.C. Hochberg, OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis, *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **19** (2011), 478–482.
- [2] J.C. Rousseau and P. Garnero, Biological markers in osteoarthritis, *Bone* **51** (2012), 265–277.
- [3] H.-K. Ea and F. Lioté, Advances in understanding calcium-containing crystal disease, *Curr. Opin. Rheumatol.* **21** (2009), 150–157.
- [4] P.T. Cheng and K.P. Pritzker, Pyrophosphate, phosphate ion interaction: effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions, *J. Rheumatol.* **10** (1983), 769–777.
- [5] L.M. Ryan, R.L. Wortmann, B. Karas, M.P. Lynch and D.J. McCarty, Pyrophosphohydrolase activity and inorganic pyrophosphate content of cultured human skin fibroblasts. Elevated levels in some patients with calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease, *J. Clin. Invest.* **77** (1986), 1689–1693.
- [6] L.M. Ryan, The ank gene story, *Arthritis Res.* **3** (2001), 77–79.
- [7] Y. Xu, K.P. Pritzker and T.F. Cruz, Characterization of chondrocyte alkaline phosphatase as a potential mediator in the dissolution of calcium pyrophosphate dihydrate crystals, *J. Rheumatol.* **21** (1994), 912–919.
- [8] I.C. Forster, N. Hernandez, J. Biber and H. Murer, Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families, *Mol. Aspects Med.* **34** (2013), 386–395.
- [9] F. Cailotto, S. Sebillaud, P. Netter, J.-Y. Jouzeau and A. Bianchi, The inorganic pyrophosphate transporter ANK preserves the differentiated phenotype of articular chondrocyte, *J. Biol. Chem.* **285** (2010), 10572–10582.
- [10] V.N. Kim, J. Han and M.C. Siomi, Biogenesis of small RNAs in animals, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10** (2009), 126–139.
- [11] A.M. Denli, B.B. Tops, R.H. Plasterk, R.F. Ketting and G.J. Hannon, Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex, *Nature* **432** (2004), 231–235.
- [12] R. Yi, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes Dev.* **17** (2003), 3011–3016.
- [13] E. Elkayam, C.-D. Kuhn, A. Tocilj, A.D. Haase, E.M. Greene, G.J. Hamon, L. Joshua-Tor, The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a, *Cell* **150** (2012), 100–110.
- [14] A. Eulalio, E. Huntzinger and E. Izaurralde, Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing, *Cell* **132** (2008), 9–14.
- [15] S. Miyaki and H. Asahara, Macro view of microRNA function in osteoarthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.* **8** (2012), 543–552.
- [16] L.T.T. Le, T.E. Swingle and I.M. Clark, Review: The role of MicroRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis, *Arthritis Rheum.* **65** (2013), 1963–1974.
- [17] A. Bianchi, D. Moulin, S. Sebillaud, M. Koufany, M.-M. Galteau, P. Netter, B. Terlain and J.-Y. Jouzeau, Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, *Arthritis Res. Ther.* **7** (2005), R1325–R1337.
- [18] K.E. Kuettner, B.U. Pauli, G. Gall, V.A. Memoli and R.K. Schenk, Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology, *J. Cell Biol.* **93** (1982), 743–750.
- [19] C. Shukunami, K. Ishizeki, T. Atsumi, Y. Ohta, F. Suzuki and Y. Hiraki, Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **12** (1997), 1174–1188.
- [20] F. Cailotto, P. Reboul, S. Sebillaud, P. Netter, J.-Y. Jouzeau and A. Bianchi, Calcium input potentiates the transforming growth factor (TGF)-beta1-dependent signaling to promote the export of inorganic pyrophosphate by articular chondrocyte, *J. Biol. Chem.* **286** (2011), 19215–19228.



S16 T. Clement et al. / Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPI balance in chondrocytes

- [21] K.J. Livak and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* **25** (2001), 402–408.
- [22] N. Akhtar, Z. Rasheed, S. Ramamurthy, A.N. Anbazhagan, F.R. Voss and T.M. Haqqi, MicroRNA-27b regulates the expression of MMP-13 in human osteoarthritis chondrocytes, *Arthritis Rheum.* **62** (2010), 1361–1371.
- [23] J.-H. Ryu, S.-J. Kim, S.-H. Kim, C.-D. Oh, S.-G. Hwang, C.-H. Chun, S.-H. Oh, J.-K. Seong, T.-L. Huh and J.-S. Chun, Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin, *Dev. Camb. Engl.* **129** (2002), 5541–5550.
- [24] L. Tan, H. Peng, M. Osaki, B.K. Choy, P.E. Auron, L.J. Sandell and M.B. Goldring, Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), 17688–17700.
- [25] F. Kojima, H. Naraba, S. Miyamoto, M. Beppu, H. Aoki and S. Kawai, Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis, *Arthritis Res. Ther.* **6** (2004), R355–R365.
- [26] L.J. Sandell and T. Aigner, Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis, *Arthritis Res.* **3** (2001), 107–113.
- [27] T. Kobayashi, J. Lu, B.S. Cobb, S.J. Rodda, A.P. McMahon, E. Schipani, M. Merkenschlager and H.M. Kronenberg, Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (2008), 1949–1954.
- [28] S.W. Jones, G. Watkins, N. Le Good, S. Roberts, C.L. Murphy, S.M.V. Brockbank, M.R.C. Needham, S.J. Read and P. Newham, The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- $\alpha$  and MMP13, *Osteoarthritis Cartilage* **17** (2009), 464–472.
- [29] J. Song, D. Kim, C.-H. Chun and E.-J. Jin, MicroRNA-9 regulates survival of chondroblasts and cartilage integrity by targeting protogenin, *Cell Commun. Signal* **11** (2013), 66.
- [30] T.A. Karlsen, A. Shahdadfar and J.E. Brinckmann, Human primary articular chondrocytes, chondroblasts-like cells, and dedifferentiated chondrocytes: differences in gene, microRNA, and protein expression and phenotype, *Tissue Eng. Part C Methods* **17** (2011), 219–227.
- [31] D. Iliopoulos, K.N. Malizos, P. Oikonomou and A. Tsezou, Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks, *PLoS One* **3** (2008), e3740.
- [32] S. Díaz-Prado, C. Cicione, E. Muñoz-López, T. Hermida-Gómez, N. Oreiro, C. Fernández-López and F.J. Blanco, Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes, *BMC Musculoskelet. Disord.* **13** (2012), 144.
- [33] L. Lin, Q. Shen, C. Zhang, L. Chen and C. Yu, Assessment of the profiling microRNA expression of differentiated and dedifferentiated human adult articular chondrocytes, *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **29** (2011), 1578–1584.
- [34] E. Van Rooij, The art of MicroRNA research, *Circ. Res.* **108** (2011), 219–234.
- [35] J.R. Robbins, B. Thomas, L. Tan, B. Choy, J.L. Arbiser, F. Berenbaum and M.B. Goldring, Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta, *Arthritis Rheum.* **43** (2000), 2189–2201.
- [36] N. Akhtar and T.M. Haqqi, MicroRNA-199a\* regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes, *Ann. Rheum. Dis.* **71** (2012), 1073–1080.
- [37] A.R. Kuhn, K. Schlauch, R. Lao, A.J. Halayko, W.T. Gerthoffer and C.A. Singer, MicroRNA expression in human airway smooth muscle cells: role of miR-25 in regulation of airway smooth muscle phenotype, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42** (2010), 506–513.
- [38] J. Xu, C.-X. Li, Y.-S. Li, J.-Y. Lv, Y. Ma, T.-T. Shao, L.-D. Xu, Y.-Y. Wang, L. Du, Y.-P. Zhang, W. Jiang, C.-Q. Li, Y. Xiao and X. Li, MiRNA-miRNA synergistic network: construction via co-regulating functional modules and disease miRNA topological features, *Nucleic. Acids Res.* **39** (2011), 825–836.
- [39] H. Guo, N.T. Ingolia, J.S. Weissman and D.P. Bartel, Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels, *Nature* **466** (2010), 835–840.





## V. Résultats complémentaires : tests luciférase

### 1. Etude du couple miR-9/ARNm *Pit-1* :

Nous avons vu précédemment, de manière surprenante miR-9, dont la séquence cible n'était pas prédite pour cibler l'ARNm de *Pit-1*, entraînait la diminution du taux d'expression du gène *Pit-1*. Afin de conforter l'hypothèse d'une action directe de miR-9 sur l'ARNm *Pit-1*, les mêmes expériences de test luciférase que précédemment ont été réalisées en présence d'un variant de miR-9 (muté ponctuellement dans sa séquences « seed ») (Figure 82). Nous avons pu observer que la présence du miARN muté abolissait l'effet observé par miR-9 sauvage, à savoir la diminution de la bioluminescence était abolie en présence du variant de miR-9

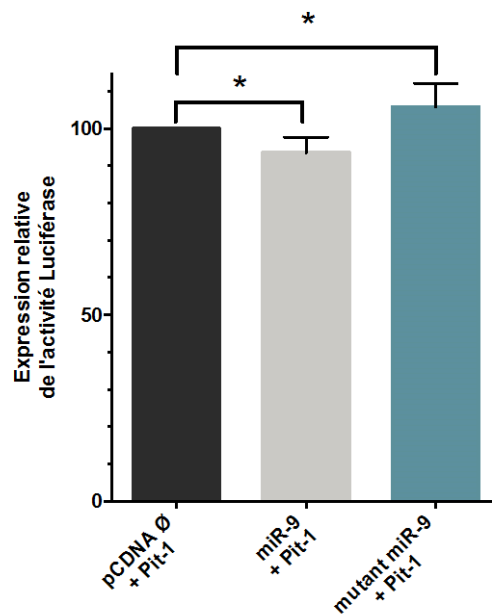
### 2. Poursuite de l'étude du couple miR-9/ARNm *Pit-1* :

Face aux effets de régulation négative modérée de miR-9 sur les ARNm *Pit-1* et *TNAP* nous avons souhaité tester l'effet synergique de miR-9 et de let7e (dont les scores de prédictions étaient supérieurs aux 3 autres miARN du panel initial) sur les 3'UTR *Pit-1* et *TNAP* (Figure 83A), mais aussi l'effet d'une exposition prolongée (48 heures) de miR-9 sur les 3'UTR de *Pit-1* et *TNAP* (Figure 83B). Les résultats de ces analyses montrent qu'aucun effet synergique entre miR-9 et let7e n'est observé, autrement dit, seul miR-9 est impliqué dans la régulation négative des ARNm *Pit-1* et *TNAP*. Aussi la prolongation de la mise en présence de miR-9 et des régions 3'UTR candidates ne permet pas d'amplifier le signal de régulation négative jusqu'alors observé dans les conditions initiales.

A.



B.



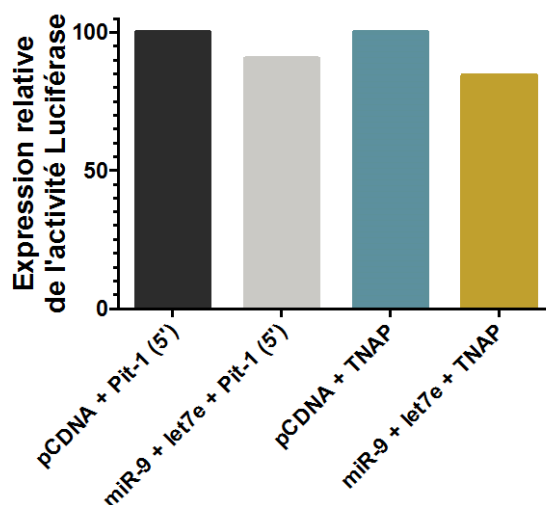
**Figure 82 : Validation des prédictions de cible miRNA/3'UTR, tests de variants par mutations ponctuelles.**

**A.** Les séquences de miR-9 WT (à gauche) et mutée (à droite) sont représentées.

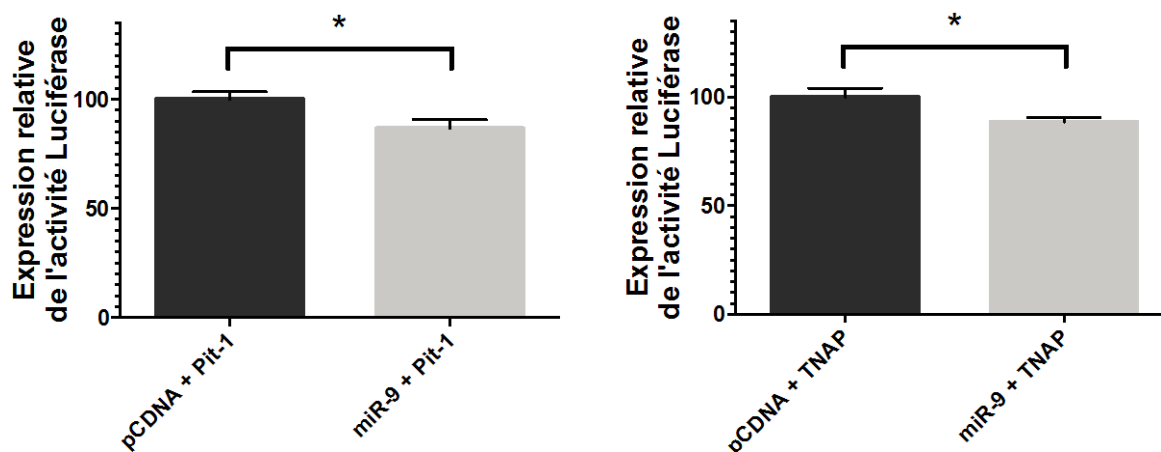
**B.** Des tests luciférase ont été réalisés en présence des variants ponctuels de la région graine de miR-9 (n=6). La construction miR-9 WT a servi de témoin positif d'interférence à l'ARN. On observe que le variant testé conduit à une activité luciférase Firefly comparable au témoin n'exprimant pas de miR-9 (pCDNA Ø). Ce variant abolit les effets d'interférence à l'ARN. miR-9 interagit avec la région 3'UTR de *Pit-1* et semble impliqué dans la régulation de l'expression de ces gènes. Les barres d'erreurs représentent la moyenne et l'écart type à la moyenne de 6 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois répliques techniques. Des tests ANOVA ont été réalisés (\* pour  $P < 0,05$  ; ns = non significatif).



A.



B.



**Figure 83 : Validation des prédictions de cible miRNA/3'UTR suite de l'étude.**

**A.** La synergie d'action d'interférence à l'ARN de miR-9 et let7e pour les régions 3'UTR de *Pit-1* et *TNAP* a été testée (n=1). On retrouve les 15% de diminution d'activité FireFly comme présenté dans l'article pour miR-9 seul. Les résultats ne montrent pas d'amplification de diminution supplémentaire de l'activité luciférase Firefly. Il n'y a aucune synergie d'action des deux miRNA étudiés.

**B.** Les mêmes tests luciférase étudiés précédemment ont été réalisés en prolongeant le temps de culture cellulaire à 48h (n=3). On retrouve une diminution de 15 de moyenne de l'activité luciférase Firefly en présence de miR-9. Aucune diminution de cette activité n'est observée lorsque l'exposition de miR-9 est prolongée. Les barres d'erreurs représentent la moyenne de et l'écart type à la moyenne de 3 expériences biologiques indépendantes, dont chacune est issue de trois répliques techniques. Des tests ANOVA ont été réalisés (\* pour  $P < 0,05$ ).

*Discussion  
Et  
Perspectives*





## Discussion

Il est de plus en plus évident que les miARN sont des régulateurs essentiels des tous les processus biologiques cellulaires. Leur découverte chez l'Homme au début des années 2000 a ouvert un champ d'investigation gigantesque. Dès lors de nombreuses équipes se sont attelées à l'étude de ce « phénomène de mode » scientifique, comme le démontre la banque de données miRBase qui aujourd'hui comptabilise 2578 séquences de miARN matures humains (v20, juin 2013) contre 1600 au début de ma thèse. C'est dans cet engouement qu'a démarré notre projet de recherche en 2009 mené par deux équipes de recherche aujourd'hui réunies au sein de l'unité de recherche IMoPA. Notre objectif principal était de déterminer le rôle de miARN dont l'expression variait au cours de la différenciation du chondrocyte et donc de miARN potentiellement impliqués dans la régulation du phénotype chondrocytaire.

A partir de nos modèles de différenciation du chondrocyte par repiquage ou d'induction à l'IL-1 $\beta$ , nous avons réalisé un criblage par micro-puces dédiées aux miARN et un panel de 43 miARN, dont les variations étaient remarquables, a été établi.

Une grande partie de mon travail a consisté en l'étude de l'expression des miARN codés par le cluster miR-23b~27b~24-1 humain. Ce cluster de gènes nous a intéressé de par les variations des taux des miARN matures correspondants, mais aussi par l'implication des miR-23b et -27b dans la régulation des gènes du chondrocyte au cours de l'arthrose d'autre part. De plus de récents cribles de profils d'expression de miARN corroborent l'implication potentielle de ces trois miARN dans la régulation du phénotype du chondrocyte. En effet, au cours de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocyte, ces trois miARN sont surexprimés (Shang, Liu, and Zhou 2013; McAlinden et al. 2013). Enfin notre attention s'est portée sur ce cluster de par son organisation génomique qui nous semblait singulière.

Nous souhaitons déterminer comment était régulée cette production différentielle des miARN miR-23b, -27b et -24-1. De plus le cluster d'intérêt était localisé dans une région qui était excisée au cours de la maturation de l'ARNm *C9orf3*. Forts de notre expérience en matière de



maturation des ARN nous avons envisagé l'étude de la maturation de l'extrémité 3' de *C9orf3*. La première piste concernant le mécanisme de maturation de cet ARNm a été la machinerie d'épissage. En 2009, à partir des séquences fournies par la banque de données NCBI nous n'avions pas repéré de sites consensus de reconnaissance de la machinerie d'épissage. Nous souhaitions alors savoir comment la maturation de l'extrémité de *C9orf3* était effectuée et s'il existait un lien entre cet événement de maturation et la production des miARN portés par cette séquence excisée.

Après 19 mois passés à étudier ce phénomène moléculaire, une mise à jour des banques de donnée NCBI a mis en évidence la présence de séquences consensus d'épissage aux bornes de l'intron portant le cluster de miARN étudié.

Au cours de ces mois de recherche notre démarche scientifique était tout à fait justifiée. Dans un premier temps, afin de connaître les séquences essentielles à ce phénomène de maturation encore inconnu, nous avons réalisé un minigène en clonant l'extrémité 3' du gène hôte *C9orf3* dans un vecteur d'expression pSplice Express. Ce vecteur est couramment utilisé pour l'analyse d'épissages alternatifs (S Kishore, Khanna, and Stamm 2008; Z. Zhang, Khanna, and Stamm 2012). L'étude de variants de délétion de séquences internes de la région portant le cluster de miARN a permis de montrer que seules les régions bordant cette séquence étaient indispensables pour la maturation du pré-ARNm *C9orf3*. De plus la mutation des nucléotides des extrémités 5' et 3' cette région entraînait la perte de ce phénomène de maturation. Nous en avons donc conclu que, comme lors d'une réaction d'épissage les séquences flanquant la région de *C9orf3* d'intérêt étaient essentielles pour son clivage.

D'une part, nous avons pu confirmer l'implication de l'épissage dans la maturation de notre séquence d'intérêt (ou intron 13). Nous avons pu écarter l'hypothèse d'un lien potentiel entre la machinerie de maturation de l'ARNm *C9orf3* et la machinerie de biogenèse des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1. En effet, l'épissage de l'intron 13 ne semble pas être essentiel pour la production des miARN du cluster d'intérêt. Ceci étant, des études récentes mettent en évidence un lien cinétique entre le clivage des précurseurs pri-miARN par le « microprocessor » et l'épissage de l'intron hébergeant les séquences codant les microARN (Flynt et al. 2010; Kataoka, Fujita, and Ohno 2009). La formation des pri-miARN précéderait l'épissage de l'intron tout en ralentissant la cinétique du spliceosome. Une question restait encore en suspens : l'épissage de l'intron 13 jouait-il un rôle dans la production différentielle des miARN et par quel mécanisme?



Mais avant de discuter de cela, revenons à mon étude de la production différentielle des miARN du cluster miR-23b~27b~24-1 humain. Les résultats des puces dédiées aux miARN montraient que les miR-23b, -27b et -24-1 étaient exprimés à des niveaux différents au cours de la perte du phénotype différencié du chondrocyte. Ainsi, le taux respectif des miR-23b et -27b diminuait tandis que celui de miR-24-1 ne variait pas. Ceci était étonnant car, de manière générale, il était admis que les miARN produits à partir d'un même cluster étaient co-produits à partir d'un seul et unique pri-miARN. Contrairement aux précurseurs pri-miARN humains ceux du cluster homologue murin avaient été caractérisés (Sun et al. 2009). Ainsi chez la souris plusieurs pri-miARN différents permettent l'expression des miARN du cluster. Cette particularité a éveillé notre intérêt et nous souhaitons savoir si le même phénomène était conservé chez l'Homme.

Plusieurs pistes de recherche ont été envisagées :

- A. une régulation de la transcription du gène *C9orf3* ou d'une transcription alternative,
- B. le rôle de la machinerie d'épissage,
- C. le rôle d'une protéine hnRNP K pour laquelle une séquence potentielle de fixation était retrouvée proche de la séquence codant miR-27b,
- D. ou encore le rôle d'un transcrit en antisens du gène codant miR-23b.

Dans un premier temps, nous avons validé par RT-qPCR TaqMan, que les miR-23b, -27b, et -24-1 étaient produits de manière différentielle dans plusieurs types cellulaires : cellules HeLa, ostéoblastes, myoblastes, fibroblastes et chondrocytes arthrosiques. Dans un deuxième temps nous avons confirmé ce profil d'expression dans un modèle de perte de phénotype chondrocytaire différencié induit par l'IL-1 $\beta$ . Les données obtenues par cette méthode reproduisaient bien la variation d'expression observées sur puces à ARN.

#### *Régulation transcriptionnelle de l'expression des miARN*

Afin de déterminer si ce changement de profil d'expression des miARN du cluster pouvait être lié à un changement d'expression du gène hôte, nous avons quantifié par RT-PCR en temps réel, l'expression du gène *C9orf3* dans notre modèle de perte induite du phénotype chondrocytaire mais aussi sur des échantillons d'ARN totaux provenant de 18 patients arthrosiques qui ont été comparés à des échantillons d'ARN totaux issus de chondrocytes de 5 patients non arthrosiques. Ces données ont montré que, tant au cours de la différenciation induite du chondrocyte que du processus physiopathologique arthrosique, l'expression de *C9orf3* ne variait pas. Ces résultats suggéraient donc que la régulation de la transcription du gène hôte n'était pas responsable de cette production différentielle de miARN. Une absence





d'implication du promoteur de l'ORF hôte dans la régulation de la production différentielle des miARN d'intérêt ne permettait cependant pas d'écarter l'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle. C'est pourquoi des tests de recherche de promoteurs alternatifs localisés en amont des gènes codant les miR-23b, 27b et 24-1 ont été réalisés. Nous avons choisi de réaliser ces expériences à partir de la séquence du minigène construit précédemment et recherché des promoteurs alternatifs dans la région couvrant 3000 paires de bases en amont du gène miR-23b. Aucun promoteur alternatif n'a été trouvé dans cette région de l'extrémité 3' de *C9orf3*. Ces résultats n'étaient pas en faveur d'une régulation transcriptionnelle bien que nous ne pouvions pas exclure catégoriquement la présence éventuelle de promoteurs alternatifs dans les séquences situées encore plus en amont dans le gène hôte. Cependant, cette éventualité semblant peu probable et au vu du temps imparti au travail de thèse, nous avons décidé de ne pas poursuivre la quête de ce promoteur potentiel dans les 360615 nucléotides que compte le gène *C9orf3*.

#### *Rôle de la machinerie d'épissage*

Nous avons poursuivi l'étude de la production différentielle des miARN d'intérêt en étudiant l'implication potentielle d'une régulation par l'épissage de l'intron 13 de *C9orf3*. Le transcrit issu du minigène pSpΔcluster pour lequel la séquence du cluster entier miR-23b~27b~24-1 est éliminée, ne permettait pas l'expression des miARN d'intérêt. On pouvait donc suggérer que la présence du cluster miR-23b~27b~24-1 n'est pas essentiel pour l'épissage de l'intron 13. A l'opposé, rien ne permettait d'exclure que des composants du spliceosome ou encore des facteurs d'épissage (protéines SR et hnRNP) n'influençaient pas la production des miARN (cf. Introduction Chapitre 1 B.VI.2., pour revue (Krol, Loedige, and Filipowicz 2010)). Au laboratoire, nous disposions d'une série de protéines SR et hnRNP recombinantes clonées dans le vecteur pXJ41. En surexprimant ces protéines par transfection de cellules HEK 293T, nous souhaitions analyser si cela pouvait conduire à des modifications des taux d'épissage de l'intron 13 mais aussi des taux de production des miR-23b, -27b et -24-1. Si tel était le cas, les études pouvaient être poursuivies par des expériences d'épissage *in vitro* du transcrit *C9orf3* portant le cluster miR-23b~27b~24-1 et observer l'effet d'un ajout des facteurs protéiques d'épissage, produits sous forme recombinante.

Ainsi dans cette perspective et parallèlement à ces expériences de surexpressions *in vivo*, j'ai mis au point des expériences d'épissages *in vitro* du pré-ARNm *C9orf3*. Ces expériences ont été réalisées à partir d'un ARN radiomarqué produit par transcription *in vitro* et incubé dans des extraits nucléaires ou cytoplasmiques préparés à partir de cellules HeLa. L'utilisation d'un



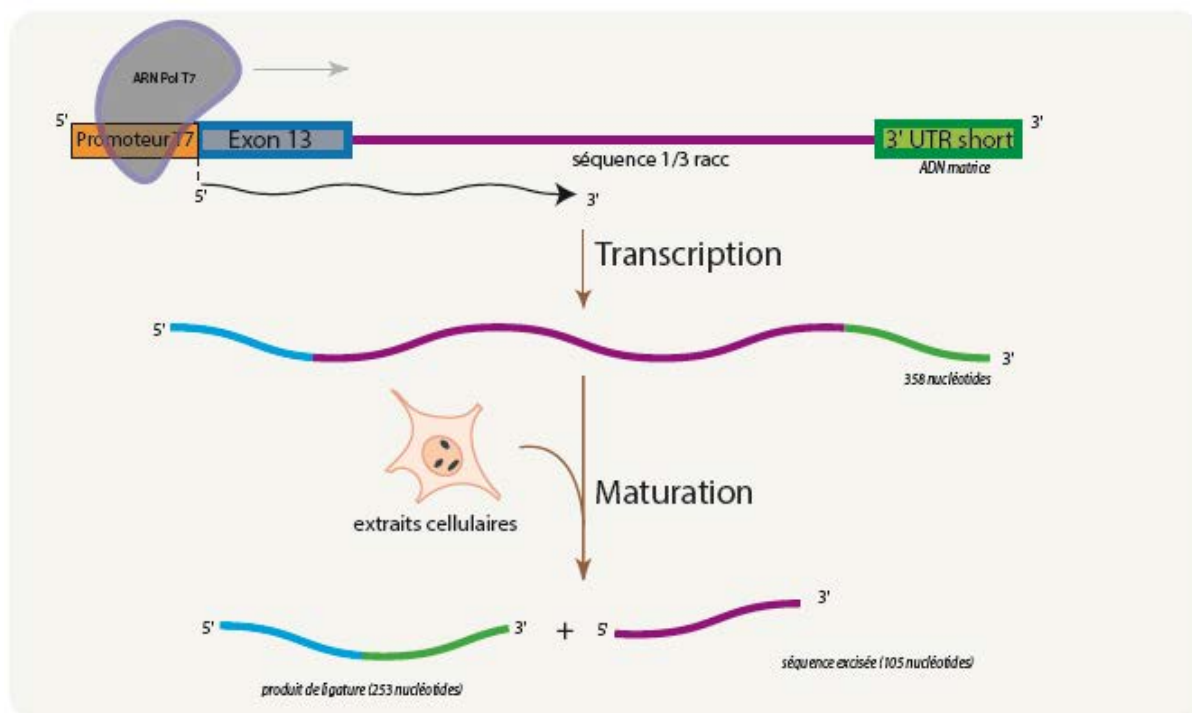
extrait nucléaire déplété en snARN U1, essentiel à l'assemblage du spliceosome servait de contrôle négatif de la réaction d'épissage (Figures 84 à 86). Ces résultats ont montré qu'en présence d'une machinerie d'épissage fonctionnelle, l'ARNm *C9orf3* pouvait être mûré *in vitro*. Ces résultats corroboraient nos premiers résultats à savoir que le cluster de gènes miR-23b, 27b et 24-1 est bien porté par l'intron 13 de *C9orf3* qui est épissé par le spliceosome.

L'étude de l'implication de la machinerie d'épissage a aussi été approchée par l'analyse de l'effet des surexpressions de facteurs protéiques d'épissage par la transfection de constructions génétiques surexprimant les différents facteurs d'épissage. Face à des résultats non reproductibles il ne nous a pas été possible de tirer de quelconques conclusions de ces analyses.

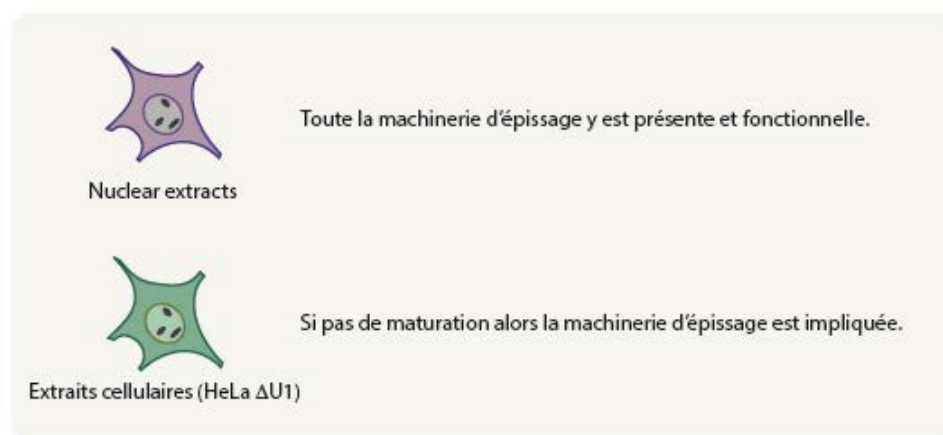
Au cours de ces expériences, nous souhaitions également comparer les taux d'épissages correspondant aux ratios pré-ARNm/ARNm, de cellules HEK et de cellules HEK transfectées par le minigène WT. Cependant la comparaison des résultats obtenus entre les cellules transfectées par le minigène et celles non transfectées, montre que les taux d'épissage et de production des miARN sont très différents. Des taux d'épissages équivalents entre les ARN exprimés à partir du chromosome et les ARN exprimés à partir du minigène, pouvaient être différents au niveau d'une amplitude de réponse plus grande dans le cas des ARN extraits des cellules exprimant le minigène. Ces résultats posent la question de la capacité du minigène à mimer les mécanismes participant à l'épissage et la production des miARN du gène *C9orf3* endogène. De plus, cette stratégie de surexpression des protéines de l'épissage reste complexe à analyser. En effet, d'un type de protéine testée à l'autre, mais aussi d'un essai à l'autre, les taux de transfection des vecteurs d'expression des protéines candidates peuvent énormément varier. De ce fait les taux de protéines d'intérêt produites par la cellule peuvent varier du tout au tout, et il devient alors très difficile de normaliser le nombre de cellules transfectées pour chaque test ou encore le taux de production d'une protéine donnée à partir du vecteur d'expression intégré dans la cellule. Une solution technique qui permettrait de normaliser le taux de transfection serait d'utiliser un vecteur d'expression des facteurs d'épissage exprimant également un gène rapporteur comme par exemple le gène de la luciférase Rénilla.

Au final l'analyse des résultats obtenus a été rendue difficile par un manque de reproductibilité. Etait-ce dû à cette stratégie de surexpression de protéines ? Le type cellulaire choisi était-il adéquat pour cette étude ? Devant ces incertitudes et au vu du temps imparti, nous avons également décidé de ne pas poursuivre plus avant cette piste de recherche.

A.



B.



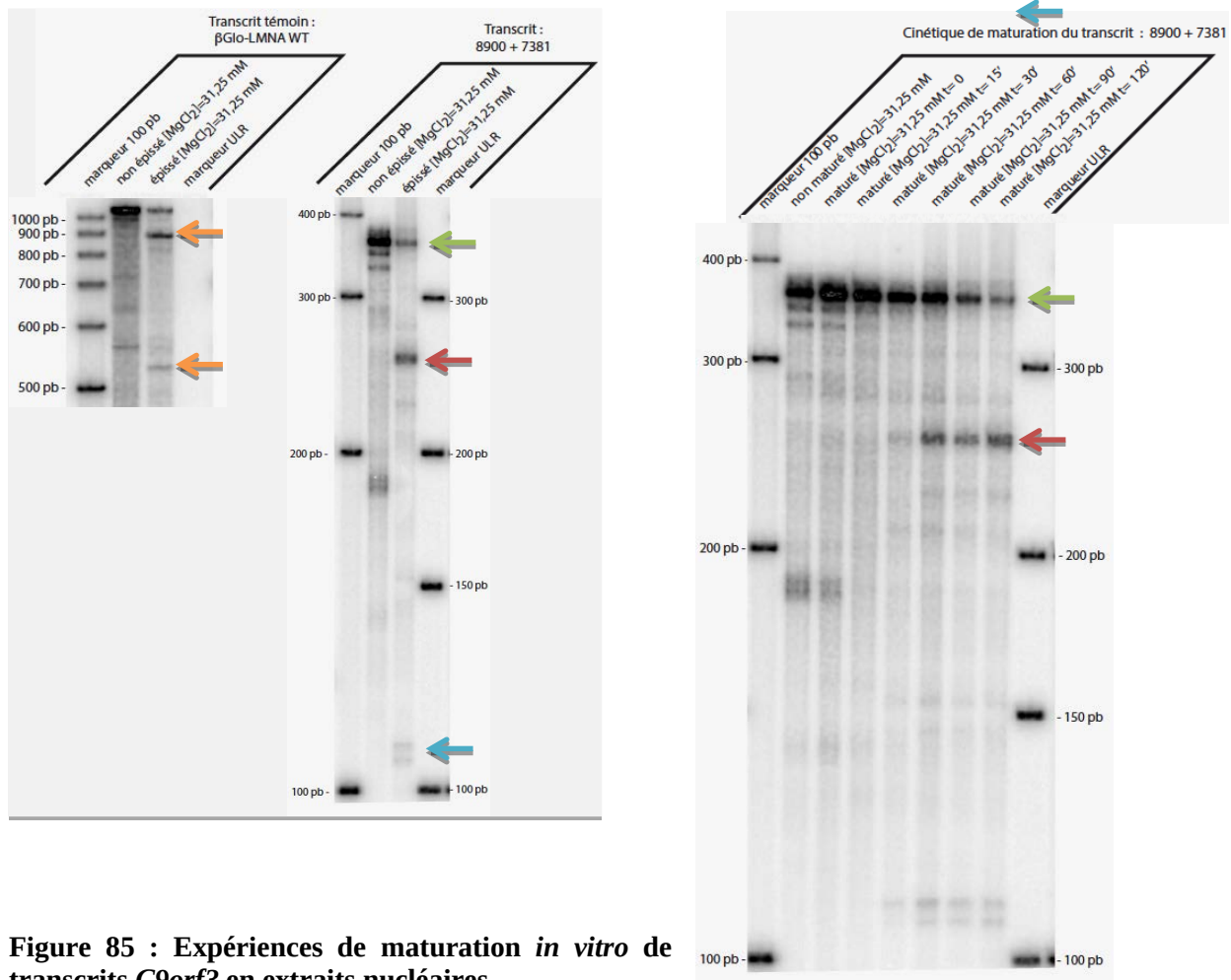
**Figure 84 : Stratégie pour l'étude de la maturation *in vitro* de l'ARNm C9orf3 et pour la recherche de la machinerie moléculaire impliquée.**

**A.** Le variant pSpseq1seq3 a été utilisé comme matrice pour synthétiser par PCR une matrice de transcription pour l'ARN polymérase du phage T7. Le ribonucléotide radiomarqué dUTP est incorporé au cours de la transcription *in vitro* de la matrice ADN. La maturation *in vitro* de ces transcrits est effectuée par les composants moléculaires d'extraits cellulaires commerciaux de cellules HeLa. Les produits de maturation sont analysés par autoradiographie.

**B.** La vérification de l'implication du spliceosome dans l'événement de maturation pourra être testée par emploi d'extraits cellulaires déficients pour un snRNA (ex : U1).

The diagram illustrates the process of joining overlapping sequencing reads. On the left, two reads (seq1 and seq3) overlap. seq1 (1 to 55 nt) and seq3 (540 to 590 nt) overlap in the 3' UTR (110 nt) region. The total length of the combined sequence is 358 nt. An arrow points to the right, showing the result: a single joined sequence of 253 nt (Exon 13 + 3' UTR) and a separate read of 105 nt (seq1 + seq3 overlap).

**C.**

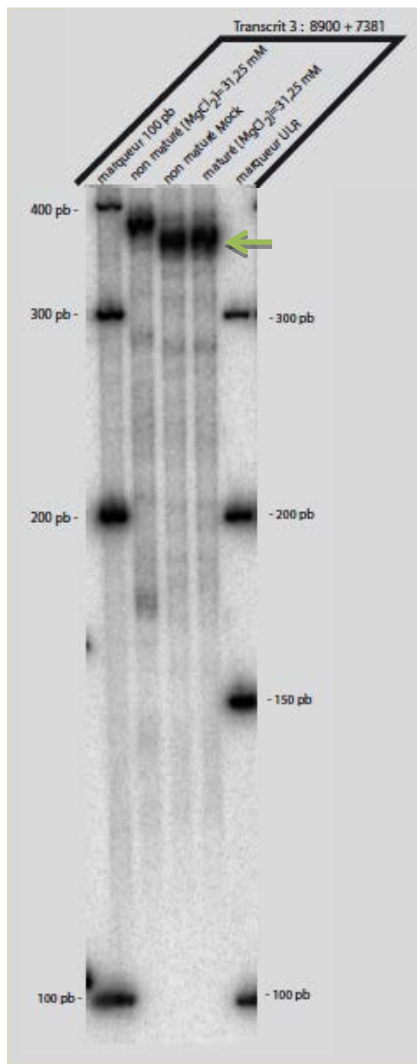


**A.** Représentation schématique du transcrit pré-ARN *C9orf3* testé (358 nt) et des produits ARN attendus après maturation (253 nt pour le produit de ligature entre l'exon13 et la région 3'UTR et 105 nt pour la séquence interne excisée). La réaction a été réalisée pendant 2 h à 30°C.

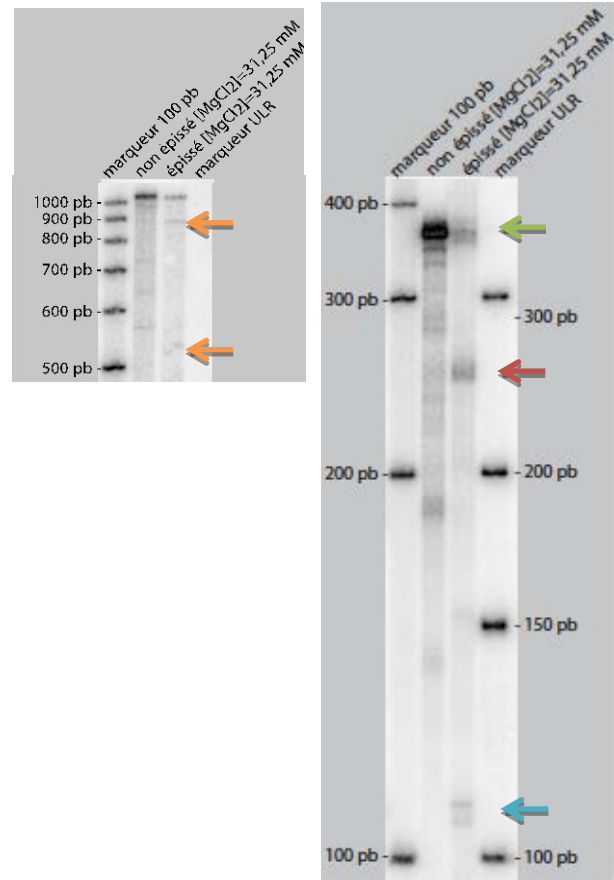
**B.** Le transcrit  $\beta$ globine-LMNA a été utilisé comme témoin positif d'épissage. Les extraits nucléaires utilisés permettent l'épissage de ce pré-ARNm contrôle (flèches oranges). Les mêmes extraits nucléaires ont été testés pour le pré-ARNm *C9orf3* (flèche verte) et permettent la maturation de ce pré-ARNm : le produit de ligature est fléché en rouge et la séquence excisée en bleu.

C. Une expérience de cinétique de maturation du pré-ARNm *C9orf3* a été effectuée. On observe l'apparition de produits de maturation après 30 minutes de réaction.

A.



B.



**Figure 86 : Rôle de l'épissage dans la maturation du pré-ARNm *C9orf3*.**

**A.** Expérience de maturation *in vitro* de transcrits *C9orf3*. Le pré-ARNm *C9orf3* a été incubé avec un extrait cellulaire dont la snRNP U1 a été déplétée. On ne détecte aucune maturation de l'ARN étudié. La réaction a été réalisée pendant 2 h à 30°C

**B.** Expérience de maturation *in vitro* de transcrits *C9orf3*. A gauche, le pré-ARNm témoin  $\beta$ globine-LMNA a été incubé dans des extraits cytoplasmiques pendant 2 h à 30°C. A droite, le pré-ARNm *C9orf3* a été incubé dans des extraits cytoplasmiques pendant 2 h à 30°C. On observe la maturation de ces deux ARN.



En revanche ces résultats peuvent être le point de départ d'une discussion concernant la caractérisation de la nature du ou des précurseurs pri-miARN potentiels exprimés à partir de *C9orf3* et permettant la synthèse des miR-23b, -27b et -24-1 humains. Ainsi ces miARN sont-ils produits à partir d'un précurseur pri-miARN unique ou au contraire à partir de plusieurs précurseurs distincts, comme il a été déjà démontré pour le cluster homologue murin (Sun et al. 2009) ? Au cours de mes travaux de thèse la détection de ce(s) précurseur(s) a été réalisée par RT-qPCR TaqMan. Pour ce faire, trois sondes ont été utilisées (cf. Figure 48), permettant de détecter des régions qui se chevaucheraient dans le cas d'un précurseur pri-miARN unique. L'observation des résultats de RT-qPCR (Figure 67 colonne de gauche), tend à conclure malgré des écarts-types importants issus de la variabilité de chacune de ces trois expériences, à une tendance de variation commune entre ces régions du pri-miARN détectées par les 3 sondes TaqMan utilisées. Ces premiers résultats pourraient alors nous laisser penser à l'existence d'un pri-miARN unique permettant la synthèse des trois miR-23b, -27b et -24-1 humains. Cependant les conditions expérimentales ayant permis d'obtenir des résultats préliminaires quant à la caractérisation de(s) précurseur(s) primaire(s) du cluster d'intérêt ne sont pas adéquates. En effet la surexpression des protéines de régulation de l'épissage ne sont conduit pas à des quantités physiologiques et pourraient biaiser le système. Des expériences supplémentaires consisteraient à détecter ce(s) précurseur(s) au sein d'extraits de cellules humaines cultivées sans surexpression de protéine de régulation de l'épissage.

#### *Régulation potentielle de l'expression de miR-27b par la protéine hnRNP K.*

L'hypothèse de l'implication de la protéine hnRNP K dans la régulation de miR-27b a été étudiée spécifiquement. En effet, des analyses de séquences sur le cluster de gènes de miARN d'intérêt par Véronique Salone, alors post-doctorante au laboratoire, avaient mis en évidence la présence de séquences identiques à la séquence consensus (UCCCUU) identifiée pour la fixation de cette protéine (Matunis, Michael, and Dreyfuss 1992; Swanson and Dreyfuss 1988). Par la réalisation d'une expérience de retard de migration sur gel, elle avait observé la fixation de la protéine hnRNP K sur un ARN transcrit *in vitro* mimant le pri-miARN de miR-27b. Nous souhaitons vérifier *in vivo* la capacité de la protéine hnRNP K à moduler l'expression du microARN miR-27b. En faisant chuter le taux intracellulaire de protéine hnRNP K par une stratégie d'ARNi, nous espérons ainsi faire varier le taux de production de miR-27b mature. En définitive nos résultats, évalués par PCR en temps réel, n'ont montré aucun changement significatif de production de miR-27b, dans nos conditions expérimentales. Un point important qui pourrait être discuté est le choix du type cellulaire utilisé. Dans notre



cas nous avons utilisé des cellules HeLa. Vient alors la question de la représentativité de l'effet de la protéine hnRNP K en cellules HeLa par rapport au contexte de la diminution du taux de miR-27b au cours de la différenciation du chondrocyte. En perspectives de ce travail des analyses identiques pourraient être effectuées dans les chondrocytes humains, qui cependant, n'autorisent pas des efficacités de transfection élevées.

#### *Implication potentielle d'un ARN antisens*

La dernière piste abordée dans l'étude de la production différentielle des miARN du cluster d'intérêt était la vérification de l'existence d'un transcrit antisens au gène codant miR-23b et si son existence était vérifiée, d'effectuer son étude fonctionnelle. Le rôle d'ARN antisens en tant que régulateur de l'expression des gènes a déjà été décrit auparavant (K. Li and Ramchandran 2010; Nishizawa et al. 2012). Dans notre cas, un transcrit antisens au locus d'intérêt (GI:12445821) est présent au sein de la banque EST de NCBI comme étant exprimé dans le placenta. Par des expériences de transcription inverse nous avons détecté la présence d'un ARN de type antisens au locus miR-23b dans les cellules HeLa et HEK. Nous avons tenté de caractériser les extrémités de ce transcrit par deux techniques de RACE PCR (Figures 76 et 77). Nous souhaitons de plus déterminer la structure chimique de ses extrémités afin de pouvoir identifier l'origine de ce transcrit. Il pouvait en effet s'agir d'un transcrit coiffé en 5' et polyadénylé en 3' exprimé à partir d'une unité transcriptionnelle interne à *C9orf3*, mais également d'un ARN ne portant plus ce type d'extrémités car issu d'un processus de maturation d'un précurseur, ce qui est légion pour la biogénèse des ARN régulateurs (pour revue (Houseley, LaCava, and Tollervey 2006)).

Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de déterminer clairement son origine. En effet les deux méthodes employées pour la caractérisation des extrémités ont conduit à l'identification de bornes différentes ce qui suggère que ce transcrit pourrait être un produit d'un événement de maturation d'un ARN de taille supérieure, avec une spécificité de coupure imprécise ou suivie de dégradations par une activité exonucléasique, générant une hétérogénéité dans la taille des extrémités. Enfin il reste encore trop d'incertitudes dans les résultats des expériences visant à la caractérisation de l'extrémité 3' de ce transcrit potentiel. Cela nous permet de douter de l'existence de sa polyadénylation et de la réelle possibilité qu'un transcrit ARN puisse être généré par l'ARN polymérase II à partir d'un brin ADN matrice en orientation antisens à la région codant miR-23b.

J'ai ensuite testé l'implication de cet ARN sur la production de miR-23b. Nous souhaitons vérifier si l'expression de cet ARN peut conduire à une corrélation inverse entre le taux





d'expression du miR-23b et l'ARN antisens, ce qui indiquerait un rôle de cet ARN antisens comme régulateur potentiel de l'expression du gène codant miR-23b. Le modèle de perte de phénotype du chondrocyte par induction à l'IL1- $\beta$  était adéquat pour réaliser cette expérience. Cependant, à la fois le taux de miR-23b et celui de l'ARN l'antisens diminuent en réponse au traitement à l'IL1- $\beta$ , rendant caduque notre hypothèse de départ sur le rôle de régulateur de l'ARN antisens.

Compte tenu que les données de caractérisation de ce transcrit antisens restent trop incertaines, nous pouvons remettre en cause la véracité de la séquence de ce transcrit présente dans la banque d'EST, jusqu'à l'existence même de ce transcrit antisens.

#### *Etude du rôle fonctionnel des miARN du cluster miR-23b~27b~ 24-1*

En parallèle de ces études la recherche de nouvelles cibles des miR-23b, 27b et 24-1 a été entreprise. Des prédictions de cible de ces miARN ont été réalisées *in silico*. Les meilleures prédictions de cibles potentielles liées à l'homéostasie du chondrocyte avaient été sélectionnées. Ainsi les algorithmes avaient prédits plusieurs cibles potentielles pour ces miARN : miR-27b  $\rightarrow$  *MMP13*, *ADAMTS6*, *MATN3* (une protéine impliquée dans la réticulation de la matrice) ; miR-23b  $\rightarrow$  *ADAMTS6*, *MATN3* ; miR-24-1  $\rightarrow$  *WNT3*.

Peu de temps après le début de nos recherches, la régulation de *MMP13* par miR-27b a été validée fonctionnellement par une autre équipe de recherche (Akhtar et al. 2010). Nous avons alors choisi d'utiliser le couple miR-27b/*MMP13* comme témoin positif dans nos tests de gène rapporteurs. Les autres prédictions ont été testées par des tests luciférase mais aucune cible n'a pu être validée (non montré dans ce manuscrit).

En marge de l'étude du cluster miR-23b~27b~24-1, j'ai pu participer à la réalisation de tests luciférase dans le cadre d'un projet de recherche soutenu par la FRM. Les travaux se sont focalisés sur l'étude du rôle de miR-29b, autre miARN du panel établi en début de projet. Ces travaux ont permis la rédaction d'un article en cours de soumission pour lequel je suis en 4<sup>ème</sup> auteur. « **MicroRNA-29b limits the expression of type II collagen in human osteoarthritic and dedifferentiated articular chondrocytes** », Salone et al.

De ces travaux découlent des perspectives d'approfondissement du rôle de miR-29b dans la régulation de l'expression du gène *Col3a1*. Comme nous l'avons abordé en introduction, les miARN peuvent entraîner soit la dégradation de l'ARNm cible soit inhiber sa traduction. Ainsi afin d'envisager le mode d'action de ce miARN nous pourrions proposer de quantifier le taux d'ARNm *Col3a1* au sein de nos échantillons d'ARN totaux issus du cartilage



d'échantillons de patients arthrosiques et non arthrosiques. L'utilisation des modèles de perte de phénotype chondrocytaire par induction à l'IL-1 $\beta$  ou repiquages cellulaires successifs pourraient aussi être employés. Ainsi nous pouvons imaginer que si nous observons une baisse du taux de protéine et un maintien ou une accumulation du taux d'ARNm *Col3a1* chez l'Homme alors ceci serait en accord avec nos résultats obtenus chez le modèle murin ATDC5 au cours de notre étude. Nous pourrions aussi étudier l'intégration ce phénomène d'ARNi dans le métabolisme global de la cellule. En effet des études précédentes décrites dans le chapitre 1 de mon introduction indiquent que miR-29b serait importé dans le noyau chez la cellule HeLa (H.-W. Hwang, Wentzel, and Mendell 2007). Nous pourrions alors envisager de vérifier si ce changement de localisation cellulaire pourrait être effectué dans le chondrocyte. En effet il serait très intéressant de prendre en compte ce phénomène dans la régulation globale de la chondrogenèse ou encore dans la perte de phénotype. Nous pourrions imaginer que miR-29b pourrait être séquestré dans le noyau afin d'empêcher l'inhibition de la traduction de l'ARNm *Col3a1*. Au contraire et en suivant cette conjecture, l'importation de miR-29b dans le noyau pourrait être bloquée au cours de la perte de phénotype du chondrocyte. Des expériences de Northern Blot à partir d'extraits nucléaires et cytoplasmiques de chondrocytes pourraient permettre d'étudier la localisation de miR-29b.

Aussi nos travaux sur la mise au point et la réalisation de tests basés sur le rapporteur luciférase permettant la validation des prédictions de cibles nous ont amené à rédiger un chapitre d'ouvrage de méthodologie qui paraîtra en 2014 dans une revue aux éditions Springer : « **Reporter gene luciferase assays to study miARN function** » Thomas Clément & Véronique Salone.

Enfin j'ai pu participer à un projet dirigé par Arnaud Bianchi et réalisé par Véronique Salone concernant la régulation des gènes codant les acteurs protéiques de la balance ePi/ePPi par les miARN, dans le cartilage et sa matrice extracellulaire. Il a été montré au laboratoire que cette balance notamment *via* l'activité du transporteur de pyrophosphate ANK, était essentielle pour le maintien du phénotype du chondrocyte. Ce projet ayant pour but de déterminer les miARN régulateurs des acteurs de la balance ePi/ePPi, s'intégrait parfaitement dans l'intitulé de ma thèse. En effet comme nous l'avons vu en introduction la dédifférenciation du chondrocyte causait un déséquilibre de la balance de phosphate dans le cartilage favorisant la formation de cristaux dans l'articulation de phosphates et au final l'apparition d'arthrose ou de maladies microcristallines.



Ces travaux ont débuté différemment des travaux précédents. En effet la démarche de prédictions de cibles de miARN était inversée. Pour l'étude du cluster miR-23b~27b~24-1 et miR-29b nous étions partis d'un panel de miARN candidats dont l'expression variait au cours de la différenciation du chondrocyte. Puis les prédictions d'ARNm cibles, dont l'expression était retrouvée dans le chondrocyte, étaient sélectionnées. Cette fois-ci nous avons recherché les miARN dont les régions « seed » pouvaient être complémentaires de sites potentiels présents au sein des régions 3'UTR des ARNm codant les protéines PC1, ANK, TNAP et Pit-1. Ces analyses de séquences ont permis d'établir un panel de 4 miARN candidats : miR-9, miR-188, miR-219 et let7e ; ces miARN étaient presque tous prédits comme régulateurs des quatre gènes codant les ARNm d'intérêt (miR-9 → *PC-1*, *ANK*, *TNAP* ; miR-188 et miR-219 → les 4 ARNm candidats ; let7e → *ANK* et *Pit-1*)

Dans un premier temps nous souhaitions connaître les profils d'expression de ces miARN candidats au cours de la différenciation du chondrocyte par induction à l'IL-1 $\beta$ . Ainsi des chondrocytes humains ont été induits à l'IL-1 $\beta$  pendant 48h et les marqueurs de la perte de phénotype chondrocytaires ont été mesurés par RT-qPCR. Ce traitement était efficace puisque la diminution du collagène de type 2 était observée. Nous avons observé que trois des miARN du panel étaient surexprimés de manière significative au cours de la perte de phénotype du chondrocyte : miR-9 (x3), miR-188 (x3,5), let7e (x8,6). La variation d'expression de miR-219 n'était pas significative. Nous avons écarté le miR-219 de notre étude. En outre ceci indiquait alors une possible implication des miR-9, miR-188 et let7e dans la régulation de la différenciation/différenciation du chondrocyte.

De plus, des tests luciférase ont été réalisés en cellules HeLa et ont permis de tester toutes les combinaisons miARN candidat/ARNm cibles dont nous disposions. Ainsi nous avons pu valider que miR-9 était impliqué dans la régulation des acteurs de la balance ePi/ePPi, à savoir le transporteur de Pi, Pit-1 et la pyrophosphatase, TNAP.

Lorsqu'on analyse ces résultats on peut être surpris du faible effet d'environ 15% de miR-9 envers ces ARN cibles. Afin de s'assurer que cette diminution n'était pas artéfactuelle, nous avons d'une part répété un très grand nombre de fois cette expérience (n=15) afin d'accroître la robustesse des statistiques calculées. Bien que les tests luciférase réalisés avec let7e n'aient pas été concluants, les forts scores de prédiction de cible de ce miARN au sein des régions 3'UTR des ARNm étudiés, faisaient que let7e entretenait notre intérêt. Ainsi, nous avons réalisé des tests de synergie des miR-9 et let7e mais aussi nous avons allongé le temps de culture des cellules dans l'optique d'augmenter l'effet d'ARNi observé précédemment. Ces



expériences n'ont pas permis d'accroître les effets déjà significatifs sur les taux d'expression de ARNm cibles *Pit-1* et *TNAP*. On pourrait aussi émettre l'hypothèse que le modèle cellulaire utilisé pour ces expériences ne soit pas tout à fait adéquat pour réaliser des tests rapporteur luciférase des miARN candidats. C'est pourquoi en contrôle nous avons quantifié au sein des cellules HeLa les taux de surexpression de miR-9. La surexpression de miR-9 était augmentée significativement.

Les séquences des couples miARN/ARNm étudiés étant conservés chez la souris nous pouvions utiliser le modèle cellulaire murin de différenciation terminale ATDC5. Nous avons réalisé des cultures cellulaires transfectées transitoirement par les miARN candidats, pendant 48h. Cette expérience a été réalisée à des fins d'étude des effets des surexpressions des miARN candidats sur les taux d'expression de leurs cibles potentielles au cours de la différenciation du chondrocyte. Ces résultats indiquaient principalement que la surexpression de miR-9 entraînait la diminution des ARNm *Pit-1* et *TNAP* de manière significative. Ces profils d'expressions étaient encourageant car ils étaient tout à fait compatibles avec l'hypothèse d'ARN interférence de ces miARN envers leurs ARNm cibles potentiels. De plus ces expériences ont permis de mettre en évidence l'implication potentielle de miR-9 en tant que régulateur de l'expression du gène codant PC-1.

En conclusion, nous avons validé de manière remarquable le couple miR-9/*Pit-1* bien que cet ARNm cible n'était pas prédit pour miR-9. Ceci pourrait être expliqué par la présence de sites complémentaires de la région « seed » dont le score de prédiction était trop faible pour être signalé par les algorithmes de prédictions de cible de miARN.

Le fait que miR-9 n'ait qu'un effet répresseur modeste sur le taux d'expression du gène *Pit-1* pourrait de plus être expliqué par un rôle indirect du miARN en question. En effet miR-9 pourrait réprimer un facteur de transcription régulant l'expression du gène codant *Pit-1*. Selon cette hypothèse le fait de réprimer un tel facteur induisant la répression du gène *Pit-1* nous conduirait à penser qu'il s'agirait d'un activateur transcriptionnel. Ainsi une augmentation de miR-9 mature dans la cellule régulerait négativement l'expression de ce potentiel activateur transcriptionnel, diminuant alors le taux d'expression du gène *Pit-1*.

Aussi miR-9 pourrait interférer par un mécanisme indirect avec l'expression de sa cible par une voie de régulation post-transcriptionnelle. miR-9 pourrait réguler négativement l'expression d'un gène codant un facteur protéique favorisant la traduction de l'ARNm *Pit-1*. Ainsi la diminution de la quantité de ce facteur dans la cellule pourrait entraîner la diminution de la traduction de l'ARNm *Pit-1* et *TNAP* et par conséquent son taux de protéine.



Une autre hypothèse qui pourrait être émise, serait celle d'un rôle de miR-9 en tant que régulateur de l'expression d'un gène codant une protéine de maturation des ARNm ou encore de structuration de l'ARNm *Pit-1*. Cette protéine potentielle pourrait masquer un site de régulation par un miARN, par son interaction avec l'ARNm *Pit-1* la stabilisation d'une structuration secondaire de l'ARN. Ainsi la diminution du taux de cette protéine potentielle par une activité l'ARNi induite par mir-9 pourrait entraîner la levée du masquage d'un site d'appariement pour un autre miARN, qui induirait alors la répression de la traduction ou la dégradation de l'ARNm *Pit-1*.

De plus ces travaux ont permis de soulever le rôle potentiel de miR-9 dans la régulation négative des gènes *TNAP* et *PC-1*. Ces résultats ont permis la rédaction d'un article scientifique pour lequel je suis co-auteur avec Véronique Salone « **Identification of new microRNA targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes** » Clement T et al., publié en 2014 dans le journal Bio-Medical Materials and Engineering.

Enfin une critique qui pourrait être émise sur ce travail, est l'absence de données des taux d'expression des miARN candidat mais aussi des ARNm cibles au cours d'une différenciation plus poussée que celle obtenue par nos expériences de transfections transitoires des miARN. Les perspectives de ce travail sont donc de réaliser des lignées ATDC5 transfectées stablement par les miARN candidat et de suivre leur taux expression et ceux de leurs cibles tout au long de leur différenciation jusqu'à leur différenciation terminale. Le suivi de la différenciation sera réalisé par la détection de marqueurs tels que la diminution des taux de Col-II et Sox9 ou encore l'augmentation de RUNX2 dans le chondrocyte mais aussi par le « monitoring » des concentrations en ePi et ePPi relargués dans les surnageants de culture. Au laboratoire Arnaud Bianchi est à même de prendre en charge la suite de ces travaux qui nous l'espérons confirmeront nos résultats obtenus jusqu'à maintenant.

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'implication de nouveaux miARN dans la régulation génique du chondrocyte. Comme je l'ai décrit dans le chapitre 3 de l'introduction de ce manuscrit, l'implication de nombreux miARN dans la régulation de la chondrogenèse et la perte de phénotype du chondrocyte a été montrée. Cependant il est évident que l'action d'un simple miARN ne peut pas être à l'origine du changement de phénotype du chondrocyte mais que la régulation génique par l'ARNi s'inscrit dans un régulome plus global. Un des enjeux futurs de la recherche du rôle des miARN sera de



pouvoir intégrer l'importance du rôle d'un miARN dans un phénomène de régulation donné et de déterminer des approches de quantification de l'apport de l'ARN interférant dans la modification d'un phénotype cellulaire, par exemple.

# *Chapitre D'ouvrage*







# Chapter 18

## Dual luciferase gene reporter assays to study miRNA function

**Thomas Clément & Véronique Salone**

Université de Lorraine, UMR 7365 IMoPA, Biopôle, 9 avenue de la Forêt de Haye, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

CNRS, UMR 7365 IMoPA, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

### Running Head

Reporter assays to study miRNA function

### Summary

This chapter describes one of the most reliable quantitative assays to test the silencing of a possible target gene by a specific miRNA using a luciferase reporter gene. The experimental procedure first consists in cloning both the wild-type and mutated forms of the 3'UTR of the miRNA predicted mRNA target downstream a firefly luciferase reporter. Next, each construct is co-transfected together with the miRNA into HeLa cells, and the reporter expression is monitored. Changes in luciferase levels will indicate whether or not a miRNA can bind to the UTR and regulate the expression of the gene.

### Key words:

MicroRNA, luciferase gene reporter assay, microRNA function, microRNA regulatory element, microRNA targeting sequence, target validation

### 1. Introduction

Metazoan microRNA (miRNA) are post-transcriptional regulators of gene expression that bind with imperfect complementarity to a mRNA sequence (MRE for MicroRNA Regulatory Element), typically located in the 3'untranslated region (3'UTR).

The first step to define a specific miRNA function often consists in bioinformatics searches for its putative biological targets. Currently, different open-access prediction programs are available. The most popular ones are MiRanda (<http://www.microrna.org>) (Witkos, Koscianska, and Krzyzosiak 2011), MicroCosm (<http://www.mirbase.org>) (Witkos, Koscianska, and Krzyzosiak 2011), TargetScan (<http://www.targetscan.org>) (Lewis, Burge, and Bartel 2005) or PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>) (Krek et al. 2005). These target prediction programs feature several similarities in their algorithms such as: identification of sites in the 3'UTR of mRNA matching the miRNA seed; conservation of miRNA and putative targets sequences among species; presence of multiple miRNA target sites and thermodynamic stability of the miRNA–mRNA duplex; the localization of predicted miRNAs target sites are also compared with mRNA 3'UTR secondary structures (Kertesz et al. 2010). However, comparing the results of different target prediction programs generally increases reliability of the predictions when they overlap. The development of the novel database miRWalk (<http://mirwalk.uni-hd.de>) (Dweep et al. 2011) has greatly facilitated these comparison approaches. To date new features have been incorporated in miRWalk, including search for miRNA target sites on the whole gene sequence (including promoter, 5' UTR and CDS); association of the predicted miRNA binding sites with information on genes, pathways,



organs, diseases and transcription factors and automatic search in PubMed for validated miRNA targets.

Despite the availability of diverse algorithms, targets prediction is still challenging and generates numerous false-positives. Therefore, it is important to experimentally validate the functional relevance of predicted miRNA-mRNA target pairs. One of the easiest and most commonly used strategies consists in a luciferase gene reporter assay, for which numerous expression vectors/systems have been developed. The predicted target site (or the full length 3'UTR- *see Note 1*) and a mutated version are subcloned downstream the luciferase gene and transfected together with a specific miRNA expressing vector or chemically synthesized miRNA analogs. Silencing of luciferase activity with the wild-type UTR and not with the mutated version (**Fig. 1**) indicates that the miRNA expressed can specifically bind to its target and negatively regulate gene expression. In this chapter, we present a simple workflow to experimentally validate a predicted miRNA/mRNA target couple, illustrated by our work on hsa-miR-29b and the 3'UTR of the COL2A1 mRNA (Salone *et al.*, in press). This approach is fast, easy and relatively cheap to test miRNA dependent gene expression regulation. Nevertheless, the choice of appropriate controls and inherent limits of the approach will be discussed in details as well (*see Notes*).

## 2. Materials

All oligonucleotides were purchased from Sigma.

### 2.1. Expression vectors preparation

#### Plasmids

1. pGL3 vector (Promega). pGL3 vector is used as a Firefly luciferase reporter vector. 3' UTR fragments to test are cloned downstream of the Firefly luciferase gene.
2. pRL-SV40 vector (Promega). pRL-SV40 vector is used as a Renilla luciferase control reporter vector. Both, pGL3 and pRL-SV40 vectors are co-transfected in cells and *Renilla* luciferase activity is used to normalize transfection efficiency.
3. pCDNA3.1 vector (Life Technologies). pCDNA3.1 vector is used to overexpress a gene of interest in mammalian cells (*see Note 2*). In our case, pCDNA3.1, containing the full-length sequence of the pre-miRNA of interest, leads to the overexpression of the corresponding miRNA in HeLa cells (*see Note 3*).

#### PCR amplification of target and pre-miRNA sequence

4. Two oligonucleotides were designed to amplify the 300-bp fragment from the 3'-UTR of the COL2A1 mRNA containing the hsa-miR-29b targeting site (*see Notes 1 and 4*). We designed sense and antisense oligonucleotides with *Xba*I restriction site (in bold) at their extremities and additional nucleotides (in italic) to enhance digestion efficiency of the PCR product.  
Sense oligonucleotide: 5'-*GACTCTAGAGGACCCAAGTACTTTCCA*-3'  
Antisense oligonucleotide: 5'-*GGCCGTCTAGATGTACTTTCCAATAATCT*-3'
5. Two oligonucleotides were designed to amplify hsa-pre-miR-29b (miRNA sequences are available on miRbase: [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). Sense and antisense oligonucleotides were respectively synthesized with a *Kpn*I or a *Bam*HI (in bold) restriction site at their 5' end and 4 nucleotides were added (in italic) to enhance digestion efficiency of PCR products.  
hsa-pre-miR-29b:  
Sense oligonucleotide: 5'-*GACGGTACCCTTCAGGAAGCTGGT*-3'  
Antisense oligonucleotide: 5'-*GACGGATCCCCCAAGAACACTG*-3'



hsa-pre-miR-199a:

Sense oligonucleotide: 5'-*GACGGTACCGCCAACCCAGTGTT*-3'

Antisense oligonucleotide: 5'-*GACGGATCCGCCTAACCAATGT*-3'

6. Human genomic DNA isolated from HeLa cell culture with Trizol® (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations.
7. Phusion® hot start Taq polymerase (Promega).
8. 5X Phusion GC buffer (Promega).
9. DMSO 3% (Promega).
10. dNTP Set (100mM) (Fermentas).
11. Thermocycler.
12. Appropriate oligonucleotides.

### PCR fragments digestion, plasmids linearization

13. Restriction enzymes *Xba*I, *Kpn*I, *Bam*HI Fast Digest (Fermentas).
14. Fast Alkaline phosphatase (Fermentas).
15. 10X Fast Buffer (Fermentas).

### Agarose Gel Electrophoresis

16. Electrophoresis equipment.
17. 10X TBE buffer (Tris-Borate Electrophoresis buffer: 108 mg/ml Tris base, 55 mg/ml Boric acid, 9,3 mg/ml EDTA).
18. Gel red (FluoProbes®).
19. Agarose (Sigma).
20. 1kb and 100 plus bp DNA ladder (Fermentas).
21. Gel loading dye (6X): 50 mM EDTA, 0.2% SDS, 50% glycerol, 0.05% w/v bromophenol blue.
22. GeneJET™ gel extraction kit (Fermentas).
23. NanoDrop 2000c spectrophotometer (ThermoScientific).

### Ligation and bacterial cells transformation

24. T4 DNA Ligase and 10X Buffer (Fermentas).
25. One Shot® TOP10 chemically competent *Escherichia coli* (Life Technologies). Other comparable competent cells can also be used.
26. LB (Luria Bertani) liquid media with ampicillin: 10 g/l Bactopeptone, 5 g/l yeast extract, 5g/l NaCl. Adjust pH to 7,5 with 10N NaOH. After autoclaving, add ampicillin to a final concentration of 100 mg/l. To prepare LB-agar plates, add 17 g/l of agar before autoclaving.
27. S.O.C. Medium (Life Technologies).
28. Incubator shaker, INNOVA®44 (New Brunswick Scientific).
29. Plasmid preparation Maxi Kit (QIAGEN).

### miRNA target site mutagenesis

30. As a negative control, a mutant of the COL2A1 3'UTR was created by replacing the entire seed region of the hsa-miR-29b by its reverse sequence. We designed 2 overlapping oligonucleotides containing a mutated hsa-miR-29b targeting site to perform this mutagenesis.

Mutagenesis sense oligonucleotide:

5'- CTGTGTGTGTCCTACACTTACCACGATTTCTGTGTCAAACACCTCT-3'

Mutagenesis antisense oligonucleotide:

5'- AGAGGTGTTTGACACAGAAATCGTGGTAAGTGTAGGACACACACAG-3'



31. *DpnI* modification enzyme (Fermentas).

## 2.2. Co-transfection of plasmids into mammalian cells

1. HeLa cells (ATCC) are an immortal cell line, derived from cervical cancer cells. They are routinely used in laboratory research. Other comparable human cell lines can be used as well, depending on the experimental design (*see Note 3*).
2. Culture medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®), 2.9 mg/ml glutamine (Sigma) and 10 units/ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies).
3. 12 wells plates for cell culture (Costar®).
4. 1X PBS buffer (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
5. JetPEI® Polyplus<sup>TM</sup> transfection reagent (Polyplus<sup>TM</sup>, *see Note 5*).

## 2.3. Dual-Luciferase Reporter Assay

1. Dual-luciferase Reporter Assay Kit (Promega) composed of lysis buffer PLB and reactive buffers LARII and Stop&Glo. Any other comparable Dual-luciferase reporter Assay kit, allowing an optimized system for the sequential assay of Firefly and Renilla luciferase activities can be used.
2. GloMax®-96 Microplate Luminometer (Promega) featuring a double automatic injector or any other comparable luminometer.
3. Nunc<sup>TM</sup> Microwell Plates (Nuncclon<sup>TM</sup> Delta Surface).

## 3. Methods

### 3.1. Expression vectors preparation

#### PCR amplification of target and pre-miRNA sequence

1. 3'UTR fragments and pre-miRNA of interest are amplified by PCR. Twenty nanograms of HeLa genomic DNA are incubated with 1 µl of each primer (10 µM), 1 U of Phusion® Taq DNA polymerase, 1,5 µl of DMSO (3% final concentration), 10 µl of 5X GC Buffer and dH<sub>2</sub>O in a final volume of 50 µl. The amplification is realized with the following PCR program: initial denaturation step at 95°C for 5 min; 30 cycles: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at a temperature depending on primers T<sub>m</sub> for 30 sec, elongation at 72°C for a time depending on the amplicon's size; final elongation step at 72°C for 5 min.

#### PCR fragments digestion, plasmids linearization

2. For the 3'UTR fragment digestion, incubate 1 µg of PCR product, purified on agarose gel (using the GeneJet Extraction kit), for 10 min at 37°C with 1 µl of *XbaI* enzyme and 1 µl of 10X digestion buffer in a final volume 10 µl.
3. Inactivate the enzyme by heating the mixture at 95°C for 3 min.
4. For the pre-miRNA fragment digestion, incubate 1 µg of purified PCR products for 10 min at 37°C with 1 µl of *KpnI* and 1 µl of *BamHI* enzymes and 1 µl of 10X digestion buffer in a final volume of 10 µl.
5. Inactivate the enzymes by heating the mixture at 95°C for 3 min.
6. pGL3-Control vector is simultaneously digested by *XbaI* and dephosphorylated by alkaline phosphatase. One microgram of pGL3 plasmid is incubated with 1 µl of *XbaI*, 1 µl of FastAP and 1 µl of 10X digestion buffer in a final volume of 10 µl at 37°C for



- 10 min. Next the mixture is incubated at 95°C for 3 min to inactivate the enzymes.
7. pCDNA 3.1 vector is simultaneously digested by *KpnI* and *BamHI* and dephosphorylated by alkaline phosphatase,. One microgram of pCDNA3.1 plasmid is incubated with 1 µl of *KpnI*, 1 µl of *BamHI*, 1 µl of FastAP and 1 µl of 10X digestion buffer in a final volume of 10 µl at 37°C for 10 min. Next the mixture is incubated at 95°C for 3 min to inactivate the enzymes.

### Agarose Gel Electrophoresis

8. Add 6X loading dye to the digested products and load them on a 2 % agarose gel.
9. Run the gel at 100 V for 35 min in 1X TBE buffer.
10. Following electrophoresis, stain the gel with Gel Red and take a picture under UV light as a record.
11. Cut the gel slice containing the DNA fragment of interest from the agarose gel with a clean and sharp scalpel blade. Follow the GeneJet gel extraction kit protocol to retrieve and purify the DNA fragments (linearized vectors and digested inserts).
12. Quantify the DNA concentration (µg/µl) using a Nanodrop spectrophotometer (*see Note 6*).

### Ligation and bacterial cells transformation

The *KpnI/BamHI* digested PCR products, corresponding to pre-miRNA of interest, are cloned into linearized pCDNA3.1 at the corresponding restriction sites.

The *XbaI* digested PCR product, corresponding to 3'UTR fragment of interest, is cloned into linearized pGL3-Control at the corresponding restriction site.

13. Combine the dephosphorylated vectors with the appropriate purified insert. Vector and insert ratio should be 1:10 (*see Note 7*).
14. Add 1 µl of T4 DNA ligase and 1 µl of 10X T4 DNA ligase buffer in a total volume of 10 µl.
15. Centrifuge briefly and incubate at 37°C for 1 hour.
16. Chill on ice. The sample is now ready for transformation or can be stored at -20°C.
17. Thaw 50 µl per transformation of One Shot<sup>®</sup> TOP10 chemically competent cells for 10 minutes on ice.
18. Add 2 to 5 µl of ligation product on thawed One Shot<sup>®</sup> cells and mix gently.
19. Incubate the cells on ice for 30 minutes.
20. Incubate the cells for 45 sec at 42°C without shaking.
21. Immediately chill on ice for 5 minutes.
22. Add 250 µl of pre-warmed sterile S.O.C. medium to each sample.
23. Incubate the transformed cells at 37°C for 1 hour with mild shaking and plate the cells on LB agar plates with 100 µg/ml ampicillin.
24. Incubate the plates overnight at 37°C. Inoculate LB medium with 100 µg/ml ampicillin with isolated clones and incubate ON at 37°C with shaking.
25. Proceed with plasmid DNA purification using the Plasmid preparation Maxi kit, according to the manufacturer's instructions.
26. Check the plasmid DNA size on a 0,8 % agarose gel, and sequence all the final vectors for sequence verification (*see Note 8*).

### miRNA target site mutagenesis :



27. A 3'UTR miRNA target site mutant is created by direct PCR mutagenesis. 200 ng of pGL3-3'UTR-COL2A1 plasmid DNA is incubated with 1 µl of each complementary mutagenesis primers (10 µM), 1 U of phusion DNA polymerase (Promega), 1,5 µl of DMSO (3%), 10 µl of 5X GC Buffer in a final volume of 50 µl. The mutagenesis is performed with the following PCR program: initial denaturation step at 95°C for 5 min; 18 cycles: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at a temperature depending on primers T<sub>m</sub> for 30 sec, elongation at 72°C for a time depending on the amplicon's size; final elongation step at 72°C for 10 min.
28. Add 1 µl of 6X loading dye to 5 µl of PCR product and load on a 0,8% agarose gel.
29. Run the gel at 100 V for 35 min in order to check the DNA amplification.
30. The PCR product is cleaned from matrix DNA using *DpnI* enzyme, which degrades only methylated DNA. 10 µl of PCR product is incubated with 5 µl of Fast *DpnI* and 2,5 µl of 10X FastDigest Buffer in a final volume of 25 µl. The reaction is incubated for 10 min at 37°C.
31. Competent bacterial cells are transformed with 5 µl of *DpnI* digestion product (as described previously, **3.1.**, steps 17-26).

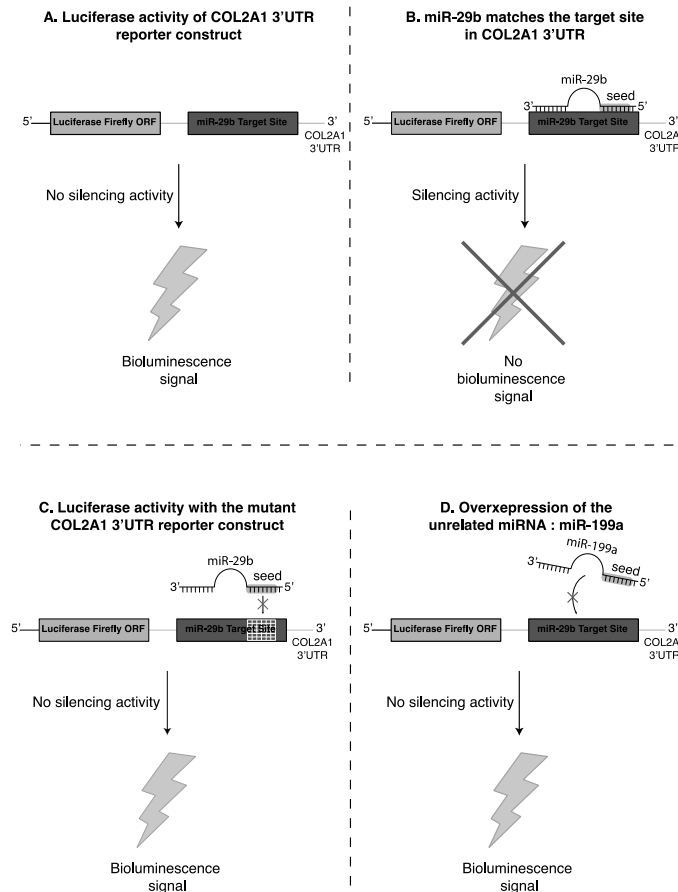
### 3.2. Co-transfection of plasmids into mammalian cells

1. One day prior transfection, seed  $1.10^5$  HeLa cells in DMEM medium in 12 wells plates. Fill as many wells as reactions to be performed (assays and control, see below). Incubate cells at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> overnight.
2. For each transfection, combine 1 µg of pGL3 plasmid, 1 µg of pCDNA3.1 plasmid and 5 ng of pRL-SV40 vector with 37 µl of 150 mM NaCl in a final volume of 40 µl. In parallel, combine 5 µl of JetPEI® transfection reagent with 35 µl of 150 mM NaCl (*see Notes 5 , 9 and 10*).
3. Add the JetPEI® mixture on the plasmids mixture and vortex thoroughly (*see Note 11*). Incubate at room temperature for 20 min.

We tested hsa-miR-29b targeting the 3'UTR of COL2A1 mRNA and the following combinations were used in our experimental design (**Fig. 1**):

- A/ pGL3-COL2A1 + pCDNA Ø + pRL SV40 (positive luciferase activity control)
- B/ pGL3-COL2A1 + pCDNA-pre-29b + pRL SV40 (assay)
- C/ pGL3-Mutant + pCDNA-pre-29b + pRL SV40 (negative control)
- D/pGL3-COL2A1 + pCDNA-pre-199a + pRL SV40 (negative control)





4. Add the 80  $\mu$ l transfection mixture drop by drop to cells and incubate 2 to 3h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.
5. To avoid JetPEI® toxicity on cells, change the culture medium with warm (37°C) DMEM. Incubate cells overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> (*see Note 12*).

### 3.3. Dual-Luciferase Reporter Assay

1. After 24h, discard the culture medium and wash cells with 1 ml of PBS buffer.
2. Dispense 250  $\mu$ l of Passive Lysis Buffer (PLB 1X) in each well. Gently shake the 12 well plate at room temperature for 15 min (*see Note 13*).
3. Dispense 20  $\mu$ l of each cells lysate in a 96 well microplate. Store the microplate at 4°C until the assay is performed.
4. Prepare buffers for the luciferase activity assay :  
For each sample, 100  $\mu$ l of LARII Buffer (Firefly luciferase substrate) and 100  $\mu$ l Stop&Glo (Firefly luciferase inhibitor and Renilla luciferase substrate) are needed (*see Note 14*).
5. The assay program is set to first measure the Firefly luciferase activity and next the Renilla luciferase activity, according to the following steps :

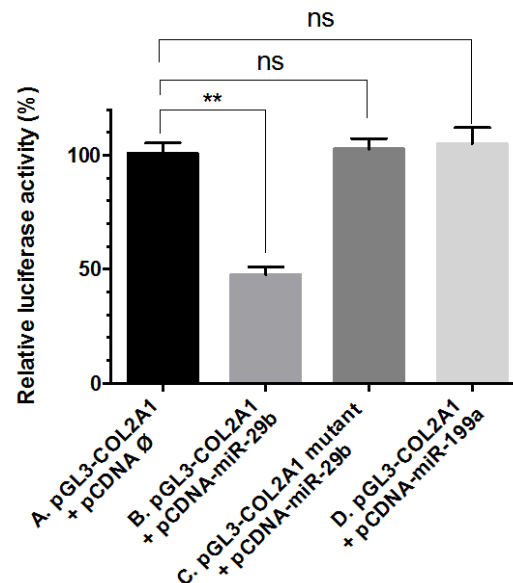


LARII Buffer injection → incubation of 3 sec → measurement of Firefly luciferase activity for 10 sec → Stop&Glo Buffer injection → incubation of 3 sec → measurement of Renilla luciferase activity for 10 sec.

- For each experiment, calculate the ratio of Firefly luciferase activity/Renilla luciferase activity to normalize luciferase activity. The control luciferase activity (condition A, 3.2.3) was defined as 100% of activity (See **Note 15** and **16**). All combinations (A-D) were run at least in triplicate (see **Note 17** and **18**). **Fig. 2** presents an example of data that was obtained (see **Note 19**).

#### 4. Notes:

- Luciferase constructs containing the full length 3'UTR of many human genes can be easily obtained from various commercial sources. However, complete 3'UTRs may contain target sequences of several miRNAs and numerous other regulatory elements, which could influence reporter mRNA stability and luciferase expression by



attenuating the putative effect of the studied miRNA. Therefore, data interpretation obtained using a full length 3'UTR may be difficult.

However, target site recognition depends on both 3'UTR sequence and structural environment (Doench, Petersen, and Sharp 2003). Restricting the sequence downstream of the luciferase reporter gene to the MRE may therefore alter targeting efficiency.

Additionally, another point to take into account is that a 3'-UTR often contain multiple target sites for the same miRNA, and all of them should actually be tested.

Finally, one could choose to subclone multiple copies of the MRE downstream of the luciferase gene. Indeed, some authors have demonstrated the existence of a nonlinear relationship between the number of miRNA target sites and the magnitude of repression (Stefan Ludwig Ameres, Martinez, and Schroeder 2007).

Consequently, many points have to be taken into account to determine the nature of the 3'UTR fragment to be tested downstream of the luciferase gene, and a specific and well thought design is needed for each experiment.

- Testing the function of a miRNA on a reporter target can be done in a cell line endogenously expressing the corresponding miRNA. If this is not the case or if the miRNA amounts are too low, cells have to be co-transfected with a vector such as pCDNA3.1, enabling the expression of the miRNA or directly with mature synthetic miRNA duplexes. The advantage of co-transfecting the miRNA is that the effect on



luciferase activity may be quantified. Nevertheless, this quantification requires the endogenous miRNA and target gene endogenous expression to be low in the chosen cell line (*see Note 3*).

3. Protocols for HeLa cells culture and transfection are routinely used in most laboratories. Many other cell lines can also be used. Nevertheless, as miRNA biogenesis and target gene expression are under control of many factors, to accurately assess whether miRNA/mRNA regulation occurs, experiments should be performed in a cell type where all these factors are expressed. Moreover, a low expression of the endogenous miRNA and target gene is necessary if quantification is required, as mentioned above. Consequently, several aspects have to be considered for the cell line choice as well.
4. Most miRNA target sites are located in the 3'UTR of a mRNA. Nevertheless, several miRNA target sites have been found in the 5' UTR or the CDS. The method described in this chapter can also be used to test such miRNA targets.
5. Several other RNA transfection reagents are available. They may be tried if results are not satisfactory.
6. Any other method of quantification of your convenience is employable as well (e.g. Qubit, Lifetechnologies).
7. The vector/insert ratio may be adjusted for a better efficiency depending on vector and insert sizes.
8. For cloning into pGL3-vector, since the insert fragment was digested with *XbaI* at both extremities, ligation may have occurred in both orientations. Therefore, prior to sequencing positive clones, insert orientation should be checked by PCR, using an oligonucleotide hybridizing in the insert, and another oligonucleotide hybridizing in the vector.
9. A master mix can be prepared.
10. One critical parameter for repression is the ratio between the miRNA and the target plasmid. Several experiments are required for optimization. The conditions we present here were, in our hands, the best ones for our experimental purposes.
11. Do not reverse order.
12. Transient transfection parameters (e.g. incubation time) generally need to be optimized, particularly depending on the cell lines that are used.
13. If cell debris appear, spin the lysate and keep the supernatant.
14. As we use a Glomax luminometer with automatic injectors, we prepare a tube for each buffer containing (100 X N reactions)  $\mu\text{l}$  + 10 % (to avoid pipeting errors) and + 1 ml (dead volume to initiate the pumps).
15. A negative control is mandatory to verify that the Firefly luciferase expression responds specifically to the miRNA of interest. One possibility is to use a mutated 3'UTR target site (our condition C) or an unrelated miRNA (our condition D), as described in this chapter. Other strategies are possible and were described elsewhere, e.g. deletion/mutation of the seed region.
16. Another possibility to test specificity is to use commercial antagomiRs (Krützfeldt et al. 2005) (antisense to miRNAs oligonucleotides) to silence the miRNA of interest.
17. A minimum of three replicates is mandatory. Indeed, miRNAs and target genes expressions may be differentially regulated, spatially and temporally. Cell type, differentiation state, stress are as many factors influencing miRNA/target interaction.
18. Despite all replicates and controls performed in one series experiment, false negative or false positive results may still be observed. Luciferase reporter assay is therefore a convenient approach to get information on a miRNA function, but additional data



must be grabbed by other means and should be accompanied by physiological observations as well.

19. miRNA negatively regulate gene expression by either translational repression or degradation of the targeted mRNA. The method presented here enables to determine the mode of repression, as a change in the reporter mRNA level (in the case of degradation) is easy to monitor.

### Figure legends

#### Figure 1:

Experimental design to test interaction between hsa-miRNA-29b and its predicted target site in the 3'UTR of the COL2A1 mRNA.

#### Figure 2:

Regulation of COL2A mRNA by hsa-miRNA-29b. Luciferase activity in HeLa cells co-transfected with (i) pGL3-Luc::COL2A1 or pGL3-Luc::COL2A1-mutant, (ii) pCDNA3.1-pre-miR29b, pCDNA3.1-pre-miR199a or a negative control (pcDNA3.1 empty) and (iii) the internal control plasmid encoding Renilla luciferase (RLuc). Results are shown as the relative luciferase activity, where luciferase activity in HeLa cells transfected by the empty version of pcDNA3.1 is defined as 100%. In all experiments, bars show the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments, each being run in triplicate. The analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's *t post-hoc* test using the Statview™ 5.0 software (SAS Institute Inc), were performed (\*\* =  $P < 0.01$ ; ns = not significant).

### 5. References:

- Ameres, S. L., Martinez, J., & Schroeder, R. (2007). Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130(1), 101–112. doi:10.1016/j.cell.2007.04.037
- Doench, J. G., Petersen, C. P., & Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development*, 17(4), 438–442. doi:10.1101/gad.1064703
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., & Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *Journal of Biomedical Informatics*, 44(5), 839–847. doi:10.1016/j.jbi.2011.05.002
- Kertesz, M., Wan, Y., Mazor, E., Rinn, J. L., Nutter, R. C., Chang, H. Y., & Segal, E. (2010). Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast. *Nature*, 467(7311), 103–107. doi:10.1038/nature09322
- Koziol, A., Martín-Alonso, M., Clemente, C., Gonzalo, P., & Arroyo, A. G. (2012). Site-specific cellular functions of MT1-MMP. *European Journal of Cell Biology*, 91(11–12), 889–895. doi:10.1016/j.ejcb.2012.07.003
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., ... Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5), 495–500. doi:10.1038/ng1536
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature*, 438(7068), 685–689. doi:10.1038/nature04303
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
- Witkos, T. M., Koscińska, E., & Krzyzosiak, W. J. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Current Molecular Medicine*, 11(2), 93–109.

# *Bibliographie*



# Bibliographie

## A

Akhtar, N, Z Rasheed, S Ramamurthy, A N Anbazhagan, F R Voss, and T M Haqqi. 2010. "MicroRNA-27b Regulates the Expression of MMP-13 in Human Osteoarthritis Chondrocytes." *Arthritis Rheum.* doi:10.1002/art.27329.

Ameres, Stefan L., Michael D. Horwich, Jui-Hung Hung, Jia Xu, Megha Ghildiyal, Zhiping Weng, and Phillip D. Zamore. 2010. "Target RNA-Directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs." *Science* 328 (5985): 1534–39. doi:10.1126/science.1187058.

Ameres, Stefan Ludwig, Javier Martinez, and Renée Schroeder. 2007. "Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC." *Cell* 130 (1): 101–12. doi:10.1016/j.cell.2007.04.037.

Attur, Mukundan, Hwa-Ying Wang, Virginia Byers Kraus, Jack F. Bukowski, Nazneen Aziz, Svetlana Krasnokutsky, Jonathan Samuels, et al. 2010. "Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis Is Conditional on Interleukin 1 Receptor Antagonist Gene Variations." *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (5): 856–61. doi:10.1136/ard.2009.113043.

## B

Bail, Sophie, Mavis Swerdel, Hudan Liu, Xinfu Jiao, Loyal A. Goff, Ronald P. Hart, and Megerditch Kiledjian. 2010. "Differential Regulation of microRNA Stability." *RNA* 16 (5): 1032–39. doi:10.1261/rna.1851510.

Bartel, David P. 2009. "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions." *Cell* 136 (2): 215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.

Baskerville, Scott, and David P. Bartel. 2005. "Microarray Profiling of microRNAs Reveals Frequent Coexpression with Neighboring miRNAs and Host Genes." *RNA* 11 (3): 241–47. doi:10.1261/rna.7240905.

Beaudoing, Emmanuel, Susan Freier, Jacqueline R. Wyatt, Jean-Michel Claverie, and Daniel Gautheret. 2000. "Patterns of Variant Polyadenylation Signal Usage in Human Genes." *Genome Research* 10 (7): 1001–10. doi:10.1101/gr.10.7.1001.

Behm-Ansmant, I. 2006. "mRNA Degradation by miRNAs and GW182 Requires Both CCR4:NOT Deadenylase and DCP1:DCP2 Decapping Complexes." *Genes & Development* 20 (14): 1885–98. doi:10.1101/gad.1424106.

Benoit, M. P. M. H., L. Imbert, A. Palencia, J. Perard, C. Ebel, J. Boisbouvier, and M. J. Plevin. 2013. "The RNA-Binding Region of Human TRBP Interacts with microRNA Precursors through Two Independent Domains." *Nucleic Acids Research* 41 (7): 4241–52. doi:10.1093/nar/gkt086.

Berenbaum, F. 2013. "Osteoarthritis as an Inflammatory Disease (osteoarthritis Is Not Osteoarthrosis!)." *Osteoarthritis and Cartilage* 21 (1): 16–21. doi:10.1016/j.joca.2012.11.012.

Berget, S M, C Moore, and P A Sharp. 1977. "Spliced Segments at the 5' Terminus of Adenovirus 2 Late mRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (8): 3171–75.

Béthune, Julien, Caroline G Artus-Revel, and Witold Filipowicz. 2012. "Kinetic Analysis Reveals Successive Steps Leading to miRNA-Mediated Silencing in Mammalian Cells." *EMBO Reports* 13 (8): 716–23.



doi:10.1038/embor.2012.82.

Bhosale, Abhijit M., and James B. Richardson. 2008. "Articular Cartilage: Structure, Injuries and Review of Management." *British Medical Bulletin* 87 (1): 77–95. doi:10.1093/bmb/ldn025.

Bianchi, Arnaud, David Moulin, Sylvie Sebillaud, Meriem Koufany, Marie-Madeleine Galteau, Patrick Netter, Bernard Terlain, and Jean-Yves Jouzeau. 2005. "Contrasting Effects of Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor (PPAR)gamma Agonists on Membrane-Associated Prostaglandin E2 Synthase-1 in IL-1beta-Stimulated Rat Chondrocytes: Evidence for PPARgamma-Independent Inhibition by 15-Deoxy-Delta12,14prostaglandin J2." *Arthritis Research & Therapy* 7 (6): R1325–1337. doi:10.1186/ar1830.

Boon, R. A., and K. C. Vickers. 2013. "Intercellular Transport of MicroRNAs." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (2): 186–92. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300139.

Borowski, L. S., A. Dziembowski, M. S. Hejnowicz, P. P. Stepień, and R. J. Szczesny. 2012. "Human Mitochondrial RNA Decay Mediated by PNPase-hSuv3 Complex Takes Place in Distinct Foci." *Nucleic Acids Research* 41 (2): 1223–40. doi:10.1093/nar/gks1130.

Boyan, Barbara D, David A Hart, Roger M Enoka, Daniel P Nicolella, Eileen Resnick, Karen J Berkley, Kathleen A Sluka, et al. 2013. "Hormonal Modulation of Connective Tissue Homeostasis and Sex Differences in Risk for Osteoarthritis of the Knee." *Biology of Sex Differences* 4 (1): 3. doi:10.1186/2042-6410-4-3.

Braun, Hillary J., and Garry E. Gold. 2012. "Diagnosis of Osteoarthritis: Imaging." *Bone* 51 (2): 278–88. doi:10.1016/j.bone.2011.11.019.

Brennecke, Julius, Alexander Stark, Robert B Russell, and Stephen M Cohen. 2005. "Principles of microRNA-Target Recognition." *PLoS Biology* 3 (3): e85. doi:10.1371/journal.pbio.0030085.

Buckwalter, Joseph A, Henry J Mankin, and Alan J Grodzinsky. 2005. "Articular Cartilage and Osteoarthritis." *Instructional Course Lectures* 54: 465–80.

## C

Cai, Xuezhong, Curt H. Hagedorn, and Bryan R. Cullen. 2004. "Human microRNAs Are Processed from Capped, Polyadenylated Transcripts That Can Also Function as mRNAs." *RNA* 10 (12): 1957–66. doi:10.1261/rna.7135204.

Cailotto, Frederic, Pascal Reboul, Sylvie Sebillaud, Patrick Netter, Jean-Yves Jouzeau, and Arnaud Bianchi. 2011. "Calcium Input Potentiates the Transforming Growth Factor (TGF)-beta1-Dependent Signaling to Promote the Export of Inorganic Pyrophosphate by Articular Chondrocyte." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (22): 19215–28. doi:10.1074/jbc.M110.175448.

Cailotto, Frederic, Sylvie Sebillaud, Patrick Netter, Jean-Yves Jouzeau, and Arnaud Bianchi. 2010. "The Inorganic Pyrophosphate Transporter ANK Preserves the Differentiated Phenotype of Articular Chondrocyte." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (14): 10572–82. doi:10.1074/jbc.M109.050534.

Carmell, Michelle A, Zhenyu Xuan, Michael Q Zhang, and Gregory J Hannon. 2002. "The Argonaute Family: Tentacles That Reach into RNAi, Developmental Control, Stem Cell Maintenance, and Tumorigenesis." *Genes & Development* 16 (21): 2733–42. doi:10.1101/gad.1026102.

Cazalla, Demián, Therese Yario, and Joan A. Steitz. 2010. "Down-Regulation of a Host microRNA by a Herpesvirus Saimiri Noncoding RNA." *Science* 328 (5985): 1563–66.

Chang, Tsung-Cheng, Duonan Yu, Yun-Sil Lee, Erik A. Wentzel, Dan E. Arking, Kristin M. West, Chi V. Dang, Andrei Thomas-Tikhonenko, and Joshua T. Mendell. 2008. "Widespread microRNA Repression by Myc Contributes to Tumorigenesis." *Nature Genetics* 40 (1): 43–50. doi:10.1038/ng.2007.30.

Chatterjee, Saibal, Monika Fasler, Ingo Büssing, and Helge Grosshans. 2011. "Target-Mediated Protection of Endogenous microRNAs in *C. Elegans*." *Developmental Cell* 20 (3): 388–96. doi:10.1016/j.devcel.2011.02.008.

Chekulaeva, Marina, and Witold Filipowicz. 2009. "Mechanisms of miRNA-Mediated Post-Transcriptional





Regulation in Animal Cells.” *Current Opinion in Cell Biology* 21 (3): 452–60. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.009.

Chen, C, D A Ridzon, A J Broomer, Z Zhou, D H Lee, J T Nguyen, M Barbisin, et al. 2005. “Real-Time Quantification of microRNAs by Stem-Loop RT-PCR.” *Nucleic Acids Res* 33 (20): e179. doi:33/20/e179 [pii] 10.1093/nar/gni178.

Chen, Pai-Sheng, Jen-Liang Su, Shih-Ting Cha, Woan-Yuh Tarn, Ming-Yang Wang, Hsing-Chih Hsu, Ming-Tsan Lin, et al. 2011. “miR-107 Promotes Tumor Progression by Targeting the Let-7 microRNA in Mice and Humans.” *Journal of Clinical Investigation* 121 (9): 3442–55. doi:10.1172/JCI45390.

Chendrimada, Thimmaiah P., Kenneth J. Finn, Xinjun Ji, David Baillat, Richard I. Gregory, Stephen A. Liebhaber, Amy E. Pasquinelli, and Ramin Shiekhattar. 2007. “MicroRNA Silencing through RISC Recruitment of eIF6.” *Nature* 447 (7146): 823–28. doi:10.1038/nature05841.

Chevalier, Xavier, Florent Eymard, and Pascal Richette. 2013. “Biologic Agents in Osteoarthritis: Hopes and Disappointments.” *Nature Reviews Rheumatology* 9 (7): 400–410. doi:10.1038/nrrheum.2013.44.

Chomczynski, P. 1993. “A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples.” *BioTechniques* 15 (3): 532–34, 536–37.

Cifuentes, Daniel, Huiling Xue, David W. Taylor, Heather Patnode, Yuichiro Mishima, Sihem Cheloufi, Enbo Ma, et al. 2010. “A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity.” *Science* 328 (5986): 1694–98. doi:10.1126/science.1190809.

Cole, Christian, Andrew Sobala, Cheng Lu, Shawn R. Thatcher, Andrew Bowman, John W. S. Brown, Pamela J. Green, Geoffrey J. Barton, and Gyorgy Hutvagner. 2009. “Filtering of Deep Sequencing Data Reveals the Existence of Abundant Dicer-Dependent Small RNAs Derived from tRNAs.” *RNA* 15 (12): 2147–60. doi:10.1261/rna.1738409.

Cook, D, M J Fry, K Hughes, R Sumathipala, J R Woodgett, and T C Dale. 1996. “Wingless Inactivates Glycogen Synthase Kinase-3 via an Intracellular Signalling Pathway Which Involves a Protein Kinase C.” *The EMBO Journal* 15 (17): 4526–36.

Corcoran, David L, Kusum V Pandit, Ben Gordon, Arindam Bhattacharjee, Naftali Kaminski, and Panayiotis V Benos. 2009. “Features of Mammalian microRNA Promoters Emerge from Polymerase II Chromatin Immunoprecipitation Data.” *PloS One* 4 (4): e5279. doi:10.1371/journal.pone.0005279.

Couttet, P, M Fromont-Racine, D Steel, R Pictet, and T Grange. 1997. “Messenger RNA Deadenylation Precedes Decapping in Mammalian Cells.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (11): 5628–33.

## D

Das, S. K., S. K. Bhutia, U. K. Sokhi, R. Dash, B. Azab, D. Sarkar, and P. B. Fisher. 2011. “Human Polynucleotide Phosphorylase (hPNPaseold-35): An Evolutionary Conserved Gene with an Expanding Repertoire of RNA Degradation Functions.” *Oncogene* 30 (15): 1733–43. doi:10.1038/onc.2010.572.

Davis-Dusenbery, Brandi N, and Akiko Hata. 2011. “Smad-Mediated miRNA Processing: A Critical Role for a Conserved RNA Sequence.” *RNA Biology* 8 (1): 71–76.

Davis-Dusenbery, Brandi N., and Akiko Hata. 2010. “Mechanisms of Control of microRNA Biogenesis.” *Journal of Biochemistry* 148 (4): 381–92. doi:10.1093/jb/mvq096.

Day, Timothy F., and Yingzi Yang. 2008. “Wnt and Hedgehog Signaling Pathways in Bone Development.” *The Journal of Bone & Joint Surgery* 90 (Supplement\_1): 19–24. doi:10.2106/JBJS.G.01174.

De Ceuninck, Frédéric, Massimo Sabatini, and Philippe Pastoureau. 2011. “Recent Progress toward Biomarker Identification in Osteoarthritis.” *Drug Discovery Today* 16 (9–10): 443–49. doi:10.1016/j.drudis.2011.01.004.

De Lange-Brokaar, B.J.E., A. Ioan-Facsinay, G.J.V.M. van Osch, A.-M. Zuurmond, J. Schoones, R.E.M. Toes, T.W.J. Huizinga, and M. Kloppenburg. 2012. “Synovial Inflammation, Immune Cells and Their Cytokines in Osteoarthritis: A Review.” *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (12): 1484–99. doi:10.1016/j.joca.2012.08.027.





Dean, D D, J Martel-Pelletier, J P Pelletier, D S Howell, and J F Woessner. 1989. "Evidence for Metalloproteinase and Metalloproteinase Inhibitor Imbalance in Human Osteoarthritic Cartilage." *Journal of Clinical Investigation* 84 (2): 678–85. doi:10.1172/JCI114215.

Deberg, M, J-E Dubuc, A Labasse, C Sanchez, E Quettier, A Bosseloir, J-M Crielaard, and Y Henrotin. 2008. "One-Year Follow-up of Coll2-1, Coll2-1NO2 and Myeloperoxidase Serum Levels in Osteoarthritis Patients after Hip or Knee Replacement." *Annals of the Rheumatic Diseases* 67 (2): 168–74. doi:10.1136/ard.2007.073452.

DeLise, A.M., L. Fischer, and R.S. Tuan. 2000. "Cellular Interactions and Signaling in Cartilage Development." *Osteoarthritis and Cartilage* 8 (5): 309–34. doi:10.1053/joca.1999.0306.

Denli, A M, B B Tops, R H Plasterk, R F Ketting, and G J Hannon. 2004. "Processing of Primary microRNAs by the Microprocessor Complex." *Nature* 432 (7014): 231–35. doi:nature03049 [pii] 10.1038/nature03049.

Diaz-Perales, A, V Quesada, L M Sanchez, A P Ugalde, M F Suarez, A Fueyo, and C Lopez-Otin. 2005. "Identification of Human Aminopeptidase O, a Novel Metalloprotease with Structural Similarity to Aminopeptidase B and Leukotriene A4 Hydrolase." *J Biol Chem* 280 (14): 14310–17. doi:M413222200 [pii] 10.1074/jbc.M413222200.

Diederichs, Sven, and Daniel A. Haber. 2007. "Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression." *Cell* 131 (6): 1097–1108. doi:10.1016/j.cell.2007.10.032.

Doench, John G, Christian P Petersen, and Phillip A Sharp. 2003. "siRNAs Can Function as miRNAs." *Genes & Development* 17 (4): 438–42. doi:10.1101/gad.1064703.

Dudek, Katarzyna A., Jérôme E. Lafont, Aida Martinez-Sanchez, and Christopher L. Murphy. 2010. "Type II Collagen Expression Is Regulated by Tissue-Specific miR-675 in Human Articular Chondrocytes." *Journal of Biological Chemistry* 285 (32): 24381–87. doi:10.1074/jbc.M110.111328.

Dweep, Harsh, Carsten Sticht, Priyanka Pandey, and Norbert Gretz. 2011. "miRWalk--Database: Prediction of Possible miRNA Binding Sites by 'Walking' the Genes of Three Genomes." *Journal of Biomedical Informatics* 44 (5): 839–47. doi:10.1016/j.jbi.2011.05.002.

## E

Elbashir, Sayda M., Jens Harborth, Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber, and Thomas Tuschl. 2001. "Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells." *Nature* 411 (6836): 494–98. doi:10.1038/35078107.

Elbashir, Sayda M., Winfried Lendeckel, and Thomas Tuschl. 2001. "RNA Interference Is Mediated by 21- and 22-Nucleotide RNAs." *Genes & Development* 15 (2): 188–200. doi:10.1101/gad.862301.

Elkayam, Elad, Claus-D. Kuhn, Ante Tocilj, Astrid D. Haase, Emily M. Greene, Gregory J. Hannon, and Leemor Joshua-Tor. 2012. "The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a." *Cell* 150 (1): 100–110. doi:10.1016/j.cell.2012.05.017.

Ender, Christine, Azra Krek, Marc R Friedländer, Michaela Beitzinger, Lasse Weinmann, Wei Chen, Sébastien Pfeffer, Nikolaus Rajewsky, and Gunter Meister. 2008. "A Human snoRNA with microRNA-like Functions." *Molecular Cell* 32 (4): 519–28. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.017.

Ender, Christine, and Gunter Meister. 2010. "Argonaute Proteins at a Glance." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 11): 1819–23. doi:10.1242/jcs.055210.

Eulalio, Ana, Eric Huntzinger, and Elisa Izaurralde. 2008. "GW182 Interaction with Argonaute Is Essential for miRNA-Mediated Translational Repression and mRNA Decay." *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (4): 346–53. doi:10.1038/nsmb.1405.

Eulalio, Ana, Felix Tritschler, and Elisa Izaurralde. 2009. "The GW182 Protein Family in Animal Cells: New



Insights into Domains Required for miRNA-Mediated Gene Silencing.” *RNA* 15 (8): 1433–42. doi:10.1261/rna.1703809.

## F

Fabian, Marc R, Géraldine Mathonnet, Thomas Sundermeier, Hansruedi Mathys, Jakob T Zipprich, Yuri V Svitkin, Fabiola Rivas, et al. 2009. “Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation.” *Molecular Cell* 35 (6): 868–80. doi:10.1016/j.molcel.2009.08.004.

Felson, D.T. 2013. “Osteoarthritis as a Disease of Mechanics.” *Osteoarthritis and Cartilage* 21 (1): 10–15. doi:10.1016/j.joca.2012.09.012.

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 (2): 102–14. doi:nrg2290 [pii] 10.1038/nrg2290.

Fire, A, S Xu, M K Montgomery, S A Kostas, S E Driver, and C C Mello. 1998. “Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*.” *Nature* 391 (6669): 806–11. doi:10.1038/35888.

Flynt, Alex S, Jaclyn C Greimann, Wei-Jen Chung, Christopher D Lima, and Eric C Lai. 2010. “MicroRNA Biogenesis via Splicing and Exosome-Mediated Trimming in *Drosophila*.” *Molecular Cell* 38 (6): 900–907. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.014.

Francin, P. -J., A. Abot, C. Guillaume, D. Moulin, A. Bianchi, P. Gegout-Pottie, J. -Y. Jouzeau, D. Mainard, and N. Presle. 2014. “Association between Adiponectin and Cartilage Degradation in Human Osteoarthritis.” *Osteoarthritis and Cartilage*. doi:10.1016/j.joca.2014.01.002.

Frank, Filipp, Nahum Sonenberg, and Bhushan Nagar. 2010. “Structural Basis for 5'-Nucleotide Base-Specific Recognition of Guide RNA by Human AGO2.” *Nature* 465 (7299): 818–22. doi:10.1038/nature09039.

Friedman, Robin C, Kyle Kai-How Farh, Christopher B Burge, and David P Bartel. 2009. “Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of microRNAs.” *Genome Research* 19 (1): 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.

Fukuda, Toru, Kaoru Yamagata, Sally Fujiyama, Takahiro Matsumoto, Iori Koshida, Kimihiro Yoshimura, Masatomo Mihara, et al. 2007. “DEAD-Box RNA Helicase Subunits of the Drosha Complex Are Required for Processing of rRNA and a Subset of microRNAs.” *Nature Cell Biology* 9 (5): 604–11. doi:10.1038/ncb1577.

## G

Galiveti, Chenna R, Timofey S Rozhdestvensky, Jürgen Brosius, Hans Lehrach, and Zoltán Konthur. 2010. “Application of Housekeeping npcRNAs for Quantitative Expression Analysis of Human Transcriptome by Real-Time PCR.” *RNA (New York, N.Y.)* 16 (2): 450–61. doi:10.1261/rna.1755810.

Gandin, Valentina, Annarita Miluzio, Anna Maria Barbieri, Anne Beugnet, Hiroaki Kiyokawa, Pier Carlo Marchisio, and Stefano Biffo. 2008. “Eukaryotic Initiation Factor 6 Is Rate-Limiting in Translation, Growth and Transformation.” *Nature* 455 (7213): 684–88. doi:10.1038/nature07267.

Gilad, Shlomit, Eti Meiri, Yariv Yogev, Sima Benjamin, Danit Lebanony, Noga Yerushalmi, Hila Benjamin, et al. 2008. “Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers.” Edited by Simon Williams. *PLoS ONE* 3 (9): e3148. doi:10.1371/journal.pone.0003148.

Gineys, E., P. Garnero, and P. D. Delmas. 2001. “Urinary Excretion of Glucosyl- galactosyl Pyridinoline: A Specific Biochemical Marker of Synovium Degradation.” *Rheumatology* 40 (3): 315–23. doi:10.1093/rheumatology/40.3.315.

Goff, L A, S Boucher, C L Ricupero, S Fenstermacher, M Swerdel, L G Chase, C C Adams, J Chesnut, U Lakshmiopathy, and R P Hart. 2008a. “Differentiating Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Regulate microRNAs: Prediction of microRNA Regulation by PDGF during Osteogenesis.” *Exp Hematol* 36 (10): 1354–69. doi:S0301-472X(08)00226-9 [pii]10.1016/j.exphem.2008.05.004.

———. 2008b. “Differentiating Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Regulate microRNAs: Prediction of microRNA Regulation by PDGF during Osteogenesis.” *Exp Hematol* 36 (10): 1354–69. doi:S0301-



472X(08)00226-9 [pii] 10.1016/j.exphem.2008.05.004.

Gossan, Nicole, Leo Zeef, James Hensman, Alun Hughes, John F Bateman, Lynn Rowley, Christopher B Little, et al. 2013. "The Circadian Clock in Chondrocytes Regulates Genes Controlling Key Aspects of Cartilage Homeostasis." *Arthritis and Rheumatism*, June. doi:10.1002/art.38035.

Green, Victoria A., and Marc S. Weinberg. 2011. "Small RNA-Induced Transcriptional Gene Regulation in Mammals: Mechanisms, Therapeutic Applications, and Scope Within the Genome." In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, edited by Dirk Grimm, Volume 102:11–46. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124157958000052>.

Gregory, R I, K P Yan, G Amuthan, T Chendrimada, B Doratotaj, N Cooch, and R Shiekhattar. 2004. "The Microprocessor Complex Mediates the Genesis of microRNAs." *Nature* 432 (7014): 235–40. doi:nature03120 [pii] 10.1038/nature03120.

Grimson, Andrew, Kyle Kai-How Farh, Wendy K. Johnston, Philip Garrett-Engele, Lee P. Lim, and David P. Bartel. 2007. "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing." *Molecular Cell* 27 (1): 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.

Gruber, Joshua J., D. Steven Zatechka, Leah R. Sabin, Jeongsik Yong, Julian J. Lum, Mei Kong, Wei-Xing Zong, et al. 2009. "Ars2 Links the Nuclear Cap-Binding Complex to RNA Interference and Cell Proliferation." *Cell* 138 (2): 328–39. doi:10.1016/j.cell.2009.04.046.

Guérit, David, Didier Philipot, Paul Chuchana, Karine Toupet, Jean-Marc Brondello, Marc Mathieu, Christian Jorgensen, and Danièle Noël. 2013. "Sox9-Regulated miRNA-574-3p Inhibits Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells." Edited by Pranela Rameshwar. *PLoS ONE* 8 (4): e62582. doi:10.1371/journal.pone.0062582.

Guil, S, and J F Caceres. 2007. "The Multifunctional RNA-Binding Protein hnRNP A1 Is Required for Processing of miR-18a." *Nat Struct Mol Biol* 14 (7): 591–96. doi:nsmb1250 [pii] 10.1038/nsmb1250.

## H

Haase, Astrid D, Lukasz Jaskiewicz, Haidi Zhang, Sébastien Lainé, Ragna Sack, Anne Gatignol, and Witold Filipowicz. 2005. "TRBP, a Regulator of Cellular PKR and HIV-1 Virus Expression, Interacts with Dicer and Functions in RNA Silencing." *EMBO Reports* 6 (10): 961–67. doi:10.1038/sj.embor.7400509.

Ham, Onju, Byeong-Wook Song, Se-Yeon Lee, Eunmi Choi, Min-Ji Cha, Chang Youn Lee, Jun-Hee Park, et al. 2012. "The Role of microRNA-23b in the Differentiation of MSC into Chondrocyte by Targeting Protein Kinase A Signaling." *Biomaterials* 33 (18): 4500–4507. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.025.

Hamilton, Andrew J., and David C. Baulcombe. 1999. "A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants." *Science* 286 (5441): 950–52. doi:10.1126/science.286.5441.950.

Han, J, J S Pedersen, S C Kwon, C D Belair, Y K Kim, K H Yeom, W Y Yang, D Haussler, R Blelloch, and V N Kim. 2009. "Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8." *Cell* 136 (1): 75–84. doi:S0092-8674(08)01490-6 [pii] 10.1016/j.cell.2008.10.053.

Han, Jinju, Yoontae Lee, Kyu-Hyeon Yeom, Jin-Wu Nam, Inha Heo, Je-Keun Rhee, Sun Young Sohn, Yunje Cho, Byoung-Tak Zhang, and V. Narry Kim. 2006. "Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex." *Cell* 125 (5): 887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043.

Han, Jinju, Yoontae Lee, Kyu-Hyun Yeom, Young-Kook Kim, Hua Jin, and V. Narry Kim. 2004. "The Drosha-DGCR8 Complex in Primary microRNA Processing." *Genes & Development* 18 (24): 3016–27. doi:10.1101/gad.1262504.

Harfe, Brian D., Michael T. McManus, Jennifer H. Mansfield, Eran Hornstein, and Clifford J. Tabin. 2005. "The RNaseIII Enzyme Dicer Is Required for Morphogenesis but Not Patterning of the Vertebrate Limb." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31): 10898–903. doi:10.1073/pnas.0504834102.



- Hauptmann, Judith, Anne Dueck, Simone Harlander, Janina Pfaff, Rainer Merkl, and Gunter Meister. 2013. "Turning Catalytically Inactive Human Argonaute Proteins into Active Slicer Enzymes." *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (7): 814–17. doi:10.1038/nsmb.2577.
- Havens, M. A., A. A. Reich, D. M. Duelli, and M. L. Hastings. 2012. "Biogenesis of Mammalian microRNAs by a Non-Canonical Processing Pathway." *Nucleic Acids Research* 40 (10): 4626–40. doi:10.1093/nar/gks026.
- Henrotin, Yves, Shelby Addison, Virginia Kraus, and Michelle Deberg. 2007. "Type II Collagen Markers in Osteoarthritis: What Do They Indicate?" *Current Opinion in Rheumatology* 19 (5): 444–50. doi:10.1097/BOR.0b013e32829fb3b5.
- Henrotin, Yves, Myriam Gharbi, Gabriel Mazzucchelli, Jean-Emile Dubuc, Edwin De Pauw, and Michelle Deberg. 2012. "Fibulin 3 Peptides Fib3-1 and Fib3-2 Are Potential Biomarkers of Osteoarthritis." *Arthritis & Rheumatism* 64 (7): 2260–67. doi:10.1002/art.34392.
- Ho, Andrew M., Michelle D. Johnson, and David M. Kingsley. 2000. "Role of the Mouse Ank Gene in Control of Tissue Calcification and Arthritis." *Science* 289 (5477): 265–70. doi:10.1126/science.289.5477.265.
- Hochberg, M.C. 2012. "Osteoarthritis Year 2012 in Review: Clinical." *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (12): 1465–69. doi:10.1016/j.joca.2012.07.022.
- Hochberg, Marc C., Laura Yerges-Armstrong, Michelle Yau, and Braxton D. Mitchell. 2013. "Genetic Epidemiology of Osteoarthritis: Recent Developments and Future Directions." *Current Opinion in Rheumatology* 25 (2): 192–97. doi:10.1097/BOR.0b013e32835cfb8e.
- Houseley, Jonathan, John LaCava, and David Tollervy. 2006. "RNA-Quality Control by the Exosome." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (7): 529–39. doi:10.1038/nrm1964.
- Huang, Vera, and Long-Cheng Li. 2012. "miRNA Goes Nuclear." *RNA Biology* 9 (3): 269–73. doi:10.4161/rna.19354.
- Humphreys, David T., Belinda J. Westman, David I. K. Martin, and Thomas Preiss. 2005. "MicroRNAs Control Translation Initiation by Inhibiting Eukaryotic Initiation Factor 4E/cap and poly(A) Tail Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (47): 16961–66. doi:10.1073/pnas.0506482102.
- Hunter, David J. 2011. "Pharmacologic Therapy for Osteoarthritis--the Era of Disease Modification." *Nature Reviews. Rheumatology* 7 (1): 13–22. doi:10.1038/nrrheum.2010.178.
- Huntzinger, Eric, Duygu Kuzuoglu-Öztürk, Joerg E Braun, Ana Eulalio, Lara Wohlbold, and Elisa Izaurralde. 2013. "The Interactions of GW182 Proteins with PABP and Deadenylases Are Required for Both Translational Repression and Degradation of miRNA Targets." *Nucleic Acids Research* 41 (2): 978–94. doi:10.1093/nar/gks1078.
- Husa, Matthew, Ru Liu-Bryan, and Robert Terkeltaub. 2010. "Shifting HIFs in Osteoarthritis." *Nature Medicine* 16 (6): 641–44. doi:10.1038/nm0610-641.
- Hwang, Hun-Way, Erik A. Wentzel, and Joshua T. Mendell. 2007. "A Hexanucleotide Element Directs MicroRNA Nuclear Import." *Science* 315 (5808): 97–100. doi:10.1126/science.1136235.
- Hwang, Sang-Gu, Je-Hwang Ryu, Il-Chul Kim, Eek-Hoon Jho, Ho-Chul Jung, Kwonseop Kim, Song-Ja Kim, and Jang-Soo Chun. 2004. "Wnt-7a Causes Loss of Differentiated Phenotype and Inhibits Apoptosis of Articular Chondrocytes via Different Mechanisms." *Journal of Biological Chemistry* 279 (25): 26597–604. doi:10.1074/jbc.M401401200.
- I**
- Ibrahim, Fadia, Linda A Rymarkis, Eun-Jeong Kim, James Becker, Eniko Balassa, Pamela J Green, and Heriberto Cerutti. 2010. "Uridylation of Mature miRNAs and siRNAs by the MUT68 Nucleotidyltransferase Promotes Their Degradation in Chlamydomonas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8): 3906–11. doi:10.1073/pnas.0912632107.



Iliopoulos, D, K N Malizos, P Oikonomou, and A Tsezou. 2008a. "Integrative microRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks." *PLoS One* 3 (11): e3740. doi:10.1371/journal.pone.0003740.

———. 2008b. "Integrative microRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks." *PLoS One* 3 (11): e3740. doi:10.1371/journal.pone.0003740.

Ishizu, Hirotugu, Haruhiko Siomi, and Mikiko C. Siomi. 2012. "Biology of PIWI-Interacting RNAs: New Insights into Biogenesis and Function inside and outside of Germlines." *Genes & Development* 26 (21): 2361–73. doi:10.1101/gad.203786.112.

Iwasaki, Shintaro, and Yukihide Tomari. 2009. "Argonaute-Mediated Translational Repression (and Activation)." *Fly* 3 (3): 204–6.

## J

Jones, S.W., G. Watkins, N. Le Good, S. Roberts, C.L. Murphy, S.M.V. Brockbank, M.R.C. Needham, S.J. Read, and P. Newham. 2009. "The Identification of Differentially Expressed microRNA in Osteoarthritic Tissue That Modulate the Production of TNF- $\alpha$  and MMP13." *Osteoarthritis and Cartilage* 17 (4): 464–72. doi:10.1016/j.joca.2008.09.012.

Joyce, Gerald F. 2002. "The Antiquity of RNA-Based Evolution." *Nature* 418 (6894): 214–21. doi:10.1038/418214a.

## K

Kataoka, N., M. Fujita, and M. Ohno. 2009. "Functional Association of the Microprocessor Complex with the Spliceosome." *Molecular and Cellular Biology* 29 (12): 3243–54. doi:10.1128/MCB.00360-09.

Kawahara, Yukio, Molly Megraw, Edward Kreider, Hisashi Iizasa, Louis Valente, Artemis G Hatzigeorgiou, and Kazuko Nishikura. 2008. "Frequency and Fate of microRNA Editing in Human Brain." *Nucleic Acids Research* 36 (16): 5270–80. doi:10.1093/nar/gkn479.

Kawamata, Tomoko, and Yukihide Tomari. 2010. "Making RISC." *Trends in Biochemical Sciences* 35 (7): 368–76. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009.

Kertesz, Michael, Yue Wan, Elad Mazor, John L Rinn, Robert C Nutter, Howard Y Chang, and Eran Segal. 2010. "Genome-Wide Measurement of RNA Secondary Structure in Yeast." *Nature* 467 (7311): 103–7. doi:10.1038/nature09322.

Khair, Mostafa, Mustapha Bourhim, Lydia Barré, Dong Li, Patrick Netter, Jacques Magdalou, Sylvie Fournel-Gigleux, and Mohamed Ouzzine. 2013. "Regulation of Xylosyltransferase I Gene Expression by Interleukin 1 $\beta$  in Human Primary Chondrocyte Cells: Mechanism and Impact on Proteoglycan Synthesis." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (3): 1774–84. doi:10.1074/jbc.M112.419887.

Kim, Dongkyun, Jinsoo Song, and Eun-Jung Jin. 2010. "MicroRNA-221 Regulates Chondrogenic Differentiation through Promoting Proteosomal Degradation of Slug by Targeting Mdm2." *Journal of Biological Chemistry* 285 (35): 26900–907. doi:10.1074/jbc.M110.115105.

Kim, Dongkyun, Jinsoo Song, Sunhyo Kim, Churl-Hong Chun, and Eun-Jung Jin. 2011. "MicroRNA-34a Regulates Migration of Chondroblast and IL-1 $\beta$ -Induced Degeneration of Chondrocytes by Targeting EphA5." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415 (4): 551–57. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.087.

Kim, John, Anna Krichevsky, Yonatan Grad, Gabriel D Hayes, Kenneth S Kosik, George M Church, and Gary Ruvkun. 2004. "Identification of Many microRNAs That Copurify with Polyribosomes in Mammalian Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (1): 360–65. doi:10.1073/pnas.2333854100.

Kim, Jongpil, Keiichi Inoue, Jennifer Ishii, William B. Vanti, Sergey V. Voronov, Elizabeth Murchison, Gregory Hannon, and Asa Abeliovich. 2007. "A MicroRNA Feedback Circuit in Midbrain Dopamine Neurons." *Science* 317 (5842): 1220–24. doi:10.1126/science.1140481.





- Kim, Y K, and V N Kim. 2007. "Processing of Intronic microRNAs." *EMBO J* 26 (3): 775–83. doi:7601512 [pii] 10.1038/sj.emboj.7601512.
- Kinch, Lisa N, and Nick V Grishin. 2009. "The Human Ago2 MC Region Does Not Contain an eIF4E-like mRNA Cap Binding Motif." *Biology Direct* 4 (1): 2. doi:10.1186/1745-6150-4-2.
- Kiriakidou, Marianthi, Grace S. Tan, Styliani Lamprinaki, Mariangels De Planell-Saguer, Peter T. Nelson, and Zissimos Mourelatos. 2007. "An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation." *Cell* 129 (6): 1141–51. doi:10.1016/j.cell.2007.05.016.
- Kishore, S, A Khanna, and S Stamm. 2008. "Rapid Generation of Splicing Reporters with pSpliceExpress." *Gene* 427 (1-2): 104–10. doi:S0378-1119(08)00477-0 [pii] 10.1016/j.gene.2008.09.021.
- Kishore, Shivendra, Andreas R Gruber, Dominik J Jedlinski, Afzal P Syed, Hadi Jorjani, and Mihaela Zavolan. 2013. "Insights into snoRNA Biogenesis and Processing from PAR-CLIP of snoRNA Core Proteins and Small RNA Sequencing." *Genome Biology* 14 (5): R45. doi:10.1186/gb-2013-14-5-r45.
- Kojima, Fumiaki, Hiroaki Naraba, Satoshi Miyamoto, Moroe Beppu, Haruhito Aoki, and Shinichi Kawai. 2004. "Membrane-Associated Prostaglandin E Synthase-1 Is Upregulated by Proinflammatory Cytokines in Chondrocytes from Patients with Osteoarthritis." *Arthritis Research & Therapy* 6 (4): R355–365. doi:10.1186/ar1195.
- Kongcharoensombat, Wirat, Tomoyuki Nakasa, Masakazu Ishikawa, Atsuo Nakamae, Masataka Deie, Nobuo Adachi, Abouheif Mohamed, and Mitsuo Ochi. 2010. "The Effect of microRNA-21 on Proliferation and Matrix Synthesis of Chondrocytes Embedded in Atelocollagen Gel." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18 (12): 1679–84. doi:10.1007/s00167-010-1111-7.
- Kornblihtt, Alberto R, Ignacio E Schor, Mariano Alló, Gwendal Dujardin, Ezequiel Petrillo, and Manuel J Muñoz. 2013. "Alternative Splicing: A Pivotal Step between Eukaryotic Transcription and Translation." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (3): 153–65. doi:10.1038/nrm3525.
- Kozioł, Agnieszka, Mara Martín-Alonso, Cristina Clemente, Pilar Gonzalo, and Alicia G. Arroyo. 2012. "Site-Specific Cellular Functions of MT1-MMP." *European Journal of Cell Biology* 91 (11–12): 889–95. doi:10.1016/j.ejcb.2012.07.003.
- Krek, Azra, Dominic Grün, Matthew N Poy, Rachel Wolf, Lauren Rosenberg, Eric J Epstein, Philip MacMenamin, et al. 2005. "Combinatorial microRNA Target Predictions." *Nature Genetics* 37 (5): 495–500. doi:10.1038/ng1536.
- Krol, Jacek, Inga Loedige, and Witold Filipowicz. 2010. "The Widespread Regulation of microRNA Biogenesis, Function and Decay." *Nature Reviews Genetics* 11 (9): 597–610. doi:10.1038/nrg2843.
- Kronenberg, Henry M. 2003. "Developmental Regulation of the Growth Plate." *Nature* 423 (6937): 332–36. doi:10.1038/nature01657.
- Krützfeldt, Jan, Nikolaus Rajewsky, Ravi Braich, Kallanthottathil G Rajeev, Thomas Tuschl, Muthiah Manoharan, and Markus Stoffel. 2005. "Silencing of microRNAs in Vivo with 'Antagomirs.'" *Nature* 438 (7068): 685–89. doi:10.1038/nature04303.
- Kulkarni, Meeta, Sevim Ozgur, and Georg Stoecklin. 2010. "On Track with P-Bodies." *Biochemical Society Transactions* 38 (1): 242. doi:10.1042/BST0380242.
- Kurz, Bodo, Angelika Lemke, Melanie Kehn, Christian Domm, Parth Patwari, Eliot H. Frank, Alan J. Grodzinsky, and Michael Schünke. 2004. "Influence of Tissue Maturation and Antioxidants on the Apoptotic Response of Articular Cartilage after Injurious Compression." *Arthritis & Rheumatism* 50 (1): 123–30. doi:10.1002/art.11438.

L

Larsen, William. 2003. *Embryologie humaine*. De Boeck Supérieur.



- Lau, Nelson C., Lee P. Lim, Earl G. Weinstein, and David P. Bartel. 2001. "An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis Elegans*." *Science* 294 (5543): 858–62. doi:10.1126/science.1065062.
- Le Pen, Claude, Camille Reygrobellet, and Isabelle Gérentes. 2005. "Les Conséquences Socioéconomiques de L'arthrose En France.  tude COART France." *Revue Du Rhumatisme* 72 (12): 1326–30. doi:10.1016/j.rhum.2005.01.016.
- Lee, E. J., M. Baek, Y. Gusev, D. J. Brackett, G. J. Nuovo, and T. D. Schmittgen. 2007. "Systematic Evaluation of microRNA Processing Patterns in Tissues, Cell Lines, and Tumors." *RNA* 14 (1): 35–42. doi:10.1261/rna.804508.
- Lee, Ho Young, Kaihong Zhou, Alison Marie Smith, Cameron L. Noland, and Jennifer A. Doudna. 2013. "Differential Roles of Human Dicer-Binding Proteins TRBP and PACT in Small RNA Processing." *Nucleic Acids Research* 41 (13): 6568–76. doi:10.1093/nar/gkt361.
- Lee, Rosalind C., Rhonda L. Feinbaum, and Victor Ambros. 1993. "The *C. Elegans* Heterochronic Gene *Lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*." *Cell* 75 (5): 843–54. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- Lee, Y S, and C M Chuong. 1997. "Activation of Protein Kinase A Is a Pivotal Step Involved in Both BMP-2- and Cyclic AMP-Induced Chondrogenesis." *Journal of Cellular Physiology* 170 (2): 153–65. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199702)170:2<153::AID-JCP7>3.0.CO;2-N.
- Lee, Y. 2002. "MicroRNA Maturation: Stepwise Processing and Subcellular Localization." *The EMBO Journal* 21 (17): 4663–70. doi:10.1093/emboj/cdf476.
- Lee, Yoontae, Chiyoungh Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, et al. 2003. "The Nuclear RNase III Droscha Initiates microRNA Processing." *Nature* 425 (6956): 415–19. doi:10.1038/nature01957.
- Lee, Yoontae, Inha Hur, Seong-Yeon Park, Young-Kook Kim, Mi Ra Suh, and V Narry Kim. 2006. "The Role of PACT in the RNA Silencing Pathway." *The EMBO Journal* 25 (3): 522–32. doi:10.1038/sj.emboj.7600942.
- Leuschner, Philipp J F, Stefan L Ameres, Stephanie Kueng, and Javier Martinez. 2006. "Cleavage of the siRNA Passenger Strand during RISC Assembly in Human Cells." *EMBO Reports* 7 (3): 314–20. doi:10.1038/sj.embor.7400637.
- Lewis, Benjamin P, Christopher B Burge, and David P Bartel. 2005. "Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are microRNA Targets." *Cell* 120 (1): 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035.
- Li, Jing, Jingang Huang, Liming Dai, Degang Yu, Qian Chen, Xiaoling Zhang, and Kerong Dai. 2012. "miR-146a, an IL-1  Responsive miRNA, Induces Vascular Endothelial Growth Factor and Chondrocyte Apoptosis by Targeting Smad4." *Arthritis Research & Therapy* 14 (2): R75. doi:10.1186/ar3798.
- Li, Keguo, and Ramani Ramchandran. 2010. "Natural Antisense Transcript: A Concomitant Engagement with Protein-Coding Transcript." *Oncotarget* 1 (6): 447–52.
- Li, Xin, Gary Gibson, Jae-Sung Kim, Jeffrey Kroin, Shunbin Xu, Andre J van Wijnen, and Hee-Jeong Im. 2011. "MicroRNA-146a Is Linked to Pain-Related Pathophysiology of Osteoarthritis." *Gene* 480 (1-2): 34–41. doi:10.1016/j.gene.2011.03.003.
- Lin, Edward A., Li Kong, Xiao-Hui Bai, Yi Luan, and Chuan-ju Liu. 2009. "miR-199a\*, a Bone Morphogenic Protein 2-Responsive MicroRNA, Regulates Chondrogenesis via Direct Targeting to Smad1." *Journal of Biological Chemistry* 284 (17): 11326–35. doi:10.1074/jbc.M807709200.
- Liu, Jidong, Michelle A. Carmell, Fabiola V. Rivas, Carolyn G. Marsden, J. Michael Thomson, Ji-Joon Song, Scott M. Hammond, Leemor Joshua-Tor, and Gregory J. Hannon. 2004. "Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi." *Science* 305 (5689): 1437–41. doi:10.1126/science.1102513.





Livak, K J, and T D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262 S1046-2023(01)91262-9 [pii].

Lotz, Martin K., and Beatriz Caramés. 2011. "Autophagy and Cartilage Homeostasis Mechanisms in Joint Health, Aging and OA." *Nature Reviews Rheumatology*, August. doi:10.1038/nrrheum.2011.109.

Lund, Elsebet, Stephan Güttinger, Angelo Calado, James E. Dahlberg, and Ulrike Kutay. 2004. "Nuclear Export of MicroRNA Precursors." *Science* 303 (5654): 95–98. doi:10.1126/science.1090599.

## M

Mackenzie, N.C.W., C. Huesa, F. Rutsch, and V.E. MacRae. 2012. "New Insights into NPP1 Function: Lessons from Clinical and Animal Studies." *Bone* 51 (5): 961–68. doi:10.1016/j.bone.2012.07.014.

Marsico, Annalisa, Matthew R Huska, Julia Lasserre, Haiyang Hu, Dubravka Vucicevic, Anne Musahl, Ulf Orom, and Martin Vingron. 2013. "PROmiRNA: A New miRNA Promoter Recognition Method Uncovers the Complex Regulation of Intronic miRNAs." *Genome Biology* 14 (8): R84. doi:10.1186/gb-2013-14-8-r84.

Mastbergen, Simon C, Daniël B F Saris, and Floris P J G Lafeber. 2013. "Functional Articular Cartilage Repair: Here, Near, or Is the Best Approach Not yet Clear?" *Nature Reviews. Rheumatology* 9 (5): 277–90. doi:10.1038/nrrheum.2013.29.

Mathivanan, Suresh, Cassie J Fahner, Gavin E Reid, and Richard J Simpson. 2012. "ExoCarta 2012: Database of Exosomal Proteins, RNA and Lipids." *Nucleic Acids Research* 40 (Database issue): D1241–1244. doi:10.1093/nar/gkr828.

Matunis, M. J., W. M. Michael, and G. Dreyfuss. 1992. "Characterization and Primary Structure of the poly(C)-Binding Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Complex K Protein." *Molecular and Cellular Biology* 12 (1): 164.

Maute, Roy L, Christof Schneider, Pavel Sumazin, Antony Holmes, Andrea Califano, Katia Basso, and Riccardo Dalla-Favera. 2013. "tRNA-Derived microRNA Modulates Proliferation and the DNA Damage Response and Is down-Regulated in B Cell Lymphoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4): 1404–9. doi:10.1073/pnas.1206761110.

McAlinden, Audrey, Nobish Varghese, Louisa Wirthlin, and Li-Wei Chang. 2013. "Differentially Expressed microRNAs in Chondrocytes from Distinct Regions of Developing Human Cartilage." *PloS One* 8 (9): e75012. doi:10.1371/journal.pone.0075012.

Meister, Gunter, Markus Landthaler, Agnieszka Patkaniowska, Yair Dorsett, Grace Teng, and Thomas Tuschl. 2004. "Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs." *Molecular Cell* 15 (2): 185–97. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007.

Melo, Sonia A., Catia Moutinho, Santiago Ropero, George A. Calin, Simona Rossi, Riccardo Spizzo, Agustin F. Fernandez, et al. 2010. "A Genetic Defect in Exportin-5 Traps Precursor MicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells." *Cancer Cell* 18 (4): 303–15. doi:10.1016/j.ccr.2010.09.007.

Miluzio, Annarita, Anne Beugnet, Viviana Volta, and Stefano Biffo. 2009. "Eukaryotic Initiation Factor 6 Mediates a Continuum between 60S Ribosome Biogenesis and Translation." *EMBO Reports* 10 (5): 459–65. doi:10.1038/embor.2009.70.

Miyaki, Shigeru, Tomoyuki Nakasa, Shuhei Otsuki, Shawn P. Grogan, Reiji Higashiyama, Atsushi Inoue, Yoshio Kato, Tempei Sato, Martin K. Lotz, and Hiroshi Asahara. 2009. "MicroRNA-140 Is Expressed in Differentiated Human Articular Chondrocytes and Modulates Interleukin-1 Responses." *Arthritis & Rheumatism* 60 (9): 2723–30. doi:10.1002/art.24745.

Molotski, Natali, and Yoav Soen. 2012. "Differential Association of microRNAs with Polysomes Reflects Distinct Strengths of Interactions with Their mRNA Targets." *RNA* 18 (9): 1612–23. doi:10.1261/rna.033142.112.



Moss, Eric G, Rosalind C Lee, and Victor Ambros. 1997. "The Cold Shock Domain Protein LIN-28 Controls Developmental Timing in *C. Elegans* and Is Regulated by the Lin-4 RNA." *Cell* 88 (5): 637–46. doi:10.1016/S0092-8674(00)81906-6.

Murata, Koichi, Hiroyuki Yoshitomi, Shimei Tanida, Masahiro Ishikawa, Kohei Nishitani, Hiromu Ito, and Takashi Nakamura. 2010. "Plasma and Synovial Fluid microRNAs as Potential Biomarkers of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis." *Arthritis Research & Therapy* 12 (3): R86. doi:10.1186/ar3013.

## N

Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen. 1990. "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans." *The Plant Cell* 2 (4): 279–89. doi:10.1105/tpc.2.4.279.

Narisawa, Sonoko, Nils Fröhlander, and José Luis Millán. 1997. "Inactivation of Two Mouse Alkaline Phosphatase Genes and Establishment of a Model of Infantile Hypophosphatasia." *Developmental Dynamics* 208 (3): 432–46. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<432::AID-AJA13>3.0.CO;2-1.

Nasser, Mohd W., Jharna Datta, Gerard Nuovo, Huban Kutay, Tasneem Motiwala, Sarmila Majumder, Bo Wang, Saul Suster, Samson T. Jacob, and Kalpana Ghoshal. 2008. "Down-Regulation of Micro-RNA-1 (miR-1) in Lung Cancer SUPPRESSION OF TUMORIGENIC PROPERTY OF LUNG CANCER CELLS AND THEIR SENSITIZATION TO DOXORUBICIN-INDUCED APOPTOSIS BY miR-1." *Journal of Biological Chemistry* 283 (48): 33394–405. doi:10.1074/jbc.M804788200.

Nemirovskiy, O.V., D.R. Dufield, T. Sunyer, P. Aggarwal, D.J. Welsch, and W.R. Mathews. 2007. "Discovery and Development of a Type II Collagen Neoepitope (TIINE) Biomarker for Matrix Metalloproteinase Activity: From in Vitro to in Vivo." *Analytical Biochemistry* 361 (1): 93–101. doi:10.1016/j.ab.2006.10.034.

Neogi, Tuhina, and Yuqing Zhang. 2013. "Epidemiology of Osteoarthritis." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 39 (1): 1–19. doi:10.1016/j.rdc.2012.10.004.

Nicolas, Francisco Esteban, Helio Pais, Frank Schwach, Morten Lindow, Sakari Kauppinen, Vincent Moulton, and Tamas Dalmay. 2008. "Experimental Identification of microRNA-140 Targets by Silencing and Overexpressing miR-140." *RNA* 14 (12): 2513–20. doi:10.1261/rna.1221108.

Nielsen, Cydney B., Noam Shomron, Rickard Sandberg, Eran Hornstein, Jacob Kitzman, and Christopher B. Burge. 2007. "Determinants of Targeting by Endogenous and Exogenous microRNAs and siRNAs." *RNA* 13 (11): 1894–1910. doi:10.1261/rna.768207.

Nishi, Kenji, Ai Nishi, Tatsuya Nagasawa, and Kumiko Ui-Tei. 2013. "Human TNRC6A Is an Argonaute-Navigator Protein for microRNA-Mediated Gene Silencing in the Nucleus." *RNA* 19 (1): 17–35. doi:10.1261/rna.034769.112.

Nishihara, T., L. Zekri, J. E. Braun, and E. Izaurralde. 2013. "miRISC Recruits Decapping Factors to miRNA Targets to Enhance Their Degradation." *Nucleic Acids Research* 41 (18): 8692–8705. doi:10.1093/nar/gkt619.

Nishizawa, Mikio, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya, and Tominori Kimura. 2012. "Regulation of Inducible Gene Expression by Natural Antisense Transcripts." *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 17: 938–58.

Nottrott, Stephanie, Martin J. Simard, and Joel D. Richter. 2006. "Human Let-7a miRNA Blocks Protein Production on Actively Translating Polyribosomes." *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (12): 1108–14. doi:10.1038/nsmb1173.

## O

Okada, Chimari, Eiki Yamashita, Soo Jae Lee, Satoshi Shibata, Jun Katahira, Atsushi Nakagawa, Yoshihiro Yoneda, and Tomitake Tsukihara. 2009. "A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery." *Science* 326 (5957): 1275–79. doi:10.1126/science.1178705.

Okuhara, Atsushi, Tomoyuki Nakasa, Hayatoshi Shibuya, Takuya Niimoto, Nobuo Adachi, Masataka Deie, and Mitsuo Ochi. 2012. "Changes in microRNA Expression in Peripheral Mononuclear Cells according to the



Progression of Osteoarthritis.” *Modern Rheumatology* 22 (3): 446–57. doi:10.1007/s10165-011-0536-2.

Ono, M, M S Scott, K Yamada, F Avolio, G J Barton, and A I Lamond. 2011. “Identification of Human miRNA Precursors That Resemble Box C/D snoRNAs.” *Nucleic Acids Res* 39 (9): 3879–91. doi:10.1093/nar/gkq1355 [pii] 10.1093/nar/gkq1355.

## P

Paik, Seungil, Ho Sun Jung, Seulgi Lee, Dong Suk Yoon, Min Sung Park, and Jin Woo Lee. 2012. “miR-449a Regulates the Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells Through Direct Targeting of Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1.” *Stem Cells and Development* 21 (18): 3298–3308. doi:10.1089/scd.2011.0732.

Pais, Helio, Francisco Esteban Nicolas, Surinder M. Soond, Tracey E. Swingler, Ian M. Clark, Andrew Chantry, Vincent Moulton, and Tamas Dalmay. 2010. “Analyzing mRNA Expression Identifies Smad3 as a microRNA-140 Target Regulated Only at Protein Level.” *RNA* 16 (3): 489–94. doi:10.1261/rna.1701210.

Peltier, Heidi J, and Gary J Latham. 2008. “Normalization of microRNA Expression Levels in Quantitative RT-PCR Assays: Identification of Suitable Reference RNA Targets in Normal and Cancerous Human Solid Tissues.” *RNA (New York, N.Y.)* 14 (5): 844–52. doi:10.1261/rna.939908.

Peters, I R, C R Helps, E J Hall, and M J Day. 2004. “Real-Time RT-PCR: Considerations for Efficient and Sensitive Assay Design.” *Journal of Immunological Methods* 286 (1-2): 203–17. doi:10.1016/j.jim.2004.01.003.

Petersen, Christian P., Marie-Eve Bordeleau, Jerry Pelletier, and Phillip A. Sharp. 2006. “Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells.” *Molecular Cell* 21 (4): 533–42. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.031.

Pfaffl, Michael W, Ales Tichopad, Christian Prgomet, and Tanja P Neuvians. 2004. “Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper–Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations.” *Biotechnology Letters* 26 (6): 509–15.

Pillai, Ramesh S., Suvendra N. Bhattacharyya, Caroline G. Artus, Tabea Zoller, Nicolas Cougot, Eugenia Basyuk, Edouard Bertrand, and Witold Filipowicz. 2005. “Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells.” *Science* 309 (5740): 1573–76. doi:10.1126/science.1115079.

Poleni, P. E., A. Bianchi, S. Etienne, M. Koufany, S. Sebillaud, P. Netter, B. Terlain, and J. Y. Jouzeau. 2007. “Agonists of Peroxisome Proliferators-Activated Receptors (PPAR) A, B/δ or γ Reduce Transforming Growth Factor (TGF)-B-Induced Proteoglycans’ Production in Chondrocytes.” *Osteoarthritis and Cartilage* 15 (5): 493–505. doi:10.1016/j.joca.2006.10.009.

Quarles, Kaycee A, Debashish Sahu, Mallory A Havens, Ellen R Forsyth, Christopher Wostenberg, Michelle L Hastings, and Scott A Showalter. 2013. “Ensemble Analysis of Primary microRNA Structure Reveals an Extensive Capacity to Deform near the Drosha Cleavage Site.” *Biochemistry* 52 (5): 795–807. doi:10.1021/bi301452a.

Radonić, Aleksandar, Stefanie Thulke, Ian M Mackay, Olfert Landt, Wolfgang Siebert, and Andreas Nitsche. 2004. “Guideline to Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (4): 856–62. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.177.

Ramachandran, Vanitharani, and Xuemei Chen. 2008. “Degradation of microRNAs by a Family of Exoribonucleases in Arabidopsis.” *Science (New York, N.Y.)* 321 (5895): 1490–92. doi:10.1126/science.1163728.

Reyes~Herrera, Paula H., and Elisa Ficarra. 2012. “One Decade of Development and Evolution of MicroRNA Target Prediction Algorithms.” *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 10 (5): 254–63. doi:10.1016/j.gpb.2012.10.001.

Reynard, Louise N., and John Loughlin. 2013. “The Genetics and Functional Analysis of Primary Osteoarthritis Susceptibility.” *Expert Reviews in Molecular Medicine* 15 (February). doi:10.1017/erm.2013.4.

Ritchie, William, Stephane Flamant, and John E J Rasko. 2009. “Predicting microRNA Targets and Functions: Traps for the Unwary.” *Nature Methods* 6 (6): 397–98. doi:10.1038/nmeth0609-397.



Rivas, Fabiola V, Niraj H Tolia, Ji-Joon Song, Juan P Aragon, Jidong Liu, Gregory J Hannon, and Leemor Joshua-Tor. 2005. "Purified Argonaute2 and an siRNA Form Recombinant Human RISC." *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (4): 340–49. doi:10.1038/nsmb918.

Rodriguez, Antony, Sam Griffiths-Jones, Jennifer L. Ashurst, and Allan Bradley. 2004. "Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units." *Genome Research* 14 (10a): 1902–10. doi:10.1101/gr.2722704.

Rousseau, J.Ch., and P. Garnero. 2012. "Biological Markers in Osteoarthritis." *Bone* 51 (2): 265–77. doi:10.1016/j.bone.2012.04.001.

Ruby, J. Graham, Calvin H. Jan, and David P. Bartel. 2007. "Intronic microRNA Precursors That Bypass Drosha Processing." *Nature* 448 (7149): 83–86. doi:10.1038/nature05983.

Rüegger, Stefan, and Helge Großhans. 2012. "MicroRNA Turnover: When, How, and Why." *Trends in Biochemical Sciences* 37 (10): 436–46. doi:10.1016/j.tibs.2012.07.002.

Ryu, Je-Hwang, Song-Ja Kim, Seon-Hee Kim, Chun-Do Oh, Sang-Gu Hwang, Churl-Hong Chun, Seung-Hyun Oh, Je-Kyung Seong, Tae-Lin Huh, and Jang-Soo Chun. 2002. "Regulation of the Chondrocyte Phenotype by Beta-Catenin." *Development (Cambridge, England)* 129 (23): 5541–50.

## S

Saito, Yoshimasa, Gangning Liang, Gerda Egger, Jeffrey M. Friedman, Jody C. Chuang, Gerhard A. Coetzee, and Peter A. Jones. 2006. "Specific Activation of microRNA-127 with Downregulation of the Proto-Oncogene BCL6 by Chromatin-Modifying Drugs in Human Cancer Cells." *Cancer Cell* 9 (6): 435–43. doi:10.1016/j.ccr.2006.04.020.

Sakamoto, Shuji, Kazuma Aoki, Takuma Higuchi, Hiroshi Todaka, Keiko Morisawa, Nobuyuki Tamaki, Etsuro Hatano, Atsuki Fukushima, Taketoshi Taniguchi, and Yasutoshi Agata. 2009. "The NF90-NF45 Complex Functions as a Negative Regulator in the MicroRNA Processing Pathway." *Molecular and Cellular Biology* 29 (13): 3754–69. doi:10.1128/MCB.01836-08.

Sambrook, J, EF Fritsch, and T Maniatis. 1989. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual." In Vol. 1–3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scanzello, Carla R, and Steven R Goldring. 2012. "The Role of Synovitis in Osteoarthritis Pathogenesis." *Bone* 51 (2): 249–57. doi:10.1016/j.bone.2012.02.012.

Schirle, Nicole T., and Ian J. MacRae. 2012. "The Crystal Structure of Human Argonaute2." *Science* 336 (6084): 1037–40. doi:10.1126/science.1221551.

Schmittgen, Thomas D, and Brian A Zakrajsek. 2000. "Effect of Experimental Treatment on Housekeeping Gene Expression: Validation by Real-Time, Quantitative RT-PCR." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46 (1–2): 69–81. doi:10.1016/S0165-022X(00)00129-9.

Schwarz, Dianne S., György Hutvagner, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, and Phillip D. Zamore. 2003. "Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex." *Cell* 115 (2): 199–208. doi:10.1016/S0092-8674(03)00759-1.

Scott, Michelle S., and Motoharu Ono. 2011. "From snoRNA to miRNA: Dual Function Regulatory Non-Coding RNAs." *Biochimie* 93 (11): 1987–92. doi:10.1016/j.biochi.2011.05.026.

Selbach, Matthias, Björn Schwanhäusser, Nadine Thierfelder, Zhuo Fang, Raya Khanin, and Nikolaus Rajewsky. 2008. "Widespread Changes in Protein Synthesis Induced by microRNAs." *Nature* 455 (7209): 58–63. doi:10.1038/nature07228.

Sethupathy, Praveen. 2013. "Illuminating microRNA Transcription from the Epigenome." *Current Genomics* 14 (1): 68–77. doi:10.2174/138920213804999183.



- Shang, Jin, Huan Liu, and Yue Zhou. 2013. "Roles of microRNAs in Prenatal Chondrogenesis, Postnatal Chondrogenesis and Cartilage-Related Diseases." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17 (12): 1515–24. doi:10.1111/jcmm.12161.
- Shin, Chanseok, Jin-Wu Nam, Kyle Kai-How Farh, H Rosaria Chiang, Alena Shkumatava, and David P Bartel. 2010. "Expanding the microRNA Targeting Code: Functional Sites with Centered Pairing." *Molecular Cell* 38 (6): 789–802. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.005.
- Shukunami, C, K Ishizeki, T Atsumi, Y Ohta, F Suzuki, and Y Hiraki. 1997. "Cellular Hypertrophy and Calcification of Embryonal Carcinoma-Derived Chondrogenic Cell Line ATDC5 in Vitro." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (8): 1174–88. doi:10.1359/jbmr.1997.12.8.1174.
- Singh, Purva, and Jean E. Schwarzbauer. 2012. "Fibronectin and Stem Cell Differentiation – Lessons from Chondrogenesis." *Journal of Cell Science* 125 (16): 3703–12. doi:10.1242/jcs.095786.
- Sobala, Andrew, and Gyorgy Hutvagner. 2011. "Transfer RNA-Derived Fragments: Origins, Processing, and Functions." *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 2 (6): 853–62. doi:10.1002/wrna.96.
- Song, Buer, Kristine D. Estrada, and Karen M. Lyons. 2009. "Smad Signaling in Skeletal Development and Regeneration." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (5–6): 379–88. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.010.
- Song, Ji-Joon, Stephanie K Smith, Gregory J Hannon, and Leemor Joshua-Tor. 2004. "Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5689): 1434–37. doi:10.1126/science.1102514.
- Song, Jinsoo, Dongkyun Kim, Churl-Hong Chun, and Eun-Jung Jin. 2013. "MicroRNA-375, a New Regulator of Cadherin-7, Suppresses the Migration of Chondrogenic Progenitors." *Cellular Signalling* 25 (3): 698–706. doi:10.1016/j.cellsig.2012.11.014.
- Song, Jinsoo, Dongkyun Kim, and Eun-Jung Jin. 2011. "MicroRNA-488 Suppresses Cell Migration through Modulation of the Focal Adhesion Activity during Chondrogenic Differentiation of Chick Limb Mesenchymal Cells." *Cell Biology International* 35 (2): 179–85. doi:10.1042/CBI20100204.
- Song, Jinsoo, Myeungsu Lee, Dongkyun Kim, Jiyeon Han, Churl-Hong Chun, and Eun-Jung Jin. 2013. "MicroRNA-181b Regulates Articular Chondrocytes Differentiation and Cartilage Integrity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431 (2): 210–14. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.133.
- Sugita, Atsushi, Shinji Kawai, Tetsuyuki Hayashibara, Atsuo Amano, Takashi Ooshima, Toshimi Michigami, Hideki Yoshikawa, and Toshiyuki Yoneda. 2011. "Cellular ATP Synthesis Mediated by Type III Sodium-Dependent Phosphate Transporter Pit-1 Is Critical to Chondrogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 286 (4): 3094–3103. doi:10.1074/jbc.M110.148403.
- Sumiyoshi, Kumi, Satoshi Kubota, Toshihiro Ohgawara, Kazumi Kawata, Tarek Abd El Kader, Takashi Nishida, Nao Ikeda, Tsuyoshi Shimo, Takashi Yamashiro, and Masaharu Takigawa. 2013. "Novel Role of miR-181a in Cartilage Metabolism." *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (9): 2094–2100. doi:10.1002/jcb.24556.
- Sun, F, J Wang, Q Pan, Y Yu, Y Zhang, Y Wan, X Li, and A Hong. 2009. "Characterization of Function and Regulation of miR-24-1 and miR-31." *Biochem Biophys Res Commun* 380 (3): 660–65. doi:S0006-291X(09)00202-2 [pii] 10.1016/j.bbrc.2009.01.161.
- Suomi, Salla, Hanna Taipaleenmaki, Anne Seppanen, Tommi Ripatti, Kalervo Vaananen, Teuvo Hentunen, Anna-Marja Saamanen, and Tiina Laitala-Leinonen. 2008. "MicroRNAs Regulate Osteogenesis and Chondrogenesis of Mouse Bone Marrow Stromal Cells." *Gene Regulation and Systems Biology* 2 (April): 177–91.
- Suri, Pradeep, David C. Morgenroth, and David J. Hunter. 2012. "Epidemiology of Osteoarthritis and Associated Comorbidities." *PM&R* 4 (5, Supplement): S10–S19. doi:10.1016/j.pmrj.2012.01.007.
- Suzuki, Hiroshi I., Kaoru Yamagata, Koichi Sugimoto, Takashi Iwamoto, Shigeaki Kato, and Kohei Miyazono. 2009. "Modulation of microRNA Processing by p53." *Nature* 460 (7254): 529–33. doi:10.1038/nature08199.





Swanson, M S, and G Dreyfuss. 1988. "Classification and Purification of Proteins of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Particles by RNA-Binding Specificities." *Molecular and Cellular Biology* 8 (5): 2237–41.

Swingler, Tracey E., Guy Wheeler, Virginia Carmont, Hannah R. Elliott, Matthew J. Barter, Muhammad Abu-Elmagd, Simon T. Donell, et al. 2012. "The Expression and Function of microRNAs in Chondrogenesis and Osteoarthritis." *Arthritis & Rheumatism* 64 (6): 1909–19. doi:10.1002/art.34314.

## T

Tagawa, Hiroyuki, Kennosuke Karube, Shinobu Tsuzuki, Kouich Ohshima, and Masao Seto. 2007. "Synergistic Action of the microRNA-17 Polycistron and Myc in Aggressive Cancer Development." *Cancer Science* 98 (9): 1482–90. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00531.x.

Tan, Lujian, Haibing Peng, Makoto Osaki, Bob K Choy, Philip E Auron, Linda J Sandell, and Mary B Goldring. 2003. "Egr-1 Mediates Transcriptional Repression of COL2A1 Promoter Activity by Interleukin-1beta." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (20): 17688–700. doi:10.1074/jbc.M301676200.

Tardif, Ginette, David Hum, Jean-Pierre Pelletier, Nicolas Duval, and Johanne Martel-Pelletier. 2009. "Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 Genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in Human Osteoarthritic Chondrocytes." *BMC Musculoskeletal Disorders* 10 (November): 148. doi:10.1186/1471-2474-10-148.

Tarun, Salvador Z., Sandra E. Wells, Julie A. Deardorff, and Alan B. Sachs. 1997. "Translation Initiation Factor eIF4G Mediates in Vitro poly(A) Tail-Dependent Translation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (17): 9046–51.

Thomas, Marshall, Judy Lieberman, and Ashish Lal. 2010. "Desperately Seeking microRNA Targets." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10): 1169–74. doi:10.1038/nsmb.1921.

Trabucchi, M, P Briata, M Garcia-Mayoral, A D Haase, W Filipowicz, A Ramos, R Gherzi, and M G Rosenfeld. 2009. "The RNA-Binding Protein KSRP Promotes the Biogenesis of a Subset of microRNAs." *Nature* 459 (7249): 1010–14. doi:nature08025 [pii] 10.1038/nature08025.

Troeberg, Linda, and Hideaki Nagase. 2012. "Proteases Involved in Cartilage Matrix Degradation in Osteoarthritis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824 (1): 133–45. doi:10.1016/j.bbapap.2011.06.020.

Turchinovich, Andrey, Ludmila Weiz, Anne Langheinz, and Barbara Burwinkel. 2011. "Characterization of Extracellular Circulating microRNA." *Nucleic Acids Research* 39 (16): 7223–33. doi:10.1093/nar/gkr254.

## V

Valadi, Hadi, Karin Ekström, Apostolos Bossios, Margareta Sjöstrand, James J Lee, and Jan O Lötvall. 2007. "Exosome-Mediated Transfer of mRNAs and microRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells." *Nature Cell Biology* 9 (6): 654–59. doi:10.1038/ncb1596.

Van Rooij, E. 2011. "The Art of MicroRNA Research." *Circulation Research* 108 (2): 219–34. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227496.

Vasudevan, Shobha. 2012. "Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3 (3): 311–30. doi:10.1002/wrna.121.

Vasudevan, Shobha, Yingchun Tong, and Joan A Steitz. 2007. "Switching from Repression to Activation: microRNAs Can up-Regulate Translation." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1931–34. doi:10.1126/science.1149460.

Venkatesan, Narayanan, Lydia Barré, Mustapha Bourhim, Jacques Magdalou, Didier Mainard, Patrick Netter, Sylvie Fournel-Gigleux, and Mohamed Ouzzine. 2012. "Xylosyltransferase-I Regulates Glycosaminoglycan Synthesis during the Pathogenic Process of Human Osteoarthritis." *PloS One* 7 (3): e34020. doi:10.1371/journal.pone.0034020.

Viswanathan, Srinivas R., and George Q. Daley. 2010. "Lin28: A MicroRNA Regulator with a Macro Role."



*Cell* 140 (4): 445–49. doi:10.1016/j.cell.2010.02.007.

## W

Wang, X., X. Xu, Z. Ma, Y. Huo, Z. Xiao, Y. Li, and Y. Wang. 2011. “Dynamic Mechanisms for Pre-miRNA Binding and Export by Exportin-5.” *RNA* 17 (8): 1511–28. doi:10.1261/rna.2732611.

Wieland, Heike A., Martin Michaelis, Bernhard J. Kirschbaum, and Karl A. Rudolphi. 2005. “Osteoarthritis — an Untreatable Disease?” *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (4): 331–44. doi:10.1038/nrd1693.

Wightman, Bruce, Ilho Ha, and Gary Ruvkun. 1993. “Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *Lin-14* by *Lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. Elegans*.” *Cell* 75 (5): 855–62. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4.

Witkos, T M, E Koscianska, and W J Krzyzosiak. 2011. “Practical Aspects of microRNA Target Prediction.” *Current Molecular Medicine* 11 (2): 93–109.

Wu, H, S Sun, K Tu, Y Gao, B Xie, A R Krainer, and J Zhu. 2010. “A Splicing-Independent Function of SF2/ASF in microRNA Processing.” *Mol Cell* 38 (1): 67–77. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.021.

## X

Xu, Jun, Yan Kang, Wei-ming Liao, and Ling Yu. 2012. “MiR-194 Regulates Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells by Targeting *Sox5*.” Edited by Jeffrey M. Gimble. *PLoS ONE* 7 (3): e31861. doi:10.1371/journal.pone.0031861.

Xu, Ling, Bao-Feng Yang, and Jing Ai. 2013. “MicroRNA Transport: A New Way in Cell Communication.” *Journal of Cellular Physiology* 228 (8): 1713–19. doi:10.1002/jcp.24344.

## Y

Yamagata, Kaoru, Sally Fujiyama, Saya Ito, Takashi Ueda, Takuya Murata, Masanori Naitou, Ken-ichi Takeyama, Yasuhiro Minami, Bert W. O'Malley, and Shigeaki Kato. 2009. “Maturation of MicroRNA Is Hormonally Regulated by a Nuclear Receptor.” *Molecular Cell* 36 (2): 340–47. doi:10.1016/j.molcel.2009.08.017.

Yamasaki, Keiichiro, Tomoyuki Nakasa, Shigeru Miyaki, Masakazu Ishikawa, Masataka Deie, Nobuo Adachi, Yuji Yasunaga, Hiroshi Asahara, and Mitsuo Ochi. 2009. “Expression of MicroRNA-146a in Osteoarthritis Cartilage.” *Arthritis & Rheumatism* 60 (4): 1035–41. doi:10.1002/art.24404.

Yan, Chao, Yang Wang, Xiao-Yan Shen, Gang Yang, Jia Jian, Hua-Su Wang, Guo-Qiang Chen, and Qiong Wu. 2011. “MicroRNA Regulation Associated Chondrogenesis of Mouse MSCs Grown on Polyhydroxyalkanoates.” *Biomaterials* 32 (27): 6435–44. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.031.

Yang, Bo, Hongfeng Guo, Yulan Zhang, Lei Chen, Dajun Ying, and Shiwu Dong. 2011. “MicroRNA-145 Regulates Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Targeting *Sox9*.” *PLoS ONE* 6 (7). doi:10.1371/journal.pone.0021679.

Yi, R. 2003. “Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-microRNAs and Short Hairpin RNAs.” *Genes & Development* 17 (24): 3011–16. doi:10.1101/gad.1158803.

Yu, Bin, Liu Bi, Binglian Zheng, Lijuan Ji, David Chevalier, Manu Agarwal, Vanitharani Ramachandran, et al. 2008. “The FHA Domain Proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in Humans Act in Small RNA Biogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (29): 10073–78. doi:10.1073/pnas.0804218105.

## Z

Zamore, Phillip D, Thomas Tuschl, Phillip A Sharp, and David P Bartel. 2000. “RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals.” *Cell* 101 (1): 25–33. doi:10.1016/S0092-8674(00)80620-0.

Zekri, Latifa, Duygu Kuzuoğlu-Öztürk, and Elisa Izaurralde. 2013. “GW182 Proteins Cause PABP Dissociation from Silenced miRNA Targets in the Absence of Deadenylation.” *The EMBO Journal* 32 (7): 1052–65.





doi:10.1038/emboj.2013.44.

Zeng, Y. 2004. "Structural Requirements for Pre-microRNA Binding and Nuclear Export by Exportin 5." *Nucleic Acids Research* 32 (16): 4776–85. doi:10.1093/nar/gkh824.

Zeng, Yan, and Bryan R. Cullen. 2005. "Efficient Processing of Primary microRNA Hairpins by Drosha Requires Flanking Nonstructured RNA Sequences." *Journal of Biological Chemistry* 280 (30): 27595–603. doi:10.1074/jbc.M504714200.

Zhang, Yuqing, and Joanne M. Jordan. 2010. "Epidemiology of Osteoarthritis." *Clinics in Geriatric Medicine* 26 (3): 355–69. doi:10.1016/j.cger.2010.03.001.

Zhang, Zhaiyi, Amit Khanna, and Stefan Stamm. 2012. "Fast Cloning of Splicing Reporter Minigenes." In *Alternative Pre-mRNA Splicing*, edited by Stefan Stamm, Christopher W. J. Smith, and Reinhard Lührmann, 381–91. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527636778.ch35/summary>.

Zhong, N., J. Sun, Z. Min, W. Zhao, R. Zhang, W. Wang, J. Tian, et al. 2012. "MicroRNA-337 Is Associated with Chondrogenesis through Regulating TGFBR2 Expression." *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (6): 593–602. doi:10.1016/j.joca.2012.03.002.

Zhou, R, G Hu, A Y Gong, and X M Chen. 2010. "Binding of NF-kappaB p65 Subunit to the Promoter Elements Is Involved in LPS-Induced Transactivation of miRNA Genes in Human Biliary Epithelial Cells." *Nucleic Acids Res.* doi:gkq056 [pii] 10.1093/nar/gkq056.

Zipprich, Jakob T, Sankar Bhattacharyya, Hansruedi Mathys, and Witold Filipowicz. 2009. "Importance of the C-Terminal Domain of the Human GW182 Protein TNRC6C for Translational Repression." *RNA (New York, N.Y.)* 15 (5): 781–93. doi:10.1261/rna.1448009.



### Recherche de liens entre expression d'ARNs non codants et physiopathologie articulaire : utilisation des microARNs comme biomarqueurs du phénotype chondrocytaire

L'arthrose est la pathologie articulaire la plus répandue et, avec l'allongement de l'espérance de vie, sa prévalence ne cesse d'augmenter. Elle se caractérise par une dégénérescence du cartilage articulaire associée à une inflammation synoviale et un remodelage anormal de l'os sous-chondral, qui résultent en une perte progressive de mobilité et des douleurs très handicapantes. Dans le cartilage, le chondrocyte est le seul type cellulaire et il est responsable de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycanes). Au cours de l'arthrose, le phénotype du chondrocyte est altéré et la balance synthèse/dégradation des composants matriciels est déséquilibrée en faveur de la dégradation du cartilage. Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de ralentir efficacement l'évolution du processus arthrosique, de sorte que la recherche de biomarqueurs pertinents et de cibles thérapeutiques potentielles est en pleine effervescence depuis l'explosion de l'étude des microARNs. Les microARNs sont des petits ARNs non codants régulant négativement l'expression des gènes. On estime que 50% des gènes sont potentiellement régulés par les miARNs. Les miARNs semblent impliqués dans tous les processus biologiques majeurs tels que la différenciation cellulaire, l'apoptose ou encore la cancérisation. Ces petits ARN non codants sont donc des biomarqueurs potentiels très intéressants. Au cours de ces travaux de thèse l'implication des miARN dans la régulation du phénotype chondrocytaire a été étudiée. A partir d'un modèle de perte du phénotype chondrocytaire différencié, provoquée par des repiquages successifs ou une stimulation par l'IL-1

□□ les variations

miARNs ont été analysées par l'utilisation de puces dédiées. Ces données ont permis de mettre en évidence 43 miARNs candidats dont le cluster miR-23~27b~24-1 et miR-29b. L'étude de la régulation de la production différentielle des miARNs de ce cluster a été entreprise, sans que nous parvenions toutefois à apporter une réponse formelle sur les mécanismes impliqués. Néanmoins, nous avons identifié miR-29b comme un régulateur négatif de l'expression du gène codant Col-IIa1 au cours de la perte du phénotype différencié, ainsi que chez les chondrocytes « arthrosiques ». Enfin, comme il a été montré au laboratoire que l'équilibre entre les concentrations extracellulaires de pyrophosphate/phosphate inorganique (ePi/ePPi) était essentiel au maintien du phénotype chondrocytaire différencié, nous nous sommes intéressés à la régulation des gènes codant les acteurs protéiques impliqués dans cette balance (ANK, PC1, Pit-1 et TNAP). A partir de prédictions de cibles par analyse *in silico*, un panel de 4 miARNs candidats a été établi : let7e, miR-9, miR-188 et miR-219. Nos travaux avec des systèmes rapporteurs ont démontré l'implication de miR-9 en tant que régulateur négatif de l'expression des gènes *PC-1*, *Pit-1* et *TNAP*, de façon cohérente ou non avec les prédictions bio-informatiques.

**Mots clés :** arthrose, chondrocyte, cluster miR-23~27b~24-1, miR-29b, miR-9, balance ePi/ePPi, PC-1, Pit-1, TNAP.

### Search for links between non-coding RNAs and joint pathophysiology: the use of microRNAs as chondrocyte phenotype biomarkers

Osteoarthritis (OA) is the most frequent joint disease and its prevalence still grows with the increase in lifespan. OA is characterized by articular cartilage degeneration, together with synovitis and abnormal subchondral bone remodeling, leading to progressive loss of mobility and pain. Chondrocyte is the unique cell type in cartilage which accounts for the synthesis of extracellular matrix (ECM) components (collagens, proteoglycans). During OA, chondrocyte phenotype is altered and the balance between ECM synthesis and degradation is impaired towards cartilage degradation. To date no treatment can efficiently reduce OA progression so that the search for reliable biomarkers and potential therapeutic targets is very active, particularly since the discovery of microRNAs. miRNAs are estimated to regulate 50% of cellular genes. They contribute to major cellular processes such as cell differentiation, apoptosis or tumorigenesis. Therefore, miRNAs are interesting putative biomarkers. During this PhD thesis, we studied the contribution of miARNs to the control of chondrocyte phenotype. Using a model of chondrocyte differentiated phenotype loss induced by extensive subculturing or IL-1 challenge we studied changes in miRNAs profile with microarrays. We determined a panel of 43 varying miRNA including the miR-23~27b~24-1 cluster and miR-29b. The differential production of miRNAs from this cluster has been investigated, but we didn't succeed in identifying the underlying mechanisms. However, we identified miR-29b as a negative post-transcriptional regulator of Col-IIa1 during differentiated phenotype loss and OA. Finally, as equilibrium between extracellular levels of inorganic phosphate and pyrophosphate (ePi/ePPi) was previously shown in the laboratory to be crucial for the maintenance of a differentiated chondrocyte phenotype, we studied the regulation of the genes encoding the 4 proteins regulating this balance (ANK, PC1, Pit-1 and TNAP). From *in silico* analysis, we selected a panel of 4 miRNAs: let7e, miR-9, miR-188 and miR-219. Using reporter assays, we showed that miR-9 was a negative regulator of *PC-1*, *Pit-1* and *TNAP*, according or not to bioinformatics prediction.

**Key words:** articular physiopathology, chondrocyte, miR-23~27b~24-1 cluster, miR-29b, miR-9, ePi/ePPi balance, PC-1, Pit-1, TNAP.