

## Rôle de mir-342-3p dans l'hétérogénéité fonctionnelle des ostéoclastes et implication dans l'arthrite auto-immune

Claire Lozano

#### ► To cite this version:

Claire Lozano. Rôle de mir-342-3p dans l'hétérogénéité fonctionnelle des ostéoclastes et implication dans l'arthrite auto-immune. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT016 . tel-03137232

#### HAL Id: tel-03137232 https://theses.hal.science/tel-03137232

Submitted on 10 Feb 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

#### THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences biologiques spécialité Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS2 n°168

Unité de recherche INSERM U1183

#### Rôle de miR-342-3p dans l'hétérogénéité fonctionnelle des ostéoclastes et implication dans l'arthrite auto-immune.

#### Présentée par Claire LOZANO Le 01 septembre 2020

#### Sous la direction de Florence APPARAILLY et Isabelle DUROUX-RICHARD

#### Devant le jury composé de

Frédéric VELARD, IR, PhD H <mark>DR, EA 4691, Univ Reims Champagne-A</mark> rdenne	Rapporteur
Hubert MAROTTE, PU-PH, <mark>MD PhD HDR, INSERM U1059, Univ Lyo</mark> n Saint-Etienne	Rapporteur
Claudine BLIN-WAKKAC <mark>H, DR2, PhD HDR, CNRS UMR7370, Univ</mark> Nice Sophia Antipolis	Présidente
Florence APPARAILLY, DR2, PhD HDR, INSERM U1183, Univ Montpellier	Directrice
Isabelle DUROUX-RICHARD, IR, PhD HDR, INSERM U1183, Univ Montpellier	Co-directrice



### Remerciements

Je tiens à remercier **Madame Florence Apparailly**, Directrice de Recherche à l'Institut de Recherche sur la Médecine régénérative et Biothérapies à l'Université de Montpellier, pour sa direction de ce projet de thèse. Ses conseils avisés et son encadrement m'ont aidé à valoriser ce travail.

Je remercie **Madame Isabelle Duroux-Richard**, Ingénieur de Recherche à l'Institut de Recherche sur la Médecine régénérative et Biothérapies à l'Université de Montpellier, pour sa direction du projet, son encadrement et sa disponibilité tout au long de ce travail. J'ai beaucoup appris à ses côtés.

J'adresse tous mes remerciements à **Monsieur le Professeur Hubert Marotte**, Professeur à l'Université de Lyon Saint-Etienne, Rhumatologue Praticien Hospitalier au CHU de Saint-Etienne, ainsi qu'à **Monsieur Frédéric Velard**, Ingénieur de Recherche à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à **Madame Claudine Blin-Wakkach**, Directrice de Recherche au Laboratoire de PhysioMédecine Moléculaire à l'Université de Nice Sophia Antipolis, pour avoir accepté de présider le jury. Je la remercie pour son bref mais chaleureux accueil dans son laboratoire en janvier 2017, ce qui m'a mis un pied à l'étrier dans les expérimentations in vitro sur les ostéoclastes. Je la remercie pour ses précieux conseils et sa gentillesse à mon égard.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe 3 dirigée par Florence Apparailly, qui m'ont apporté de précieuses aides scientifiques et techniques, en particulier **Valentin Estibals**, Ingénieur d'Etude, et **Hortense Courot**, Assistante Ingénieur, pour leur implication quotidienne dans ce projet, et **Gabriel Courties**, Chargé de Recherche, pour ses conseils avisés et son aide dans les expérimentations animales.

Enfin, je tiens à remercier **Monsieur le Professeur Thierry Vincent**, Professeur à l'Université de Montpellier, Chef du Département d'Immunologie au CHU de Montpellier, et **Monsieur le Docteur Pierre Portalès**, Praticien Hospitalier au CHU de Montpellier, pour m'avoir libéré le temps nécessaire pour mener à bien ce projet de thèse durant mes 4 années d'Assistante Hospitalo-Universitaire au sein du Département d'Immunologie.

## Résumé

Les micro-ARNs (miARNs) sont de petits ARN simples brins non codants qui contrôlent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, dans de nombreux processus cellulaires. Ils jouent un rôle clé dans la régulation de l'ostéoclastogenèse, un processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la formation d'ostéoclastes (OCs). Les OCs sont des cellules multinucléées du tissu osseux issus de précurseurs myéloïdes. Ce sont les seules cellules de l'organisme capables de résorption osseuse, donc essentielles à l'homéostasie osseuse et au renouvellement osseux. Toute anomalie de leur fonctionnement est associée à des pathologies osseuses. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (PR), les OCs participent activement à l'érosion osseuse. La PR est une maladie auto-immune invalidante caractérisée par une atteinte articulaire inflammatoire associée à une destruction du cartilage et de l'os. Il a été décrit différents types d'OCs sur la base de leurs propriétés immunologiques : les OC tolérogènes (t-OCs) et les OC inflammatoires (i-OCs). Des études récentes ont montré que les i-OCs dérivent exclusivement de précurseurs circulants qui infiltrent les articulations arthritiques. Mon travail a consisté à combiner les analyses du miRNome et du transcriptome des sous-types t-OCs et i-OCs, en contexte physiologique et arthritique, afin d'identifier des miARNs spécifiques de chaque type d'OCs et les voies biologiques associées. Parmi les miARNs associés aux i-OCs, j'ai identifié miR-342-3p, encore non décrit dans l'ostéoclastogenèse ou l'arthrite. J'ai montré que miR-342-3p a un effet pro-ostéoclastique in vitro en soutenant la phase précoce de l'ostéoclastogenèse par induction de la survie et de la motilité des précurseurs myéloïdes. J'ai optimisé l'inhibition de miR-342-3p dans les précurseurs des i-OCs dans le modèle murin de l'arthrite auto-immune (K/BxN serum-transfert arthritis, STA) par l'administration systémique ou locale d'un inhibiteur ou agoniste de miR-342-3p formulé avec le liposome cationique DMAPAP/DOPE. J'ai montré le ciblage des monocytes inflammatoires Ly6C<sup>high</sup> du sang et de l'articulation, associée à l'inhibition d'ADAM17 quand un lipoplex miR-342-3p est injecté. J'ai enfin montré qu'ADAM17 est une nouvelle cible de miR-342-3p dans les précurseurs OCs. Mes travaux suggèrent que la modulation in vivo de l'expression de miR-342-3p dans les précurseurs des i-OCs pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour réduire l'érosionosseuse liée à l'arthrite.

Mots-clés : micro-ARNs ; miR-342-3p ; ostéoclastes ; arthrite

## Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small, single-strand non-coding RNAs that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level in many cellular processes. They play a key role in the regulation of osteoclastogenesis, a process of cell differentiation that leads to the formation of osteoclasts (OCs). OCs are multinucleated cells located in bone tissue that derived from myeloid precursors. OCs are the only cells capable of bone resorption, which role is essential to bone homeostasis and turnover. However, they actively participate in bone erosion in rheumatoid arthritis (RA), an autoimmune disease characterized by chronic joint inflammation associated with destruction of cartilage and bone. Based on their immunological properties, two OC subsets have been identified, the so called tolerogenic OCs (t-OCs) and inflammatory OCs (i-OCs). Recent studies have shown that the i-OCs associated with arthritis exclusively derive from circulating Ly6C<sup>high</sup> precursors that infiltrate inflamed joints. Combining miRNome and RNA-Seg analyses of t-OC and i-OC subsets, I aimed at identifying miRNAs markers specific for each subsetand associated biological pathways. Among the miRNAs associated with i-OCs, I identified miR-342-3p, neither described yet in osteoclastogenesis or in arthritis. I demonstrated that miR-342-3p has a pro-osteoclastic effect in vitro by supporting the early phase of osteoclastogenesis, through the controlof survival and motility of the precursors. I optimized the delivery of miR-342-3p agonist or neutralizing molecules in the precursors of i-OCs using the mouse model of autoimmune arthritis (K/BxN serum-transfer arthritis, STA) and the cationic liposome DMAPAP/DOPE. I showed that the systemic or intra-articular administration of miR-342-3p lipoplex selectively targets blood and joint inflammatory Ly6C<sup>high</sup> monocytes, and that in vivo neutralization of miR-342-3p in Ly6Chigh OC precursors of STA mice increased ADAM17 expression. I identified ADAM17 as a novel target for miR-342-3p. Overall, my data indicate that the in vivo modulation of miR-342-3p expression in i-OC precursors could be a potential therapeutic strategy to reduce bone erosion in arthritis.

Keywords: microRNAs; miR-342-3p; osteoclasts; arthritis

## SOMMAIRE

Introduction	13
L'ostéoclastogenèse	16
L'ostéoclaste	
Définition	16
Fonctions	16
Résorption osseuse : mécanisme	16
Résorption osseuse et homéostasie	17
Fonctions immunologiques	18
Les différentes origines de l'ostéoclaste	19
Les progéniteurs myéloïdes	20
Développement osseux dès la vie fœtale	20
Renouvellement continu pour le maintien de l'homéostasie osseuse	20
Autres précurseurs en condition inflammatoire	23
Les étapes de l'ostéoclastogenèse	
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce	24 24
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL	<b>24</b> <b>24</b> 
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL Motilité des précurseurs	<b>24</b> <b>24</b> 24 
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL Motilité des précurseurs La phase tardive	24 24 24 27 27 28
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL Motilité des précurseurs La phase tardive NFATc1 : le régulateur précoce de la phase tardive	24 24 24 27 28 28
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL Motilité des précurseurs La phase tardive NFATc1 : le régulateur précoce de la phase tardive Fusion et maturation en ostéoclaste fonctionnel	
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL Motilité des précurseurs La phase tardive NFATc1 : le régulateur précoce de la phase tardive Fusion et maturation en ostéoclaste fonctionnel Motilité des ostéoclastes matures	24 24 24 27 28 28 28 29 30
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL Motilité des précurseurs La phase tardive NFATc1 : le régulateur précoce de la phase tardive Fusion et maturation en ostéoclaste fonctionnel Motilité des ostéoclastes matures <i>Les podosomes dans l'ostéoclastogenèse</i>	24 24 24 27 28 28 29 30 31
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL Motilité des précurseurs La phase tardive NFATc1 : le régulateur précoce de la phase tardive Fusion et maturation en ostéoclaste fonctionnel Motilité des ostéoclastes matures Les podosomes dans l'ostéoclastogenèse Motilité des ostéoclastes : une simple balade digestive ?	<b>24</b> <b>24</b> 24 27 <b>28</b> 28 28 29 30 31 32
Les étapes de l'ostéoclastogenèse La phase précoce	24 24 24 27 28 28 28 29 30 30 31 32 34
Les étapes de l'ostéoclastogenèse	24 24 24 27 28 28 29 30 31 32 34 34

Axe OPG/RANKL/RANK et résorption osseuse	35
Axe Wnt/β-caténine et formation osseuse	35
Ostéocytes et mécano-transduction : rôle de la sclérostine	36
Axe S1P/S1PR : la dualité du Sphinx	37
Régulation associée à l'homéostasie phosphocalcique	39
Régulation par les hormones sexuelles	40
Régulation par les facteurs de croissance	40
Facteurs de croissance ostéogéniques	40
Facteurs pro-ostéoclastiques à forte dose	41
Régulation par les médiateurs de l'immunité	43
Médiateurs pro-ostéoclastiques	43
Cytokines pro-inflammatoires : la triade IL-1, IL-6, TNFα	43
Autres cytokines	43
Signaux de danger : PAMPs et DAMPs	43
Voies non classiques d'induction de l'ostéoclastogenèse	44
Médiateurs inhibiteurs de l'ostéoclastogenèse	44
Les interférons	44
Autres cytokines	45
GM-CSF	45
Les ostéoclastes dans l'arthrite auto-immune	47
La polyarthrite rhumatoïde	47
Les mots-clés	47
Physiopathologie	47
Environnement pro-ostéoclastique	48
Pannus synovial	48
Ostéoclastogenèse inflammatoire	49
Hypoxie tissulaire	49
Cytokines pro-ostéoclastiques	50
Rôles des auto-anticorps	51

Thérapies ciblant les ostéoclastes	51
Thérapies ciblées anti-inflammatoires	51
Cibler directement les ostéoclastes inflammatoires ?	53
Les micro-ARNs dans l'ostéoclastogenèse	55
Article 1	55
"MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation?	o"55
Rationnel de l'étude	55
Résumé	58
Objectifs du projet de thèse	72
Résultats	73
Axe 1. Article 2	73
Micro-RNA profiling of osteoclast subsets according to their tole inflammatory function.	erogenic or 73
Rationnel de l'étude	73
Résumé	76
Axe 2. Article 3	103
"MiR-342-3p regulates osteoclastogenesis in arthritis-associated precursors"	osteoclast 103
Résultats préliminaires	103
Rationnel de l'étude	107
Résumé	109
Résultats complémentaires sur la régulation fonctionnelle de miR-342-3p.	137
Expression de miR-342-3p et de son gène hôte EVL	137
Régulation de miR-342-3p par les ARNs non codants endogènes	138
Discussion générale	140
Perspectives	151
Annexe	152

### **Tables des illustrations**

FIGURE 1. MECANISME DE LA RESORPTION OSSEUSE PAR L'OSTEOCLASTE. ADAPTE DE (GEORGESS ET AL.
2014)
FIGURE 2. ORIGINES ET RENOUVELLEMENT DES OSTEOCLASTES DANS UN MODELE MURIN IN VIVO. ADAPTE DE
(JACOME-GALARZA ET AL. 2019)
FIGURE 3. VUE D'ENSEMBLE DES ORIGINES DES OSTEOCLASTES DEPUIS LA VIE FŒTALE DANS UN MODELE
MURIN IN VIVO. ADAPTE DE (YAHARA ET AL. 2020)
FIGURE 4. VOIE DE SIGNALISATION DU M-CSF. MODIFIE DE (PIXLEY AND STANLEY 2004)25
FIGURE 5. REPRESENTATION SEQUENTIELLE DE L'EXPRESSION DES FACTEURS CLES DANS
L'OSTEOCLASTOGENESE. ADAPTE DE (ARAI ET AL. 2000)
FIGURE 6. VOIES DE SIGNALISATION RANK/RANKL ET BOUCLE D'AMPLIFICATION DE NFATC1 DANS LA PHASE
PRECOCE DE L'OSTEOCLASTOGENESE. ADAPTE DE (PARK, LEE, AND LEE 2017)
FIGURE 7. L'AMPLIFICATION DU SIGNAL NFATC1 INDUIT LES GENES DE LA PHASE TARDIVE DE
L'OSTEOCLASTOGENESE, D'APRES (PARK, LEE, AND LEE 2017)
FIGURE 8. FUSION DE PRE-OSTEOCLASTES. TRAP STAINING SUR BMMS PRIMAIRES DE SOURIS
FIGURE 9. FUSION ET OSTEOCLASTES MATURES. ADAPTE DE (JANSEN ET AL. 2012)
FIGURE 10. DYNAMIQUE DE FORMATION DES PODOSOMES AU COURS DE L'OSTEOCLASTOGENESE. ADAPTE DE
(DESTAING ET AL. 2002; SALTEL ET AL. 2004)
FIGURE 11. RESORPTION OSSEUSE PAR LACUNES SUCCESSIVES OU FORMATION DE TRANCHEES, MODELE
PROPOSE PAR (SØE AND DELAISSE 2017)
FIGURE 12. ROLE DE L'AXE WNT/B-CATENINE DANS LE REMODELAGE OSSEUX. ADAPTE DE (BARON AND
KNEISSEL 2013)
FIGURE 13. LA SCLEROSTINE DANS LE COUPLAGE DU REMODELAGE OSSEUX. MODELE PROPOSE PAR (KOIDE
and Kobayashi 2019)
FIGURE 14. LE S1P CONTROLE LA MIGRATION DES PRECURSEURS OSTEOCLASTIQUES. ADAPTE DE (ISHII AND
Kikuta 2013)
FIGURE 15. PRINCIPALES VOIES DE REGULATION PHYSIOLOGIQUES DU REMODELAGE OSSEUX. ADAPTE DE
(SIDDIQUI AND PARTRIDGE 2016)
FIGURE 16. DEVELOPPEMENT ET PROGRESSION DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE. ADAPTE DE (SMOLEN ET
AL. 2018)
FIGURE 17. ROLE DE L'HYPOXIE DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE. ADAPTE DE (MUZ ET AL. 2009) 50
FIGURE 18. LES DIFFERENTS AXES CIBLES PAR LES BIOTHERAPIES DANS LA PR. ADAPTE DE (SMOLEN ET AL.
2018)

TABLEAU 1. RESUME DES EFFETS PRO- ET ANTI-OSTEOCLASTIQUES DES CYTOKINES DANS	
L'OSTEOCLASTOGENESE. ADAPTE DE (AMARASEKARA ET AL. 2018)	46

## Liste des abréviations

ACPAs : anti-citrullinated protein antibodies ACR/EULAR : American college of rheumatology / European league against rheumatism ADAM17 : ADAM metalloproteinase domain 17 AKT : AKT serine/threonine kinase AP-1 : activator protein 1 BMMs : bone marrow-derived macrophages BMPs : bone morphogenetic proteins CIA : collagen-induced arthritis CSF1R : colony-stimulating factor 1 receptor CSH : cellules souches hématopoïétiques CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12 DAMPs : damage associated molecular patterns DKK1 : dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 DMARDs : disease-modifying antirheumatic drugs EGF, EGFR : epidermal growth factor, EGF receptor EMP : erythro-myeloid progenitor FcyR : Fc fragment of IgG receptor FDA : food and drug administration FGF : fibroblast growth factor FLS : fibroblast-like synoviocyte GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor HIF : hypoxia-inducible factor IL-: interleukine IGF-1 : insulin-like growth factor 1 IFN : interferon ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif JAK : janus kinase LIF : leukemia inhibitory factor

LPS : lipopolysaccharide

- M-CSF : macrophage colony-stimulating factor
- MAPK : mitogen-activated protein kinase 1
- miRNA : micro-RNA
- MMP : matrix metallopeptidase
- $\text{NF-}\kappa\text{B}$  : nuclear factor kappa-B
- NFATc1 : nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1
- OPG : osteoprotegerin
- OSCAR : osteoclast-associated receptor
- PAMPs : pathogen associated molecular patterns
- PI3Ks : Phosphoinositide 3-kinases
- PR : polyarthrite rhumatoïde
- PRRs : pattern recognition receptors
- PTH : parathromone
- RANK, RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B, RANK ligand
- S1P, S1PR : sphingosine-1-phosphate, S1P receptor
- SCF1 : stem cell factor 1
- SOST : sclerostin
- SRC : SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
- STA : serum-transfert arthritis
- $TGF-\beta$ : transforming growth factor beta
- TLR : toll-like receptor
- $\mathsf{TNF}\alpha$  : tumor necrosis factor alpha
- TRAF6 : TNF receptor associated factor 6
- TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase
- TREM2 : triggering receptor expressed in myeloid cells-2
- VEGF : vascular endothelial growth factor
- Wnt : wingless-type MMTV integration site family

## Introduction

Les récentes découvertes sur l'hétérogénéité fonctionnelle des ostéoclastes (OCs), et en particulier sur leurs fonctions immunitaires, ont nourri et renforcé le domaine de l'ostéoimmunologie et ouvert de nouvelles perspectives pour des applications cliniques dans les pathologies inflammatoires associées à une perte osseuse accrue. L'intérêt grandissant pour les différents sous-types d'OCs s'est traduit par des études mécanistiques visant à définir et caractériser les différentes origines et rôles biologiques des OCs en fonction du contexte physiologique ou pathologique. Ainsi, je me suis particulièrement intéressée aux OCs qui ont été décrits sur la base de leurs propriétés immunologiques : les OCs tolérogènes (t-OCs) et inflammatoires (i-OCs).

Il est proposé que les t-OCs soient formés en condition physiologique à partir des précurseurs myéloïdes médullaires afin d'assurer l'homéostasie osseuse, tandis que les i-OCs émergeraient en conditions inflammatoires à partir de précurseurs monocytaires, ou de précurseurs plus atypiques tels que les cellules dendritiques (Madel et al. 2019). Il est intéressant de rappeler que les cellules myéloïdes jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire par la production de cytokines et chémokines, la présentation d'antigènes et la polarisation des lymphocytes T, et n'ont pas toutes vocation à se différencier en OCs. Le microenvironnement est déterminant dans l'orientation de ces précurseurs vers l'ostéoclastogenèse. On parle de transdifférenciation pour les cellules dendritiques qui ne sont pas des précurseurs d'OCs classiques (Rivollier et al. 2004; Wakkach et al. 2008). Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'infiltration de précurseurs inflammatoires circulants dans l'articulation enflammée favoriserait le conditionnement pro-ostéoclastique de ces cellules, à travers l'hypoxie tissulaire propice à l'ostéoclastogenèse et la synthèse locale de facteurs proostéoclastiques tels que RANKL, M-CSF et TNFα.

Les t-OCs et les i-OCs ont été caractérisés en 2016 dans une étude fonctionnelle réalisée *ex vivo* chez la souris saine. Celle-ci est basée sur un modèle de différenciation ostéoclastique utilisant deux précurseurs distincts : les monocytes ou les cellules dendritiques immatures médullaires, donnant respectivement les t-OCs ou les i-OCs (Ibáñez et al. 2016). Cette étude montre que les t-OCs et les i-OCs conservent l'activité de résorption osseuse propre aux OCs, mais présentent des propriétés immunologiques opposées. En effet, en co-culture avec des lymphocytes T CD4 naïfs, les t-OCs induisent une polarisation vers le phénotype de T régulateurs Foxp3<sup>+</sup> tandis que les i-OCs induisent la formation de T CD4 producteurs de TNFα.

Mon projet a débuté en 2017 par l'établissement d'une signature moléculaire des t-OCs et des i-OCs chez des souris saines et arthritiques. Dans un premier temps, j'ai analysé le profil d'expression de l'ensemble des micro-ARNs (miARNs), ou miRNome. Cette approche originale permet de repérer des facteurs clés de la régulation des voies biologiques qui sont différemment activées dans les deux types d'OCs. En effet, les miARNs sont de petits ARNs simple brin non codants (≈ 22 nucléotides) qui régulent négativement l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel dans les cellules eucaryotes. Ils reconnaissent des séquences cibles principalement localisées dans la 3'UTR (partie non codante en aval de la région codante et avant la queue polyA) des ARNm. Une particularité des miARNs est que leur hybridation à l'ARNm cible est déterminée par une séquence très courte (≈ 7 nucléotides) du miARN appelée « seed » en anglais. L'hybridation avec l'ARNm cible s'effectue donc par complémentarité de séguence imparfaite, ce qui conduit soit au blocage de la traduction soit à la dégradation de la cible. Ainsi, un seul miARN peut reconnaitre des centaines de cibles potentielles et réguler de nombreuses voies biologiques. La dynamique de régulation de l'expression des gènes par les miARNs dépend donc du type cellulaire dans lequel ils sont exprimés, des voies biologiques qui sont activées au même moment (différentiation, prolifération, survie...) et du niveau d'expression des miARNs (eux-mêmes régulés au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel). La signature miARN est donc spécifique d'un contexte cellulaire, et peut aider non seulement à distinguer différents types d'OCs mais également à identifier les gènes et voies métaboliques impliqués dans leurs diverses fonctions cellulaires.

J'ai validé plusieurs miARNs discriminant les t-OCs et les i-OCs, en particulier dans un modèle murin d'arthrite auto-immune induit par transfert de sérum arthritogénique K/BxN (STA : serum transfer arthritis). J'ai étudié les profils transcriptomiques des i-OCs et t-OCs chez la souris saine, en particulier pour rechercher une régulation différentielle de voies biologiques impliquées dans la réponse immunitaire et dans l'ostéoclastogenèse. J'ai également croisé les données du transcriptome avec ces miARNs afin d'établir des connexions entre les voies biologiques dérégulées et les miARNs respectivement associés aux i-OCs et t-OCs. L'un des miARNs associés aux i-OCs est miR-342-3p. Il n'a encore jamais été décrit dans la différenciation ostéoclastique ni dans les pathologies inflammatoires. J'ai donc poursuivi mon projet de thèse sur l'étude de ce miARN dans l'ostéoclastogenèse dans des modèles cellulaires primaires et dans la lignée murine monocytaire RAW 264.7. Les résultats de mes recherches m'ont amenée à évaluer l'impact d'une modulation de l'expression de miR-342-3p dans les précurseurs des OCs dans l'arthrite expérimentale.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à un état des lieux des connaissances sur l'ostéoclastogenèse et les principales voies de régulation en condition physiologique et dans

le contexte de l'arthrite. Une deuxième partie est spécialement dédiée à un état des lieux des miARNs exprimés dans l'ostéoclastogenèse et à leur rôle à travers une revue scientifique publiée dans *Frontiers in Immunology* que je signe en premier auteur.

Les résultats de mon projet de thèse sont ensuite décrits sous forme de deux articles en anglais que je signe également en premier auteur, précédés d'un rationnel en français où j'expose le contexte scientifique et ma démarche. Les matériels et méthodes sont inclus dans ces articles. Chaque article contient également une discussion propre. Une discussion générale et les perspectives de mes travaux de thèse clôturent ce manuscrit.

## L'ostéoclastogenèse

#### L'ostéoclaste

#### Définition

L'ostéoclaste est une cellule multinucléée résidente du tissu osseux. Il est considéré comme étant un macrophage spécialisé dans la résorption de la matrice osseuse sur laquelle il évolue. Il s'agit du seul type cellulaire capable de dégrader une matrice minéralisée comme celle de l'os, la dentine ou du cartilage minéralisé. L'ostéoclaste est principalement dérivé de précurseurs hématopoïétiques de la lignée monocytaire et représente la forme terminale fonctionnelle de la différenciation ostéoclastique. La durée de vie moyenne d'un ostéoclaste a été estimée à 2 semaines chez l'Homme (Parfitt 1994), sans dépasser 6 semaines chez la souris (Marks and Seifert 1985). Des fusions successives avec des pré-ostéoclastes permettent de remplacer les noyaux de l'ostéoclaste d'origine et de prolonger la durée de vie globale du syncitia ostéoclastique à plusieurs mois. Une étude récente chez la souris a montré que l'ostéoclaste peut renouveler un noyau toutes les 4 à 8 semaines par fusion avec un préostéoclaste, ce qui aboutit à un renouvellement complet de l'ostéoclaste d'origine au bout de 6 mois environ (Jacome-Galarza et al. 2019). Sa durée de vie dépend essentiellement du micro-environnement osseux contenant les facteurs de croissance et les nombreux facteurs de régulation de l'ostéoclastogenèse, mais aussi de facteurs systémiques. L'homéostasie osseuse est assurée par un dialogue finement régulé entre les ostéoclastes et de nombreux types cellulaires de l'environnement (ostéoblastes, cellules immunitaires...).

#### **Fonctions**

#### Résorption osseuse : mécanisme

La résorption débute par l'adhésion stable de l'ostéoclaste sur la travée osseuse *via* des intégrines, dont αvβ3. Celle-ci est non seulement déterminante pour l'adhérence, mais également pour la motilité et l'activation de l'ostéoclaste (Väänänen and Horton, 1995). L'ostéoclaste est une cellule polarisée dont le pôle apical présente une membrane en bordure en brosse au contact de laquelle la matrice osseuse est résorbée (Baron 2001). La zone de

résorption est délimitée par un anneau d'actine où les filaments d'actine forment une bande continue encadrée par un double anneau de vinculine et de taline. Cette structure est obtenue par le remaniement du cytosquelette, en particulier des podosomes, et délimite de façon hermétique la zone de résorption. Dans cette zone de résorption, l'acidification du milieu est assurée par le relargage d'ions H+ grâce à une pompe à protons ATPase. Il s'ensuit une dissolution de la phase minérale du tissu osseux, suivie d'une phase de digestion de la matrice collagénique, sous l'effet d'enzymes lysosomales libérées par exocytose telles que la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP), la cathepsine K et des métalloprotéinases matricielles (telle que MMP-9). Il se forme alors une lacune de résorption (ou lacune de Howship). Les éléments issus de la dégradation osseuse sont éliminés par transcytose depuis le centre de la zone de résorption jusqu'au pôle basal de l'ostéoclaste.



Figure 1. Mécanisme de la résorption osseuse par l'ostéoclaste. Adapté de (Georgess et al. 2014)

#### Résorption osseuse et homéostasie

L'ostéoclaste est l'unique cellule de l'organisme capable de résorber la matrice osseuse. Cette fonction est essentielle au renouvellement du tissu osseux, qui suit une dynamique de développement et d'adaptation aux contraintes biologiques et mécaniques tout au long de la vie. Le remodelage osseux est donc un phénomène physiologique permanent, critique pour la solidité et la résistance de l'os. Chez l'homme, le taux de renouvellement est estimé à 25% par an pour l'os spongieux, et à 4% par an pour l'os cortical (Manolagas 2000). Pour mieux

appréhender l'importance de la résorption osseuse en condition physiologique, il est utile de rappeler que l'os est un tissu conjonctif spécialisé constitué d'une matrice extracellulaire solide calcifiée, autrement dit un « tissu squelettique ». Le squelette possède trois fonctions remarquables : une fonction mécanique qui se traduit par le soutien de l'organisme et la protection des organes, une fonction métabolique dans la régulation phosphocalcique, et une fonction hématopoïétique où les espaces médullaires hébergent les niches de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les types cellulaires composant le tissu osseux sont divisés en deux groupes complémentaires : les cellules ostéoformatrices (ostéoblastes, ostéocytes, cellules bordantes), et les cellules ostéorésorbantes (ostéoclastes).

La résorption osseuse est un phénomène physiologique qui permet de maintenir l'homéostasie phosphocalcique. La matrice osseuse contient près de 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme. La résorption osseuse permet de libérer ces sels minéraux qui jouent un rôle biologique prépondérant dans la vie cellulaire, la transmission nerveuse et la coagulation sanguine.

Un autre rôle essentiel de la résorption osseuse est de maintenir, ou de libérer selon les besoins de l'organisme, des zones privilégiées pouvant accueillir les niches hématopoïétiques dans l'os trabéculaire (spongieux) richement vascularisé. Ces niches contiennent les cellules souches du tissu sanguin indispensables au renouvellement continu des lignées cellulaires myéloïdes (érythrocytaire, plaquettaire, granuleuse, monocytaire) et lymphoïdes. Les niches sont préservées par le soutien des cellules stromales mésenchymateuses. Le maintien des CSH dans les niches endostéales serait favorisé par des taux localement élevés d'ions calcium libérés par l'ostéoclaste pendant la résorption osseuse (Adams et al. 2006). L'ostéoclaste joue également un rôle dans la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques par l'action de la cathepsine K qui clive la chimiokine CXCL12 (aussi appelée SDF1) et le Stem-Cell Factor (SCF) ligand de c-kit (CD117), impliqués dans la domiciliation et le maintien des cellules souches médullaires (Kollet et al. 2006). Ce phénomène de mobilisation des cellules hématopoïétiques vers la circulation périphérique est une réponse physiologique en cas de besoin accru, comme par exemple lors d'un stress induit par l'inflammation suite à une infection.

#### Fonctions immunologiques

Le terme d'ostéoimmunologie a été pour la première fois proposé en 2000 dans la revue Nature (Arron and Choi 2000), suite à la mise en évidence d'une régulation de l'ostéoclastogenèse par les lymphocytes T à travers la sécrétion de cytokines ayant un effet inhibiteur, tel l'interféron (IFN)- $\gamma$ , ou un effet stimulant, tel RANKL (Takayanagi et al. 2000).

En plus d'être sensible à certains médiateurs de l'immunité, l'ostéoclaste peut à son tour impacter sur les réponses immunitaires. Ce rôle actif a fait l'objet d'études plus récentes et démontre un véritable dialogue entre les ostéoclastes et les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes T.

De par ses origines myéloïdes, l'ostéoclaste partage les propriétés immunologiques des macrophages. Il exprime les molécules de classes I et II du complexe majeur d'histocompatibilité et les molécules de co-stimulation CD80/86 et CD40. Ceci lui confère les propriétés des cellules présentatrices d'antigène et la capacité d'activer les lymphocytes T CD4 et CD8 *in vitro*, avec une intensité comparable à celle des macrophages, sans toutefois atteindre le niveau de stimulation obtenu avec des cellules dendritiques (H. Li et al. 2010). L'ostéoclaste peut également sécréter des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire et dans la polarisation des lymphocytes T telles que l'IL-1, IL6, TNF-alpha, IL-10, TGF-beta (H. Li et al. 2010). Il a été montré chez la souris que l'ostéoclaste est capable de réaliser *in vitro* la présentation croisée d'un antigène aux lymphocytes T CD8+, et de les polariser vers un phénotype de lymphocytes T régulateurs Foxp3+CD8+ qui, en retour, freinent l'activité ostéoclastique par la production d'IFN<sub>γ</sub>, maintenant ainsi l'homéostasie osseuse (Kiesel, Buchwald, and Aurora 2009; Shashkova et al. 2016). Cette polarisation des lymphocytes vers le phénotype T régulateur permettrait d'établir une tolérance périphérique vis-à-vis de néo-antigènes produits lors de la dégradation de la matrice osseuse.

En conditions physiologiques, l'ostéoclaste présente un phénotype tolérogène. Cependant, dans certaines conditions pathologiques, ses fonctions immunologiques peuvent induire un phénotype inflammatoire qui favorise l'activation immunitaire. L'ostéoclaste « inflammatoire » a une capacité de résorption augmentée, avec pour conséquence la rupture de l'homéostasie osseuse en faveur d'une dégradation osseuse accrue. Nous détaillerons en fin de chapitre les différents mécanismes pathologiques du dialogue entre l'ostéoclaste et les cellules immunitaires décrits dans le contexte de l'arthrite auto-immune.

#### Les différentes origines de l'ostéoclaste

L'ostéoclaste est une cellule très différenciée (sans retour possible à un état moins différencié) et très spécialisée, dont plusieurs origines ont été décrites. Il est bien établi que l'ostéoclaste dérive de la lignée myéloïde, mais la description fine du lignage et de l'engagement des précurseurs fait encore l'objet de recherches. La plasticité cellulaire des précurseurs myéloïdes rend complexes, mais pour le moins très intéressants, les mécanismes impliqués dans l'engagement de ces cellules dans l'ostéoclastogenèse. Des études récentes réalisées dans des modèles murins ont confirmé et/ou apporté des précisions sur les différentes origines

de l'ostéoclaste au cours de la vie en fonction du stade de développement osseux et de l'environnement physiopathologique.

#### Les progéniteurs myéloïdes

#### Développement osseux dès la vie fœtale

Le tissu osseux se développe dès la vie fœtale, quand se forment des centres d'ossification fœtaux. Les premiers ostéoclastes à coloniser ce tissu proviennent de progéniteurs érythromyéloïdes (EMPs) du sac vitellin embryonnaire ; puis du foie et de la rate, organes où se développe l'hématopoïèse fœtale. D'après une étude récente chez la souris, ces premiers ostéoclastes sont nécessaires au développement osseux et à l'éruption dentaire (Jacome-Galarza et al. 2019). Les EMPs ont été décrits comme étant les progéniteurs des macrophages résidents de la peau (cellules de Langherans), du foie (cellules de Küpffer), du système nerveux central (microglie) et du poumon (macrophages alvéolaires), mais n'ont pas encore été décrits dans la genèse des ostéoclastes primitifs s'apparentent à des macrophages résidents du tissu osseux partageant un progéniteur commun avec les autres types de macrophages résidents.

#### Renouvellement continu pour le maintien de l'homéostasie osseuse

Les CSH fœtales colonisent tardivement la moelle osseuse. L'hématopoïèse médullaire est alors mise en place progressivement et devient exclusive dès la naissance. Certaines situations pathologiques, telles que la fibrose médullaire ou l'ostéopétrose, empêchent le bon développement hématopoïétique au sein de la moelle, ce qui entraîne la persistance (ou l'apparition) de l'hématopoïèse extra-médullaire (foie, rate). La fonction des ostéoclastes primitifs est donc essentielle pour former les cavités osseuses nécessaires à la mise en place et au maintien des niches de l'hématopoïèse médullaire (Mansour et al. 2012).

Les CSH médullaires donnent naissance aux progéniteurs myéloïdes qui eux-mêmes peuvent se différencier en précurseurs restreints à la lignée monocytaire/macrophagique, directement parents des ostéoclastes (Xiao et al. 2017). Il est maintenant bien établi que les monocytes et macrophages peuvent se différencier en ostéoclastes dans un environnement conditionné par les cellules stromales médullaires (Udagawa et al. 1990). Ce conditionnement est essentiel et limite l'ostéoclastogenèse *in situ* dans la moelle. Toutefois, il est intéressant de constater que de nombreuses sous-populations monocytaires et macrophagiques sont capables de se différencier en ostéoclastes *in vitro*, même lorsqu'elles sont originaires de tissus extramédullaires (sang, rate, thymus, macrophages alvéolaires) (Udagawa et al. 1990).

La génération de nouveaux ostéoclastes à partir des précurseurs médullaires permet de renouveler de façon continue le pool d'ostéoclastes et de maintenir l'homéostasie osseuse tout au long de la vie. Très récemment, il a été montré que les ostéoclastes primitifs dérivés des EMPs sont remplacés au fur et à mesure par des ostéoclastes dérivés des CSH médullaires, et plus précisément de monocytes circulants qui retournent dans le tissu osseux (Jacome-Galarza et al. 2019). Cette étude in vivo chez la souris est très intéressante par l'approche utilisée : la parabiose post-natale entre deux souris dont les précurseurs myéloïdes expriment les protéines YFP (vert) ou tdTomato (rouge) a permis de tracer in vivo l'origine et le renouvellement des ostéoclastes. L'expression de YFP ou de tdTomato est sous le contrôle de l'expression de *Csf1r*, gène exprimé à la fois par les EMPs et les CSH, ce qui a permis de suivre simultanément, tout en les discriminant, les ostéoclastes primitifs dérivés des EMPs et ceux plus tardifs dérivés des CSH médullaires (Figure 2). Cette étude montre que les ostéoclastes primitifs sont progressivement renouvelés par incrémentation successive de cellules monocytaires circulantes, donnant des ostéoclastes « hybrides » transitoires. Cette étude suggère que les ostéoclastes forment des structures en syncitia à longue durée de vie, où les noyaux sont remplacés un à un par fusion avec des précurseurs monocytaires toutes les 4 à 8 semaines, avec un renouvellement complet au bout de 6 mois environ (Jacome-Galarza et al. 2019). Contrairement aux ostéoclastes générés in vitro qui présentent une durée de vie courte, de quelques jours, ces observations montrent pour la première fois que les ostéoclastes ont la capacité de survivre sur une longue période in situ.



Figure 2. Origines et renouvellement des ostéoclastes dans un modèle murin in vivo. Adapté de (Jacome-Galarza et al. 2019)

Les différentes origines des ostéoclastes (EMPs ou CSH) au cours de la vie ont été confirmées dans une étude encore plus récente réalisée chez la souris, qui utilise une approche similaire de traçage des cellules myéloïdes exprimant tdTomato sous le contrôle de l'expression de *Csfr1* (exprimés par les EMPs et les CSH) ou de *Flt3* (exprimé par les CSH uniquement) (Yahara et al. 2020). De plus, cette dernière étude détaille la genèse des précurseurs ostéoclastiques aux différents stades du développement intra-utérin et post-natal chez la souris. Ainsi, les auteurs ont montré que les EMPs sont les progéniteurs de macrophages primitifs CX3CR1<sup>+</sup> à longue durée de vie, résidents de la rate, et capables de générer des ostéoclastes à l'âge adulte. Ces « pré-macrophages » sont mobilisés en cas de lésions osseuses et migrent dans le tissu osseux pour se différencier en nouveaux ostéoclastes fonctionnels participant au remodelage osseux (Figure 3) (Yahara et al. 2020).



Figure 3. Vue d'ensemble des origines des ostéoclastes depuis la vie fœtale dans un modèle murin in vivo. Adapté de (Yahara et al. 2020).

#### Autres précurseurs en condition inflammatoire

De par leur origine myéloïde commune et la plasticité cellulaire dont elles font preuve, de nombreuses sous-populations monocytaires et macrophagiques sont capables de se différencier in vitro en ostéoclastes dans un milieu conditionné par les cellules médullaires stromales (Udagawa et al. 1990). Une question intéressante et toujours actuelle est la dichotomie entre une origine médullaire (cellules résidentes) et une origine extra-médullaire (cellules circulantes infiltrantes). En condition physiologique, les précurseurs ostéoclastiques privilégiés semblent être d'une part le précurseur restreint à la lignée mono-macrophagique et d'autre part les monocytes/macrophages médullaires. Dans le cadre de la réparation osseuse, d'autres précurseurs peuvent être recrutés, tels que les macrophages primitifs dérivés des EMPs contenus dans la rate (dégradation de l'os abimé avant de reformer de l'os « neuf ») (Yahara et al. 2020). En condition inflammatoire, l'activité des ostéoclastes est potentialisée par un micro-environnement pro-ostéoclastique (cytokines pro-inflammatoires). L'intérêt de ce phénomène est la formation de cavités osseuses supplémentaires qui permettent de palier à un besoin accru en production de cellules de l'immunité innée (monocytes, polynucléaires neutrophiles). Ceci est observé dans le cadre d'une réponse inflammatoire anti-infectieuse par exemple. En revanche, une réponse immunitaire inadaptée (comme c'est le cas dans une inflammation chronique) sera associée à un environnement pro-ostéoclastique délétère qui induit une érosion osseuse pathologique. Cet état pathologique est classiquement décrit dans la polyarthrite rhumatoïde.

La production d'ostéoclastes inflammatoires est de mieux en mieux décrite, à la fois in vitro et in vivo dans le contexte de l'arthrite auto-immune. Les ostéoclastes inflammatoires sont dénommés ainsi de par leur implication directe dans l'érosion osseuse pathologique, et de par leur implication dans le dialogue avec l'immunité adaptative qui passe par la production de cytokines pro-inflammatoires, induisant l'activation et la polarisation de lymphocytes T producteurs de TNFα<sup>+</sup> (Ibáñez et al. 2016). Ces ostéoclastes inflammatoires sont générés à partir de précurseurs différents de ceux décrits en condition physiologique. Dès 2004, il a été montré que les cellules dendritiques immatures peuvent générer des ostéoclastes in vitro par un phénomène de transdifférenciation, exacerbé par un conditionnement arthritique (Rivollier et al. 2004). Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) présentent le plus fort potentiel ostéoclastique in vitro et donnent naissance à des ostéoclastes fonctionnels in vivo chez la souris ostéopétrotique oc/oc (Wakkach et al. 2008). Récemment, une étude menée chez la souris arthritique suggère que les ostéoclastes inflammatoires sont issus exclusivement de précurseurs circulants infiltrants, en particulier à partir d'une souspopulation de macrophages à fort potentiel ostéoclastique dénommés « AtoMs » (arthriticassociated osteoclastogenic macrophages) (Hasegawa et al. 2019).

#### Les étapes de l'ostéoclastogenèse

L'ostéoclastogenèse est un processus complexe de différentiation cellulaire qui nécessite plusieurs étapes que l'on peut distinguer sur le plan morphologique et fonctionnel. Les voies de signalisation impliquées sont bien connues à ce jour et seront intégrées dans les différentes phases décrites.

#### La phase précoce

La phase précoce de l'ostéoclastogenèse se caractérise par la prolifération et la motilité des précurseurs. Les cellules sont encore au stade de cellules mononucléées et doivent dans un premier temps recevoir des signaux de survie et de prolifération. Une bonne motilité cellulaire est requise pour permettre d'une part le recrutement et la migration vers les zones médullaires privilégiées et d'autre part la rencontre entre précurseurs qui précède la fusion cellulaire et la formation du polykaryon.

#### Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL

Il existe deux facteurs hématopoïétiques nécessaires et suffisants pour l'ostéoclastogenèse, la cytokine RANKL et le facteur de croissance de la lignée monocytaire M-CSF (macrophagecolony stimulating factor). La liaison de M-CSF à son récepteur CSF1R induit l'activation des voies ERK/MAP kinases et PI3K/AKT qui sont impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire par leur action anti-apoptotique (Datta, Brunet, and Greenberg 1999; Pixley and Stanley 2004). Les PI3-Kinases induisent l'activation des GTPases de la famille Rac et Rho. Ces GTPases sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette (Golden and Insogna 2004) qui impacte l'adhésion cellulaire, la polarisation, la migration et la phagocytose des macrophages (Pixley and Stanley 2004). L'axe M-CSF/CSF1R n'est pas spécifique de l'ostéoclastogenèse puisqu'il intervient dans la différentiation et la fonction des cellules myéloïdes. Il apparaît cependant nécessaire dans la voie d'activation classique de l'ostéoclastogenèse, car les souris CSF1R<sup>-/-</sup> développent une ostéopétrose associée à un défaut en cellules phagocytaires (Dai et al. 2002).



Figure 4. Voie de signalisation du M-CSF. Modifié de (Pixley and Stanley 2004)

La cytokine RANKL est le ligand du récepteur RANK (receptor activator of Nuclear Factor-KB) de la famille des récepteurs au TNF codé par le gène TNFRSF11A (TNF Receptor Superfamily Member 11a). L'axe RANK/RANKL est indispensable à la formation des ostéoclastes. Le modèle de souris RANK<sup>-/-</sup> présente un phénotype ostéopétrotique et sont dépourvues d'ostéoclastes, sans altération des autres cellules monocytaires et phagocytaires (Dougall et al. 1999; J. Li et al. 2000). L'expression membranaire de RANK par les précurseurs des ostéoclastes paraît donc nécessaire. L'expression de RANK est induite rapidement in vitro, dès 24h après stimulation des cellules médullaires de souris par le M-CSF (Arai et al. 2000). Cependant, les mécanismes de régulation de l'expression de RANK par l'axe MCSF/CSF1R ne sont pas encore totalement établis. Récemment, il a été montré que la voie ERK/MAP kinases située en aval du récepteur à l'insuline est capable d'induire l'expression de RANK (Oh and Lee 2017). La voie ERK/MAP kinases qui est activée en aval de CSF1R pourrait également être impliquée dans l'induction de l'expression de RANK dans les précurseurs en phase précoce de l'ostéoclastogenèse. Les précurseurs RANK<sup>+</sup> présentent un potentiel ostéoclastogénique supérieur, notamment les monocytes humains CD14<sup>+</sup>RANK<sup>+</sup> (Atkins et al. 2006).



Figure 5. Représentation séquentielle de l'expression des facteurs clés dans l'ostéoclastogenèse. Adapté de (Arai et al. 2000)

L'axe RANK/RANKL induit l'activation de l'adaptateur TRAF6 qui, à son tour, active les voies MAP kinases (p38, JNK et ERK), PI3K/AKT et NF-kB (Park, Lee, and Lee 2017). Les facteurs de transcription AP-1 (activator protein 1) et NF-kB s'associent en hétérodimères pour induire l'expression précoce de c-Fos et de NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1). Une boucle d'amplification de NFATc1 est enclenchée et permet l'expression robuste de ce facteur de transcription majeur de l'ostéoclastogenèse. La coopération d'autres récepteurs, tels que TREM2 (triggering receptor expressed in myeloid cells-2) et OSCAR (osteoclast-associated receptor), qui sont associés à des adaptateurs à motifs activateurs ITAM, aboutit à un afflux de calcium intracellulaire nécessaire à la transduction du signal de NFATc1. A ce stade, les pré-ostéoclastes vont entrer dans la phase tardive de l'ostéoclastogenèse qui est caractérisée par la fusion cellulaire, et qui précède la formation des ostéoclastes matures et fonctionnels.



Figure 6. Voies de signalisation RANK/RANKL et boucle d'amplification de NFATc1 dans la phase précoce de l'ostéoclastogenèse. Adapté de (Park, Lee, and Lee 2017)

#### Motilité des précurseurs

Les précurseurs myéloïdes sont capables de migration par chimiotactisme, *i.e.* en réponse à un gradient de concentration de facteurs solubles chimio-attractants (chimiokines). La morphologie des cellules polarisées se caractérise par la formation d'extensions cytoplasmiques grâce à la polymérisation d'actine au front de migration. Ce type d'extension est appelé le « lamellipode » lorsque la cellule migre sur une surface à deux dimensions et le « pseudopode » sur une surface à trois dimensions. Dans les deux cas, les mêmes machineries moléculaires sont impliquées. De fines protrusions tubulaires dynamiques, les filopodes, peuvent également se former. Bien qu'ils participent à la migration cellulaire, les filopodes auraient plutôt un rôle de senseur de l'environnement (Mattila and Lappalainen 2008). Au niveau moléculaire, les protéines de la famille des Rho GTPases, dont Rac1, Cdc42 et RhoA, jouent un rôle central dans la migration cellulaire, à travers la régulation de la polarisation cellulaire et de l'organisation de l'actine (Nobes and Hall 1995; Raftopoulou and Hall 2004). Elles facilitent le réarrangement et la stabilisation des microtubules au niveau du front de migration (Fukata, Nakagawa, and Kaibuchi 2003).

#### La phase tardive

#### NFATc1 : le régulateur précoce de la phase tardive

NFATc1 est le facteur de transcription majeur induit pendant la phase précoce de l'ostéoclastogenèse. Il est au cœur d'une boucle d'amplification positive permettant *in fine* d'induire l'expression des gènes clés de l'ostéoclaste fonctionnel, tels que *ACP5* codant pour la protéine phosphatase TRAP, *CSTK* codant pour la cathepsine K, *MMP9* codant pour la métalloprotéase 9 (Park, Lee, and Lee 2017). NFATc1 induit également l'expression de *DCSTAMP* (Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein) et *OCSTAMP* (Osteoclast Stimulatory Transmembrane Protein), codant pour deux protéines impliquées dans la fusion cellulaire des pré-ostéoclastes (Miyamoto et al. 2012; Park, Lee, and Lee 2017).



Figure 7. L'amplification du signal NFATc1 induit les gènes de la phase tardive de l'ostéoclastogenèse, d'après (Park, Lee, and Lee 2017)

#### Fusion et maturation en ostéoclaste fonctionnel

Il est communément admis qu'un ostéoclaste atteint sa maturité lorsqu'il exprime la protéine TRAP et qu'il possède au moins trois noyaux. Les cellules TRAP<sup>+</sup> mono- ou bi-nucléées sont considérées comme des pré-ostéoclastes. Le polykaryon ne se forme pas par division nucléaire mais uniquement par fusion cellulaire. Il faut donc au moins deux événements de fusion cellulaire pour aboutir à un ostéoclaste mature. Dans un premier temps, les pré-ostéoclastes doivent établir un contact inter-cellulaire à l'aide de pores de fusion nanométriques pour mettre en commun leur contenu cytoplasmique. Ce premier contact peut s'effectuer entre deux cellules adjacentes, mais aussi lors d'émission de protrusions cytoplasmiques qui facilitent les connexions « longue distance » entre cellules (Davis and Sowinski 2008). L'expansion de ces connexions permet d'aboutir à la fusion cellulaire complète, reposant notamment sur l'activité de la dynamine (Verma et al. 2014).



Figure 8. Fusion de pré-ostéoclastes. TRAP staining sur BMMs primaires de souris

Une approche intéressante basée sur la vidéo de pré-ostéoclastes en culture a permis de mieux caractériser l'hétérogénéité morphologique et dynamique des cellules en train de fusionner. La nucléarité des cellules impacte le mécanisme impliqué : la fusion de deux pré-ostéoclastes mono-nucléés (mono/mono) et l'ajout progressif d'un noyau à une cellule multi-nucléée (mono/multi) fait intervenir la molécule CD47, tandis que la syncytin-1 favorise la génération de larges ostéoclastes par la fusion de deux cellules multi-nucléées (multi/multi) (Møller, Delaissé, and Søe 2017). Par ailleurs, la fusion est plus fréquente entre une cellule immobile et une cellule mobile, cette dernière présentant en général la plus faible nucléarité, ce qui suggère un mécanisme préférentiel de gain d'un noyau à la fois (Søe, Hobolt-Pedersen, and Delaisse 2015). Les ostéoclastes matures contiennent en moyenne 5 à 7 noyaux, mais certains peuvent aller jusqu'à une cinquantaine de noyaux, formant ainsi un syncitium (Piper, Boyde, and Jones 1992). Des phénomènes de fusion à partir de deux polykaryons ont été observés et, plus surprenant, des phénomènes de fission qui permettent soit de générer un

ostéoclaste fonctionnel plus petit à partir d'un syncitium, soit d'éliminer un ostéoclaste composé de noyaux apoptotiques (Jansen et al. 2012). La multi-nucléation semble être indispensable à la fonction de résorption osseuse (Piper, Boyde, and Jones 1992). Tous les noyaux d'un ostéoclaste présenteraient le même niveau d'activité transcriptionnelle, qui peut cependant varier d'un ostéoclaste à l'autre. Ceci entraînerait des synthèses protéiques plus ou moins importantes et expliquerait les différences d'activités ostéolytiques observées (Boissy et al. 2002).



Figure 9. Fusion et ostéoclastes matures. Adapté de (Jansen et al. 2012)

L'ostéoclaste mature devient fonctionnel après la réorganisation du cytosquelette, son adhérence à la matrice grâce aux intégrines, et enfin la formation de l'anneau d'actine et de la membrane en bordure en brosse au contact de la matrice osseuse. Cette structure est appelée zone de scellement, ou « sealing zone », elle définit la zone d'acidification et de dégradation de la matrice par les enzymes libérées localement (TRAP, cathepsine K, MMP9). Une lacune osseuse, ou « pit », est alors formée. Un ostéoclaste peut former une ou plusieurs « sealing zone » en même temps. Il peut également former une tranchée, ou « trench », lorsqu'il présente une forte activité collagénolytique avec un taux élevé de cathepsine K (Merrild et al. 2015).

#### Motilité des ostéoclastes matures

L'ostéoclaste est une cellule mobile qui suit un cycle de migration – résorption lui permettant de former plusieurs lacunes de résorption au fur et à mesure de ses déplacements le long des travées osseuses. La migration de l'ostéoclaste est essentielle à sa fonction de résorption.

Tous les processus associés au déplacement des ostéoclastes matures, ainsi qu'à la formation de la « sealing zone », nécessitent une réorganisation du cytosquelette. La motilité de ces cellules adhérentes fait intervenir le système des intégrines, molécules transmembranaires faisant le lien entre le cytosquelette de la cellule et la matrice

extracellulaire. La protéine majeure impliquée est l'intégrine  $\alpha v\beta 3$ , dont l'activité est régulée par la gelsoline, les kinases PI3K et c-Src (Chellaiah et al. 2000; Golden and Insogna 2004; Izawa et al. 2012). L'intégrine  $\alpha v\beta 3$  permet l'attachement de l'ostéoclaste par reconnaissance de l'ostéopontine sous sa forme liée aux cristaux d'hydroxyapatite de la matrice osseuse (Reinholt et al. 1990; Ross et al. 1993). Au niveau intracellulaire, les intégrines sont reliées à des structures du cytosquelette riches en actine, les podosomes.

#### Les podosomes dans l'ostéoclastogenèse

Les podosomes sont des structures dynamiques pouvant rapidement s'assembler et se désassembler, rythmant ainsi le mouvement et les fonctions des cellules adhérentes. Ils sont constitués d'un cœur dense d'actine F, ou « core », entouré d'une toile de filaments d'actine F, ou « cloud ». La dynamique des podosomes repose sur l'activité de nombreuses protéines régulatrices telles que Wasp, le complexe Arp2/3 et la cortactine dans le « core », et les intégrines, les kinases Src/Pyk2 et les Rho GTPases dans le « cloud ». Au cours de l'ostéoclastogenèse, les podosomes s'organisent selon trois formes successives : en clusters dans les pré-ostéoclastes qui s'accumulent en structures annulaires transitoires en expansion, ou « rings », et qui forment enfin une structure stable en périphérie de la cellule, le « podosome belt », correspondant à la « sealing zone » lorsque la cellule évolue sur une matrice minéralisée (Destaing et al. 2002; Jurdic et al. 2006; Georgess et al. 2014).



Figure 10. Dynamique de formation des podosomes au cours de l'ostéoclastogenèse. Adapté de (Destaing et al. 2002; Saltel et al. 2004).

#### Motilité des ostéoclastes : une simple balade digestive ?

Généralement, l'ostéoclaste est statique pendant la dégradation osseuse, ce qui permet de stabiliser la « sealing zone », et alterne les épisodes de résorption et de migration. Toutefois, il a été observé qu'il peut poursuivre sa fonction ostéolytique tout en se déplaçant sur la

matrice, et ainsi former des tranchées qui semblent être associées à un potentiel d'érosion plus agressif (Søe and Delaissé 2017).



Figure 11. Résorption osseuse par lacunes successives ou formation de tranchées, modèle proposé par (Søe and Delaissé 2017).

# Les voies de régulation de l'ostéoclastogenèse

#### Le remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dynamique en constante adaptation aux contraintes environnementales et aux besoins de l'organisme. Ses fonctions de tissu squelettique de soutien, mais également son rôle central dans le métabolisme phosphocalcique et dans l'hématopoïèse, nécessitent une bonne capacité de régénération. L'homéostasie osseuse est maintenue grâce au cycle de résorption – formation osseuse, appelé remodelage osseux. Ce cycle consiste à remplacer périodiquement de l'os âgé par de l'os nouveau, afin de lutter contre l'usure mécanique et l'effet du vieillissement. Il se décompose en phases séquentielles : quiescence, activation, résorption, inversion, formation, minéralisation, arrêt lorsque l'os dégradé est entièrement reformé.

Un déséquilibre du remodelage osseux par défaut de formation induit une ostéopénie pouvant aboutir à l'état d'ostéoporose. Une stimulation anormale de la résorption osseuse se décrit dans certaines pathologies inflammatoires érosives telles que la polyarthrite rhumatoïde (arthrite auto-immune). Le phénotype inverse, l'ostéopétrose, est décrit dans certaines maladies génétiques rares caractérisées par une augmentation de la densité osseuse due à un défaut de développement ou de fonction des ostéoclastes.

La régulation du remodelage osseux se fait aux niveaux local et systémique, et impacte directement l'ostéoclastogenèse et la fonction des ostéoclastes.

#### Régulation locale et réciproque par les cellules osseuses

Les cellules de la lignée ostéoblastique (cellules bordantes, ostéoblastes, ostéocytes) et les ostéoclastes forment un compartiment de remodelage facilitant le couplage entre résorption osseuse (ostéoclastes) et apposition (ostéoblastes). L'association étroite des ostéoblastes et des ostéoclastes permet de former des unités multicellulaires basiques temporaires directement responsables du remodelage osseux.

#### Axe OPG/RANKL/RANK et résorption osseuse

Les facteurs clés de l'ostéoclastogenèse sont le facteur de croissance myéloïde M-CSF et la cytokine RANKL. Les cellules de la lignée ostéoblastique peuvent sécréter ces deux facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Les ostéocytes semblent être la source majoritaire de RANKL, que ce soit sous forme soluble ou membranaire (Xiong et al. 2011; Honma et al. 2014). La proximité des cellules dans le compartiment du remodelage osseux facilite l'activation directe des pré-ostéoclastes à travers l'axe RANKL/RANK, essentiel dans la génération d'ostéoclastes fonctionnels. La régulation négative de la phase de résorption met en jeu la sécrétion de l'ostéoprotégérine (OPG) par les ostéoblastes et ostéocytes. L'OPG est un récepteur « leurre » soluble de RANKL qui empêche la liaison de RANKL à son récepteur RANK. L'OPG peut aussi diminuer l'expression membranaire de RANKL sur les ostéocytes par un phénomène de séquestration intracellulaire dans l'appareil de Golgi (Honma et al. 2013; 2014). L'axe OPG/RANKL/RANK se place au cœur du remodelage osseux. Le ratio OPG/RANKL est déterminant dans le couplage résorption – formation osseuse.

Un anticorps monoclonal spécifique de RANKL, le dénosumab, a été développé dans le but de mimer l'action de l'OPG et ainsi réduire la perte osseuse. Le dénosumab est un traitement indiqué dans l'ostéoporose et en cancérologie dans la prévention des complications osseuses de certaines tumeurs solides avec métastases osseuses (cancer de la prostate, cancer du sein) et dans le traitement des tumeurs osseuses à cellules géantes.

#### Axe Wnt/β-caténine et formation osseuse

Les protéines solubles Wnt sont impliquées dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus, dont le tissu osseux. La liaison à leur récepteur transmembranaire Frizzled associé au co-récepteur LRP5/6 entraine la stabilisation de la β-caténine sous forme hypophosphorylée. Celle-ci s'accumule dans le cytosol et se transloque dans le noyau pour se lier aux facteurs de transcription Lef1/Tcf. La β-caténine déplace les co-répresseurs nucléaires (CoR) de Lef1/Tcf pour faciliter l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (par exemple la cycline D1) et la survie (par exemple le c-myc) (Westendorf, Kahler, and Schroeder 2004). L'axe Wnt/β-caténine exerce un effet ostéogénique en induisant la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes, et en inhibant l'ostéoclastogenèse par augmentation du ratio OPG/RANKL (Krishnan 2006). De plus, le signal Wnt induit l'engagement des cellules souches mésenchymateuses vers une différenciation ostéoblastique, en réduisant leur différenciation en adipocyte ou en chondrocyte. Les protéines Wnt interviennent dans la régulation locale du remodelage osseux par action autocrine et paracrine. L'axe Wnt/β-caténine est lui-même la cible de nombreuses voies régulatrices, en
particulier par des facteurs inhibiteurs se liant à LRP5/6, tels que le facteur Dickkopf-1 (DKK-1) et la sclérostine (SOST).



<u>Figure 12. Rôle de l'axe Wnt/β-caténine dans le remodelage osseux. Adapté de (Baron and Kneissel</u> <u>2013).</u>

### Ostéocytes et mécano-transduction : rôle de la sclérostine

La régulation mécanique du remodelage osseux n'est pas encore totalement élucidée. Cependant, il a été montré que les ostéocytes sont les cellules responsables de la mécanotransduction. Les ostéocytes représentent le stade terminal de différenciation de la lignée ostéoblastique, et peuvent persister plusieurs dizaines d'années (Franz-Odendaal, Hall, and Witten 2006). Ils se localisent dans des logettes, appelées ostéoplastes, qui sont inclues dans la matrice osseuse nouvellement minéralisée, et reliées entre elles par des jonctions communicantes (canalicules). L'élimination spécifique des ostéocytes dans un modèle de souris transgénique induit une résistance à la perte osseuse induite par la mise en décharge des pattes postérieures pendant 7 jours (Tatsumi et al. 2007).

Le médiateur clé de la mécano-transduction semble être la sclérostine sécrétée spécifiquement par les ostéocytes. En effet, la charge mécanique entraîne une suppression de la transcription ostéocytaire de la sclérostine, une réduction des taux de sclérostine sécrétée et une augmentation de la masse et de la résistance osseuses. A l'inverse, l'absence

de charge mécanique semble augmenter l'expression de la sclérostine et entraîne une perte osseuse accrue (Sapir-Koren and Livshits 2014). L'expression de la sclérostine par les ostéocytes semble être directement régulée par la perception des contraintes mécaniques *via* le réseau canaliculaire des ostéocytes, bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore totalement élucidés.

Le rôle central de la sclérostine dans le couplage du remodelage osseux est de mieux en mieux connu. En effet, cet antagoniste de la voie canonique Wnt/β-caténine se fixe sur le corécepteur LRP5/6, ce qui le rend indisponible et empêche la transduction du signal. La sclérostine exerce ainsi un frein sur la formation osseuse par inhibition de la maturation des pré-ostéoblastes, et favorise la résorption osseuse par inhibition de la production ostéocytaire d'OPG, ce qui augmente la stimulation pro-ostéoclastique par l'axe RANK/KANKL. Il a été récemment montré que les ostéoclastes pourraient réguler négativement l'expression de la sclérostine par la sécrétion du facteur LIF (leukemia inhibitory factor), exerçant ainsi un rétrocontrôle sur le couplage résorption – formation osseuse (Koide et al. 2017).



Figure 13. La sclérostine dans le couplage du remodelage osseux. Modèle proposé par (Koide and Kobayashi 2019).

### Axe S1P/S1PR : la dualité du Sphinx

La sphingosine tient son nom du Sphinx grec, créature mythologique célèbre pour son énigme (finalement résolue par Œdipe). Le sphingosine-1-phosphate (S1P) est un métabolite pléiotrope issu des sphingolipides membranaires. Il est impliqué dans la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation, la migration par chimiotactisme, et dans la production de cytokines. Cinq récepteurs S1PR ont été décrits à ce jour chez les mammifères, S1PR1 étant le récepteur le plus largement exprimé. Le S1P participe directement à la régulation du remodelage osseux par un effet positif à la fois sur l'ostéoclastogenèse et sur l'ostéogenèse, ce qui suggère une régulation complexe.

Le S1P exerce une action pro-ostéoclastique en régulant la migration des précurseurs ostéoclastiques et leur rétention dans le tissu osseux. L'expression séquentielle des récepteurs S1PR1 et S1PR2 par les précurseurs détermine l'effet global du chimiotactisme exercé par S1P. La concentration de S1P est bien plus élevée dans la circulation sanguine et lymphatique que dans les autres tissus. L'expression et l'activation de S1PR2 par des taux élevés de S1P a un effet de chimio-répulsion : les précurseurs migrent du sang vers le tissu osseux (Ishii et al. 2010). Localement à faibles concentrations de S1P, l'activation de S1PR1 a un effet chimio-attracteur : les précurseurs peuvent retourner dans la circulation périphérique (Ishii et al. 2009).

Le S1P a aussi une action ostéogénique directe *via* S1PR1 et S1PR2 en favorisant l'activation du facteur de transcription RUNX2 et ainsi l'expression de l'ostéocalcine et de la phosphatase alkaline, deux facteurs clés de l'ostéogenèse (Sato et al. 2012). Le S1P sécrété par les ostéoclastes participe au couplage résorption – formation osseuse en se liant à son récepteur S1PR3 exprimé par les ostéoblastes (Keller et al. 2014).



Figure 14. Le S1P contrôle la migration des précurseurs ostéoclastiques. Adapté de (Ishii and Kikuta 2013)

## Régulation associée à l'homéostasie phosphocalcique

Le tissu osseux est le lieu principal de stockage du calcium et du phosphore dans la matrice osseuse minéralisée. L'os, l'émail dentaire et la dentine contiennent 99% du calcium de l'organisme sous forme de cristal osseux complexe, de structure très proche de l'hydroxyapatite naturel. L'action des hormones calciotropes permet soit de libérer le calcium osseux (effet hypercalcémiant), soit de le stocker (effet hypocalcémiant). Les hormones calciotropes sont la parathormone (PTH), la calcitonine et la vitamine D active (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

La PTH est une hormone hypercalcémiante et hypophosphorémiante synthétisée par les glandes parathyroïdes en réponse à une hypocalcémie. Ses effets sur le métabolisme osseux sont complexes et dépendent de la dose et du mode de sécrétion continu ou intermittent. Il est maintenant bien établi qu'une administration intermittente de faibles doses de PTH a un effet anabolisant et augmente la masse osseuse : ce phénomène est mis à profit dans le traitement journalier de l'ostéoporose par des analogues de PTH, tels que le tériparatide. A l'inverse, un excès continu ou intermittent de PTH tel que retrouvé dans l'hyperparathyroïdisme induit un effet global catabolisant avec une majoration de la résorption osseuse. Son récepteur PTH1R est exprimé par toutes les cellules de la lignée ostéoblastique, mais pas par les ostéoclastes. La PTH a donc un effet direct sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, et un effet indirect sur l'ostéoclastogenèse. A titre d'exemple, la dualité de la PTH sur le remodelage osseux est illustrée par ses effets directs sur les ostéocytes : elle induit d'une part l'expression de RANKL avec un effet pro-ostéoclastique, et d'autre part elle inhibe l'expression de la sclérostine ayant un effet pro-ostéogénique (Wein and Kronenberg 2018).

La vitamine D3, ou calcitriol, est obtenue par voie endogène par l'action des rayons UVB sur le 7-déhydrocholestérol des cellules de la peau, et par voie exogène après deux hydroxylations successives de la vitamine D alimentaire. Elle présente un effet hypercalcémiant et hyperphosphorémiant en stimulant la résorption osseuse. Elle favorise également le couplage résorption – formation osseuse en induisant l'expression de nombreux gènes par les ostéoblastes, tels que la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine et le collagène de type I, impliqués dans la minéralisation osseuse.

La calcitonine est une hormone hypocalcémiante et hypophosphorémiante sécrétée par les cellules C de la glande thyroïde, en réponse à l'hypercalcémie. Elle exerce une action directe sur les ostéoclastes, qui expriment le récepteur CTR. Elle inhibe la résorption osseuse et le rejet du calcium par le système ostéolytique. Par ailleurs, la calcitonine inhibe l'expression du canal d'efflux du shingosine-1-phosphate (S1P) produit par les ostéoclastes, ce qui réduit l'effet ostéogénique du S1P *via* le récepteur S1PR3 exprimé par les ostéoblastes, réduisant *in fine* la formation osseuse (Keller et al. 2014). Ainsi, la calcitonine réduit de manière importante

le renouvellement osseux dans les situations caractérisées par une augmentation du taux de résorption osseuse (forte activité ostéoclastique), telles que la maladie de Paget et la perte osseuse aiguë suite à une immobilisation soudaine.

# Régulation par les hormones sexuelles

En dehors du contrôle de l'homéostasie phosphocalcique, les œstrogènes sont les principaux régulateurs hormonaux du niveau de remodelage du tissu osseux. La privation des œstrogènes à la ménopause induit une perte osseuse responsable de l'ostéoporose postménopausique chez les femmes. Les androgènes ont également des effets sur le tissu osseux par conversion oestrogénique sous la dépendance de l'aromatase largement exprimée par les ostéoblastes.

Les récepteurs aux œstrogènes (ERa et ERß) et aux androgènes (AR) sont exprimés par les lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques. Cependant, les mécanismes de régulation directe ne sont pas encore clairement établis. Les œstrogènes auraient un effet pro-apoptotique sur les ostéoclastes et, à l'inverse, un effet anti-apoptotique sur les ostéoblastes ; ils induiraient également la synthèse d'OPG par les ostéoblastes (Kousteni et al. 2001; Bord et al. 2003). Par ailleurs, les œstrogènes ont un effet indirect sur le remodelage osseux en modulant l'expression de cytokines pro-ostéoclastiques. Par exemple, des taux augmentés en IL-1 et IL-6 ont été retrouvés après la ménopause, ce qui expliquerait la perte osseuse accrue due à un déséquilibre du remodelage osseux en faveur de l'activité ostéoclastique (Zallone 2006).

Une étude de la masse osseuse chez 2336 femmes pré- et péri-ménopausées (42-52 ans) a également montré que la perte osseuse chez la femme intervient parfois des années avant la ménopause, alors que les taux d'œstrogènes sont conservés (Sowers et al. 2003). Seul le taux d'hormone de stimulation folliculaire (FSH) est corrélé à la perte osseuse mesurée (Sowers et al. 2003). Plus récemment, il a été montré *in vitro* que la FSH stimule l'expression de RANK sur les monocytes humains CD14<sup>+</sup>, qui sont des précurseurs ostéoclastiques (Cannon, Kraj, and Sloan 2011).

# Régulation par les facteurs de croissance

### Facteurs de croissance ostéogéniques

**Les protéines BMPs** (bone morphogenetic proteins) font partie de la superfamille du TGF-β et régulent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes,

adipocytes et chondrocytes. Elles induisent l'expression de RUNX2 codant pour un facteur de transcription essentiel dans l'ostéogenèse. Elles activent toutes les phases de l'ostéogenèse jusqu'à la génération d'ostéoblastes matures et d'ostéocytes (M. Wu, Chen, and Li 2016).

**Le TGF-**β active l'ostéogenèse jusqu'à la génération d'ostéoblastes immatures. Contrairement aux BMPs, il active la voie Smad2/3 inhibitrice de la maturation tardive des ostéoblastes par une régulation négative de Runx2, ce qui réduit la minéralisation et la génération d'ostéocytes (M. Wu, Chen, and Li 2016).

**Le FGF** (fibroblast growth factor) est localement produit par les cellules de la lignée ostéoblastique. Le FGF-2 et le FGF-18 ont un effet ostéogénique direct. Le FGF-2 potentialise l'ostéogenèse induite par les BMPs (M. Wu, Chen, and Li 2016).

L'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) stimule la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, favorisant la croissance osseuse. Dans le remodelage osseux, l'IGF-1 exerce également un effet pro-ostéoclastique comme le suggère le modèle murin déficient pour l'IGF-1 qui présente une masse osseuse élevée et un défaut de résorption osseuse (Y. Wang et al. 2006).

L'activation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) induit la prolifération des cellules souches mésenchymateuses et des précurseurs ostéoblastiques, mais inhibe la maturation des pré-ostéoblastes. D'autre part, il induit la synthèse des facteurs pro-ostéoclastiques M-CSF et RANKL, tout en inhibant la synthèse d'OPG, favorisant indirectement l'ostéoclastogenèse (Schneider, Sibilia, and Erben 2009).

### Facteurs pro-ostéoclastiques à forte dose

Les glucocorticoïdes sont les hormones synthétisées en réponse à diverses situations de stress (besoins énergétiques, stress physique ou psychologique) selon un mécanisme partagé par tous les vertébrés (Suarez-Bregua, Guerreiro, and Rotllant 2018). Ils sont réputés pour avoir un effet pro-ostéoclastique et accélérer la résorption osseuse. Toutefois, des taux physiologiques de glucocorticoïdes sont indispensables dans la formation normale du squelette et activent l'ostéogenèse *via* la sécrétion de protéines Wnt par les ostéoblastes (Zhou, Cooper, and Seibel 2013). Lors de la réponse au stress, des taux élevés en glucocorticoïdes sont produits. Dans ce contexte, ils bloquent l'ostéogenèse, induisent l'apoptose des ostéoblastes matures et des ostéocytes, et augmentent le ratio RANKL/OPG en faveur de l'ostéoclastogenèse (Siddiqui and Partridge 2016). Une exposition prolongée iatrogène ou une synthèse anormale (maladie de Cushing) diminuent la densité osseuse pouvant évoluer vers une ostéoporose induite par les glucocorticoïdes.

L'hormone thyroïdienne est essentielle à l'homéostasie osseuse et à la croissance normale du squelette en régulant le turn-over osseux (Bassett and Williams 2016). L'hyperthyroïdie est caractérisée par une augmentation du remodelage osseux, l'augmentation du nombre d'ostéoclastes et une résorption osseuse plus rapide conduisant à une perte osseuse accrue (Murphy and Williams 2004).



Figure 15. Principales voies de régulation physiologiques du remodelage osseux. Adapté de (Siddiqui and Partridge 2016).

# Régulation par les médiateurs de l'immunité

Dans les années 2000, la mise en évidence d'une régulation de l'ostéoclastogenèse par des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les lymphocytes T a fait naître la discipline de l'ostéo-immunologie (Takayanagi et al. 2000). Cette régulation entre dans le cadre d'une activation immunitaire adaptée et limitée dans le temps. Dans cette partie, nous allons décrire les principaux médiateurs de l'immunité et les signaux de danger qui impactent l'ostéoclastogenèse. Nous verrons plus loin que des mécanismes similaires, mais non contrôlés, sont impliqués dans la physiopathologie de l'arthrite auto-immune.

## Médiateurs pro-ostéoclastiques

### Cytokines pro-inflammatoires : la triade IL-1, IL-6, TNFa

Le TNF $\alpha$  peut induire directement la formation d'ostéoclastes matures, par l'induction de l'expression du récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques (Komine et al. 2001). De plus, il potentialise indirectement l'ostéoclastogenèse par l'induction de l'expression de M-CSF et de RANKL par les cellules stromales (Kitaura et al. 2013). Les interleukines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 induisent également l'expression de RANKL et agissent en tant que co-facteurs de stimulation de l'axe RANK/RANKL sur les précurseurs ostéoclastiques (Amarasekara et al. 2018).

### Autres cytokines

La production d'IL-17 par les lymphocytes Th17 est une des voies pro-ostéoclastiques majeures. L'IL-17 induit l'expression de RANKL et des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNFα, ce qui potentialise indirectement l'ostéoclastogenèse (Amarasekara et al. 2018). D'autres cytokines pro-ostéoclastiques ont été décrites, telles que les interleukines IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, IL-23 et IL-34 (Tableau 1).

### Signaux de danger : PAMPs et DAMPs

La réponse immunitaire innée débute par la reconnaissance de motifs particuliers associés aux pathogènes, appelés PAMPs (pathogen associated molecular patterns), et de motifs endogènes associés aux lésions tissulaires, appelés DAMPs (damage associated molecular patterns). Ces signaux de danger sont captés grâce à des récepteurs de la famille des PRRs (pattern recognition receptors) exprimés principalement par les cellules phagocytaires. L'activation des récepteurs toll-like TLRs participe à la production des cytokines pro-inflammatoires avec un effet global pro-ostéoclastique. Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'activation des TLR2 et TLR4 par les DAMPs dans le tissu synovial des articulations atteintes entretient l'inflammation chronique et l'érosion osseuse observées (Goh and Midwood 2012).

Le TLR4 est aussi exprimé par les cellules souches mésenchymateuses et les ostéoblastes. Son activation par le lipopolysaccharide LPS exogène (PAMP) ou par des DAMPs induit la synthèse de RANKL et de M-CSF par les ostéoblastes, sans modifier la synthèse d'OPG, ce qui entraine un ratio RANKL/OPG augmenté en faveur de l'ostéoclastogenèse (Alonso-Pérez et al. 2018).

### Voies non classiques d'induction de l'ostéoclastogenèse

L'ostéoclastogenèse nécessite deux facteurs clés : le M-CSF et le RANKL. Toutefois, il a été montré il y a 20 ans que la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  est un facteur qui stimule directement les précurseurs ostéoclastiques par une voie indépendante de l'axe OPG/RANK/RANKL (Kobayashi et al. 2000). Le cocktail TNF $\alpha$  et M-CSF permet de générer *in vitro* des ostéoclastes fonctionnels, ayant toutefois une capacité de résorption osseuse plus faible que celle des ostéoclastes obtenus par la stimulation classique (M-CSF et RANKL) (Azuma et al. 2000). Une co-stimulation par l'IL-1 $\alpha$  (Kobayashi et al. 2000) ou par l'IL-1 $\beta$  (Azuma et al. 2000) permet de potentialiser la fonction de résorption des ostéoclastes générés. Plus récemment, une étude dans le modèle murin déficient pour RANK a confirmé que le TNF $\alpha$  induit faiblement l'ostéoclastogenèse en présence de M-CSF, et que l'IL-6 potentialise la formation d'ostéoclastes fonctionnels (O'Brien et al. 2016).

Le LPS est signal de danger exogène issu de la structure membranaire externe des bactéries à Gram négatif. Il est reconnu par le TLR4 exprimé par les cellules phagocytaires, dont les monocytes/macrophages. L'axe LPS/TLR4 inhibe l'ostéoclastogenèse en induisant préférentiellement la différenciation macrophagique (Alonso-Pérez et al. 2018). Le LPS inhibe l'expression de NFATc1 dans les précurseurs encore non engagés. Cependant, sous certaines conditions, le LPS peut favoriser l'ostéoclastogenèse sur des précurseurs déjà engagés par la stimulation M-CSF/RANKL, où la boucle d'amplification de NFATc1 est déjà en place. Dans ce cadre, il prolonge la survie des ostéoclastes. Une étude *in vitro* sur les précurseurs médullaires de souris (bone marrow-derived macrophages, BMMs) a permis de mieux comprendre le rôle ambivalent du LPS dans l'ostéoclastogenèse et de définir des conditions particulières de culture *in vitro* pour sa modulation par le LPS (J. Liu et al. 2009).

# Médiateurs inhibiteurs de l'ostéoclastogenèse

## Les interférons

Les interférons de type I, IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ , sont produits en réponse à la stimulation de TLRs intracellulaires (TLR3/7/8/9) et ont un effet anti-ostéoclastique en diminuant l'expression de c-Fos impliqué dans la voie de signalisation de RANK (Amarasekara et al. 2018).

L'interféron de type II, IFN<sub>Y</sub>, est une cytokine majeure dans la réponse immunitaire cytotoxique impliquant les cellules NK, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes Th1 et les macrophages activés, toutes ces cellules produisant elles-mêmes l'IFN<sub>Y</sub>. Cette cytokine inhibe fortement l'ostéoclastogenèse en induisant l'ubiquitinylation et la dégradation de TRAF6, un facteur essentiel dans la transduction du signal RANK/RANKL (Takayanagi et al. 2000).

### Autres cytokines

Très récemment, il a été montré que le TGF- $\beta$ 1 a un effet négatif direct en bloquant la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, ce qui inhibe la synthèse précoce de NFATc1 dans l'ostéoclastogenèse (Tokunaga et al. 2020). D'autres cytokines ont été décrites comme étant anti-ostéoclastiques, telles que l'IL-3, -4, -10, -12, -27, -33 (Tableau 1). Les cytokines IL-4 et IL-10 interviennent dans la réponse T de type Th2 et ont un effet anti-inflammatoire en inhibant la production des cytokines pro-inflammatoires et pro-ostéoclastiques IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$ . L'IL-12 intervient dans l'axe IFN $\gamma$ /IL-12 de la réponse immunitaire T de type Th1, connue pour inhiber l'ostéoclastogenèse (Takayanagi et al. 2000).

### **GM-CSF**

Le facteur de croissance GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) induit l'engagement des progéniteurs myéloïdes vers la lignée restreinte des cellules dendritiques. Il induit la prolifération cellulaire et permet ainsi d'augmenter le pool de précurseurs ostéoclastiques (Ruef et al. 2017). Une pré-incubation des précurseurs CD11c+ de souris avec le GM-CSF retarde l'ostéoclastogenèse par une phase prolongée de prolifération. *In vitro*, le GM-CSF en association à l'IL-4 induit la différenciation des progéniteurs en cellules dendritiques. Tableau 1. Résumé des effets pro- et anti-ostéoclastiques des cytokines dans

### l'ostéoclastogenèse. Adapté de (Amarasekara et al. 2018)

Cytokine	Action
Osteoclastogenic cytokines	
RANKL	Induces OC differentiation, survival, proliferation, and maturation
M-CSF	Induces OC differentiation, survival, proliferation, and maturation
TNF-α	Induces RANKL and RANK expression; stimulates OC differentiation
IL-1a	Induces RANKL and OC marker expression; activates MITF induction
IL-1b	Induces RANKL expression and OC differentiation
IL-6	Induces RANKL and OC marker expression
1L-7	Induces RANKL and TNF-α expression; activates STAT5
IL-8	Induces RANK-mediated NFATc1 activation
IL-11	Induces OC differentiation; increases OC progenitor cells
IL-15	Induces TNF-α and RANKL expression; stimulates OC differentiation
IL-17	Induces RANKL, TNF-α, IL-1, and IL-6 expression
IL-23	Induces RANKL and RANK expression; stimulates IL-17 producing Th17 cell expansion
IL-34	Induces OC differentiation; activates STAT3/Smad7 signaling pathway
Anti-osteoclastogenic cytokines	3
OPG	Inhibits OC differentiation (a decoy receptor of RANKL)
IFN-α	Downregulates c-Fos expression
IFN-β	Inhibits RANK- and TLR5-mediated OC differentiation; downregulates JAK1/STAT3/c-Fos signaling pathway
IFN-γ	Inhibits RANKL- and TNF- $\alpha$ -induced OC differentiation; stimulates OC apoptosis
IL-3	Downregulates c-Fms, PU.1, c-Fos, and TNFR expression
IL-4	Inhibits RANKL-induced NFATc1 induction; downregulates TNF-α, IL-1, IL-6, and RANKL expression
IL-10	Downregulates NFATc1, IL-1, TNF-α, and IL-6 production; induces OPG expression
IL-12	Inhibits RANKL- and TNF-α-induced OC differentiation
IL-27	Inhibits RANKL-induced signaling pathway; downregulates IL-17-mediated Th17 cell differentiation
IL-33	Inhibits RANKL-induced OC differentiation; induces OC apoptosis

# Les ostéoclastes dans l'arthrite autoimmune

# La polyarthrite rhumatoïde

# Les mots-clés

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie inflammatoire chronique des articulations d'origine auto-immune. Bien que la physiopathologie ne soit pas encore totalement élucidée, de très nombreuses études ont permis de décrire avec de plus en plus de précisions les mécanismes impliqués et les facteurs de risques associés. En effet, la PR est une maladie multifactorielle, dont l'apparition et le développement dépendent de facteurs environnementaux (40%) et (épi)génétiques (60%) (Smolen et al. 2018). La prévalence globale est estimée entre 0.5 et 1% de la population générale d'Europe du Nord (Tobón, Youinou, and Saraux 2010), ce qui en fait le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. La PR se caractérise par une atteinte poly-articulaire, évoluant par poussées inflammatoires avec destruction progressive du cartilage, érosion osseuse et déformation articulaire invalidante. Les différentes stratégies thérapeutiques permettent aujourd'hui d'atteindre une rémission par le contrôle de la maladie, mais sans toutefois obtenir une véritable guérison. Sans lister toutes les lignes de traitements possibles, nous exposerons les biothérapies ciblant les différents axes de la réponse immunitaire impliqués dans l'entretien d'un environnement inflammatoire pro-ostéoclastique.

# **Physiopathologie**

La PR se développe progressivement, avec un premier stade asymptomatique où apparaissent les stigmates d'auto-immunité. La rupture de tolérance périphérique est facilitée par les facteurs de risques génétiques et environnementaux. L'apparition d'une réponse auto-immune se caractérise par la production d'auto-anticorps tels que le facteur rhumatoïde, dirigé contre les IgG, et les ACPAs, dirigés contre des peptides citrullinés. Ces deux entités sont des critères biologiques du score de classification ACR/EULAR 2010. D'autres auto-anticorps sont également décrits dans la PR, mais leur place dans le diagnostic et la physiopathologie reste à mieux définir (Fang, Ou, and Nandakumar 2019). La production d'ACPAs est secondaire à l'activation immunitaire des lymphocytes T spécifiques de néo-antigènes issus de protéines du soi modifiées par citrullination. Ces lymphocytes T vont ensuite activer les lymphocytes B

générant les plasmocytes producteurs d'ACPAs. La réaction inflammatoire intra-articulaire se développerait à la suite d'un second événement immunitaire, comme la formation de complexes immuns et/ou l'activation du complément *in situ*. A ce stade, l'infiltrat inflammatoire induit une synovite, avec hyperplasie de la membrane synoviale, hypervascularisation et infiltrat de cellules monocytaires et lymphocytaires. L'environnement pro-inflammatoire dans le pannus synovial formé induit les lésions retrouvées au stade de PR établie, notamment en exerçant un effet pro-ostéoclastique.



*Figure 16. Développement et progression de la polyarthrite rhumatoïde. Adapté de (Smolen et al.* <u>2018)</u>

# Environnement pro-ostéoclastique

## Pannus synovial

Le synovium est un tissu formé d'une fine couche de synoviocytes de type macrophages et fibroblastes (FLS) et d'une sous-couche vascularisée contenant des fibroblastes, des adipocytes et quelques cellules immunitaires. Ce tissu produit dans la cavité articulaire le liquide synovial qui permet une bonne fluidité articulaire, et contient des nutriments pour les chondrocytes, uniques cellules du cartilage articulaire. L'infiltrat inflammatoire induit une

hyperplasie du synovium où les synoviocytes activés prolifèrent et sécrètent eux-mêmes des cytokines pro-inflammatoires et des protéases. L'infiltrat de cellules immunitaires induit la formation de centre germinatifs ectopiques avec production locale de plasmocytes autoréactifs. Les monocytes et cellules dendritiques infiltrants participent activement à l'entretien de l'inflammation. L'ensemble de la lésion est ainsi nommé pannus synovial. Le liquide synovial, normalement acellulaire, est colonisé par des polynucléaires neutrophiles et par des synoviocytes ayant acquis un phénotype invasif. Ces synoviocytes, en particulier les FLS exprimant la cadhérine-11 (Kiener et al. 2009), produisent des protéases et collagénases responsables de la destruction progressive du cartilage.

### Ostéoclastogenèse inflammatoire

### Hypoxie tissulaire

L'hyperplasie synoviale induit un besoin localement accru en oxygène. Le tissu synovial enflammé contient des zones d'hypoxie et d'hypoperfusion, ce qui entraîne un stress métabolique et la translocation nucléaire de facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie (HIFs). Ceux-ci induisent l'expression de gènes du métabolisme glycolytique tel que le récepteur au glucose GLUT1, et la production de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Muz et al. 2009). L'angiogenèse facilite l'infiltrat des cellules inflammatoires et entretient la synovite dans la PR (Akhavani et al. 2009; Elshabrawy et al. 2015). L'hypoxie pathologique du synovium, mesurée par la pression partielle en oxygène (pO2), est inversement corrélée à la synovite macroscopique et aux taux de cytokines pro-inflammatoires dans le liquide synovial des patients atteints de PR (C. T. Ng et al. 2010). L'hypoxie du micro-environnement synovial de la PR reflète les conditions relativement appauvries en oxygène du micro-environnement osseux (environ 6% dans le périoste et 1,5% dans la moelle osseuse de souris) (Spencer et al. 2014). L'hypoxie est favorable à l'ostéoclastogenèse, mais en conservant des ré-oxygénations intermittentes pour éviter une acidification excessive délétère à la survie et à l'activité des ostéoclastes (Utting et al. 2010). Ces fluctuations d'apport en oxygène semblent essentielles au métabolisme complexe des ostéoclastes où la glycolyse et la respiration mitochondriale sont utilisées pour fournir assez d'énergie (ATP) pour leur fonction de résorption osseuse, et limiter l'accumulation de radicaux libres oxygénés (ROS) pro-apoptotiques (Knowles 2015; Arnett and Orriss 2018). Récemment, Murata et al ont montré que l'hypoxie stimule la voie NF- $\kappa$ B non canonique dans les macrophages humains en présence de RANKL, induisant le facteur de transcription E2F1 qui est impliqué dans l'expression des gènes du métabolisme glycolytique (en synergie avec HIF-1α) et de l'inflammation (Murata et al. 2017). Ces auteurs ont identifié COMMD1 comme régulateur négatif de l'ostéoclastogenèse, inactivé par l'hypoxie (Murata et al. 2017). Ces

49

résultats suggèrent que l'hypoxie favorise la génération d'ostéoclastes inflammatoires à partir des précurseurs infiltrants dans la PR.



Figure 17. Rôle de l'hypoxie dans la polyarthrite rhumatoïde. Adapté de (Muz et al. 2009)

## Cytokines pro-ostéoclastiques

La PR est une pathologie érosive caractérisée par une destruction osseuse au niveau des articulations atteintes. La maturation des ostéoclastes est induite par la sécrétion de cytokines pro-ostéoclastiques telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$ , l'IL-17 et RANKL par les macrophages infiltrants, les lymphocytes T et les FLS activés. Les ostéoclastes sont générés directement à partir des précurseurs infiltrants du synovium, avec migration dans le tissu osseux adjacent (Schett and Gravallese 2012). Les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL-6 peuvent directement générer des ostéoclastes par la voie RANK-indépendante dans le synovium enflammé, mais pas dans la moelle osseuse des souris arthritiques déficientes en RANK (O'Brien et al. 2016). Ces ostéoclastes inflammatoires sont responsables d'une augmentation

de la résorption osseuse et participent au dialogue pro-inflammatoire par l'activation et la polarisation des lymphocytes T producteurs de TNFα (Ibáñez et al. 2016). Récemment, il a été montré que la sous-population lymphocytaire Th22 a un effet pro-ostéoclastique en sécrétant de l'IL-22, une cytokine augmentée dans le fluide synovial des patients atteints de PR (Miyazaki et al. 2018). Les Th22 infiltrent le tissu synovial sous l'effet des chimiokines CCL17, CCL20 et CCL28, présentes en abondance dans le synovium dans la PR. L'IL-22 augmente l'ostéoclastogenèse *in vitro* en induisant l'expression de NFATc1 dans les monocytes humains (Miyazaki et al. 2018).

### Rôles des auto-anticorps

Par ailleurs, les auto-anticorps de la PR, en particulier les ACPAs, présenteraient des effets pro-ostéoclastiques directs selon deux voies possibles : *via* la liaison de la partie Fc des IgG au récepteur membranaire FcγR exprimé par les pré-ostéoclastes (Seeling et al. 2013), et *via* la reconnaissance de motifs citrullinés présents à la surface de ces derniers (Harre et al. 2012; Steffen, Schett, and Bozec 2019). De plus, la citrullination de protéines présentes à la surface des cellules dendritiques immatures serait la cible des ACPAs, et faciliterait la trans-différenciation de ces cellules en ostéoclastes *via* la sécrétion autocrine d'IL-8 pro-ostéoclastique (Krishnamurthy et al. 2019).

# Thérapies ciblant les ostéoclastes

## Thérapies ciblées anti-inflammatoires

La composante inflammatoire est prédominante dans la PR, elle est responsable des poussées d'arthrite à la fois douloureuses et invalidantes. Les stratégies thérapeutiques visent la rémission de la maladie, ou au moins une activité minimale de la maladie, afin de restaurer les meilleures fonctions articulaires possibles et de réduire les atteintes tissulaires. Les traitements utilisés dans la PR sont communément appelés DMARDs, « disease-modifying antirheumatic drugs », qui comprennent des thérapies conventionnelles et des thérapies ciblées. Les molécules synthétiques utilisées en thérapies conventionnelles sont les plus anciennes et n'ont pour la plupart pas de cibles reconnues. On peut citer le méthotrexate, utilisé en première ligne en association avec des glucocorticoïdes, la sulfasalazine, l'hydroxychloroquine, le léflunomide et les sels d'or. Les thérapies ciblées sont indiquées en cas de réponse insuffisante ou d'intolérance aux thérapies conventionnelles. Ces molécules ont été développées sur la base des connaissances de plus en plus précises des processus biologiques en jeu dans la composante inflammatoire de la PR, qui repose sur un réseau

complexe de cytokines, avec le TNFa comme élément prépondérant. Ainsi, les anti-TNF ont ouvert la voie des biothérapies ciblées dans le traitement de la PR depuis le succès thérapeutique de l'infliximab, autorisé par la Food and Drug Administration (FDA) dès 1999 dans la PR, un an après sa première autorisation de mise sur le marché dans le traitement de la maladie de Crohn, une autre maladie inflammatoire chronique avec une « composante TNF $\alpha$  » majeure révélée par l'efficacité thérapeutique d'un anti-TNF (Targan et al. 1997). Aujourd'hui, 5 molécules ciblent le TNFa: infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab, certolizumab. Le panel de biothérapies s'élargit et permet de cibler la voie de l'IL-6, autre cytokine pro-inflammatoire majeure de la PR : deux anticorps monoclonaux inhibiteurs du récepteur de l'IL6 sont des biothérapies indiquées dans la PR depuis 2009 (tocilizumab) et 2018 (sarilumab) ; d'autres anticorps dirigés contre l'IL6 sont en cours d'évaluation (sirukumab et olokizumab). D'autres biothérapies immunosuppressives sont aussi proposées afin de réguler la réponse humorale par déplétion des lymphocytes B (rituximab, un anti-CD20), ou la réponse cellulaire par action sur les molécules « checkpoint » (abatacept, une protéine de fusion soluble CTLA-4-Ig). Des inhibiteurs des Janus kinases (JAK) ont également été testés dans la PR, montrant une efficacité comparable aux anti-TNF (Taylor 2019).

D'autres thérapies ciblées ont été évaluées avec plus ou moins d'efficacité. Une méta-analyse des essais cliniques (Kerschbaumer et al. 2020) montre que les biothérapies ciblant l'axe IL-12/IL-23 (ustekinumab, guselkumab) n'ont pas d'efficacité supérieure au placebo. Les biothérapies ciblant l'IL-17 (secukinumab) et les lymphocytes T CD4 (tregalizumab, anti-CD4) ont une efficacité modérée, inférieure aux anti-TNF. La piste des biothérapies ciblant le GM-CSF (mavrilimumab, otilimab) semble être plus prometteuse. L'analyse des essais cliniques permet de mettre à jour de façon très régulière les recommandations internationales émises par l'EULAR (European League Against Rheumatism) pour la prise en charge thérapeutique de la PR (Smolen et al. 2020).



Figure 18. Les différents axes ciblés par les biothérapies dans la PR. Adapté de (Smolen et al. 2018)

## Cibler directement les ostéoclastes inflammatoires ?

Les stratégies thérapeutiques dans la PR visent toutes à réduire l'emballement inflammatoire, ce qui impacte indirectement sur la formation et l'activité des ostéoclastes inflammatoires. L'effet global attendu intègre la prévention de la perte osseuse au niveau des articulations atteintes. Une thérapie « anti-ostéoclaste » pourrait s'avérer intéressante en cas d'érosion osseuse importante ou d'ostéoporose préexistante, même en cas de rémission clinique de la PR. Une alternative possible aux thérapies ciblées DMARDs pourrait être le denosumab, un anticorps monoclonal anti-RANKL indiqué dans l'ostéoporose. Certains experts ont évalué le bénéfice clinique global dans la PR basé sur les résultats d'essais cliniques en association

avec le méthotrexate, et évoquent un intérêt en association avec un anti-TNF dans le cas d'ostéoporose chez les patients PR (Chiu and Ritchlin 2017). Cependant, le denosumab ne permet pas de réduire la destruction du cartilage ni l'activité de la maladie. Des essais cliniques sont encore en cours pour mieux établir le positionnement du denosumab dans la stratégie thérapeutique de la PR.

L'hétérogénéité fonctionnelle des ostéoclastes est de mieux en mieux perçue dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* en condition physiologique et pathologique, en particulier dans les modèles d'arthrite auto-immune. Les ostéoclastes sont les seules cellules capables de résorption osseuse et jouent ainsi un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie osseuse (développement et renouvellement osseux, hématopoïèse médullaire, métabolisme phosphocalcique). Nous avons vu que ces ostéoclastes présentent un phénotype tolérogène vis-à-vis des lymphocytes T en favorisant la tolérance immunologique au niveau osseux. En condition inflammatoire, et en particulier dans le contexte auto-immun de la PR, les ostéoclastes nouvellement formés présentent un phénotype inflammatoire participant à l'entretien de l'activation immunitaire et causant une érosion osseuse pathologique. Il est donc important de préserver les ostéoclastes tolérogènes tout en ciblant les ostéoclastes inflammatoires ou leurs précurseurs. L'hétérogénéité des précurseurs ostéoclastiques pourrait expliquer ces différents phénotypes. La plasticité cellulaire des précurseurs myéloïdes permettrait la trans-différenciation en ostéoclastes inflammatoires à partir de cellules circulantes infiltrantes au niveau des articulations enflammées. Cette hétérogénéité rend complexe l'identification des précurseurs inflammatoires. De nombreux efforts sont actuellement réalisés pour mieux caractériser ces précurseurs et le phénomène d'ostéoclastogenèse inflammatoire, dans le but d'identifier des marqueurs spécifiques, de développer des stratégies thérapeutiques ciblées des ostéoclastes inflammatoires ou encore d'inverser le phénotype inflammatoire pour restaurer un phénotype tolérogène.

Il n'existe pas à ce jour de thérapie ciblant directement et sélectivement les ostéoclastes inflammatoires ou leurs précurseurs infiltrants capables de trans-différenciation en ostéoclastes. Une meilleure connaissance des mécanismes de régulation impliqués dans la formation et l'activité des ostéoclastes inflammatoires permettrait de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques, là encore à replacer dans le contexte de la PR, mais aussi dans d'autres pathologies caractérisées par une érosion osseuse d'origine inflammatoire.

54

# Les micro-ARNs dans l'ostéoclastogenèse

# Article 1

# "MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation?"

# Rationnel de l'étude

L'ostéoclastogenèse est un processus de différenciation cellulaire complexe qui est contrôlé par de nombreuses voies, elles-mêmes dépendantes du micro-environnement et des besoins systémiques. Les facteurs clés et les voies de signalisation de l'ostéoclastogenèse sont aujourd'hui bien connus. La régulation de l'ostéoclastogenèse par des modulations épigénétiques et par l'action des micro-ARNs est moins étudiée. Elle est porteuse de nouvelles pistes de recherche pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'ostéoclastogenèse en condition physiologique et inflammatoire.

Depuis la première découverte des micro-ARNs (miARNs) dans les années 1990s, la description de leurs fonctions régulatrices dans de nombreux processus biologiques leur a conféré un rôle complexe de rhéostat. Ils modulent finement l'expression des gènes codant pour des protéines au niveau post-transcriptionnel. Ces petits ARNs simples brins non codants de 22 nucléotides en moyenne ont des séquences conservées entre individus de la même espèce. Certains miARNs présentent même des homologies de séquence entre espèces (miARNs orthologues), ce qui montre que ce mécanisme de régulation des processus biologiques a été conservé durant l'évolution (Berezikov 2011). La base de nomenclature officielle des miARNs, miRbase 22 (Kozomara, Birgaoanu, and Griffiths-Jones 2019), permet de récapituler les découvertes des miARNs selon les espèces. Le nombre de miARNs

augmente avec la complexité des organismes. A ce jour, miRBase 22 décrit environ 2000 miARNs chez *Homo sapiens*, 1300 chez la souris *Mus musculus*, et 260 chez la drosophile *Drosophila melanogaster*. Des logiciels en ligne, tels que TargetScan (Agarwal et al. 2015), ou Mirwalk 2.0 et 3.0 (Dweep and Gretz 2015; Sticht et al. 2018), permettent également de connaitre leurs cibles ARNm qui ont été validées dans la littérature, ainsi que leurs cibles potentielles qui sont définies par des algorithmes de prédiction *in silico*. Les stratégies de prédiction diffèrent entre les bases de données, mais reposent essentiellement sur la complémentarité des séquences miARN/ARNm, l'énergie de liaison nécessaire pour rompre cette hybridation, l'accessibilité du site de liaison du miARN sur la séquence cible, la conservation de la séquence dans les espèces. Chez les mammifères, la complémentarité de séquence dans les espèces. Les run seul miARN, et un ARNm peut être ciblé par plusieurs miARNs différents. La séquence reconnue par le miARN est généralement localisée dans la 3'UTR de l'ARNm. Bien que plus rares, des sites de liaison aux miARNs peuvent être retrouvés dans la partie codante et la 5'UTR.

L'action des miARNs dépend du type cellulaire qui les exprime. L'ostéoclastogenèse est un processus biologique qui démarre dans les cellules de la lignée monocytaire/macrophagique pour aboutir à la formation de l'ostéoclaste spécialisé dans la résorption osseuse. Plusieurs études ont démontré l'influence des miARNs dans la régulation de l'ostéoclastogenèse en utilisant des modèles de culture cellulaire *in vitro* ou *ex vivo*, plus rarement *in vivo*. La régulation par les miARNs peut s'effectuer lors d'une ou plusieurs étapes de l'ostéoclastogenèse, depuis l'engagement des progéniteurs jusqu'au maintien fonctionnel de l'ostéoclaste.

Des revues de la littérature sur le rôle des miARNs dans l'ostéoclastogenèse sont régulièrement publiées. La plupart de ces revues se concentrent sur le rôle des miARNs dans le remodelage osseux et l'ostéoporose (Z. Xia et al. 2011; Tang et al. 2014; J. Chen et al. 2015; M. Sun et al. 2016; Ji, Chen, and Yu 2016; Gennari, Bianciardi, and Merlotti 2017; Feng, Zheng, and Zheng 2018) avec l'objectif de décrire des biomarqueurs et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles dans la perte osseuse. D'autres revues récentes orientent leurs propos sur les miARNs dans le contexte de l'arthrite auto-immune (Ammari, Jorgensen, and Apparailly 2013; Salehi et al. 2015; Churov, Oleinik, and Knip 2015; Sharma et al. 2016; Moran-Moguel et al. 2018; Mousavi et al. 2018; Tavasolian et al. 2018; Evangelatos et al. 2019). Enfin, quelques revues et méta-analyses se focalisent sur le rôle d'un miARN bien caractérisé dans la PR, tel que l'effet pathogène de miR-155 (Alivernini et al. 2017; Su et al. 2017) ou la corrélation de l'expression de miR-146a avec l'activité de la maladie (Bae and Lee 2018). La lecture attentive de ces revues donne des informations sur les miARNs dans

56

l'érosion osseuse, et permet ainsi de repérer les miARNs potentiellement impliqués dans l'ostéoclastogenèse inflammatoire.

Ma première démarche a été de réaliser une revue de la littérature sous un nouvel angle. En effet, j'ai souhaité détailler le rôle des miARNs dans chaque étape de l'ostéoclastogenèse, en précisant l'impact fonctionnel sur les processus biologiques impliqués tels que la prolifération, la motilité, la survie et la fusion cellulaire.

L'état des lieux des études sur les miARNs dans l'ostéoclastogenèse m'a permis de mettre en évidence des différences méthodologiques, allant d'études *in vitro* sur lignées cellulaires à des études *ex vivo* sur des cultures primaires. Ces méthodes ont l'avantage de fournir suffisamment de matériel biologique pour étudier l'expression et la fonction des miARNs dans l'ostéoclastogenèse induite *in vitro*, notamment par des approches artificielles de perte et gain de fonction. Celles-ci consistent à moduler l'expression des miARNs étudiés par transfection de miARNs de synthèse (« miRNA mimics ») ou de séquences spécifiques neutralisantes (« anti-miRNA »). Ces modèles sont donc très utiles pour identifier les cibles et les effets biologiques attendus, mais s'éloignent fortement des conditions physiologiques ou pathologiques de l'organisme entier.

L'ostéoclastogenèse *in vivo* s'effectue dans le tissu osseux peu accessible chez un animal vivant. Par ailleurs, les ostéoclastes primaires sont des cellules rares, nichées dans les lacunes osseuses et donc difficiles à isoler. L'étude de l'expression des miARNs dans les tissus biologiques se confronte à trois obstacles : l'hétérogénéité des populations cellulaires présentes (spécificité ?), l'accès difficile au sein d'un tissu dur et la relative rareté des cellules d'intérêt (sensibilité ?).

J'ai abordé dans un second temps la question de la robustesse des techniques de biologie moléculaire utilisées pour la quantification des miARNs en fonction de la qualité et de la pureté du matériel biologique. J'ai fait appel à l'expertise d'Eric Schordan et d'Hüseyin Firat de la société Firalis spécialisée dans la détection et la quantification des miARNs dans les tissus et liquides biologiques. Ceci m'a permis de comparer les différentes technologies de biologie moléculaire et de rappeler les bonnes pratiques pour éviter autant que possible les biais de mesure et obtenir les résultats les plus robustes possibles.

# **Résumé**

Les micro-ARNs (miARNs) sont de petits ARN simples brins non codants qui sont d'importants régulateurs post-transcriptionnels des gènes codant pour les protéines. En particulier, les miARNs jouent un rôle clé dans la régulation des processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Récemment, les miARNs ont été décrits comme des régulateurs majeurs de la biologie des ostéoclastes (OCs) et ont été impliqués dans le rôle pathogène des OCs dans plusieurs maladies. Les OCs sont des cellules multi-nucléées générées à partir de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse, spécialisées dans la résorption osseuse. Bien qu'il existe un nombre important d'études sur les cytokines et voies de signalisation essentielles à la différenciation des précurseurs des ostéoclastes (OCPs) en OCs matures, le lien existant entre les étapes de différenciation des OC et les miARNs est moins bien compris. Le présent travail résume dans un premier temps la compréhension actuelle des processus biologiques régulés par les miARNs dans les différentes étapes de l'ostéoclastogenèse : la motilité et la migration des OCP, la fusion cellulaire, la formation de l'anneau d'actine et de la bordure en brosse des OCs fonctionnels. Puis, considérant la difficulté de travailler sur les OCs primaires et sur la génération de données robustes, j'ai fait un état des lieux des dernières avancées dans les technologies de détection et de quantification des miARNs et de leur utilisation comme biomarqueurs potentiels dans l'ostéoclastogenèse.





# MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation?

Claire Lozano<sup>1,2</sup>, Isabelle Duroux-Richard<sup>1</sup>, Hüseyin Firat<sup>3</sup>, Eric Schordan<sup>3</sup> and Florence Apparailly<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> IRMB, Univ Montpellier, INSERM, CHU Montpellier, Montpellier, France, <sup>2</sup> Immunology Department, CHU Montpellier, Montpellier, France, <sup>3</sup> Firalis SA, Molecular Diagnostics, Huningue, France

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding single-stranded RNAs that represent important posttranscriptional regulators of protein-encoding genes. In particular, miRNAs play key roles in regulating cellular processes such as proliferation, migration, and cell differentiation. Recently, miRNAs emerged as critical regulators of osteoclasts (OCs) biology and have been involved in OCs pathogenic role in several disorders. OCs are multinucleated cells generated from myeloid precursors in the bone marrow, specialized in bone resorption. While there is a growing number of information on the cytokines and signaling pathways that are critical to control the differentiation of osteoclast precursors (OCPs) into mature OCs, the connection between OC differentiation steps and miRNAs is less well-understood. The present review will first summarize our current understanding of the miRNA-regulated pathways in the sequential steps required for OC formation, from the motility and migration of OCPs to the cell-cell fusion and the final formation of the actin ring and ruffled border in the functionally resorbing multinucleated OCs. Then, considering the difficulty of working on primary OCs and on the generation of robust data we will give an update on the most recent advances in the detection technologies for miRNAs quantification and how these are of particular interest for the understanding of OC biology and their use as potential biomarkers.

Keywords: microRNA, osteoclast, differentiation, regulation, detection, biomarker

### INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are key regulatory molecules that control cellular processes such as proliferation, migration and cell differentiation small. As shown in **Figure 1**, in the canonical pathway, miRNAs are transcribed by RNA polymerase II as large RNA precursors called primary (pri-) miRNAs that will be cleaved in the nucleus by the microprocessors complex into short hairpin precursors (pre-miRNAs) of about 70-nucleotides in length (1, 2). Pre-miRNAs are subsequently exported to the cytoplasm to be processed by DICER and yield mature miRNA duplexes (~22 nucleotides long) prior their loading onto the Argonaute-containing RNA-induced silencing complex (RISC). They bind through imperfect complementarity, mostly to the 3'-UTR regions of their target mRNAs, and lead to translation inhibition or degradation (3). These single-stranded RNAs thus modulate gene expression mostly at a posttranscriptional level. Current database describes more than 1,917 miRNA genes, which can contain 3 and 5p miRNAs. MiRNAs are recognized as crucial regulators of the expression of more than 60% of mammalian genes. The

OPEN ACCESS

### Edited by:

Teun J. De Vries, VU University Amsterdam, Netherlands

#### Reviewed by:

Toshio Kukita, Kyushu University, Japan Frédéric Velard, Université de Reims Champagne-Ardenne, France Jeroen Van De Peppel, Erasmus University Rotterdam, Netherlands

\*Correspondence:

Florence Apparailly florence.apparailly@inserm.fr

### Specialty section:

This article was submitted to Inflammation, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 08 December 2018 Accepted: 14 February 2019 Published: 07 March 2019

#### Citation:

Lozano C, Duroux-Richard I, Firat H, Schordan E and Apparailly F (2019) MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation? Front. Immunol. 10:375. doi: 10.3389/fimmu.2019.00375



FIGURE 1 | Schematic miRNA biogenesis and mode of action. miRNA biogenesis begins in the nucleus with transcription of miRNA gene into a pri-miRNA, followed by the action of the enzyme Drosha to produce pre-miRNA hairpins. After exportation into the cytosol, pre-miRNA, are processed into an intermediary miRNA duplex by Dicer. One miRNA strand is loaded onto the RNA-induced silencing complex (RISC) to form mature miRNA, which can regulate the expression of target mRNAs. The miRNA/RISC complex can also be incorporated into extracellular vesicles such as exosomes or microvesicle bodies, to be released into extracellular space. Then, miRNAs can be found in body fluids and travel across the entire body till elimination, or can be incorporated into a recipient cell and specifically regulate the expression of target genes into this new cell. Drosha, RNase III-type endonuclease family protein; Dicer, endoribonuclease; RISC; RNA- used silencing complex; EV, extracellular vesicles.

number of encoded miRNAs is limited compared to mRNAs and proteins expressed; however, one miRNA may regulate hundreds of mRNAs/lncRNAs and, as a result, may have substantial effects on gene expression networks. Although a lot of miRNAs have conserved sequences between species, the targeted mRNA sequences may be poorly conserved and biological effects are difficult to predict. *In silico* analyses using updated databases are thus useful to screen for putative targets according to the species and to find the miRNA sequence homology. *In vitro* functional studies are however needed to validate the miRNA targets, which may provide clues on the biological effects of the miRNA. In addition, available and freely accessible algorithms have been designed to identify potential miRNA-promoter interactions conserved between species that could represent additional clues to further push toward experimental validation (4). *In vivo* studies add indeed robustness to the biological role of miRNA-mediated regulation in pathophysiological conditions.

As to many other biological processes, miRNAs act as fine modulators to maintain bone homeostasis. Key evidence that miRNAs are essential to osteoclastogenesis is provided by genetic studies deleting one enzyme essential for their biogenesis, DICER1. DICER deficient mouse and osteoclast-specific DICER gene deficiency both lead to impaired osteoclast (OC) formation and activity (5, 6). Since then, the field of bone biology has regularly reviewed the role of miRNAs in OC biology or bone remodeling, mostly in the context of osteoporosis (7–13). A growing interest in miRNA-based therapeutic strategies has also emerged in bone-related disorders [for review see (14)]. Although the role of miRNAs in the OC lineage and ontogeny is a current hot topic, it remains poorly studied.

OCs are multinucleated cells specialized in bone resorption and derived from myeloid precursors that differentiate in situ in the bone marrow (15). The commitment of myeloid precursors in osteoclastic differentiation is controlled by microenvironmental factors to maintain bone homeostasis. Among them, osteoblasts, osteocytes and bone marrow stromal cells stimulate OC differentiation through the production of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), which binds to its receptor RANK. The growth factor macrophage colony-stimulating factor (MCSF) is also required to initiate the differentiation of osteoclastic precursors by binding its receptor CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor). The Wnt-5a ligand is another pro-osteoclastic factor secreted by osteoblasts and OCs themselves (16, 17). In addition to these pro-osteoclastogenic factors, there are several inhibitory regulators including the osteoprotegerin (OPG), a soluble protein secreted by stromal cells that binds soluble and membrane forms of RANKL, thus preventing the activation of the RANK/RANKL signaling pathway. Indirectly, estrogens repress bone resorption by stimulating the production of OPG. Other environmental factors such as cytokines and lipid mediators impact on the osteoclastogenesis (18, 19). In addition to these well-known regulatory mechanisms, other elements could influence the commitment of myeloid precursors to the osteoclastic lineage. Instead of being differentiated into OCs, the myeloid precursors can also be differentiated into macrophages, especially in the presence of MCSF. Indeed, the osteoclastic and macrophagic lineages are thought to originate from an immediate bipotent precursor (20), demonstrating their close proximity. OCs retain the phagocytic potential and the ability to present the antigen of macrophages (21) but are the only cells capable of bone resorption. Among critical regulators of the polarization toward the OC vs. macrophage lineage, the mitochondrial metabolism has been involved (22). Although the role of miRNAs in the commitment of hematopoietic (23) and osteoblastic (24) lineages has been reviewed, only few studies have addressed the involvement of miRNAs in the commitment of the osteoclastic lineage.

The initiation of osteoclastogenesis requires the major signaling pathways RANK/RANKL and CSF1R/MCSF. The transcription factor NFATC1 (nuclear factor of activated T cells 1) is the cornerstone of the early phase of osteoclastogenesis. An amplification loop of NFATC1 induces the expression of many genes of the late phase, such as ACP5 (acid phosphatase 5, tartrate resistant), CTSK (Cathepsin K), and DCSTAMP (dendrocyte expressed seven transmembrane protein) [reviewed in (25)].

Under physiological conditions, the selective expression of miRNAs promoting and repressing the generation of OCs relies on the regulation of their own promoter (a shared promoter in case of miRNA clusters) and is thus closely linked to the sequential signaling pathways involved in the different steps of OC differentiation. MiRNAs are thus essential in a lot of biological feedback loops, including in the regulation of the OC biology. Our present review will focus on the miRNA-mediated regulation of the sequential steps of OC formation. We will also report on the most recent advances in technologies used for the quantification of miRNAs. Finally, we will discuss the contribution of these technologies to the field of OC biology and the questions that remain to be asked.

# miRNAs AND THE COMMITMENT OF PROGENITORS TOWARD OCs

There are very few studies available on the miRNA-mediated regulation of OC commitment. Osteoclastogenesis is repressed by miR-155-mediated control of the transcription factor MITF (melanocyte inducing transcription factor) that is involved in the differentiation of monocytes toward macrophages (26). Conversely, miR-29 family (miR-29a, b, c) guides the commitment of bone marrow precursors toward the OC lineage by inhibiting GPR85 and CD93, two molecules involved in macrophage engagement (27). Authors showed that the transfection of the mouse monocytic cell line RAW264.7 with an inhibitor of miR-29 promotes macrophage differentiation, as evidenced by an up-regulation of the F4/80 surface marker and of the phagocytosis, even in presence of the major proosteoclastogenic cytokine RANKL.

# miRNAs IN THE EARLY PHASE OF OCs GENERATION

Majority of the studies have described the global impact of miRNAs on the terminal OC formation, as evidenced by OC number and bone resorption activity. Few studies addressed beyond this final step which cellular processes are impacted. In **Figure 2**, we have summarized the miRNAs involved in the functional steps paving the generation of OCs, including cell survival, proliferation and motility of OC precursors. We also provide an updated list of their validated target genes (**Table 1**).

### Pro-Osteoclastogenic miRNAs

In addition to its role in the OC commitment of precursors, miR-29 family may promote migration of precursors since miR-29 neutralization inhibits the migration RAW264.7 cells (27). Furthermore, miR-29 family is involved in early phase of osteoclastogenesis by targeting NFIA (nuclear factor I A), a negative regulator of CSF1R (27). CSF1R is also indirectly induced by miR-223 through NFIA targeting as a positive feedback loop enhanced by the transcription factor PU.1 induced downstream of the MCSF/CSF1R (5). Same authors however previously reported contradictory findings using the same RAW264.7 cell line, as overexpression of miRNA-223 suppressed TRAP-positive OC formation (28). These later data were in agreement with a work performed on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (29). Bone loss is enhanced in arthritic condition due to activation of OC differentiation, and miR-223 is intensely expressed in rheumatoid arthritis (RA) synovium, particularly in monocyte/macrophage and CD4<sup>+</sup> Tcell subsets (29). All these findings suggest an important role of



FIGURE 2 | miRNA regulation of osteoclast differentiation. Illustration of the 3 phases of osteoclastogenesis. The early phase is associated with pre-osteoclast (OC) survival, motility, and proliferation; the late phase focused on pre-OC cell fusion and OC acting-ring formation; and the mature OC phase consists in the degradation of the mineralized matrix by mature OC. Green, red and black colors indicate down, up and normal miRNA expression, respectively. Arrows and bars indicate positive or negative effects on osteoclastogenesis respectively. M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; RANKL, Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand.

miR-223 in the early phase of osteoclastogenesis, but an in-depth evaluation of the expression level of miR-223 under physiological osteoclastogenesis requires further studies.

The early phase of OC generation triggers increased NFATC1 expression, together with reduced expression of its three negative regulators MAFB (MAF bZIP transcription factor B), IRF8 (interferon regulatory factor 8), and BCL6 (BCL6, transcription repressor) (25). MAFB is a relevant target of miRNAs in OC precursors. Up-regulation of miR-199a-5p and miR-148a promotes the amplification loop of NFATC1 and the formation of resorbing OCs by targeting MAFB in RAW264.7 cells (30) and in CD14<sup>+</sup> PBMCs (31), respectively. MiR-9718 is a newly described miRNA specifically expressed in the OC lineage, which promotes OC differentiation by targeting PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT3) (32), another negative modulator of NFATC1 (33). Finally, the injection of molecules neutralizing miR-148a or miR-9718 in ovariectomy-induced osteoporotic mice increases total bone mass and decreases the OC number and activity (31, 32).

Among the other miRNAs up-regulated in OCs, the proosteoclastogenic role of miR-21 was demonstrated *in vivo* using the miR-21 KO mouse that display a slight increase in the trabecular bone mass and a reduced OC number and bone resorption (34). The expression of miR-21 is induced by c-Fos, which activation upon RANKL treatment of mouse bone marrow-derived macrophages (BMMs) operates a positive feedback loop by targeting the programmed cell death protein 4 (PDCD4) (35). The binding of c-Fos to miR-21 promoter is strikingly diminished by estrogen E2 treatment in RANKL-induced osteoclastogenesis. Estrogen attenuate miR-21 biogenesis, leading to increased FasL protein level and caspase-3 activity in mouse BMMs precursors (36). These results suggest that miR-21 expression is important in the development of OCs, particularly by controlling pre-osteoclast survival.

The activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) downstream of the early RANKL pro-osteoclastogenic signaling cascade is supported by the reactive oxygen species (ROS) produced by RANK-NADPH oxidase 1-dependant pathway (25). ROS production by mouse BMMs is regulated by heme oxygenase 1 (HMOX1), which attenuates osteoclastogenesis, specifically during the early phase of OC formation (37). MiR-183 is up-regulated by RANKL and targets HMOX1, thus promoting the early phase of osteoclastogenesis (38).

The PI3K/AKT pathway is induced by RANKL signaling and promotes cell survival (39). By reversing the action of PI3K (phosphoinositide 3-kinase), PTEN (phosphatase and tensin homolog) negatively impacts on OC precursor motility in the early phase of osteoclastogenesis (40). It was shown that miR-214 enhances the OC precursor differentiation via the PTEN/PI3K/AKT pathway, downstream of RANK signaling in RAW264.7 and primary mouse BMMs. *In vivo*, OC-specific miR-214 transgenic mice exhibit reduced expression of PTEN,

miRNAs	Species	Up/Down	Overall impact	Targets	Early steps impacted	References	
miR-21	Mouse <sup>a,b</sup>	Up	Positive	PDCD4 FASLG	Survival	(34–36)	
miR-29 family	Mouse <sup>a</sup>	Up	Positive	NFIA CDC42 SRGAP2	ND	(27)	
miR-148a	Human <sup>a</sup> Mouse <sup>a,b</sup>	Up	Positive	MAFB	ND	(31)	
miR-183	Mouse <sup>a</sup>	Up	Positive	HMOX1	ND	(38)	
miR-199a-5p	Mouse <sup>a</sup>	Up	Positive	MAFB	ND	(30)	
miR-214	Mouse <sup>a,b</sup>	Up	Positive	PTEN	Motility	(41)	
miR-223	Mouse <sup>a,b</sup>	Up	Pos/neg	NFIA	ND	(5)	
miR-9718	Mouse <sup>a,b</sup>	Up	Positive	PIAS3	ND	(32)	
miR-34a	Mouse <sup>a,b</sup> Human <sup>a</sup>	Down	Negative	TGIF2	NS (survival, proliferation)	(54)	
miR-124	Mouse <sup>a</sup> Rat <sup>a,b</sup>	Down	Negative	NFATC1	Proliferation, motility	(67, 68)	
miR-125a	Human <sup>a</sup>	Down	Negative	TRAF6	ND	(48)	
miR-141	Monkey <sup>a,b</sup>	Down	Negative	EPHA2 CALCR	ND	(56)	
miR-144-3p	Human <sup>a</sup>	Down	Negative	RANK	Survival, proliferation	(47)	
miR-145	Mouse <sup>a,b</sup>	Down	Negative	SMAD3	ND	(58)	
miR-155	Mouse <sup>a</sup>	Down	Negative	SOCS1 MITF	ND	(61)	
miR-155	Mouse <sup>a</sup>	Down	Positive	TAB2	ND	(63)	
miR-218	Mouse <sup>a</sup>	Down	Negative	ND	Motility	(52)	
miR-218	Mouse <sup>a</sup>	Down	Negative	TNFRSF1A	ND	(53)	
miR-340	Mouse <sup>a</sup>	Down	Negative	MITF	ND	(65)	
miR-503	Human <sup>a</sup> Mouse <sup>a,b</sup>	Down	Negative	RANK	ND	(46)	
miR-9; miR-181a	Mouse <sup>a</sup>	ND	Negative	CBL	Survival, motility	(45)	
miR-146a	Human <sup>a</sup> Mouse <sup>a,b</sup>	ND	Negative	TRAF6	ND	(50, 51)	

TABLE 1 | MIRNAs involved in the early phase of OC generation.

Species and experimental context of the model used are indicated (a, in vitro). Up- or down-regulation of respective miRNAs during OC generation and the overall impact on OC differentiation are given. We detailed steps impacted in OC precursors (pre-OC) such as cell survival, proliferation and motility. Validated targets are also listed. PDCD4, programmed cell death protein 4; FASLG, Fas ligand: NFIA, nuclear factor I A; CDC42, cell division cycle 42; SRGAP2, SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2; MAFB, MAF bZIP transcription factor B; HMOX1, heme oxygenase 1; PTEN, phosphatase and tensin homolog; PIAS3, protein inhibitor of activated STAT3; TGIF2, TGFB induced factor homeobox 2; NFATC1, nuclear factor of activated T cells 1; TRAF6, TNF receptor associated factor 6; EphA2: EPH receptor A2; CALCR, calcitonin receptor; RANK, receptor activator of nuclear factor kappa-B; SMAD3, SMAD family member 3; SOCS1, suppressor of cytokine signaling 1; MITF; melanocyte inducing transcription factor; TAB2, TGF-beta activated kinase 1 binding protein 2; TNFRSF1A, TNF receptor superfamily member 1A; CBL, Cbl proto-oncogene. ND, not determined; NS, not significant.

increased OC resorption activity, and reduced bone mineral density (41). Since a miR-214/PTEN axis has been involved in cell proliferation and invasion of various cancer cells (42–44), it would be of particular interest to investigate the specific role of miR-214 on cell proliferation, survival and motility in the context of OC lineage.

The over-expression of miR-9 and miR-181a diminishes the migration of RAW264.7 cells and primary mouse OC survival by repressing the expression of the protooncogene Cbl, which enhances the amount of the pro-apoptotic protein Bim (45). This was the first study reporting a functional role for miR-9 and miR-181a by targeting proteins belonging to the apoptosis pathway. Further experiments are needed to confirm the potential role of these miRNAs on the precursor survival during osteoclastogenesis.

# miRNAs With an Inhibitory Role on OC Precursors

The initiation of the OC precursor differentiation is largely mediated by RANK/RANKL signaling. The expression density of RANK at the cell surface conditions the efficacy of RANK trimerization and downstream signal transduction. In human CD14<sup>+</sup> precursors, miR-503 targets RANK mRNA in the coding sequence (CDS) region, leading to reduced RANK protein level, OC numbers and cell density *in vitro* (46). *In vivo*, treatment of OVX mice with anti-miR-503 reduced bone resorption (46). The 3' untranslated region (UTR) of RANK is also targeted by miR-144-3p in CD14<sup>+</sup> precursors, controlling OC formation, proliferation and survival of OC precursors (47).

The binding of RANKL to RANK induces the recruitment of the adaptor protein TRAF6 (TNF Receptor Associated

Factor 6). This important signaling adaptor for RANK is targeted by miR-125a and miR-146a in human PBMCs (48, 49). The expression of miR-125a is controlled by NFATC1, which directly binds to the promoter of miR-125a during osteoclastogenesis and reduces its expression (48). MiR-146a has been extensively studied in monocytes in pathological conditions, including pathologies associated with bone erosion such as RA. The expression of miR-146a is induced by LPS, TNFa, or IL1β signaling cascades, through the activation of NF-κB (nuclear factor kappa B), which directly binds to the miR-146 promoter (49). It was shown that miR-146a inhibits OC formation from human PBMCs in a dose-dependent manner and that the treatment of collagen-induced arthritic mice with miR-146 mimics attenuates bone resorption (50). We recently demonstrated that the reduced expression of miR-146a in the Ly6Chigh monocyte subset of arthritic mice is involved in the pathogenic bone erosion, and that it can be rescued by specific delivery of miR-146 mimics to Ly6C<sup>high</sup> monocytes (51). Taken together, these findings evidence a negative regulation of osteoclastogenesis by NFkB-induced miR-146a to partly counterbalance the deregulated differentiation of OC precursors in inflammatory disorders.

The RANK/TRAF6 signaling cascade activates the NFkB and MAPK pathways, which may represent additional miRNA targets. Indeed, miR-218 over-expression inhibits osteoclastogenesis by controling the p38MAPK pathway in mouse BMMs (52). Interestingly, miR-218 negatively impacts on the migration of RANKL-treated BMMs. Although authors also reported a decrease of actin-ring formation, it was most probably a consequence than a cause of the decreased OC number. The putative targets of miR-218 were not explored in this study. A recent study confirmed the negative regulation of osteoclastogenesis by miR-218, and show that it was mediated by targeting TNFRSF1A (TNF receptor superfamily member 1A), which leads to the inhibition of the NFkB pathway activation in RAW264.7 cells (53). Overall, miR-218 may act on both NFkB and MAPK pathways in OC precursors to control OC precursor differentiation, and further studies are required to unravel the molecular mechanisms involved.

The early RANKL signaling is mediated by two transcription factors, NF $\kappa$ B and AP1, which are essential to the initiation of the NFATC1 amplification loop. AP1 components such as c-Jun and c-Fos could be critical targets to modulate NFATC1 activation in OC precursors. The transcriptional regulator TGIF2 (TGFB induced factor homeobox 2) is induced by NFATC1, c-Fos and c-Jun and potentiates the activity of NFATC1 and c-Jun in turn, promoting the osteoclastogenesis in a positive feedback loop (54). Interestingly, TGIF2 is a direct target of miR-34a, and OC-specific miR-34a transgenic mice exhibit lower bone resorption and higher bone mass, with no alteration of OC precursor survival and proliferation (54). Finally, miR-34a seems to negatively regulate the NFATC1 pathway during OC differentiation, mostly in the early phase upon RANKL signaling.

RANKL signaling enhances another co-stimulatory signal mediated by the ephrinA2-EphA2 interaction at the cell surface

of OC precursors. EphrinA2 expression is rapidly induced in a c-Fos-dependent manner and cleaved by metalloproteinases to release an active soluble form able to interact with its receptor EphA2, enhancing osteoclastogenesis (55). In rhesus monkey BMMs EphA2 is a potential target of miR-141 (56). OC differentiation and bone resorption are suppressed *in vitro* by miR-141, and *in vivo* using repeated injections of an OCtargeted delivery system into aged monkeys (56). The calcitonin receptor (CALCR) is also a target of miR-141 in rhesus OCs. A down-regulation of CALCR is however expected to suppress the negative effect of calcitonin on OC differentiation and to enhance bone resorption, whereas miR-141 globally inhibits OC differentiation and activity, both *in vitro* and *in vivo*. One can speculate that the targeting of CALCR by miR-141 may represent a minor part of the effects of miR-141 functions in rhesus OCs.

Another critical interaction in RANKL-induced osteoclast ogenesis is the cooperation between Smad complex and c-Fos, which leads to NFATC1 transcription (57). Recently, miR-145 was shown to target Smad3, thus reducing the formation of p-Smad2/3 complex, repressing c-Fos and NFATC1 transcription in mouse OC precursors, and decreasing OC number (58). Smad proteins are induced by members of the transforming growth factor beta (TGFB) super family, and Smad pathway has become of particular interest in inflammatory disorders [reviewed in (59)]. TGFβ1/Smad4 signaling directly induces miR-155 expression, a negative regulator of osteoclastogenesis (60). In addition, miR-155 is induced by interferon (IFN)-β and mediates its suppressive effect on OC differentiation by targeting the pro-osteoclastogenic gene SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) in OC precursors (61). These data were suggestive of a suppressive role of miR-155 in osteoclastogenesis. In physiological condition, miR-155 is downregulated during osteoclastogenesis. Nevertheless, miR-155 is up-regulated in activated immune cells, such as lymphocyte B-cells, T-cells and dendritic cells, promoting the inflammatory response and thus aggravating the inflammatory-induced arthritis and bone erosion in vivo through the indirect immune-mediated activation of OCs [reviewed in (62)]. In lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory condition, miR-155 directly induces autophagy in OCs as well as OC differentiation and activity by targeting TGFβ-activated kinase 1-binding protein 2 (TAB2) (63). A fine modulation of the TAB2 expression level may promote the destabilization of the inactive complex TAB2/Beclin1, leading to (i) the release of Beclin1 and induction of autophagy and (ii) the interaction of the adaptor proteins TAB2 and TAK1 that activates the RANK/TRAF6/NFkB pathway. These findings illustrate the variable role of miR-155 in osteoclastogenesis depending on the microenvironment, i.e., according to the presence of LPS, IFNβ, or TGFβ-mediated inflammatory signals. To make things even more complex, miR-155 also targets the transcription factor MITF that is up-regulated upon RANKL signaling (60, 61). MITF plays a critical role in the OC differentiation by collaborating with NFATC1 in the early phase of osteoclastogenesis (64). In summary, miR-155 seems to globally inhibit the OC generation in physiological condition by acting both in the commitment of myeloid precursors (26) and in osteoclastogenesis (61) through

miRNAs	Species	Up/Down	Overall impact	Targets	Late steps impacted	References
miR-26a	Mouse <sup>a</sup>	Up	Negative	CTGF	Actin ring formation	(82)
miR-31	Mouse <sup>a</sup>	Up	Positive	RHOA	Actin ring formation	(70)
miR-34c	Mouse <sup>a</sup>	Up	Positive	LGR4	OC survival	(74)
miR-7b	Mouse <sup>a</sup>	Down	Negative	DCSTAMP	Cell fusion	(79)
miR-29b	Human <sup>a</sup>	Down	Negative	FOS MMP2	Actin ring formation	(77)
miR-30a	Mouse <sup>a</sup>	Down	Negative	DCSTAMP	Actin ring formation	(80)
miR-124	Mouse <sup>a</sup>	Down	Negative	RAB27A	ND	(69)
miR-142-3p	Human <sup>a</sup>	Down	Negative	PRKCA	Cell fusion, OC survival	(83)
miR-186	Mouse <sup>a</sup>	ND	Negative	CTSK	OC survival	(84)

TABLE 2 | MIRNAs involved in the late phase of OC generation.

Species of model used are indicated; whether experiments were performed in vitro (a) or in vivo (b) is specified with superscript letters. Up- or down-regulation of respective miRNAs during OC generation and the overall impact on OC differentiation are given. We detailed steps impacted in the late phase such as cell fusion, actin ring formation and the survival of mature OCs. Validated targets are also listed. CTGF, connective tissue growth factor; RHOA, ras homolog family member A; LGR4, leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4; DCSTAMP, dendrocyte expressed seven transmembrane protein; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; MMP2, matrix metallopeptidase 2; RAB27A, RAB27A, member RAS oncogene family; PRKCA, protein kinase C alpha; CTSK, cathepsin K. ND, not determined; NS, not significant.

the regulation of MITF expression. MITF is also targeted by miR-340, which inhibits the OC differentiation of mouse BMMs (65). This reinforces the idea that MITF is a key target for miRNAs in osteoclastogenesis.

Finally, NFATC1 has hardly been described as a direct target of miRNAs so far. The activity of NFATC1 is regulated by phosphorylation, which retains NFATC1 in the cytosol compartment and inhibits its translocation into the nucleus. Epigenetic controls of the NFATC1 gene have been reported [reviewed in (66)]. To date, only miR-124 is predicted to bind NFATC1 in its 3' UTR in OC precursors (67). The targeting of the 3'UTR of both rat and human NFATC1 mRNAs by miR-124 was confirmed using luciferase reporter assays (68). Functionally, miR-124 represses NFATC1 expression in mouse BMMs and diminishes the migration and proliferation of OC precursors (67), without impact on their survival (69).

# miRNAs IN THE LATE PHASE OF OC GENERATION

To achieve OC maturation, the key transcription factors MITF, PU.1, and NFATC1 lead to the expression of several osteoclastogenic genes involved in the cytoskeleton organization, the cell fusion and actin-ring formation. MiRNAs also regulate the late stage of OC formation by targeting Rho GTPases, DCSTAMP, CSTK, and the RANKL-receptor inhibitor LGR4 (**Table 2**).

### Pro-Osteoclastogenic miRNAs

One of the most up-regulated miRNAs during osteoclastogenesis in mouse BMMs is miR-31. It specifically acts on the actinring formation (70). Neutralization of miR-31 impairs the matrix resorption and the ring-shaped OC formation, while cell-fusion is conserved. Increased RhoA activity and protein expression level are also observed in miR-31-deficient OC precursors, suggesting that RhoA is targeted by miR-31 in the OC lineage (70). Small GTPases of the Rho family (Rac1, Rac2, CDC42, RhoA, and RhoU) play important roles in the cell-fusion of OC precursors, podosome organization, migration, and polarization of mature OCs [reviewed in (71)]. RhoA controls the polymerization of actin, the turnover of podosomes, and the migration of OCs through the bone matrix (72). While a moderate level of RhoA activity is required to allow both stability of the sealing zone and bone resorption, RhoA over-activation or inhibition cause disassembly of the podosomes and thus impair the OC activity [reviewed in (73)]. Finally, miR-31 seems essential to OC maturation by finely modulating RhoA activity.

Another relevant miRNA in mature OC biology is miR-34c, which promotes the OC survival at the end of maturation by targeting the R-spondins receptor LGR4 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4), also known as GPR48 (74). During the OC maturation, NFATC1 induces the expression of LGR4 at the cell surface to negatively regulate RANK/RANKL-signaling by a direct competition with RANK. The binding of RANKL to LGR4 activates the NF $\kappa$ B-inhibitor GSK3 $\beta$ , which results in OC apoptosis (75). These data suggest that miR-34c sustains the OC formation.

# miRNAs Displaying an Inhibitory Role in OC Maturation

Based on the study of Franceschetti et al. (27), we reviewed above the role of miR-29 family in the OC commitment and in the early phase of OC generation. The authors however also showed a late up-regulation of miR-29 (a, b, c) family members at the third day of RANKL-induced OC differentiation of mouse BMMs, suggesting another predominant role of miR-29 in the late phase of osteoclastogenesis. They found two targets involved in the cytoskeleton organization, CDC42 and SRGAP2 (SLIT-ROBO Rho GTPase Activating Protein 2), which present opposite effects. Indeed, SRGAP2 belongs to GAP family, which inactivates Rho GTPases such as CDC42 by increasing the intrinsic GTPase activity of Rho proteins (76). Rho GTPases are essential in the polarization and the podosome belt/sealing zone formation of functional OCs [reviewed in (17, 71)].The neutralization of miR-29 family has no effect on the formation of the actin-ring in mature RAW-derived OCs. A role for miR-29 family in the OC maturation remains thus questionable. Another study showed a down-regulation of miR-29b during OC

generation, and demonstrated an inhibitory role of miR-29b in resorption and actin-ring formation in human CD14<sup>+</sup>-derived OCs (77). Considering only the multinucleated cells for their analysis, authors observed disarranged nodular actin spots in OCs over-expressing miR-29b, leading to a failure to form actinrings. Although the authors did not perform a validation of the known targets of miR-29b in the OC lineage, they observed a significant down-regulation of c-Fos and MMP2 expression in miR-29b-transfected OCs at the end of the differentiation. The apparent discrepancies on the role of miR-29 family members and miR-29b could be partially explained by the chosen approach in the different studies, which rely either on gain-of function of miR-29b (77) or loss-of function of miR-29 family (27), as well as on the nature of OC precursors used (cell line vs. primary cells).

In addition to its negative effect on cell proliferation and motility in the early phase of osteoclatogenesis (67), miR-124 seems to act on the late phase of the differentiation by targeting Rab27a (69), a protein belonging to the small Rab GTPase family and involved in vesicle trafficking and resorbing activity of OCs (78). Notably, miR-124 is under-expressed in the OVX mouse model, which displays a deregulated resorbing activity (69).

DCSTAMP is a key protein involved in cell fusion. DCSTAMP is targeted by miR-7b and miR-30a in mouse BM precursors (79, 80). Mimics of miR-7b and miR-30a repress the expression level of DCSTAMP, decrease the OC number and inhibit matrix resorption. Conversely, anti-miR-7b promotes the OC formation and increase nuclei number in mature OC, suggesting an increase of cell fusion events (79). By measuring the membrane merge rate, the authors confirmed that overexpression of miR-7b in mouse BMMs significantly abrogates OC fusion (81). Anti-miR-30a enhances the actin-ring formation (80). Similarly, miR-26a attenuates the actin-ring formation and resorption in mouse BMMs. MiR-26a targets the connective tissue growth factor (CTGF), which induces and interacts with DCSTAMP (82). Contrary to miR-7b and miR-30a, miR-26a is upregulated in the late phase of osteoclastogenesis, suggesting a physiological regulation of multinucleation in the OC lineage. Thus, it will be of particular interest to evaluate the role of miR-30a and miR-26a on cell fusion.

During OC formation from human CD14<sup>+</sup> progenitors, the enforced expression of miR-142-3p inhibits cell-to-cell contact, clustering and fusion events associated with the induction of OC apoptosis upon RANKL stimulation (83). The negative effect of miR-142-3p on OC fusion could be partially explained by the silencing of PKC $\alpha$ . Indeed, PKC $\alpha$  is involved in the microtubule and actin networks and is predicted as a putative target of miR-142-3p by prediction software. A decreased expression of antiapoptotic factors downstream of PKC $\alpha$  might also explain the induction of cell death (83), however it has not been functionally explored yet.

Finally, miR-186 was newly described as a negative regulator of mature OC survival. Mimics of miR-186 induce caspase-3/7 activity and OC apoptosis in transfected RAW264.7-derived mature OCs (84). Moreover, miR-186 targets the CTSK gene (84) and probably represses the resorbing function of OCs, although it remains to be explored in functional assays.

### ADVANCES IN TECHNOLOGIES FOR THE QUANTIFICATION OF miRNAs IN BIOLOGICAL TISSUES

MiRNAs are classically studied from the total mRNA (including small RNAs) extracted from the tissue of interest. As miRNAs are expressed in various cell types and tissues, it is necessary to well define the targeted sample and to control the purity of the elicited source of miRNAs. The study of miRNAs in primary OCs is challenging because of the localization of OCs into bone cavities, and thus a purified extract of primary OCs is very hard. Finally, primary OC precursors from blood sample or bone marrow are used to derive OCs in in vivo experiments. Nevertheless, the OC differentiation in culture is only partial without reaching a pure OC population. The obtained population includes all stages from the precursor to the mature OC. The study of miRNAs in such heterogeneous cell culture is not satisfactory and gives a lot of variations between samples that could impact on the reliability of the results, particularly in "endpoint" studies without a kinetic expression of miRNAs during the OC differentiation. Some studies are based on purified OCs using chemical methods to eliminate non- and poor-adherent cells, as mature OCs are extremely adherent. Very recently, a novel method of purification based on the OC sorting has been described, allowing a standardized approach to better characterize the miRNA profiling in mature OCs (85).

Other biological tissues are become novel sources of study in the OC biology and the bone remodeling. Indeed, miRNAs can be exported from a donor cell to a recipient *via* exosomes and microvesicles (**Figure 1**), and thus participate to the cell communication between osteocytes, osteoblasts and osteoclasts in the bone micro-environment (86–89). Circulating miRNAs can also be used as biomarkers in pathophysiological conditions, reaching liquid biopsies as potential interesting samples in clinical application.

Molecular technologies are used to detect and quantify miRNAs, and some panels were developed to determine the miRNA profiling. Here we provide a global and detailed view of these technologies and their application in the quantification of miRNAs in biological tissues.

### Screening Methods for the miRNA Profiling

In recent years, technological advances in research tools including qPCR, microarrays, and next generation sequencing (NGS), have enabled sensitive detection of miRNAs. Typically, miRNA biomarkers are measured with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) after RNA extraction and conversion into complementary DNA (cDNA). Many other methods are available for large screening of the miRNome to understand pathologies or discovery of biomarkers. Mestdagh et al., have extensively analyzed analytical parameters of many solutions available for miRNA measurement based on qPCR, hybridization platforms and sequencing technologies (90). Recently, new technologies for miRNAs measurement or optimization of existing methods have emerged. Currently, the miRbase 22 includes 1917 miRNA genes. With the constant evolution of the miRbase, the different miRNA detection platforms need to adapt their product. This flexibility however depends on the technic used. New technologies that are more sensitive, or extraction free chemistry, are definitively modifying the miRNA measurement landscape (**Table 3**).

Among these technologies, we will focus on the most innovative technologies for miRNA detection. These technologies provide real advance and alternative with the direct use of matrices avoiding preprocessing step or optimized library preparation for RNA-Seq method for the profiling of miRNAs. For the measurement of single miRNAs, new methods using microfluidic detection by laminar flow (91) or absolute quantification of signal by RCA-FRET technology (92) are in development. These last technologies may simplify the adoption of miRNA testing in clinical laboratories.

Screening methods such as the microarrays of Affymetrix (version 4.1) and Agilent (v21) now include 2,578 and 2,549 miRNAs, respectively, thus offering a more comprehensive dataset. In addition to these updated microarray versions, the company Takara Bio have recently developed the SMARTer miRNA-Seq kit, which uses Mono-Adapter ligation and Intramolecular Circularization (MAGIC) technology to efficiently capture miRNA species with reduced bias inherent to other approaches. Measurement of equimolar mixture of 963 miRNAs shows that >70% of the miRNAs are accurately represented, whereas other competitors have 49-79% of the miRNAs underrepresented Nevertheless, besides having less bias than the competitors (including TruSeq and NEXTFlex), this kit also produces large amounts of side products and as a result did not perform better for the detection of biological miRNAs (93). Since several years now, a new technology of HTG Molecular (High Throughput Genomic) called EdgeSeq provides miRNAs measurement without RNA extraction. The technology is a combination of hybridization with nuclease protection assay and next generation sequencing. Based on an extraction free chemistry, the technology<sup>1</sup> allows the direct measurement of miRNAs from as little as 15  $\mu l$  of body fluid. This last critical point avoids biases associated to the extraction protocols (94) and increases the sensitivity of the measure. Correlation between replicates is very similar to those shown previously (90) for hybridization and sequencing technologies, whereas accuracy of the gradient of miRNA measure is superior to other hybridization and sequencing platform<sup>2</sup>. Nevertheless, cross reactivity is higher compared to qPCR assays<sup>2</sup>. It has been shown that HTG EdgeSeq results were closest to the RNASeq results with >95% concordance on tissue samples (95). The technology also shows very good correlation with the PCR on plasma samples, with Pearson's coefficient of 0.93 and 0.94 for qPCR and digital PCR (dPCR) data, respectively (96).

### **Circulating miRNAs as Biomarkers**

In the past decade, the search for circulating miRNA for functional studies and biomarkers research has yielded numerous associations between miRNAs and different types of disease. However, many of these relations could not be replicated in subsequent studies under similar experimental conditions. Although this lack of reproducibility may be explained by variations in experimental design and analytical methods, guidelines of the most appropriate design and methods of analysis are scarce. MiRNAs have significant promise as biomarkers for diseases, due to their regulatory role in many cellular processes, and their stability in samples such as plasma and serum. Circulating miRNAs are moreover easily accessible. Biomarker experiments generally consist of a discovery phase and a validation phase. In the discovery phase, typically hundreds of miRNAs are simultaneously measured to identify candidates. Because of the costs of such high-throughput experiments, numbers of subjects are often too small, which can lead to false positives and negatives. In validation phase, a small number of identified candidates are measured in a large cohort, generally using quantitative PCR (qPCR). Although qPCR is a sensitive method to measure miRNAs in the circulation, experimental design, and qPCR data analysis remain challenging with many sources of biases. The MIQE guidelines are useful to stress on the most important biases in qPCR experiments and to give some elements to improve experimental practice (97). There is still a need for standardization or development of new methods to reach the clinic. Thus, choosing the right tools is critical for a successful miRNA-based experiment.

Despite new advances and evolution of technologies, many challenges remain unmet. For example, the impact of RNA isolation, which is known to induce biases (94), but also the lack of standardization of miRNA measurement or normalization of miRNAs data from plasma/serum samples, are key factors of variation, making more challenging the translation of biomarker discovery to diagnostic tool. Indeed, while many reports are describing miRNAs as potential biomarkers since many years, miRNA-based diagnostics have many difficulties to enter to the clinic and to get IVD approval. Moreover, these kinds of tests are likely best suited to a companion role. In contrast to RNA or DNA-based tests, especially that indicate the presence of SNP or a specific expression profile (98), miRNA tests produce results that are more difficult to interpret. While many miRNAs were reported as biomarkers in many reports (99), most miRNAs are expressed widely in a non-cell-specific manner, and their levels of expression are not differing drastically between patients' group and controls. For liquid biopsies such as blood, urine, or other body fluids, miRNA levels are very sensitive to pre-processing and post-processing factors. As a result, despite being very stable, miRNA-based tests are often based on a combination of miRNAs associated with an algorithm, and strict standardization of the entire process, from obtaining and processing the sample to results reporting, is mandatory and is key for reproducible results, no matter what technology is used.

Point of care diagnostics requires short detection time, small sample volume and portability of the device. These requests are often not compatible with miRNA measurement technologies since they are requesting many steps and devices. New methods based on microfluidic chip and laminar flow assisted dentritic amplification is currently under development, with a promise of time to result of only 20 min (91). Sensitivity and accuracy have still to be increased, but this attractive solution could potentially allow the compatibility of miRNAs to short diagnostic

 <sup>&</sup>lt;sup>1</sup>From www.takarabio.com/learning-centers/next-generation-sequencing/ technical-notes/accurate-mirna-representation-in-microrna-seq,2018
<sup>2</sup>From the poster presented at ESHG, 2017, available on https://www. htgmolecular.com/assets/htg/publications/PO-17-Aissaoui-EHSG-miRNA-Metrics.pdf

	Exiqon qiagen LNA	Open array (Taqman)	Takara smarter microRNA-Seq kit	lllumina TruSeq	IonTorrent	Affymetrix miRNA 4.1	Agilent miRNA microarray (21.0)	Nanostring ncounter	HTG molecular
Technology	qPCR	qPCR	NGS	NGS	NGS	Hybrid.	Hybrid.	Hybrid.	Hybrid. and NGS
Input RNA	40 ng	100 ng	100 ng	1000 ng	1000 ng	130 ng	100 ng	100 ng	15 μl/25 ng
Extraction	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
miRNAs in the assay	752	754	miRNome*	miRNome*	miRNome*	2,578	2,549	800	2,083

### TABLE 3 | Technologies of miRNA profiling.

LNA, locked nucleic acid; HTG, high throughput genomic; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; NGS, next generation sequencing; Hybrid, hybridization. \*Based on current database miRBase 22 with 1.917 entries.

delay. Without such solution able to reduce time to results, use of miRNAs in diagnostic is only possible for non-urgent test. Most used platforms remain qPCR, with various technologies available such as LNA/Taqman/SybrGreen PCR, which request high level of standardization to provide accurate and stable results. Another novel technology that could facilitate miRNA transfer to clinic is called RCA-FRET, which is a combination of rolling circle amplification (RCA) and Förster resonance energy transfer (FRET) (92). Key advantage of the technology is a simple workflow, device needed and material for absolute quantification results. This last point is of key importance since normalization of miRNA data is a true hurdle.

Indeed, accurate quantification of miRNAs using qPCR is largely dependent on proper normalization techniques, the absence of which can lead to misinterpretation of data and incorrect conclusions (100). The goal of most miRNA experiments using qPCR is to identify differences in expression between two groups of samples. In this case, cell-free miRNAs from biofluids are emerging as important noninvasive biomarkers because of their stability. Many works are describing miRNAs as potential blood biomarkers. One challenge in studying miRNAs from serum and plasma is their relatively low abundance and lack of reliable endogenous controls. It has been shown that hsa-miR-24, hsamiR-126, hsa-miR-484 (101), hsamiR-16-5p, hsa-miR-93-5p (102), hsamiR-484, and hsa-miR-191-5p (103) are stable normalizers in serum. Nevertheless, some reports indicate also these miRNAs not as normalizers but as biomarkers, as for miR-16-5p described in the progression of gastric cancer for example (104). In the absence of reliable endogenous controls in serum/plasma, exogenous or spike-in controls can be used to normalize miRNA expression data. Exogenous controls can also be used to monitor extraction efficiency or sample input amount for difficult samples (e.g., serum, plasma, or other biofluids).

In addition to most common used matrices, extracellular vesicles (EVs) are emerging and even more challenging to get reliable results. EVs are nanometer-scale particles, which include exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies. EVs are intercellular communicators released by most cell types with key functions in physiological and pathological processes (86, 105). EVs deliver specific proteins, microRNAs and other cellular components. One of the most important aspects of EV research is analyzing their nucleic acid cargo, particularly

miRNAs. These are commonly quantified by RT-qPCR or, increasingly, by comprehensive transcriptomic profiling using NGS or hybridization technologies. One critical issue is the methods for RNA extraction that can influence downstream analyses by yielding non-identical, kit-specific results. This is of particular challenge since typical concentration of this type of sample is low, RNA integrity is decreased and associated to high individual variability. Several kits are on the market and tested (106) but optimal isolation methodology is mainly dependent on the respective research setting and downstream analyses.

Overall, it is not easy to give a simple answer to a complex problem. Many methods are available for miRNAs measurement and generate complex data that need to be validated. Real efforts have to be done on standardization and analytical validation until one can consider to successfully translate biomarker discovery to the clinic.

### CONCLUSION

In the present review we have shown the complexity of understanding OC biology and pointed out key miRNAs that have been involved in OC differentiation as key regulators, with very specific roles in the different phases progressing from early progenitors toward fully mature OC. We also stressed the challenge to get reliable data from miRNA measurement either for supporting the knowledge of OC regulation or the translation into biomarker tools for clinical application.

### DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the supplementary files.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL, ID-R, HF, ES, and FA wrote the review. CL, ID-R, and ES designed the figures and tables.

### FUNDING

INSERM, ANR-16-CE14-0030-02, ANR-15-RAR3-0013-05, University of Montpellier, and H2020 project RABIOPRED (#666798).

### REFERENCES

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. (1998) 391:806–11. doi: 10.10 38/35888
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* (2009) 11:228–34. doi: 10.1038/nc b0309-228
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. (2014) 15:509–24. doi: 10.1038/nrm3838
- Piriyapongsa J, Bootchai C, Ngamphiw C, Tongsima S. microPIR2: a comprehensive database for human-mouse comparative study of microRNA-promoter interactions. *Database*. (2014) 2014:bau115. doi: 10.1093/database/bau115
- Sugatani T, Hruska KA. Impaired Micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. J Biol Chem. (2009) 284:4667–78. doi: 10.1074/jbc.M805777200
- Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, et al. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. J Cell Biochem. (2010) 109:866–75. doi: 10.1002/jcb.22228
- Xia Z, Chen C, Chen P, Xie H, Luo X. MicroRNAs and their roles in osteoclast differentiation. *Front Med.* (2011) 5:414–9. doi: 10.1007/s11684-011-0168-0
- Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biol.* (2014) 11:1355–63. doi: 10.1080/15476286.2014.996462
- 9. Chen J, Qiu M, Dou C, Cao Z, Dong S. MicroRNAs in bone balance and osteoporosis. *Drug Dev Res.* (2015) 76:235–45. doi: 10.1002/ddr.21260
- Sun M, Zhou X, Chen L, Huang S, Leung V, Wu N, et al. The regulatory roles of MicroRNAs in bone remodeling and perspectives as biomarkers in osteoporosis. *Biomed Res Int.* (2016) 2016:1652417. doi: 10.1155/2016/1652417
- Ji X, Chen X, Yu X. MicroRNAs in osteoclastogenesis and function: potential therapeutic targets for osteoporosis. *Int J Mol Sci.* (2016) 17:349. doi: 10.3390/ijms17030349
- Gennari L, Bianciardi S, Merlotti D. MicroRNAs in bone diseases. Osteoporos Int. (2017) 28:1191–13. doi: 10.1007/s00198-016-3847-5
- Feng Q, Zheng S, Zheng J. The emerging role of microRNAs in bone remodeling and its therapeutic implications for osteoporosis. *Biosci Rep.* (2018) 38:BSR20180453. doi: 10.1042/BSR20180453
- Yang Y, Fang S. Small non-coding RNAs-based bone regulation and targeting therapeutic strategies. *Mol Cell Endocrinol.* (2017) 456:16–35. doi: 10.1016/j.mce.2016.11.018
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. (2003) 423:337–42. doi: 10.1038/nature01658
- Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med.* (2012) 18:405–12. doi: 10.1038/nm.2653
- Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y. Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts. *Cell Mol Life Sci.* (2018) 75:3683–92. doi: 10.1007/s00018-018-2881-1
- Oikawa T, Kuroda Y, Matsuo K. Regulation of osteoclasts by membranederived lipid mediators. *Cell Mol Life Sci.* (2013) 70:3341–53. doi: 10.1007/s00018-012-1238-4
- Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.* (2018) 18:e8. doi: 10.4110/in.2018.18.e8
- Xiao Y, Palomero J, Grabowska J, Wang L, de Rink I, van Helvert L, et al. Macrophages and osteoclasts stem from a bipotent progenitor downstream of a macrophage/osteoclast/dendritic cell progenitor. *Blood Adv.* (2017) 1:1993–2006. doi: 10.1182/bloodadvances.2017008540
- Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells. *Blood.* (2010) 116:210–7. doi: 10.1182/blood-2009-11-255026

- 22. Jin Z, Wei W, Yang M, Du Y, Wan Y. Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization. *Cell Metab.* (2014) 20:483–98. doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.011
- Undi RB, Kandi R, Gutti RK. MicroRNAs as haematopoiesis regulators. Adv Hematol. (2013) 2013:695754. doi: 10.1155/2013/695754
- Valenti MT, Dalle Carbonare L, Mottes M. Role of microRNAs in progenitor cell commitment and osteogenic differentiation in health and disease (Review). Int J Mol Med. (2018) 41:2441–9. doi: 10.3892/ijmm.2018.3452
- Park JH, Lee NK, Lee SY. Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation. *Mol Cells.* (2017) 40:706–13. doi: 10.14348/molcells.2017.0225
- Mann M, Barad O, Agami R, Geiger B, Hornstein E. miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:15804–9. doi: 10.1073/pnas.0915022107
- Franceschetti T, Kessler CB, Lee S-K, Delany AM. miR-29 promotes murine osteoclastogenesis by regulating osteoclast commitment and migration. *J Biol Chem.* (2013) 288:33347–60. doi: 10.1074/jbc.M113.484568
- Sugatani T, Hruska KA. MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. J Cell Biochem. (2007) 101:996–9. doi: 10.1002/jcb.21335
- Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, Nagata Y, Ishikawa M, Deie M, et al. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Mod Rheumatol.* (2013) 23:674–85. doi: 10.3109/s10165-012-0710-1
- Guo K, Zhang D, Wu H, Zhu Q, Yang C, Zhu J. MiRNA-199a-5p positively regulated RANKL-induced osteoclast differentiation by target Mafb protein. *J Cell Biochem.* (2018). doi: 10.1002/jcb.27968. [Epub ahead of print].
- Cheng P, Chen C, He H-B, Hu R, Zhou H-D, Xie H, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. J Bone Miner Res. (2013) 28:1180–90. doi: 10.1002/jbmr.1845
- Liu T, Qin A-P, Liao B, Shao H-G, Guo L-J, Xie G-Q, et al. A novel microRNA regulates osteoclast differentiation via targeting protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Bone*. (2014) 67:156–65. doi: 10.1016/j.bone.2014. 07.004
- Kim K, Lee J, Kim JH, Jin HM, Zhou B, Lee SY, et al. Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. *J Immunol.* (2007) 178:5588–94. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5588
- Hu C-H, Sui B-D, Du F-Y, Shuai Y, Zheng C-X, Zhao P, et al. miR-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Sci Rep.* (2017) 7:43191. doi: 10.1038/srep43191
- Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood.* (2011) 117:3648–57. doi: 10.1182/blood-2010-10-311415
- Sugatani T, Hruska KA. Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis. J Cell Biochem. (2013) 114:1217– 22. doi: 10.1002/jcb.24471
- Florczyk-Soluch U, Józefczuk E, Stępniewski J, Bukowska-Strakova K, Mendel M, Viscardi M, et al. Various roles of heme oxygenase-1 in response of bone marrow macrophages to RANKL and in the early stage of osteoclastogenesis. *Sci Rep.* (2018) 8:10797. doi: 10.1038/s41598-018-2 9122-1
- Ke K, Sul O-J, Rajasekaran M, Choi H-S. MicroRNA-183 increases osteoclastogenesis by repressing heme oxygenase-1. *Bone*. (2015) 81:237–46. doi: 10.1016/j.bone.2015.07.006
- Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet. (2003) 4:638–49. doi: 10.1038/nrg1122
- Sugatani T, Alvarez U, Hruska KA. PTEN regulates RANKLand osteopontin-stimulated signal transduction during osteoclast differentiation and cell motility. J Biol Chem. (2003) 278:5001–8. doi: 10.1074/jbc.M209299200
- Zhao C, Sun W, Zhang P, Ling S, Li Y, Zhao D, et al. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA Biol.* (2015) 12:343–53. doi: 10.1080/15476286.2015.1017205

- Penna E, Orso F, Taverna D. miR-214 as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple functions. J Invest Dermatol. (2015) 135:960–9. doi: 10.1038/jid.2014.479
- Xin R, Bai F, Feng Y, Jiu M, Liu X, Bai F, et al. MicroRNA-214 promotes peritoneal metastasis through regulating PTEN negatively in gastric cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* (2016) 40:748–54. doi: 10.1016/j.clinre.2016.05.006
- Liu J, Chen W, Zhang H, Liu T, Zhao L. miR-214 targets the PTEN-mediated PI3K/Akt signaling pathway and regulates cell proliferation and apoptosis in ovarian cancer. *Oncol Lett.* (2017) 14:5711–8. doi: 10.3892/ol.2017.6953
- Wang S, Tang C, Zhang Q, Chen W. Reduced miR-9 and miR-181a expression down-regulates Bim concentration and promote osteoclasts survival. *Int J Clin Exp Pathol.* (2014) 7:2209–18.
- Chen C, Cheng P, Xie H, Zhou H-D, Wu X-P, Liao E-Y, et al. MiR-503 regulates osteoclastogenesis via targeting RANK. J Bone Miner Res. (2014) 29:338–47. doi: 10.1002/jbmr.2032
- Wang C, He H, Wang L, Jiang Y, Xu Y. Reduced miR-144-3p expression in serum and bone mediates osteoporosis pathogenesis by targeting RANK. *Biochem Cell Biol.* (2018) 96:627–35. doi: 10.1139/bcb-2017-0243
- Guo L-J, Liao L, Yang L, Li Y, Jiang T-J. MiR-125a TNF receptor-associated factor 6 to inhibit osteoclastogenesis. *Exp Cell Res.* (2014) 321:142–52. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.001
- Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2006) 103:12481–6. doi: 10.1073/pnas.0605298103
- Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* (2011) 63:1582–90. doi: 10.1002/art.30321
- Ammari M, Presumey J, Ponsolles C, Roussignol G, Roubert C, Escriou V, et al. Delivery of miR-146a to Ly6C high monocytes inhibits pathogenic bone erosion in inflammatory arthritis. *Theranostics.* (2018) 8:5972–85. doi: 10.7150/thno.29313
- 52. Qu B, Xia X, Yan M, Gong K, Deng S, Huang G, et al. miR-218 is involved in the negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by partial suppression of p38MAPK-c-Fos-NFATc1 signaling: potential role for osteopenic diseases. *Exp Cell Res.* (2015) 338:89–96. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.07.023
- 53. Wang W, Yang L, Zhang D, Gao C, Wu J, Zhu Y, et al. MicroRNA-218 negatively regulates osteoclastogenic differentiation by repressing the nuclear factor-κB signaling pathway and targeting tumor necrosis factor receptor 1. *Cell Physiol Biochem.* (2018) 48:339–47. doi: 10.1159/0 00491740
- Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang T-C, et al. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature*. (2014) 512:431–5. doi: 10.1038/nature13375
- Irie N, Takada Y, Watanabe Y, Matsuzaki Y, Naruse C, Asano M, et al. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. J Biol Chem. (2009) 284:14637–44. doi: 10.1074/jbc.M807598200
- Yang S, Zhang W, Cai M, Zhang Y, Jin F, Yan S, et al. Suppression of bone resorption by miR-141 in aged rhesus monkeys. *J Bone Miner Res.* (2018) 33:1799–812. doi: 10.1002/jbmr.3479
- Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Imai Y, Matsumoto T, et al. Genomewide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. J Bone Miner Res. (2015) 30:869–77. doi: 10.1002/jbmr.2418
- Yu F, Xie C, Sun J, Peng W, Huang X. Overexpressed miR-145 inhibits osteoclastogenesis in RANKL-induced bone marrow-derived macrophages and ovariectomized mice by regulation of Smad3. *Life Sci.* (2018) 202:11–20. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.042
- Fennen M, Pap T, Dankbar B. Smad-dependent mechanisms of inflammatory bone destruction. *Arthritis Res Ther.* (2016) 18:279. doi: 10.1186/s13075-016-1187-7
- 60. Zhao H, Zhang J, Shao H, Liu J, Jin M, Chen J, et al. Transforming growth factor  $\beta 1/Smad4$  signaling affects osteoclast differentiation via regulation of miR-155 expression. Mol Cells. (2017) 40:211–21. doi: 10.14348/molcells.2017.230

- Zhang J, Zhao H, Chen J, Xia B, Jin Y, Wei W, et al. Interferon-β-induced miR-155 inhibits osteoclast differentiation by targeting SOCS1 and MITF. *FEBS Lett.* (2012) 586:3255–62. doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.047
- Su L-C, Huang A-F, Jia H, Liu Y, Xu W-D. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. (2017) 20:1631–7. doi: 10.1111/1756-185X.13202
- Sul O-J, Sung Y-B, Rajasekaran M, Ke K, Yu R, Back S-H, et al. MicroRNA-155 induces autophagy in osteoclasts by targeting transforming growth factor β-activated kinase 1-binding protein 2 upon lipopolysaccharide stimulation. *Bone*. (2018) 116:279–89. doi: 10.1016/j.bone.2018.08.014
- Lu S-Y, Li M, Lin Y-L. Mitf regulates osteoclastogenesis by modulating NFATc1 activity. *Exp Cell Res.* (2014) 328:32–43. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.018
- Zhao H, Zhang J, Shao H, Liu J, Jin M, Chen J, et al. miRNA-340 inhibits osteoclast differentiation via repression of MITF. *Biosci Rep.* (2017) 37:BSR20170302. doi: 10.1042/BSR20170302
- Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation. J Bone Metab. (2014) 21:233–41. doi: 10.11005/jbm.2014.21.4.233
- Lee Y, Kim HJ, Park CK, Kim Y-G, Lee H-J, Kim J-Y, et al. MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation. *Bone*. (2013) 56:383–9. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.007
- Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. *Ann Rheum Dis.* (2016) 75:601–8. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206417
- Tang L, Yin Y, Liu J, Li Z, Lu X. MiR-124 attenuates osteoclastogenic differentiation of bone marrow monocytes via targeting Rab27a. *Cell Physiol Biochem.* (2017) 43:1663–72. doi: 10.1159/000 484027
- Mizoguchi F, Murakami Y, Saito T, Miyasaka N, Kohsaka H. miR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA. *Arthritis Res Ther.* (2013) 15:R102. doi: 10.1186/ar4282
- Strzelecka-Kiliszek A, Mebarek S, Roszkowska M, Buchet R, Magne D, Pikula S. Functions of Rho family of small GTPases and Rhoassociated coiled-coil kinases in bone cells during differentiation and mineralization. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* (2017) 1861:1009–23. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.02.005
- Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, et al. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem.* (2000) 275:11993–2002. doi: 10.1074/jbc.275.16.11993
- Georgess D, Machuca-Gayet I, Blangy A, Jurdic P. Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adh Migr.* (2014) 8:191– 204. doi: 10.4161/cam.27840
- Cong F, Wu N, Tian X, Fan J, Liu J, Song T, et al. MicroRNA-34c promotes osteoclast differentiation through targeting LGR4. *Gene.* (2017) 610:1–8. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.028
- Luo J, Yang Z, Ma Y, Yue Z, Lin H, Qu G, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat Med.* (2016) 22:539–46. doi: 10.1038/nm.4076
- Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2008) 9:690–701. doi: 10.1038/nrm2476
- 77. Rossi M, Pitari MR, Amodio N, Di Martino MT, Conforti F, Leone E, et al. miR-29b negatively regulates human osteoclastic cell differentiation and function: implications for the treatment of multiple myelomarelated bone disease. J Cell Physiol. (2013) 228:1506–15. doi: 10.1002/jcp. 24306
- Shimada-Sugawara M, Sakai E, Okamoto K, Fukuda M, Izumi T, Yoshida N, Tsukuba T. Rab27A regulates transport of cell surface receptors modulating multinucleation and lysosome-related organelles in osteoclasts. *Sci Rep.* (2015) 5:9620. doi: 10.1038/srep09620
- Dou C, Zhang C, Kang F, Yang X, Jiang H, Bai Y, et al. MiR-7b directly targets DC-STAMP causing suppression of NFATc1 and c-Fos signaling during osteoclast fusion and differentiation. *Biochim Biophys Acta*. (2014) 1839:1084–96. doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.08.002
- Yin Y, Tang L, Chen J, Lu X. MiR-30a attenuates osteoclastogenesis via targeting DC-STAMP-c-Fos-NFATc1 signaling. *Am J Transl Res.* (2017) 9:5743–53.

- Dou C, Ding N, Luo F, Hou T, Cao Z, Bai Y, et al. Graphene-based MicroRNA transfection blocks preosteoclast fusion to increase bone formation and vascularization. *Adv Sci.* (2018) 5:1700578. doi: 10.1002/advs.201700578
- Kim K, Kim JH, Kim I, Lee J, Seong S, Park Y-W, et al. MicroRNA-26a regulates RANKL-induced osteoclast formation. *Mol Cells*. (2015) 38:75–80. doi: 10.14348/molcells.2015.2241
- Fordham JB, Guilfoyle K, Naqvi AR, Nares S. MiR-142-3p is a RANKLdependent inducer of cell death in osteoclasts. *Sci Rep.* (2016) 6:24980. doi: 10.1038/srep24980
- Ma Y, Yang H, Huang J. Icariin ameliorates dexamethasone-induced bone deterioration in an experimental mouse model via activation of microRNA-186 inhibition of cathepsin K. *Mol Med Rep.* (2018) 17:1633–41. doi: 10.3892/mmr.2017.8065
- Madel M-B, Ibáñez L, Rouleau M, Wakkach A, Blin-Wakkach C. A novel reliable and efficient procedure for purification of mature osteoclasts allowing functional assays in mouse cells. *Front Immunol.* (2018) 9:2567. doi: 10.3389/fimmu.2018.02567
- Liu M, Sun Y, Zhang Q. Emerging role of extracellular vesicles in bone remodeling. J Dent Res. (2018) 97:859–68. doi: 10.1177/0022034518764411
- Xie Y, Chen Y, Zhang L, Ge W, Tang P. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. J Cell Mol Med. (2017) 21:1033–41. doi: 10.1111/jcmm.13039
- Yuan F-L, Wu Q-Y, Miao Z-N, Xu M-H, Xu R-S, Jiang D-L, et al. Osteoclastderived extracellular vesicles: novel regulators of osteoclastogenesis and osteoclast-osteoblasts communication in bone remodeling. *Front Physiol.* (2018) 9:628. doi: 10.3389/fphys.2018.00628
- Tao S-C, Guo S-C. Extracellular vesicles in bone: "dogrobbers" in the "eternal battle field." *Cell Commun Signal.* (2019) 17:6. doi: 10.1186/s12964-019-0319-5
- Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreasen D, Bernard N, Chen C, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods*. (2014) 11:809–15. doi: 10.1038/nmeth.3014
- Ishihara R, Hasegawa K, Hosokawa K, Maeda M. Multiplex MicroRNA detection on a power-free microfluidic chip with laminar flow-assisted dendritic amplification. *Anal Sci.* (2015) 31:573–6. doi: 10.2116/analsci.31.573
- Wu X, Zhu S, Huang P, Chen Y. Highly specific quantification of microRNA by coupling probe-rolling circle amplification and Förster resonance energy transfer. *Anal Biochem.* (2016) 502:16–23. doi: 10.1016/j.ab.2016.03.001
- Dard-Dascot C, Naquin D, d'Aubenton-Carafa Y, Alix K, Thermes C, van Dijk E. Systematic comparison of small RNA library preparation protocols for next-generation sequencing. *BMC Genomics*. (2018) 19:118. doi: 10.1186/s12864-018-4491-6
- Rice J, Roberts H, Burton J, Pan J, States V, Rai SN, et al. Assay reproducibility in clinical studies of plasma miRNA. *PLoS ONE*. (2015) 10:e0121948. doi: 10.1371/journal.pone.0121948
- 95. Yeri A, Courtright A, Danielson K, Hutchins E, Alsop E, Carlson E, et al. Evaluation of commercially available small RNASeq library preparation kits using low input RNA. *BMC Genomics*. (2018) 19:331. doi: 10.1186/s12864-018-4726-6

- Songia P, Chiesa M, Valerio V, Moschetta D, Myasoedova VA, D'Alessandra Y, et al. Direct screening of plasma circulating microRNAs. *RNA Biol.* (2018) 15:1268–72. doi: 10.1080/15476286.2018.1526538
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* (2009) 55:611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Deng MC. The AlloMap<sup>TM</sup> genomic biomarker story: 10 years after. Clin Transplant. (2017) 31:e12900. doi: 10.1111/ctr.12900
- Haider BA, Baras AS, McCall MN, Hertel JA, Cornish TC, Halushka MK. A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. *PLoS ONE*. (2014) 9:e89565. doi: 10.1371/journal.pone.0089565
- Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. RNA. (2008) 14:844–52. doi: 10.1261/rna.939908
- 101. Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* (2016) 17:204–12. doi: 10.1093/bib/bbv056
- 102. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci.* (2012) 57:897–904. doi: 10.1007/s1062 0-011-1981-7
- Hu Z, Dong J, Wang L-E, Ma H, Liu J, Zhao Y, et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*. (2012) 33:828–34. doi: 10.1093/carcin/bgs030
- Zhang J, Song Y, Zhang C, Zhi X, Fu H, Ma Y, et al. Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as two novel potential biomarkers to indicate progression of gastric cancer. *Theranostics*. (2015) 5:733–45. doi: 10.7150/thno.10305
- 105. Luo H, Li X, Li T, Zhao L, He J, Zha L, et al. Exosomes/microvesicles microRNA-423-3p derived from cardiac fibroblasts mediates the cardioprotective effects of ischemic postconditioning. *Cardiovasc Res.* (2018) doi: 10.1093/cvr/cvy231. [Epub ahead of print].
- 106. Buschmann D, Kirchner B, Hermann S, Märte M, Wurmser C, Brandes F, et al. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. J Extracell Vesicles. (2018) 7:1481321. doi: 10.1080/20013078.2018. 1481321

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

Copyright © 2019 Lozano, Duroux-Richard, Firat, Schordan and Apparailly. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.
# Objectifs du projet de thèse

Mon travail de thèse s'est orienté vers l'étude des miARNs dans l'ostéoclastogenèse et dans les précurseurs des ostéoclastes inflammatoires dans le contexte de l'arthrite auto-immune. L'expertise de l'équipe de recherche dirigée par Florence Apparailly dans le domaine des miARNs et dans l'étude des populations monocytaires, ainsi qu'une collaboration étroite avec l'équipe de recherche dirigée par Claudine Blin, spécialisée dans l'étude des propriétés immunologiques des sous-populations d'ostéoclastes, ont permis de mettre en place ce projet de thèse.

Ma démarche a débuté par un état des lieux des connaissances sur les miARNs dans l'ostéoclastogenèse. Puis deux axes principaux de recherche ont émergé au cours de ce travail :

Axe 1

Recherche d'une signature de miARNs caractérisant les ostéoclastes inflammatoires et tolérogènes.

La mise en évidence de la sur-expression de miR-342-3p dans les ostéoclastes inflammatoires a conduit à l'axe 2, miR-342-3p n'ayant encore jamais été décrit dans l'ostéoclastogenèse ni dans l'arthrite auto-immune.

Axe 2

Etude du rôle de miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse et modulation de son expression dans un modèle murin d'arthrite auto-immune à visée thérapeutique.

Ce projet a été financé par l'ANR-16-CE14-0030-02, intitulé « ORIOS: origin and role of inflammatory osteoclasts, novel therapeutic targets in rheumatic diseases », coordonné par Claudine Blin-Wakkach, DR2 INSERM, CNRS UMR7370, Université de Nice Sophia Antipolis.

## Résultats

### Axe 1. Article 2

# Micro-RNA profiling of osteoclast subsets according to their tolerogenic or inflammatory function.

#### Rationnel de l'étude

Les ostéoclastes (OCs) sont responsables de la résorption osseuse physiologique intégrée dans l'homéostasie osseuse. Il a été montré que les OCs ont également des fonctions immunologiques. Ils peuvent exercer une action tolérogène en inhibant l'activation lymphocytaire T et en favorisant la polarisation de T régulateurs Foxp3+ (Kiesel, Buchwald, and Aurora 2009; Grassi et al. 2011). Ces interactions entre les OCs tolérogènes (t-OCs) et les cellules de l'immunité adaptative sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie osseuse en condition physiologique. Cependant, les OCs sont responsables de la destruction osseuse pathologique dans un contexte inflammatoire tel que retrouvé dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), où l'ostéoclastogenèse est fortement augmentée (Schett and Gravallese 2012). Dans ce contexte, les OCs ont une action inflammatoire puisqu'ils polarisent les lymphocytes T en cellules productrices de TNFa (Ibáñez et al. 2016), une cytokine proinflammatoire majeure dans la PR. Ces OCs inflammatoires (i-OCs) sont principalement dérivés de précurseurs circulants tels que les monocytes inflammatoires Ly6C<sup>high</sup> chez la souris (Hasegawa et al. 2019), mais peuvent également dériver de cellules dendritiques (Rivollier et al. 2004; Wakkach et al. 2008). Les OCs dérivés de cellules dendritiques présentent une activité de résorption plus élevée en réponse aux cytokines inflammatoires que les OCs dérivés de monocytes (Rivollier et al. 2004; Gallois et al. 2010).

Les différentes origines possibles des OCs dépendent donc du contexte physiologique ou inflammatoire. Par ailleurs, les OCs générés ont des fonctions immunologiques directement reliées à leurs origines et au micro-environnement dans lequel ils sont produits. Récemment, des efforts ont été faits pour caractériser au niveau phénotypique les précurseurs des i-OCs, et ont identifié l'expression de CX3CR1 comme associée à une partie des i-OCs (Ibáñez et al. 2016). Une étude très récente a montré que les i-OCs CX3CR1<sup>+</sup> expriment PD-L1 et ont un

effet immunosuppresseur *in vitro* sur les i-OCs CX3CR1<sup>-</sup> (Madel et al. 2020), montrant une hétérogénéité fonctionnelle au sein même des i-OCs.

Une autre étude récente a caractérisé chez la souris une sous-population de précurseurs de monocytes sanguins qui infiltrent les articulations arthritiques et donnent les macrophages CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>Ly6C<sup>int</sup>F4/80<sup>+</sup>I-A<sup>+</sup>/I-E<sup>+</sup> dénommés « AtoMs », dont l'équivalent chez l'homme seraient les macrophages CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>-</sup>CD86<sup>+</sup> (Hasegawa et al. 2019). Cependant, ces marqueurs manquent de spécificité et de sensibilité.

Un modèle d'étude fonctionnelle des OCs dérivés soit des précurseurs médullaires monocytaires (MN-OCs) soit des cellules dendritiques immatures (DC-OCs) de la souris (Ibáñez et al. 2016) a montré que les MN-OCs expriment des fonctions tolérogènes, tandis que les DC-OCs ont des fonctions inflammatoires. En effet, après co-culture avec des MN-OCs, les lymphocytes T CD4+ sont enrichis en T régulateurs Foxp3+ capables d'inhiber la prolifération T dans une réaction mixte lymphocytaire alors que les DC-OCs induisent la prolifération T et polarisent les lymphocytes T vers un phénotype inflammatoire, sécrétant du TNF $\alpha$  (Figure 1).



Figure 1. Fonctions immunologiques des OCs selon leurs origines, d'après (Ibáñez et al. 2016)

Le concept qui est formulé à partir de ces résultats est que les MN-OCs issus de cellules monocytaires résidentes de la moelle osseuse de souris peuvent être considérés comme un modèle de t-OCs représentant les OCs responsables du maintien de l'homéostasie osseuse en condition physiologique. A l'inverse, les DC-OCs peuvent être considérés comme un modèle d'OC inflammatoires (i-OCs), pouvant refléter sur le plan fonctionnel les OCs produits à partir de précurseurs périphériques infiltrants dans les articulations enflammées.

Mon étude a eu pour but de caractériser les t-OCs et les i-OCs sur le plan moléculaire par l'étude de leur miRNome, dans l'idée de mettre en évidence des miRNAs spécifiques de chacune des deux sous-populations d'OCs générées selon le modèle proposé par Ibáñez et

al. Les miRNAs étant impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques par le ciblage direct d'ARNm, l'analyse combinée du miRNome avec celle du transcriptome par l'approche globale du « RNA-Sequencing » m'a également permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs et voies de signalisation modulés par les miRNAs spécifiques des i-OCs. Mon étude avait également pour but de comprendre les processus sous-jacents de la différenciation des OCPs en i-OCs, et d'identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques pour la prévention de l'érosion osseuse dans la PR.

Mes résultats ont conduit à la rédaction d'un manuscrit que je signe en 1<sup>er</sup> auteure, actuellement en préparation.

#### <u>Résumé</u>

Les ostéoclastes (OCs) sont les seules cellules capables de résorption osseuse, essentielles à l'homéostasie osseuse et au renouvellement osseux. Cependant, ils participent activement à l'érosion osseuse et à l'entretien d'une inflammation chronique dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) grâce à un dialogue avec les cellules de l'immunité, en particulier les lymphocytes T. Des sous-types d'OCs tels que les OC tolérogènes (t-OCs) et les OC inflammatoires (i-OCs) ont été décrits sur la base de leurs propriétés immunologiques. Des études récentes ont montré que les i-OCs produits dans la PR dérivent de précurseurs circulants qui infiltrent les articulations enflammées. Une étude globale des voies dérégulées, y compris les voies impliquées dans la différenciation ostéoclastique et dans les fonctions immunitaires, complèterait la caractérisation moléculaire de l'hétérogénéité des OCs. Dans ce travail, j'ai combiné les analyses du miRNome et du transcriptome des t-OCs et i-OCs afin d'identifier des micro-ARNs (miARNs) discriminants et les voies biologiques associées.

J'ai généré des OCs à partir de monocytes CD11b + (t-OCs) ou de cellules dendritiques immatures CD11c + (i-OCs) issus de la moelle de souris saines et arthritiques (selon le modèle de serum-transfer arthritis, ou STA). Les différents OCs ont été purifiés par cytométrie en flux. Le miRNome a été établi en utilisant l'approche TaqMan Low Density Array pour 750 miARNs murins. Le niveau d'expression des miARNs discriminants a été validé par RT-qPCR. Le transcriptome a été réalisé par la méthode de séquençage à haut débit des transcrits (ARNm). Une analyse avec Ingenuity Pathway Analysis (IPA) a permis de mettre en réseau les miARNs et gènes différemment exprimés.

J'ai ainsi identifié 8 miARNs différemment exprimés par les 2 sous-types d'OCs, dont 4 miARNs associés aux i-OCs (miR-155, miR-146b, miR-151-3p, miR-342-3p) et 4 miARNs associés aux t-OCs (miR-185, miR-674, miR-26b, miR-29a). Parmi eux, miR-155, miR-146b et miR-342-3p sont fortement discriminants pour les i-OCs (AUC>0,9). Ils sont aussi significativement sur-exprimés dans les OCs dérivés des précurseurs médullaires de souris arthritiques comparé aux souris saines contrôles, ce qui suggère un enrichissement en i-OCs dans la moëlle osseuse en condition arthritique. L'analyse du RNAseq des t-OCs et i-OCs a montré une expression significativement différente de 867 gènes (« false discovery rate » FDR<0,05 et différence >±log2). L'étude de ces gènes a identifié des voies biologiques distinctes qui pourraient être liées aux propriétés immunologiques des 2 type d'OCs. En particulier, les i-OCs présentent un profil d'expression enrichi avec des voies impliquées dans les interactions immunitaires, la mobilité cellulaire et le trafic cellulaire. L'analyse *in silico* de prédiction a montré que 215 gènes (soit 24,8% des gènes différemment exprimés) sont des cibles potentielles d'un ou de plusieurs miARNs discriminants. De façon surprenante, ces

76

gènes sont tous sur-exprimés dans les i-OCs, et près de 50% seraient des cibles potentielles de miR-185. Une analyse complémentaire avec l'outil IPA a révélé des connections centrales entre les miARNs et les gènes différemment exprimés, pointant sur des miARNs cruciaux dans la régulation de l'expression de voies biologiques pouvant distinguer les t-OCs des i-OCs.

Les données collectées dans mon étude pourront servir de ressources à de futures études visant à identifier et à cibler plus spécifiquement les i-OCs, en particulier dans un contexte inflammatoire associé à une érosion osseuse pathologique.

Article

### MiRNA profiling of osteoclast subsets according to their tolerogenic or inflammatory function.

Claire Lozano<sup>1</sup>, Valentin Estibals<sup>1</sup>, Maria-Bernadette Madel<sup>2</sup>, Claudine Blin-Wakkach<sup>2</sup>, Christophe Hue<sup>3</sup>, Hendrick Mambu-Mambueni<sup>3</sup>, Henri-Jean Garchon<sup>3</sup>, Florence Apparailly<sup>1, \*, §</sup>and Isabelle Duroux-Richard<sup>1, \*, §</sup>

- <sup>1</sup> IRMB, INSERM, Univ Montpellier, CHU Montpellier, F-34000 Montpellier, France
- <sup>2</sup> CNRS UMR7370, Univ Côte d'Azur, Nice, France
- <sup>3</sup> UVSQ, INSERM, Univ Paris-Saclay, Montigny-Le-Bretonneux, France
- <sup>§</sup> Correspondence: isabelle.richard@inserm.fr; Tel.: +33-467-335-697; <u>Florence.apparailly@inserm.fr</u>; Tel.: +33-467-335-696
- \* These authors contributed equally to this work.

#### Abstract:

Osteoclasts (OCs) are unique bone-resorbing cells that are essential to bone homeostasis and turnover. However, they actively participate to bone erosion and sustain chronic inflammation in rheumatoid arthritis (RA) through a dialog with immune cells including T-cells. Tolerogenic OCs (t-OCs) and inflammatory OCs (i-OCs) subsets were thus described based on their distinct immunological properties. Recent studies pointed out that i-OCs produced in RA exclusively originate from circulating precursors that infiltrate the inflamed joints. Here, we combined miRNome and transcriptome analyzes of t-OCs and i-OCs to identify distinct miRNAs and related biological pathways, related to their immunological properties in particular.

We generated *ex vivo* OC subsets from either bone marrow (BM)-derived CD11b+ monocytes (t-OCs) or CD11c+ immature dendritic cells (i-OCs) isolated from healthy and arthritic mice. Both OC subsets were FACS sorted and miRNome and transcriptome analyses were performed using TaqMan Low Density Array for rodent miRNAs and RNA-sequencing, respectively. The expression level of miRNAs differentially expressed between i-OCs and t-OCs was quantified by RT-qPCR. Putative target genes and pathways were found using miRWalk, Pathcards and Gene Ontology databases. The Ingenuity Pathway Analysis helped to integrate the interplay between identified miRNAs and genes expression.

We found 8 miRNAs differentially expressed between both OC subsets: 4 miRNAs were associated with i-OCs (miR-155, miR-146b, miR-151-3p, miR-342-3p) and 4 with t-OCs (miR-185, miR-674, miR-26b, miR-29a). Among them, miR-155, miR-146b and miR-342-3p were highly specific for i-OCs (AUC>0.9) and were significantly up-regulated in BM-derived OCs of arthritic mice. OC subsets did not differ in the OC-specific gene expression, suggesting that they display similar osteoclastic functions. Conversely, OC subsets display distinct biological pathways that are linked to their immune properties. Of note, i-OCs highly expressed genes related to pathways related to immune interactions, cell mobility and cell trafficking. The miRNA-mRNA network showed linkages in central nodes, indicating that some miRNAs are crucially involved in the pathways specific for each OC subsets.

Keywords: miRNA; osteoclast; arthritis; transcriptome

#### 1. Introduction

Osteoclasts (OCs) are bone-resorbing cells originating from myeloid precursors. Osteoclastogenesis locally occurs in bone tissue from resident cells such as common progenitors of the monocytic/macrophage lineage or from circulating monocytes [1] that can migrate to the bone thanks to chemo-attractant molecules. OCs are key players in maintaining bone homeostasis through their unique function of bone resorption and their immune properties. First, they actively participate to bone

turnover by degrading the mineralized bone matrix. What is more recently known is that OCs are capable of antigen presentation and cytokine secretion [2]. OCs display tolerogenic properties to maintain bone homeostasis and self-tolerance in the bone tissue by locally promoting regulatory T-cells [3,4]. Inversely, they can display an inflammatory phenotype and promote  $\text{TNF}\alpha$ -producing T-cells under specific inflammatory conditions [5].

A subset of OCs generated in inflammatory disorders might be responsible for the pathologic bone erosion and for the maintenance of chronic inflammation. These so-called inflammatory OCs (i-OCs) are mainly derived from circulating precursors such as inflammatory monocytes, which can infiltrate the inflamed joints in autoimmune arthritis [6]. Dendritic cells (DCs) can also give rise to i-OCs through a mechanism of trans-differentiation [7,8]. DC-derived OCs are more aggressive as they have a higher capacity of bone destruction in response to pro-inflammatory cytokines than monocyte-derived OCs [7,9]. Collectively, these findings suggest that OCs are a heterogeneous population, mainly based on their immune functions that are linked to their origin.

Recent efforts have been made to characterize the precursors of i-OCs at the phenotypic level, in particular the high expression of CX3CR1 [5], especially in the context of rheumatoid arthritis (RA) [6]. CX3CL1 (fractalkine) is the unique ligand of CX3CR1 and is overexpressed in synovial fluid of RA [10]. Both fractalkine and CX3CR1 are expressed on synovial macrophages and DCs in RA [11]. The CX3CR1/fractalkine axis is partly involved in the recruitment of monocyte subsets into the RA synovium [12]. Although, CX3CR1 is highly expressed by non-classical monocytes that are preferentially recruited in non-inflamed tissues [13], it is also expressed to lesser extent by intermediate monocytes, which accumulate into inflamed joints [14,15]. CX3CR1 is also expressed by bone marrow resident cells, which give rise to OCs in healthy conditions [16], suggesting that CX3CR1 is not sufficient to distinguish the precursors of i-OCs from those of t-OCs. The phenotyping of inflammatory precursors with high osteoclastogenic potential still remains partial and may suffer from a lack of specificity. Finally, the use of OC precursors' phenotyping could have limited relevance to distinguish between mature OC subsets because of the dynamic changes in the expression of cell surface markers during osteoclastogenesis.

MicroRNAs (miRNAs) are small single strand non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides, which are involved in the post-transcriptional regulation of genes through the sequestration or degradation of targeted mRNAs. MiRNAs act as fine regulators of many biological processes including cell differentiation, proliferation and apoptosis. We recently reviewed their crucial role in all phases of osteoclastogenesis [17]. Furthermore, miRNAs can modulate the immune response through the regulation of cytokine signaling and the polarization of immune cells toward inflammatory or tolerogenic phenotypes [18-20]. It is also well acknowledged that abnormal expression of miRNAs plays a role in the pathogenesis of autoimmune diseases [21], such as the pro-inflammatory miR-155 in RA [22]. On the other hand, anti-inflammatory miRNAs might serve as therapeutic agents in various inflammatory disorders. For example, miR-146 is one of the most upregulated miRNA in response to pro-inflammatory stimuli, acting as a negative feedback to control immune activation and excessive inflammation [23]. Circulating and synovial miR-146a levels are high in patients with RA [24], a disease associated with uncontrolled inflammation and bone erosion. Although increased expression of miR-146a in RA is induced in response to inflammation, endogenous miR-146a is unable to properly control disease progression. However, a selective delivery of miR-146a to circulating inflammatory Ly6Chigh monocytes leads to reduced bone erosion in experimental arthritis [25], suggesting a potential therapeutic role for miRNAs in OC precursors.

Recently, Ibañez et al. designed a functional study model of OC subsets derived either from mouse BM monocytic precursors (MN-OCs) or immature dendritic cells (DC-OCs) [5]. These findings functionally recapitulate the physiological tolerogenic OCs (t-OCs) derived from bone marrow resident monocytic cells, and the inflammatory OCs (i-OCs) derived from circulating precursors such as DC.

In the present study, we combined the RNA sequencing and miRNome analyses of both t-OCs and i-OCs generated from healthy and arthritic mice to identify biological pathways and markers that

characterize OCs with different immune functions. Of note, we found that miR-155, miR-146b and miR-342-3p are markers for i-OCs in arthritic individuals.

#### 2. Materials and Methods

#### 2.1 Mouse

C57Bl/6JOlaHsd male mice were purchased from Envigo and housed in our animal facility in the accordance with the ethic statements and general guidelines of the Institute for Neurosciences Montpellier. Serum-transfer arthritis (STA) was induced in 8 weeks old males by i.p. injection of  $100\mu$ l of arthritogenic serum obtained from K/BxN mice (day 0 and 1). Alternatively, controls received  $100\mu$ l of serum previously collected from healthy mice. We daily performed the clinical scoring based on the paw swelling measurement and on the number of inflamed joints until the sacrifice 10 days after STA induction.

#### 2.2. Ex vivo generation of osteoclast subsets

Osteoclast (OC) subsets were generated according to the protocol designed by Ibáñez and colleagues [5]. Briefly, we flushed total bone marrow (BM) cells from the femur and tibia of mice using PBS 1X. Subsequent lysis of the red blood cells was performed with ACK lysis buffer (Sigma-Aldrich). BM cells were plated at 1.10<sup>-6</sup> cells/ml and cultured 5 to 10 days in pro-osteoclastic medium, which consisted in enriched GlutaMax  $\alpha$ MEM medium with recombinant murine M-CSF (25 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) (Miltenyi Biotec) in controlled atmosphere (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) until the generation of OCs. Medium was changed each 3-4 days. Tolerogenic OCs (t-OCs) were generated from CD11b<sup>+</sup> monocytic precursors sorted by magnetic separation (MACS) according to the manufacturer's instructions (CD11b microbeads, Miltenyi Biotec), then plated at 4.10<sup>^5</sup> cells/ml and cultured 5 days in pro-osteoclastic condition as detailed above. To generate inflammatory OCs (i-OCs), we first plated BM cells at 1.10<sup>-6</sup> cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with recombinant murine IL-4 (10 ng/ml) and GM-CSF (10 ng/ml) (PeproTech) for 6 days to allow an enrichment in immature DCs. Then CD11c+ poorly-adherent cells were sorted by MACS (CD11c microbeads UltraPure, Miltenyi Biotec) and plated at 4.10<sup>-4</sup> cells/ml in  $\alpha$ MEM medium for 5-6 days with M-CSF 25 ng/ml and RANKL 50 ng/ml to generate i-OC. All media were supplemented with 5% fetal bovine serum (GE Healthcare Hyclone, Fisher Scientific), 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) and 0,1% of 2-mercaptoethanol 50mM (Gibco, Fisher Scientific).

#### 2.3. FACS sorting of osteoclasts

The OC subsets (t-OCs and i-OCs) generated *ex vivo* were enriched by FACS sorting. To get a cell suspension, we washed the cells once with DPBS, and adherent cells were incubated 20 min with Accutase (Sigma-Aldrich) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. We gently collected cells and harvested the residual cells with two extensive PBS 1X washes. Cells were centrifuged 5 min at 300 g and re-suspended in cold PBS. Cells were labeled with 5 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) in PBS 1X supplemented with 1% FBS and 2 mM EDTA (PSE) for 30 min at 37°C. Cells were centrifuged at 350 g for 5 min and re-suspended at  $6.10^{\circ6}$  cells/ml in ice-cold PSE for cell sorting. Before FACS sorting, cells were filtered on a 100 µm nylon mesh. Hoechst-stained cells were sorted on a FACS Aria II (BD Bioscience) as previously described [26]. Briefly, doublets were excluded and singlets with 1–2 nuclei and ≥3 nuclei were selected by a histogram display and by plotting against the nuclei number. Alternatively, unlabeled cells were sorted on a FACS SH800S (Sony) after doublets exclusion as previously described [5]. We sorted cells using a 100 µm nozzle at a flow rate of 1000-2000 events/s. Sorted osteoclasts were collected in pure fetal bovine serum.

#### 2.4. miRNA profiling and RT-qPCR

Total RNA was extracted using the miRNeasy Micro Kit (QIAGEN) and the procedure automatized using the QIAcube (QIAGEN). The miRNA expression profiles were analyzed on paired samples using the TaqMan® Array rodent MicroRNA Card Set v3.0 (TLDA, Applied Biosystems) after preamplification steps, according to the manufacturer's instructions. Relative expression and statistical analysis was calculated using the ExpressionSuite software (Applied Biosciences). Comparison of the expression patterns of 750 miRNAs in i-OCs and t-OCs was performed using Ct values < 35, difference of at least 2-fold with a p-value lower than 0.05. Mature miRNAs of interest were specifically converted into cDNA using TaqMan microRNA reverse transcription kit according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). RT specific primers 5X (Thermofisher) were multiplexed in a primer pool containing 1% of each diluted in an adequate volume of Tris-EDTA 1X. Pre-amplification step was performed using FAM-labeled specific PCR primers 20X and TaqMan PreAmp Master Mix kit (Applied Biosystems) for 12 cycles. Alternatively, these preliminary steps were performed using Megaplex RT and PreAmp Primers Rodent pool A (Applied Biosystems), which include specific primers for miRNAs of interest. Quantitative Real Time PCR (qPCR) was performed on diluted pre-amp products using the specific TaqMan PCR primers and TaqMan Universal Master Mix II with no UNG, and run on Viia7 system (Applied Biosystems) in 96-well PCR plates for 40 cycles. Relative miRNA expression was normalized on sno202 expression in murine cells with the 2<sup>^</sup>-(deltaCT) method.

#### 2.5. Gene expression in OC subsets

Total RNA was retrotranscribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems). Quantitative Real Time PCR was performed on Viia7 system (Applied Biosystems) using TaqMan Universal Master Mix II with no UNG and FAM-labelled specific primers (Thermofisher) for OC-associated genes *Acp5*, *Nfatc1*, *Mmp9*, *Cstk*, and for the housekeeping gene *Gapdh* used for the normalization of gene expression.

#### 2.6. RNA-Sequencing

Total RNA (100 ng) from 4 biological replicates in each group was extracted from i-OCs and t-OCs after FACS sorting with the RNeasy kit (Qiagen) and processed for directional library preparation using the Truseq stranded total RNA library kit (Illumina). Libraries were performed on a Nextseq500 sequencer (Illumina) to generate 30-40 million fragments per sample. After quality controls, raw RNAseq fastq reads were trimmed with Trimmomatic and aligned to the reference mouse transcriptome (Gencode mm10) using STAR (v. 2.6.1c) [27] on the National Institutes of Health high-performance computing Biowulf cluster. Gene-assignment and estimated counts of RNA reads were performed with HTseq [28]. Gene expression in biological replicates was compared between the different conditions to identify differentially expressed genes using Perseus software [29] and the Wald test (FDR < 0.05).

#### 2.7. In silico analyses

Dysregulated miRNAs were examined with miRWalk [30], a miRNA database aiming to identify predicted and validated target genes, as well as related pathways. This software provides information on miRNA-target interactions, not only based on 3'-UTR, but also on the other regions of all known genes, and simultaneously interrogates several algorithms (TargetScan, Miranda, RNA22 and miRWalk). We used a high predictive score with at least 3 of the 4 queried algorithms predicting miRNA target genes.

#### 2.8. Statistical analyses

For miRNA studies, relative expression and statistical analyses were calculated using the ExpressionSuite software (Applied Biosciences), which included the student's t-test for sample group comparisons and built Volcano Plot comparing the size of the fold change (biological significance) to the statistical significance (p-value). For RNAseq analyses, false discovery rate (FDR) was determined with threshold 0.05 and log2 (fold change < -2 and > +2) to identify differences in gene expression.

Heatmaps and hierarchical clustering involved using z-scores transformed from the original normalized values. GraphPad prism software was used for receiver operating characteristic (ROC) and area under the ROC curve (AUC) determination.

#### 3. Results

#### 3.1. MiRnome reveals differences between i-OCs and t-OCs in healthy conditions

To explore the differential expression of miRNAs in OC subsets, we generated t-OCs and i-OCs from bone marrow (BM) CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup>, respectively, in the presence of RANKL and M-CSF, (Fig1A). The expression levels of OC-specific genes such as *Nfatc1*, *Acp5*, *Mmp9* and *Cstk* were monitored by RT-qPCR to validate the OC differentiation (Fig S1A). We performed a global miRNA profiling on sorted OC subsets by considering 750 rodent miRNAs dispatched in highly characterized miRNAs (pool A) and more recently discovered miRNAs (pool B). More than 50% of the 750 miRNAs analyzed were detectable in i-OC and t-OC samples with Ct values  $\geq$  32.



**Figure 1. MiRNA profiling in OC subsets from healthy mice. (A)** Primary OC subsets were generated from bone marrow (BM) of healthy C57Bl/6 mice (n=4), either from CD11b+ monocytes (t-OCs) or CD11c+ immature dendritic cells (i-OCs). **(B)** Volcano plot representation of miRNA profiling used thresholds defined as a 2-fold change expression and a p-value < 0.05. **(C)** Validation of miRNA expression in OC subsets of healthy mice (n=10). The expression levels are normalized with sno202. Medians are represented. Differences between groups were compared using Mann-Whitney test: p-value \* < 0.05; \*\* < 0.01; \*\*\*\* < 0.0001.

The miRNA expression distribution was visualized using the volcano plot analysis, which shows the log2 of the fold change between i-OC and t-OC subsets for each miRNA expression versus -log10 of p-value from the t-test. A list of significantly dysregulated miRNAs was generated from the volcano plot by selecting miRNAs with qPCR cycle threshold (CT) values up to 32, a minimum of a 2-fold change and a *p*-value <0.05 (Fig1B and Table 1). RT-qPCR was performed to validate microarray data (Fig1C). We confirmed that miR-151-3p (p=0.0052), miR-342-3p (p=0.0013), miR-146b (p=0.0029), miR-155 (p<0.0001) were significantly upregulated in i-OCs, and that miR-185 (p=0.0089), miR-674 (p=0.0089), miR-26b (p=0.0177) and miR-29a (p=0.0232) were upregulated in t-OCs (Fig. 1C).

MiRNA Symbol	Ст value	log2(FC)	p-value
mmu-miR-151-3p	28,3	-5,06	0,04
mmu-miR-342-3p	23,1	-2,40	0,018
rno-miR-351	29,1	-1,94	0,019
mmu-miR-125a-3p	30,2	-1,84	0,041
mmu-miR-146b	21,3	-1,64	0,001
mmu-miR-155	26,5	-1,56	0,011
mmu-miR-30e	21,4	0,59	0,03
mmu-miR-106a	17,8	0,70	0,011
mmu-miR-26b	20,9	0,70	0,024
mmu-miR-17	17,0	0,82	0,005
snoRNA135	18,4	0,90	0,029
mmu-miR-29a	19,1	0,93	0,012
mmu-miR-674	20,6	1,06	0,045
mmu-miR-185	23,8	1,20	0,036
mmu-miR-18a	22,7	1,71	0,035
mmu-miR-148a	23,7	1,82	0,039
mmu-miR-32	28,6	2,45	0,022
mmu-miR-130a	25,2	3,94	0,046

**Table 1. miRNA differentially expressed between OC subsets.** CT: qPCR cycle threshold; FC: fold change of t-OCs compared to i-OCs.

#### 3.2. OC subset-specific miRNAs are deregulated in arthritis

To determine whether the expression of the differentially expressed miRNAs was modified in arthritis, we compared their expression in OC subsets generated *ex vivo* from arthritic mice using the K/BxN serum transfer arthritis (STA) model. Animals were sacrificed at the peak of arthritis, i.e. 10 days after STA induction (Fig 2A). Primary i-OCs and t-OCs were generated as described above, the expression levels of miRNAs and OC-specific genes (Fig S1B and S2) were quantified using RT-qPCR.



**Figure 2: miRNA expression levels in OC subsets from arthritic mice. (A)** The hind paw swelling was measured for 10 days in arthritic mice (STA group) and in the healthy controls (HC) (n=5 per group). Black arrows represent the two i.p. injections of 100 µl of either K/BxN serum for arthritis induction (STA, red) or healthy serum for healthy controls (HC, black). **(B)** miR-151-3p expression levels in i-OCs (squares) generated from either healthy or arthritic mice. **(C)** miR-185, miR-674, miR-26b and miR-29a expression levels in t-OCs (circles) of healthy or arthritic mice. The miRNA expression levels are normalized with sno202. Medians are represented. Mann-Whitney test: p-value \*< 0.05; \*\*< 0.01.

The expression levels of the most expressed miRNAs in i-OCs in steady state such as miR-151-3p, miR-342-3p, miR-146b and miR-155, showed similar and significant expression profiles in the context of arthritis (Fig S2A). We found the same trend for t-OC miRNAs, but observed more dispersion of the results, and only miR-185 and miR-674 were significantly upregulated in arthritic t-OCs compared with arthritic i-OCs (Fig S2B).

Interestingly, we observed that the expression of some discriminant miRNAs was reinforced in OC subsets under arthritic conditions compared to healthy controls. The i-OC-associated miR-151-3p was significantly increased in arthritic i-OCs (Fig 2B), and the 4 t-OC-associated miRNAs (miR-185, miR-26b, miR-29a and miR-674) were significantly increased in t-OCs isolated from arthritic mice, at least more than 2-fold compared with healthy mice (Fig 2C). This reinforced miRNA signature of OC subsets suggests that the inflammatory conditions reinforce miRNAs that might be involved in the distinct functions of OC subsets in arthritis.

#### 3.3. High levels of miR-155, miR-342-3p or miR-146b in arthritis-associated OCs reflect the presence of i-OCs

To determine whether specific miRNAs could represent potential markers of OC subsets, we performed an analysis allowing to generate ROC curve and AUC measurements for the 8 miRNAs previously validated as discriminating i-OCs from t-OCs (Table S1). AUC values were > 0.9 only for miR-155 (AUC=0.917, Fig 3A), miR-342-3p (AUC= 0.902, Fig 3B) and miR-146b (AUC= 0.901, Fig 3C), reflecting a high discrimination performance. The combination of miR-155, miR-342-3p, and miR-146b did not further increase the performance of individual miRNAs (data not shown).



**Figure 3: Highly discriminant i-OC-associated miRNAs. (A-C)** The ability to discriminate i-OC from t-OC subsets are shown using ROC curves for miR-155 (**A**), miR-342-3p (**B**), and miR-146b (**C**). (**D**) miRNA expression levels in bone marrow-derived OCs from arthritic mice (STA) and healthy controls (HC), (n=5 per group). The expression levels are normalized with sno202. Medians are represented. Mann-Whitney test: p-value \*< 0.05; \*\*< 0.01.

We then wondered if these 3 miRNAs could be discriminant markers in a heterogenous population of OCs. We thus quantified their expression in BM-derived OCs from either arthritic mice or healthy controls. We showed that miR-155, miR-146b and miR-342-3p were significantly up-regulated in arthritis (Fig 3D). Collectively, these results suggest the ability of these 3 miRNAs to identify i-OCs and that arthritic-associated OCs were enriched with i-OCs.

#### 3.4. Pathways associated with immune functions predominate in i-OCs

To examine which biological pathways characterize both OC subsets, we analyzed the transcriptomic profiles of 23,420 genes using mRNA-seq analysis. We identified 867 differentially expressed genes (DEG) (p < 0.05, FDR-corrected, and fold change >2 and <-2) between t-OCs and i-OCs (Fig 4A, Table S2). We further performed a network analysis of gene sets representing changes in DEG between t-OCs and i-OCs using the Ingenuity Systems<sup>TM</sup> Pathways Analysis (IPA) tool (http://www.ingenuity.com). The combined analysis of i) the probability that the correlation between an input set of observed factors and co-regulated gene sets in the IPA database did not occur by chance ( $-\log(p-value)$ ), and ii) the number of DEG per biological process, revealed a high enrichment of specific biological processes including cell movement and migration, cell death and survival, tissue morphology and hematological system development and function (Figure 4B). Nearly 25% of significantly DEG are involved in cell mobility functions, and the calculation of the predicted activation state showed that this function is increased in i-OCs (Table S3).



**Figure 4**: **RNA-seq analysis of t-OC and i-OC subsets. (A)** Heatmap of unsupervised hierarchical clustering from RNA-Seq data. The clustering was performed on all samples on the 867 differentially expressed genes between i-OC and t-OC subsets (corrected FDR p-values <0.05). (B) Gene ontology analysis of the 867 differentially expressed genes in t-OC and i-OC subsets using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software.

Because we compared two OC subsets originating from distinct precursors, we wondered whether they differed in the OC-associated pathways. The unsupervised analysis of genes involved in "OC differentiation" or in "OC signaling" pathways (issued by the Pathcards database, https://pathcards.genecards.org) showed no difference between t-OCs and i-OCs (Fig S3A and S3B). This suggested that both OC subsets are mature OCs sharing similar OC-specific properties. However, we noted that 9 previously identified DEG (Table S2) were also included in the "OC differentiation" pathway, such as *Ncf1, Lilrb4, Trem2, Ifngr1, Nfatc2, Socs3, Stat2, Irf9* and *FosB* (Fig 5). These 9 genes are common to the "Immune system" pathway, indicating that OC subsets differed in their immune properties rather than in their OC-specific properties.



**Figure 5: Heatmap of supervised hierarchical clustering of 9 genes included in the "Immune system" and "Osteoclast differentiation" pathways.** Each row represents a single gene, and each column represents one sample (n=4 per group of OC subset). The sample clustering trees of genes and OC subsets are shown on the left and the top, respectively. The color scale illustrates the relative expression level of a single gene across all samples: yellow color represents an expression level above mean, blue color represents expression lower than the mean.

### 3.5. Networks of mRNAs-miRNAs identify specific pathways in OC subsets that are linked to their immune properties

The integrative analysis of discriminant miRNAs and significantly DEG in OC subsets has been carried out to find possible relationships. We crossed the 867 DEG with the genes putatively targeted by the 8 OC subset-specific miRNAs. We performed the *in silico* analysis using the miRWalk software that provides information on miRNA-target interactions, by simultaneously interrogating several algorithms such as TargetScan, Miranda, RNA22 and miRWalk. Using a high predictive score with at least 3 of the 4 queried algorithms predicting miRNA target genes, we identified 215 DEG carrying binding sites for miRNAs of interest (Table S4). Surprisingly, all these 215 genes were upregulated in i-OCs. Although we applied a stringent predictive score, we still observed that 50% of genes (n=107) were putatively targeted by several miRNAs. A global view of these data highlighted that miR-185 was predicted to nearly target 50% of DEG (n=106). To a lesser extent, the 3 other "t-OC miRNAs" (miR-674, miR-26b, miR-29a) putatively target more than 50 DEG each. These findings suggest that these "t-OC miRNAs", which were down-regulated in i-OCs, were probably involved in the dysregulation of gene expression in i-OCs. IPA gene ontology analysis showed that prominent pathways were associated with the immune cell trafficking, such as leucocyte migration, cell movement and recruitment with p-values ranging from 1.52 10-23 to 4.4 10-14, involving 60, 47 and 26 DEG putatively targeted by OC miRNA signature, respectively (Table S5).

Next, we constructed the mRNA-miRNA networks using IPA tool and miRNA-target gene interaction. To optimize the visualization, we separated into two network analyzes to identify pathways regulated either by the "i-OC miRNAs" (Fig 6A) or by the "t-OC miRNAs" (Fig 6B). The "i-OC miRNAs" network consisted in 4 miRNAs (miR-146b, miR-342-3p, miR-155 and miR-151-3p) and 28 genes, including 15 putative targets. In this network, two miRNAs (miR-342-3p and miR-155) and two targets (*Tal1* (TAL BHLH Transcription Factor 1) and *Satb1* (SATB Homeobox 1)) were the most common regulators. Interestingly, we found that the chemokine genes *Cxcl1*, *Cxcl2* and *Cxcl3*, which promote neutrophil chemotaxis, were also connected. The "t-OC miRNAs" network consisted in edges

connecting 3 miRNAs (miR-185, miR-26b, miR-29a) and 36 targets; miR-29a and miR-185 were linked to 19 and 16 targets, respectively. The common mRNAs linking these miRNAs are *Ccnd2* (Cyclin D2), *Klf4* (Kruppel-like factor 4), *Nrp1* (Neuropilin 1) and *Btg2* (BTG Anti-Proliferation Factor 2).



**Figure 6: Ingenuity Pathway Analysis (IPA) showed predicted interactions between validated i-OC and t-OC miRNAs and their respective targets. (A, B)** The "i-OC miRNAs" **(A)** and "t-OC miRNAs" **(B)** networks with their putative targets are shown. Red and green shapes represent mRNA and miRNA that are over- (red) or under-expressed (green) in i-OCs **(A)** and in t-OCs **(B)**. Solid lines are direct interactions and dashed lines are indirect interactions. **(C, D)** Gene ontology analysis of differentially expressed genes in i-OCs **(C)** and t-OCs **(D)** networks using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool. The dashed grey line represents a FDR p-value of 0.001.

Functional enrichment analyzes of DEG in each OC subset showed that i-OC-associated pathways are highly enriched with cell mobility functions such as chemotaxis of myeloid cells, cell infiltration and migration (Fig 6C and Table S6). On the other hand, t-OC-associated pathways include cell cycle and cell death such as self-renewal of cells and apoptosis (Fig 6D and Table S6). Interestingly, the main networks identified for i-OCs and t-OCs are "Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Immune Cell Trafficking" (Fig. S4A) and "Lymphoid Tissue Structure and Development, Tissue Morphology", respectively (Fig. S4B). These high IPA scores (20 and 33, respectively) take into account the number of genes and the size of the networks to approximate the relevance of the networks to the original list of target genes.

#### 4. Discussion

In this study, we report for the first time a new characterization of OC subsets defined by their immunological origin at the molecular level using transcriptomic analyses.

Here, based on the miRNA profiling and further the validation of differentially expressed miRNAs in OC subsets, we identified 4 miRNAs upregulated in DC-derived inflammatory OCs (i-OCs), namely miR-155, miR-146b, miR-342-3p and miR-151-3p, and 4 miRNAs upregulated in monocyte-derived tolerogenic OCs (t-OCs), namely miR-674, miR-185, miR-26b and miR-29a. We further evidenced the presence of the i-OCs miRNA signature among bone marrow OC precursors of arthritic mice, in particular miR-155, miR-146b and miR-342-3p, which expression is highly specific for i-OCs (AUC>0.9) and increased in arthritis. Overall, these data suggest that those miRNAs might be used as molecular markers of i-OCs and of increased potential of pathogenic bone erosion.

The i-OC-associated miRNAs found in our study included miR-155, which play a crucial role in the activation of myeloid cells by promoting the production of pro-inflammatory cytokines [31], DC maturation [32] and break of self-tolerance [33]. Interestingly, miR-155<sup>-/-</sup> mice are resistant to collagen-induced arthritis (CIA) but not protected from the passive transfer of collagen antibodies (CAIA model) [31]. MiR-155 is clearly involved in DC-driven T-cell immunity [34], that can explain the different outcome in these two arthritis models. Indeed, a lack of T-cell driven autoimmunity in miR-155<sup>-/-</sup> mice prevents from arthritis development in CIA model but not in CAIA model, which are innate and adaptive immune-dependent and innate-dependent models, respectively. The expanded data on miR-155 in the immune activation and its role in rheumatoid arthritis were recently reviewed [35]. However, the role of miR-155 in osteoclastogenesis remains controversial and seems to depend on the local stimuli. MiR-155 inhibits the early phase of osteoclastogenesis upon interferon-beta stimulation [36], although it enhances autophagy in OCs upon lipopolysaccharide (LPS) stimulation [37]. Finally, miR-155 appears to be a strong marker of the DC origin of i-OC subset in our model.

Another i-OC-associated miRNA revealed by our study is miR-146b. This miRNA is dramatically increased during monocyte differentiation into immature and mature DCs [32], but its role in this biological process is not defined yet. MiR-146b is part of the miR-146 family but it was globally less studied than the first discovered miR-146a. Although miR-146a and miR-146b sequences are located in distinct chromosomal regions (respectively on ch.11 and ch.19 in *Mus musculus*), they share the same critical seed sequence in their mature form, and they have more than 99% of predicted targets in common according to miRDB database (www.mirdb.org). It has been found that miR-146 family plays a pivotal role in the fine regulation of Toll-like receptor and cytokine signaling through a negative feedback that controls monocyte activation and inflammatory responses [38]. Similar overexpression of miR-146 family members is found in RA patients [39,40], suggesting that miR-146a and miR-146b may have the same biological effects, particularly in inflammatory disorders. MiR-146a (and probably miR-146b) acts as an inhibitor of osteoclastogenesis by inhibiting TRAF6 and RelB, both key elements in the RANKL and NF-kB signaling cascades. Importantly, delivery of therapeutic miR-146a to Ly6C<sup>high</sup> OCs precursors in arthritis reduces joint destruction [25,39]. The miR-146b overexpression in i-OCs suggests that potential regulatory functions are solicited in these cells.

Contrary to miR-155 and miR-146b, the other two i-OC-associated miRNAs (miR-342-3p and miR-151-3p) have not been described so far involved in OC biology. MiR-151-3p is pro-oncogenic [43], acting in synergy with its host gene *Fak* (focal adhesion kinase) to promote cancer cell motility, cell cycle progression and cell survival [44]. In our study, although detectable by RT-qPCR, miR-151-3p is poorly expressed in OC subsets, which questions its biological relevance to control myeloid cells' functions [41].

MiR-342-3p is classically reported as a tumor suppressor in various types of cancers, inhibiting cell proliferation, migration and invasion of metastatic cells [42–45]. One study suggested that miR-342-3p expression depends on the IL-4/STAT6 axis in macrophages [46]. Since the generation of immature DC as i-OCs precursors requires IL-4 and GM-CSF in our model, the upregulation of miR-342-3p in i-OCs

might only reflect culture conditions, signing for their DC origins rather than OCs biological functions. This however remains to be clarified.

The t-OC-associated miRNAs found in our study have been associated with bone homeostasis, but are poorly described in tolerogenic processes mediated by the monocyte/macrophage lineage. The scarce literature for miR-674 could be explained by the absence of homologous human miRNA. This non-conserved miRNA is thus not found in our IPA networking. MiR-185, miR-26b and miR-29a are widely cited as tumor suppressive factors in various types of human cancers.

Notably, miR-185 suppresses cancer progression by negatively regulating the oncogenic Wnt/ $\beta$ catenin signaling in colorectal cancer [47,48]. In the field of bone homeostasis, miR-185 down-regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin axis and thus negatively regulates osteogenesis [49]. Although osteoblasts derived from miR-185<sup>-/-</sup> mice exhibit enhanced osteogenesis, bone mass and growth were not affected in these mice, suggesting that increased bone formation might compensate increased bone loss [50]. However, no experiment was performed to validate increased osteoclastogenesis and/or resorbing activity of OCs generated from miR-185<sup>-/-</sup> mice.

Contrary to miR-185, miR-26b and miR-29a promote osteogenesis by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway through direct targeting of *Gsk3* $\beta$  and *Dkk-1*, respectively [51–53]. Besides, miR-29a promotes OC commitment of murine bone marrow-derived macrophages and is overall pro-osteoclastogenic [54], suggesting that miR-29a might be important to maintain bone turnover and homeostasis. Moreover, miR-29a protects against glucocorticoid-induced bone loss and fragility [55,56] by regulating peripheral glucocorticoid receptor signaling [57]. In bone diseases, a protective role of miR-26 family and miR-29a is found in osteoarthritis (OA), through the control of chondrocyte's proliferation and apoptosis [58,59]. Moreover, the enforced expression of miR-26a/b by intra-articular injection in OA rats significantly attenuates OA progression [58], and miR-29a transgenic mice display minor destructions in collagenase-mediated OA [60]. The *in vitro* overexpression of miR-26b or miR-29a in RA-associated fibroblast-like synoviocytes inhibits cell proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion, thus suggesting that miR-26b and miR-29a may play an anti-inflammatory role in RA [61,62].

Our RNAseq analysis showed that i-OC and t-OC subsets have specific transcriptional signatures, suggesting that these two cell subsets have distinct biological functions. The unsupervised analysis of the expression of OC-associated genes showed no significant differences between both subsets, indicating that i-OCs and t-OCs share the same osteoclastogenic functions, which is in agreement with their shared capacity of resorbing a bone-like mineralized matrix in vitro [5]. However, we picked up to 9 differentially expressed genes included in both the "OC differentiation" and the "Immune system" pathways that are increased in i-OCs compared to t-OCs. Among them, Ncf1 (Neutrophil Cytosolic Factor 1) and Trem2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2, alias DAP12) are proosteoclastogenic [63,64], although Lilrb4 (Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor B4 alias CD85K), and Ifngr1 (Interferon Gamma Receptor 1) negatively affect OC differentiation and formation [65,66]. Altogether, the opposite roles of these genes might not induce significant changes in the OC biology of i-OCs. More interestingly, these genes are also involved in immune response and functions that can be linked to the DC origin of i-OCs, particularly Trem2 that is closely related to DCs homeostasis [67]. NCF1 is a subunit of NADPH oxidase 2 involved in the production of reactive oxygen species important for both OCs activation and antigen cross-presentation in DCs. A recent study showed that Ncf1 drives autoimmunity by facilitating autoantigen presentation to CD8 T-cells [68], suggesting a potential involvement in the immune functions of i-OCs.

Finally, mRNA-miRNA networks were constructed using the i-OCs- and t-OCs-associated miRNAs. In the i-OCs network, we found *Tal1* and *Satb1* as two under-expressed genes in central position. The transcription factor *Tal1* is a master regulator of hematopoiesis, including proliferation of monocyte progenitors [69], but not in DC lineage. Thus, *Tal1* is rather part of the monocytic origin of t-OCs. *Satb1* is required for normal differentiation of conventional DCs, but drives DC to an

immunosuppressive phenotype when overexpressed [70]. Besides, miR-155 targets *Satb1* [71], which might explain the miR-155-mediated downregulation of *Satb1* observed in i-OCs despite their DC origin. We also observed overexpressed genes in the i-OCs network, such as the *Cxcl1*, *Cxcl2* and *Cxcl3* chemokines that are involved in chemotaxis of myeloid cells and cellular infiltration, which makes sense with the enrichment pathway analysis. It looks like the i-OCs are more prone to attract immune cells than t-OCs under inflammatory condition.

The t-OCs network showed only under-expressed genes connected with miR-185, miR-26b and miR-29a. Here we found an interesting connection between miR-29a, miR-185 and *Ccnd2*, *Klf4*, *Nrp1*, *Btg2*. *Btg2* is a negative regulator of cell cycle that promotes apoptosis in monocytes downstream of inflammatory C-Reactive Protein signaling [72] and might be involved in OCs differentiation [73]. *Btg2* is a predicted target for miR-29a and miR-185. However, its differential action in OC subsets remains unknown. The transcription factor *Klf4* is essential for the monocyte differentiation [74], particularly for inflammatory monocytes [75], and is induced during monocyte-derived DC differentiation under GM-CSF and IL-4 stimulation [76]. Moreover, *Klf4* induces the expression of Cyclin D2 (*Ccnd2*) [77], an important positive regulator of cell cycle progression. *Klf4* and *Ccnd2* are validated targets of the miR-29 family [78,79], suggesting that miR-29a represses the inflammatory phenotype in t-OCs. Neuropilin 1 (*Nrp1*) is involved in the formation of immunologic synapse between DCs and T cells by promoting cell–cell adhesion [80]. Thus, being more expressed in i-OCs might kept their important DC-related immune properties for the dialog with T cells.

In addition to the targets of miRNAs that are already validated in the literature, such as miR-29 and *Klf4*, we predicted the putative targeting of differentially expressed genes between OC subsets by the 8 discriminant miRNAs. Overall, miR-185 potentially targets nearly half of the over-expressed transcripts in i-OCs. The inverse correlation between the expression level of miR-185, which is high in t-OCs, and its putative targets suggests that miR-185 might play an important role in the tolerogenic functions of t-OCs through the negative regulation of biological processes involved in immune and inflammatory responses. Our data might help to select some interesting targets for future studies.

#### 5. Conclusion

The miRNA profiling of the i-OC subset is clearly imprinted by their DC origin. Although our model is based on the *ex vivo* generation of OC subsets, the conservation of their precursor signature is not only of interest to better characterize OC subsets but also to predict their immunological functions in pathological conditions, especially those associated with arthritis. Future studies are needed to confirm the relevance of the miRNA expression profile in OCs generated in inflammatory diseases. Functional studies may also help to unravel the biological role of deregulated miRNAs in OC activities to distinguish the "good guy" with tolerogenic, or at least an anti-inflammatory effect, as it might be the case with miR-146a/b, from the pro-inflammatory "bad guy" as miR-155. A future application would be the development of therapeutic strategies based on the modulation of miRNAs of interest to reverse the aggressive phenotype of i-OCs into more tolerogenic cells. This might help to better control the pathological bone erosion while maintaining bone homeostasis in erosive diseases.

**Author Contributions:** C.L. performed the experiments, analyzed data, and contributed to the writing. V.E performed the in vivo experiments and contributed to the writing. C.B-W. and M-B.M. participated in the OC sample collection. C.H., H. M-M. and H-J.G. performed small RNA-seq and analysis. I.D.R. and F.A. supervised the work, designed the study, analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. All authors were involved in reading and editing the manuscript, and approved the final version.

**Funding:** This research was funded by INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier, the ANR grant ORIOS (ANR-16-CE14-0030-02).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

#### References

1. Komano, Y.; Nanki, T.; Hayashida, K.; Taniguchi, K.; Miyasaka, N. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Research & Therapy* **2006**, *8*, R152, doi:10.1186/ar2046.

2. Li, H.; Hong, S.; Qian, J.; Zheng, Y.; Yang, J.; Yi, Q. Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells. *Blood* **2010**, *116*, 210–217, doi:10.1182/blood-2009-11-255026.

3. Kiesel, J.R.; Buchwald, Z.S.; Aurora, R. Cross-Presentation by Osteoclasts Induces FoxP3 in CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology* **2009**, *182*, 5477–5487, doi:10.4049/jimmunol.0803897.

4. Grassi, F.; Manferdini, C.; Cattini, L.; Piacentini, A.; Gabusi, E.; Facchini, A.; Lisignoli, G. T cell suppression by osteoclasts in vitro. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 982–990, doi:10.1002/jcp.22411.

5. Ibáñez, L.; Abou-Ezzi, G.; Ciucci, T.; Amiot, V.; Belaïd, N.; Obino, D.; Mansour, A.; Rouleau, M.; Wakkach, A.; Blin-Wakkach, C. Inflammatory Osteoclasts Prime TNF*α*-Producing CD4+ T Cells and Express CX3 CR1. *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 1899–1908, doi:10.1002/jbmr.2868.

6. Hasegawa, T.; Kikuta, J.; Sudo, T.; Matsuura, Y.; Matsui, T.; Simmons, S.; Ebina, K.; Hirao, M.; Okuzaki, D.; Yoshida, Y.; et al. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. *Nature Immunology* **2019**, *20*, 1631–1643, doi:10.1038/s41590-019-0526-7.

7. Rivollier, A.; Mazzorana, M.; Tebib, J.; Piperno, M.; Aitsiselmi, T.; Rabourdin-Combe, C.; Jurdic, P.; Servet-Delprat, C. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* **2004**, *104*, 4029–4037, doi:10.1182/blood-2004-01-0041.

8. Wakkach, A.; Mansour, A.; Dacquin, R.; Coste, E.; Jurdic, P.; Carle, G.F.; Blin-Wakkach, C. Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* **2008**, *112*, 5074–5083, doi:10.1182/blood-2008-01-132787.

9. Gallois, A.; Lachuer, J.; Yvert, G.; Wierinckx, A.; Brunet, F.; Rabourdin-Combe, C.; Delprat, C.; Jurdic, P.; Mazzorana, M. Genome-wide expression analyses establish dendritic cells as a new osteoclast precursor able to generate bone-resorbing cells more efficiently than monocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* **2010**, *25*, 661–672, doi:10.1359/jbmr.090829.

10. Ruth, J.H.; Volin, M.V.; Haines, G.K.; Woodruff, D.C.; Katschke, K.J.; Woods, J.M.; Park, C.C.; Morel, J.C.; Koch, A.E. Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **2001**, *44*, 1568–1581, doi:10.1002/1529-0131(200107)44:7<1568::AID-ART280>3.0.CO;2-1.

11. Blaschke, S.; Koziolek, M.; Schwarz, A.; Benöhr, P.; Middel, P.; Schwarz, G.; Hummel, K.-M.; Müller, G.A. Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **2003**, *30*, 1918–1927.

12. Rana, A.K.; Li, Y.; Dang, Q.; Yang, F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *65*, 348–359, doi:10.1016/j.intimp.2018.10.016.

13. Geissmann, F.; Jung, S.; Littman, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **2003**, *19*, 71–82, doi:10.1016/s1074-7613(03)00174-2.

14. Ancuta, P.; Rao, R.; Moses, A.; Mehle, A.; Shaw, S.K.; Luscinskas, F.W.; Gabuzda, D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 1701–1707, doi:10.1084/jem.20022156.

15. Yano, R.; Yamamura, M.; Sunahori, K.; Takasugi, K.; Yamana, J.; Kawashima, M.; Makino, H. Recruitment of CD16+ Monocytes into Synovial Tissues Is Mediated by Fractalkine and CX3CR1 in Rheumatoid Arthritis Patients. *Acta Med. Okayama* **2007**, *61*, 10.

16. Novak, S.; Roeder, E.; Kalinowski, J.; Jastrzebski, S.; Aguila, H.L.; Lee, S.-K.; Kalajzic, I.; Lorenzo, J.A. Osteoclasts Derive Predominantly from Bone Marrow–Resident CX 3 CR1 <sup>+</sup> Precursor Cells in Homeostasis, whereas Circulating CX 3 CR1 <sup>+</sup> Cells Contribute to Osteoclast Development during Fracture Repair. *The Journal of Immunology* **2020**, ji1900665, doi:10.4049/jimmunol.1900665.

17. Lozano, C.; Duroux-Richard, I.; Firat, H.; Schordan, E.; Apparailly, F. MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation? *Front Immunol* **2019**, *10*, 375, doi:10.3389/fimmu.2019.00375.

18. Momen-Heravi, F.; Bala, S. miRNA regulation of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2018, doi:10.1002/JLB.3MIR1117-459R.

19. Liu, C.; Yang, H.; Shi, W.; Wang, T.; Ruan, Q. MicroRNA-mediated regulation of T helper type 17/regulatory T-cell balance in autoimmune disease. *Immunology* **2018**, *155*, 427–434, doi:10.1111/imm.12994.

20. Rodríguez-Galán, A.; Fernández-Messina, L.; Sánchez-Madrid, F. Control of Immunoregulatory Molecules by miRNAs in T Cell Activation. *Front Immunol* **2018**, *9*, 2148, doi:10.3389/fimmu.2018.02148.

21. Zhang, L.; Wu, H.; Zhao, M.; Chang, C.; Lu, Q. Clinical significance of miRNAs in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2020**, 102438, doi:10.1016/j.jaut.2020.102438.

22. Alivernini, S.; Gremese, E.; McSharry, C.; Tolusso, B.; Ferraccioli, G.; McInnes, I.B.; Kurowska-Stolarska, M. MicroRNA-155-at the Critical Interface of Innate and Adaptive Immunity in Arthritis. *Front Immunol* **2017**, *8*, 1932, doi:10.3389/fimmu.2017.01932.

23. Tahamtan, A.; Teymoori-Rad, M.; Nakstad, B.; Salimi, V. Anti-Inflammatory MicroRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment. *Front Immunol* **2018**, *9*, 1377, doi:10.3389/fimmu.2018.01377.

24. Bae, S.-C.; Lee, Y.H. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis* **2018**, *21*, 1335–1342, doi:10.1111/1756-185X.13338.

25. Ammari, M.; Presumey, J.; Ponsolles, C.; Roussignol, G.; Roubert, C.; Escriou, V.; Toupet, K.; Mausset-Bonnefont, A.-L.; Cren, M.; Robin, M.; et al. Delivery of miR-146a to Ly6C <sup>high</sup> Monocytes Inhibits Pathogenic Bone Erosion in Inflammatory Arthritis. *Theranostics* **2018**, *8*, 5972–5985, doi:10.7150/thno.29313.

26. Madel, M.-B.; Ibáñez, L.; Rouleau, M.; Wakkach, A.; Blin-Wakkach, C. A Novel Reliable and Efficient Procedure for Purification of Mature Osteoclasts Allowing Functional Assays in Mouse Cells. *Front Immunol* **2018**, *9*, 2567, doi:10.3389/fimmu.2018.02567.

27. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635.

28. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 166–169, doi:10.1093/bioinformatics/btu638.

29. Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M.Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 731–740, doi:10.1038/nmeth.3901.

30. Dweep, H.; Gretz, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 697, doi:10.1038/nmeth.3485.

31. Kurowska-Stolarska, M.; Alivernini, S.; Ballantine, L.E.; Asquith, D.L.; Millar, N.L.; Gilchrist, D.S.; Reilly, J.; Ierna, M.; Fraser, A.R.; Stolarski, B.; et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 11193–11198, doi:10.1073/pnas.1019536108.

32. Lu, C.; Huang, X.; Zhang, X.; Roensch, K.; Cao, Q.; Nakayama, K.I.; Blazar, B.R.; Zeng, Y.; Zhou, X. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood* **2011**, *117*, 4293–4303, doi:10.1182/blood-2010-12-322503.

33. Lind, E.F.; Millar, D.G.; Dissanayake, D.; Savage, J.C.; Grimshaw, N.K.; Kerr, W.G.; Ohashi, P.S. miR-155 Upregulation in Dendritic Cells Is Sufficient To Break Tolerance In Vivo by Negatively Regulating SHIP1. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 4632–4640, doi:10.4049/jimmunol.1302941.

34. O'Connell, R.M.; Kahn, D.; Gibson, W.S.J.; Round, J.L.; Scholz, R.L.; Chaudhuri, A.A.; Kahn, M.E.; Rao, D.S.; Baltimore, D. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* **2010**, *33*, 607–619, doi:10.1016/j.immuni.2010.09.009.

35. Su, L.-C.; Huang, A.-F.; Jia, H.; Liu, Y.; Xu, W.-D. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* **2017**, *20*, 1631–1637, doi:10.1111/1756-185X.13202.

36. Zhang, J.; Zhao, H.; Chen, J.; Xia, B.; Jin, Y.; Wei, W.; Shen, J.; Huang, Y. Interferon-β-induced miR-155 inhibits osteoclast differentiation by targeting SOCS1 and MITF. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3255–3262, doi:10.1016/j.febslet.2012.06.047.

37. Sul, O.-J.; Sung, Y.-B.; Rajasekaran, M.; Ke, K.; Yu, R.; Back, S.-H.; Choi, H.-S. MicroRNA-155 induces autophagy in osteoclasts by targeting transforming growth factor β-activated kinase 1-binding protein 2 upon lipopolysaccharide stimulation. *Bone* **2018**, *116*, 279–289, doi:10.1016/j.bone.2018.08.014.

38. Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Chang, K.-J.; Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 12481–12486, doi:10.1073/pnas.0605298103.

39. Nakasa, T.; Miyaki, S.; Okubo, A.; Hashimoto, M.; Nishida, K.; Ochi, M.; Asahara, H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 1284–1292, doi:10.1002/art.23429.

40. Rezaeepoor, M.; Pourjafar, M.; Tahamoli-Roudsari, A.; Basiri, Z.; Hajilooi, M.; Solgi, G. Altered expression of microRNAs may predict therapeutic response in rheumatoid arthritis patients. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *83*, 106404, doi:10.1016/j.intimp.2020.106404.

41. Seitz, H. Redefining microRNA targets. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 870–873, doi:10.1016/j.cub.2009.03.059.

42. Li, X.-R.; Chu, H.-J.; Lv, T.; Wang, L.; Kong, S.-F.; Dai, S.-Z. miR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 3298–3307, doi:10.1016/j.febslet.2014.07.020.

43. Tai, M.C.; Kajino, T.; Nakatochi, M.; Arima, C.; Shimada, Y.; Suzuki, M.; Miyoshi, H.; Yatabe, Y.; Yanagisawa, K.; Takahashi, T. miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 1464–1473, doi:10.1093/carcin/bgv152.

44. Cui, Z.; Zhao, Y. microRNA-342-3p targets FOXQ1 to suppress the aggressive phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 104, doi:10.1186/s12885-018-5225-5.

45. Song, X.; Jin, Y.; Yan, M.; Zhang, Y.; Chen, B. MicroRNA-342-3p functions as a tumor suppressor by targeting LIM and SH3 protein 1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* **2019**, *17*, 688–696, doi:10.3892/ol.2018.9637.

46. Czimmerer, Z.; Varga, T.; Kiss, M.; Vázquez, C.O.; Doan-Xuan, Q.M.; Rückerl, D.; Tattikota, S.G.; Yan, X.; Nagy, Z.S.; Daniel, B.; et al. The IL-4/STAT6 signaling axis establishes a conserved microRNA signature in human and mouse macrophages regulating cell survival via miR-342-3p. *Genome Med* **2016**, *8*, 63, doi:10.1186/s13073-016-0315-y.

47. Dong-Xu, W.; Jia, L.; Su-Juan, Z. MicroRNA-185 is a novel tumor suppressor by negatively modulating the Wnt/β-catenin pathway in human colorectal cancer. *Indian J Cancer* **2015**, *52 Suppl* 3, E182-185, doi:10.4103/0019-509X.186576.

48. Zhang, W.; Sun, Z.; Su, L.; Wang, F.; Jiang, Y.; Yu, D.; Zhang, F.; Sun, Z.; Liang, W. miRNA-185 serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in colon cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *825*, 75–84, doi:10.1016/j.ejphar.2018.02.019.

49. Yao, C.-J.; Lv, Y.; Zhang, C.-J.; Jin, J.-X.; Xu, L.-H.; Jiang, J.; Geng, B.; Li, H.; Xia, Y.-Y.; Wu, M. MicroRNA-185 inhibits the growth and proliferation of osteoblasts in fracture healing by targeting PTH gene through downregulating Wnt/β -catenin axis: In an animal experiment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *501*, 55–63, doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.138.

50. Cui, Q.; Xing, J.; Yu, M.; Wang, Y.; Xu, J.; Gu, Y.; Nan, X.; Ma, W.; Liu, H.; Zhao, H. Mmu-miR-185 depletion promotes osteogenic differentiation and suppresses bone loss in osteoporosis through the Bgn-mediated BMP/Smad pathway. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 172, doi:10.1038/s41419-019-1428-1.

51. Kapinas, K.; Kessler, C.; Ricks, T.; Gronowicz, G.; Delany, A.M. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 25221–25231, doi:10.1074/jbc.M110.116137.

52. Hu, H.; Zhao, C.; Zhang, P.; Liu, Y.; Jiang, Y.; Wu, E.; Xue, H.; Liu, C.; Li, Z. miR-26b modulates OA induced BMSC osteogenesis through regulating GSK3β/β-catenin pathway. *Exp. Mol. Pathol.* **2019**, *107*, 158–164, doi:10.1016/j.yexmp.2019.02.003.

53. Zhang, F.; Cao, K.; Du, G.; Zhang, Q.; Yin, Z. miR-29a promotes osteoblast proliferation by downregulating DKK-1 expression and activating Wnt/β-catenin signaling pathway. *Adv Clin Exp Med* **2019**, *28*, 1293–1300, doi:10.17219/acem/104533.

54. Franceschetti, T.; Kessler, C.B.; Lee, S.-K.; Delany, A.M. miR-29 promotes murine osteoclastogenesis by regulating osteoclast commitment and migration. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 33347–33360, doi:10.1074/jbc.M113.484568.

55. Wang, F.-S.; Chuang, P.-C.; Chung, P.-C.; Lin, C.-L.; Chen, M.-W.; Ke, H.-J.; Chang, Y.-H.; Chen, Y.-S.; Wu, S.-L.; Ko, J.-Y. MicroRNA-29a protects against glucocorticoid-induced bone loss and fragility in rats by orchestrating bone acquisition and resorption. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 1530–1540, doi:10.1002/art.37948.

56. Ko, J.-Y.; Chuang, P.-C.; Chen, M.-W.; Ke, H.-C.; Wu, S.-L.; Chang, Y.-H.; Chen, Y.-S.; Wang, F.-S. MicroRNA-29a ameliorates glucocorticoid-induced suppression of osteoblast differentiation by regulating  $\beta$ -catenin acetylation. *Bone* **2013**, *57*, 468–475, doi:10.1016/j.bone.2013.09.019.

57. Glantschnig, C.; Koenen, M.; Gil-Lozano, M.; Karbiener, M.; Pickrahn, I.; Williams-Dautovich, J.; Patel, R.; Cummins, C.L.; Giroud, M.; Hartleben, G.; et al. A miR-29a-driven negative feedback loop regulates peripheral glucocorticoid receptor signaling. *FASEB J.* **2019**, *33*, 5924–5941, doi:10.1096/fj.201801385RR.

58. Hu, J.; Wang, Z.; Pan, Y.; Ma, J.; Miao, X.; Qi, X.; Zhou, H.; Jia, L. MiR-26a and miR-26b mediate osteoarthritis progression by targeting FUT4 via NF-κB signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *94*, 79–88, doi:10.1016/j.biocel.2017.12.003.

59. Miao, G.; Zang, X.; Hou, H.; Sun, H.; Wang, L.; Zhang, T.; Tan, Y.; Liu, W.; Ye, P.; Gao, L.; et al. Bax Targeted by miR-29a Regulates Chondrocyte Apoptosis in Osteoarthritis. *Biomed Res Int* **2019**, 2019, 1434538, doi:10.1155/2019/1434538.

60. Ko, J.-Y.; Lee, M.S.; Lian, W.-S.; Weng, W.-T.; Sun, Y.-C.; Chen, Y.-S.; Wang, F.-S. MicroRNA-29a Counteracts Synovitis in Knee Osteoarthritis Pathogenesis by Targeting VEGF. *Sci Rep* **2017**, *7*, 3584, doi:10.1038/s41598-017-03616-w.

61. Sun, J.; Yan, P.; Chen, Y.; Chen, Y.; Yang, J.; Xu, G.; Mao, H.; Qiu, Y. MicroRNA-26b inhibits cell proliferation and cytokine secretion in human RASF cells via the Wnt/GSK-3β/β-catenin pathway. *Diagn Pathol* **2015**, *10*, 72, doi:10.1186/s13000-015-0309-x.

62. Liu, J.; Fei, D.; Xing, J.; Du, J. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 173–181, doi:10.1016/j.biopha.2017.09.120.

63. Stubelius, A.; Andersson, A.; Holmdahl, R.; Ohlsson, C.; Islander, U.; Carlsten, H. Ncf1 affects osteoclast formation but is not critical for postmenopausal bone loss. *BMC Musculoskelet Disord* **2016**, *17*, 464, doi:10.1186/s12891-016-1315-1.

64. Paloneva, J.; Mandelin, J.; Kiialainen, A.; Bohling, T.; Prudlo, J.; Hakola, P.; Haltia, M.; Konttinen, Y.T.; Peltonen, L. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 669–675, doi:10.1084/jem.20030027.

65. Mori, Y.; Tsuji, S.; Inui, M.; Sakamoto, Y.; Endo, S.; Ito, Y.; Fujimura, S.; Koga, T.; Nakamura, A.; Takayanagi, H.; et al. Inhibitory immunoglobulin-like receptors LILRB and PIR-B negatively regulate osteoclast development. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4742–4751, doi:10.4049/jimmunol.181.7.4742.

66. Takayanagi, H.; Kim, S.; Taniguchi, T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res.* **2002**, *4 Suppl 3*, S227-232, doi:10.1186/ar581.

67. Bouchon, A.; Hernández-Munain, C.; Cella, M.; Colonna, M. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 1111–1122, doi:10.1084/jem.194.8.1111.

68. Liu, C.; Whitener, R.L.; Lin, A.; Xu, Y.; Chen, J.; Savinov, A.; Leiding, J.W.; Wallet, M.A.; Mathews, C.E. Neutrophil Cytosolic Factor 1 in Dendritic Cells Promotes Autoreactive CD8+ T Cell Activation via Cross-Presentation in Type 1 Diabetes. *Front Immunol* **2019**, *10*, 952, doi:10.3389/fimmu.2019.00952.

69. Dey, S.; Curtis, D.J.; Jane, S.M.; Brandt, S.J. The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 2181–2192, doi:10.1128/MCB.01441-09.

70. Tesone, A.J.; Rutkowski, M.R.; Brencicova, E.; Svoronos, N.; Perales-Puchalt, A.; Stephen, T.L.; Allegrezza, M.J.; Payne, K.K.; Nguyen, J.M.; Wickramasinghe, J.; et al. Satb1 Overexpression Drives Tumor-Promoting Activities in Cancer-Associated Dendritic Cells. *Cell Rep* **2016**, *14*, 1774–1786, doi:10.1016/j.celrep.2016.01.056.

71. McInnes, N.; Sadlon, T.J.; Brown, C.Y.; Pederson, S.; Beyer, M.; Schultze, J.L.; McColl, S.; Goodall, G.J.; Barry, S.C. FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells. *Oncogene* **2012**, *31*, 1045–1054, doi:10.1038/onc.2011.293.

72. Kim, Y.; Ryu, J.; Ryu, M.S.; Lim, S.; Han, K.O.; Lim, I.K.; Han, K.H. C-reactive protein induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in monocytes through the upregulation of B-cell translocation gene 2 expression. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 625–631, doi:10.1016/j.febslet.2014.01.008.

73. Lee, S.W.; Kwak, H.B.; Lee, H.C.; Lee, S.K.; Kim, H.-H.; Lee, Z.H. The anti-proliferative gene TIS21 is involved in osteoclast differentiation. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *35*, 609–614, doi:10.5483/bmbrep.2002.35.6.609.

74. Feinberg, M.W.; Wara, A.K.; Cao, Z.; Lebedeva, M.A.; Rosenbauer, F.; Iwasaki, H.; Hirai, H.; Katz, J.P.; Haspel, R.L.; Gray, S.; et al. The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J.* **2007**, *26*, 4138–4148, doi:10.1038/sj.emboj.7601824.

75. Alder, J.K.; Georgantas, R.W.; Hildreth, R.L.; Kaplan, I.M.; Morisot, S.; Yu, X.; McDevitt, M.; Civin, C.I. Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 5645–5652, doi:10.4049/jimmunol.180.8.5645.

76. Jurkin, J.; Krump, C.; Köffel, R.; Fieber, C.; Schuster, C.; Brunner, P.M.; Borek, I.; Eisenwort, G.; Lim, C.; Mages, J.; et al. Human skin dendritic cell fate is differentially regulated by the monocyte identity factor Kruppellike factor 4 during steady state and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 1873-1884.e10, doi:10.1016/j.jaci.2016.09.018.

77. Klaewsongkram, J.; Yang, Y.; Golech, S.; Katz, J.; Kaestner, K.H.; Weng, N.-P. Krüppel-like factor 4 regulates B cell number and activation-induced B cell proliferation. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4679–4684, doi:10.4049/jimmunol.179.7.4679.

78. Cittelly, D.M.; Finlay-Schultz, J.; Howe, E.N.; Spoelstra, N.S.; Axlund, S.D.; Hendricks, P.; Jacobsen, B.M.; Sartorius, C.A.; Richer, J.K. Progestin suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4. *Oncogene* **2013**, *32*, 2555–2564, doi:10.1038/onc.2012.275.

79. Gong, J.; Li, J.; Wang, Y.; Liu, C.; Jia, H.; Jiang, C.; Wang, Y.; Luo, M.; Zhao, H.; Dong, L.; et al. Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 497–506, doi:10.1093/carcin/bgt337.

80. Tordjman, R.; Lepelletier, Y.; Lemarchandel, V.; Cambot, M.; Gaulard, P.; Hermine, O.; Roméo, P.-H. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 477–482, doi:10.1038/ni789.



**Figure S1. Gene expression of** *Nfatc1, Acp5, Mmp9 and Cstk* **in OC subsets.** The t-OC and i-OC subsets were generated from bone marrow of healthy mice used for the validation of miRNAs (n=10) (**A**), and in the STA experiment (n=5/group) (**B**). Gene expression was normalized with *Gapdh*. HC: healthy controls; STA: serum-transfer arthritis. Mean with SD are shown. Normality tests were passed and unpaired t-test (A) or 2-way ANOVA (B) were performed. P-value \* < 0.05; \*\* < 0.01; \*\*\*\* < 0.001.



**Figure S2.** Comparative expression of miRNAs in OC subsets in arthritic condition. The t-OC and i-OC subsets were generated from bone marrow of arthritic mice (n=5). (**A**, **B**) The relative expression of miRNAs associated with i-OCs (**A**) or with t-OCs (**B**) was quantified by RT-qPCR and normalized with sno202. Medians are shown. Mann-Whitney test: p-value \*\* < 0.01; ns: no significant.



**Figure S3. Heatmap of unsupervised hierarchical of genes associated with the "Osteoclast differentiation" pathway (Pathcards) from RNAseq analysis of i-OCs** *vs* **t-OCs**. Orange and blue squares represent i-OCs and t-OCs, respectively.



**Figure S4: Top of IPA networks in OC subsets. (A, B)** The networks "Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Immune Cell Trafficking" **(A)** and "Lymphoid Tissue Structure and Development, Tissue Morphology, Hematological System Development and Function" **(B)** identified from the differentially expressed genes between OC subsets were generated by IPA. Green and red shapes represent downand up-regulated genes in i-OCs, respectively, and the white shapes are other genes of the network. Solid lines are direct interactions and dashed lines are indirect interactions.

#### Supplementary Table captions:

**Table S1: AUC of ROC curves for the 8 validated miRNAs.** AUC and 95% confidence intervals (95%CI) are given for each validated miRNA differentially expressed between t-OCs and i-OCs.

**Table S2: differentially expressed genes between t-OCs and i-OCs.** This table lists the 867 significantly differentially expressed genes (p< 0.05, FDR-corrected, and absolute fold change >2) between the two OC subsets. Detailed enrichment value from RNA-Seq data in each biological sample are shown.

**Table S3: Predicted activation state of biological functions associated with the differentially expressed genes between OC subsets.** The calculation of the predicted activation state of disease-associated pathways or biological functions is given by the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool. The differentially expressed genes that enriched each annoted pathway are listed.

**Table S4: putative targeting of the differentially expressed genes by the 8 validated miRNAs.** This table lists the 215 differentially expressed genes putatively targeted by one or more discriminant miRNAs according to the in silico prediction analysis using 4 algorithms (TargetScan, Miranda, RNA22 and miRWalk). The crosses indicate a putative target predicted by 3 or 4 algorithms (score 3-4). i-OCs: inflammatory osteoclasts; t-OCs: tolerogenic osteoclasts.

**Table S5: Enrichment analysis of the 215 putative target genes for the 8 "miRNA OC subsets".** This table lists the biological pathways associated with the "immune cell trafficking" development and function found using IPA core analysis tool, for the 215 genes putatively targeted by the 8 validated miRNAs

**Table S6: Enrichment analysis of biological pathways of differentially expressed genes according to i-OC or t-OC subsets.** The 867 differentially expressed genes were integrated according to their relative expression level in each OC subset. The enrichment analysis was performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool.

### Axe 2. Article 3

# "MiR-342-3p regulates osteoclastogenesis in arthritis-associated osteoclast precursors"

#### Résultats préliminaires

Les résultats obtenus dans l'axe 1 de mon projet de thèse ont permis d'établir une signature de miARNs sur-exprimés dans les ostéoclastes inflammatoires (i-OCs). En particulier, miR-155, miR-146b et miR-342-3p sont étroitement associés aux i-OCs obtenus dans un modèle de souris saine à partir de cellules dendritiques immatures. Ces 3 miARNs sont également fortement exprimés dans les OCs obtenus à partir de la moelle osseuse totale de souris arthritiques, dans le modèle de l'arthrite auto-immune induit par transfert passif de sérum de souris K/BxN (K/BxN serum-transfer arthritis, STA). Le rôle pro-inflammatoire de miR-155 et le rôle anti-inflammatoire de miR-146a/b sont bien décrits dans la littérature. De plus, ces 2 micro-ARNs sont très étudiés dans les maladies inflammatoires telle que la polyarthrite rhumatoïde (PR) où leur surexpression sont classiquement retrouvées. A l'inverse, miR-342-3p n'a encore jamais été décrit dans la PR et son rôle dans la réponse inflammatoire n'est pas connu à ce jour. Enfin, miR-342-3p n'a encore jamais fait l'objet d'une étude dans l'ostéoclastogenèse.

La découverte de miR-342-3p en tant que marqueur moléculaire associé aux i-OCs dans le modèle murin d'arthrite auto-immune STA m'a amenée à conforter ces résultats dans un autre modèle murin d'arthrite auto-immune, l'arthrite induite par le collagène (collagen-induced arthritis, CIA). Le modèle de CIA est considéré comme le « gold-standard » car il fait appel à une auto-immunisation active des souris qui reproduit la physiopathologie de la PR avec la susceptibilité génétique et l'implication de l'immunité innée et adaptative. Les souris utilisées dans ce modèle sont effectivement de fond génétique DBA/1, différent des souris du modèle de STA (fond C57BI/6). Mes résultats montrent que miR-342-3p est sur-exprimé dans les i-OCs dans ces deux modèles (Figure 1A et 1B). Par ailleurs, miR-342-3p reste sur-exprimé dans les OCs dérivés de la moelle osseuse totale de souris arthritiques (STA) (Figure 1C). L'ensemble de ces premiers résultats suggère donc que miR-342-3p est un marqueur sélectif robuste des i-OCs, en particulier dans le contexte de l'arthrite auto-immune.



**Figure 1. Sur-expression de miR-342-3p dans les ostéoclastes inflammatoires dans le contexte de l'arthrite auto-immune**. L'expression de miR-342-3p a été mesuré par RT-qPCR dans les ostéoclastes tolérogènes (t-OCs) et dans les ostéoclastes inflammatoires (i-OCs) générés *ex vivo* à partir de précurseurs myéloïdes de souris arthritiques selon le modèle CIA (A) et selon le modèle STA (B et C). Brièvement, les t-OCs ont été générés à partir de monocytes médullaires CD11b+ et les i-OCs ont été dérivés à partir de cellules dendritiques immatures CD11c+. Les ostéoclastes « BM-derived OCs » ont été obtenus à partir de la moelle osseuse totale de souris arthritiques (STA) ou de leurs contrôles sains respectifs (HC). Expression relative à celle de sno202. Mann-Whitney test : p-value \*< 0,05; \*\*< 0,01; \*\*\*<0,001.

L'état des connaissances actuelles sur les rôles biologiques de miR-342-3p montre une littérature assez prolifique dans le domaine de l'oncologie, de par l'intérêt thérapeutique potentiel de miR-342-3p en tant que facteur anti-tumoral. En effet, miR-342-3p présente un effet anti-tumoral (ou suppresseur de tumeur) par l'inhibition de la prolifération cellulaire, de la migration et de l'invasion tumorale dans de nombreux types de cancers. Les gènes ciblés par miR-342-3p sont multiples et différents selon le type cellulaire et la tumeur étudiée, bien que certaines cibles soient régulièrement validées dans le processus de cancérogenèse, tels que les facteurs de transcription E2F1, FOXM1, FOXQ1 (Tableau 1).

Cibles	Tumos cellulaines	Dethelesies	Dresses historieus	Courses
LIDIES		Cliama	Processus Diologiques	
AEG1	Lignees cellulaires cancereuses	Gliome	Proliferation cellulaire Invasion tumorale	(w. Zhang et al. 2017)
AEG1	Lignées cellulaires cancéreuses	Ostéosarcome	Prolifération cellulaire Migration Invasion tumorale	(S. Zhang et al. 2017)
AGR2	Lignées cellulaires cancéreuses	Cancer du poumon non à petites cellules	Prolifération cellulaire Migration	(Xue et al. 2018)
CUL4B	Cellules cancéreuses primaires	Cancer de la prostate	Prolifération cellulaire Migration Invasion tumorale	(Ma et al. 2020a)
E2F1	Etude in silico (bioinformatique)	Cancers	Progression tumorale	(Lai et al. 2018)
E2F1	Lignées cellulaires cancéreuses	Gliome	Prolifération cellulaire	(Y. Huang and Chi 2019)
E2F1	Lignées cellulaires cancéreuses	Cancer du poumon	Malignité	(Tai et al. 2015)
EGFR BCL2	Lignées cellulaires cancéreuses	Cancer colorectal	Progression tumorale	(PF. Zhang et al. 2019)
FOXM1	Lignées cellulaires cancéreuses	Cancer du col de l'utérus	Malignité	(XR. Li et al. 2014)
FOXM1	Lignées cellulaires cancéreuses	Cancer de la vessie	Malignité	(SH. Wang et al. 2016)
FOXQ1	Tissu primaire, lignée cellulaire	Cancer ovarien	Migration Invasion tumorale	(C. Wang et al. 2019)
FOXQ1	Tissu primaire	Carcinome nasopharyngé	Prolifération cellulaire Invasion tumorale	(Cui and Zhao 2019)
ID4	Tissu primaire, lignée cellulaire	Cancer du pancréas	Proliferation Migration Invasion tumorale	(D. Cheng et al. 2019)
IGF1R	Lignées cellulaires cancéreuses	Carcinome hépatocellulaire	Glycolyse / assimilation du glucose	(W. Liu et al. 2018)
IKKG TAB2 TAB3	Lignées cellulaires cancéreuses	Carcinome hépatocellulaire	Prolifération cellulaire	(Zhao and Zhang 2015)
KDM2A	Lignées cellulaires cancéreuses	Cancer gastrique	Prolifération cellulaire Migration Invasion tumorale	(F. Wang et al. 2018)
LASP1	Lignées cellulaires cancéreuses	Carcinome épidermoïde oral	Prolifération cellulaire	(Song et al. 2019)
MCT1	Cellules cancéreuses primaires	Cancer du sein triple négatif	Glycolyse Métabolisme carcinogénique	(Romero-Cordoba et al. 2018)
MTDH	Lignées cellulaires cancéreuses	Cancer de la prostate	Apoptose	(Hu et al. 2018)
RAP2B	Cellules cancéreuses primaires	Cancer du poumon non à petites cellules	Prolifération cellulaire Invasion tumorale	(X. Xie et al. 2015)
TIAM1	Lignées cellulaires cancéreuses	Lymphome extranodal NK/T, de type nasal	Malignité	(H. Huang et al. 2016)
Zic4	Lignées cellulaires cancéreuses	Gliome	Malignité	(Shao et al. 2019)
ID4	Trophoblastes HTR-8/SVneo	Pré-éclampsie	Viabilité cellulaire Invasion tumorale Apoptose	(X. Han et al. 2020)
IER3	Cellules stromales endométriales	Endométriose	Prolifération cellulaire	(Z. Liu et al. 2019)
BCL2L1	Macrophages primaires murins et humains ; lignée RAW264.7		Apoptose	(Czimmerer et al. 2016)
MAPK1	Lignée humaine A549 Modèle murin	Lésion pulmonaire aiguë (ALI)	Inflammation (LPS) Apoptose	(Zhu et al. 2020)
CTBP2	Cellules souches mésenchymateuses	Obésité	Adipogenèse	(Liang Wang et al. 2015)
FGF11	Cellules endothéliales	Diabète de type 2 (dysfonction angiogénique)	Prolifération cellulaire Migration	(S. Cheng et al. 2018)
?	Lignée humaine THP1	Athérosclérose	Assimilation des lipides Inflammation	(Lei Wang et al. 2019)
PAK1	Modèle murin	Maladie de Parkinson	Prolifération neuronale Apoptose	(DM. Wu et al. 2019)
?	Tissus humain et murin de l'hippocampe	Maladie d'Alzheimer	Dépôts β-amyloïdes	(Fu et al. 2019)
ATF3	Lignées d'ostéoblastes humains et murins		Ostéogenèse	(Y. Han et al. 2018)
SUFU	Cellules souches mésenchymateuses du cordon		Ostéogenèse	(M. Huang et al. 2017)

#### Tableau 1. Cibles identifiées de miR-342-3p et processus biologiques associés.

Cependant, encore peu de données sont disponibles dans les systèmes physiologiques ou dans d'autres pathologies non malignes. Dans l'hématopoïèse, miR-342-3p est sur-exprimé durant la maturation monocytaire (Momen-Heravi and Bala 2018) (Figure 2A). Le facteur de transcription PU.1 a été identifié comme l'un des facteurs inducteurs de l'expression de miR-342 dans la phase précoce de la différenciation des progéniteurs myéloïdes (Ghani et al. 2011). De plus, miR-342-3p est plus exprimé dans les monocytes dits « non classiques » CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> chez l'Homme (Duroux-Richard et al. 2019) (Figure 2B), mais son rôle dans l'hétérogénéité fonctionnelle des monocytes n'est pas connu. Dans les macrophages, miR-342-3p aurait un effet pro-apoptotique en ciblant le facteur anti-apoptotique BCL2L1 (Czimmerer et al. 2016). D'autre part, la surexpression de miR-342-3p *in vitro* dans la lignée monocytique humaine THP-1 diminue l'assimilation des lipides et la réponse inflammatoire induite par les LDL oxydés, suggérant un rôle protecteur de miR-342-3p dans l'athérosclérose (Lei Wang et al. 2019).



**Figure 2. Les micro-ARNs dans la maturation monocytaire. A**. Résumé des miARNs surexprimés dans les stades de la différenciation monocytaire chez la souris, d'après (Momen-Heravi and Bala 2018). **B.** MiARNs différentiellement exprimés dans les sous-populations monocytaires chez l'Homme, d'après les données issues de (Duroux-Richard et al. 2019).

En physiologie osseuse, miR-342-3p semble jouer un rôle pro-ostéogénique, à la fois au niveau de l'engagement des cellules souches mésenchymateuses primaires (M. Huang et al. 2017) et des pré-ostéoblastes (Y. Han et al. 2018). Il est important de noter à ce stade qu'aucune étude n'a été publiée sur le rôle biologique de miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse.

#### Rationnel de l'étude

L'originalité de mon étude repose tout d'abord sur l'exploration du rôle biologique de miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse en condition physiologique. J'ai mesuré la cinétique d'expression de miR-342-3p pendant la différenciation ostéoclastique in vitro, à partir de plusieurs précurseurs myéloïdes : la lignée myéloïde murine RAW264.7 ; les monocytes et les DC immatures primaires obtenus à partir de la moelle osseuse de souris qui ont respectivement servi de précurseurs des t-OCs et des i-OCs dans ma précédente étude ; les macrophages médullaires primaires (bone marrow-derived macrophages BMMs). Cette cinétique permet de repérer les modulations naturelles de l'expression de miR-342-3p au cours de l'ostéoclastogenèse, et d'identifier une fenêtre cruciale de surexpression où il exercerait sa fonction biologique. J'ai ensuite appliqué l'approche du perte et gain de fonction pour moduler artificiellement le niveau d'expression du miARN dans la cellule transfectée à l'aide d'un mimic pré-miARN (gain de fonction) ou un inhibiteur spécifique anti-miARN (perte de fonction). Ces études in vitro ont été débutées dans les cellules RAW264.7 qui ont les avantages d'une lignée cellulaire : homogénéité, croissance rapide, facilité de transfection et de différenciation rapide en OCs (quelques jours en présence de RANKL). J'ai utilisé ce modèle cellulaire dans les tests quantitatifs et fonctionnels in vitro de l'ostéoclastogenèse : nombre d'OCs formés par marquage de la protéine TRAP ; viabilité cellulaire par production d'ATP ; apoptose par la mesure de l'activité des caspases 3/7 ; motilité des précurseurs par acquisition en temps réel par microscopie ; formation de l'anneau d'actine par immunofluorescence et résorption d'une matrice minéralisée par osteo-assay. J'ai validé mes résultats dans les cellules primaires dérivées de la moelle osseuse (BMMs qui sont des cellules monocytaires obtenues après enrichissement des cellules de la moelle osseuse de souris C57BI/6, en présence de M-CSF).

J'ai poursuivi mon étude par la recherche des cibles potentielles de miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse. Pour cela, j'ai croisé les données de prédiction *in silico* des gènes potentiellement ciblés par miR-342-3p (plusieurs centaines) avec l'analyse du transcriptome des cellules RAW264.7 transfectées par l'anti-miR-342-3p ou un inhibiteur contrôle neutre (anti-CT). Le transcriptome a été établi 24h après transfection des RAW264.7 mises en présence de RANKL. J'ai ensuite retenu les cibles les plus intéressantes dans le contexte de l'ostéoclastogenèse. La validation des gènes cibles candidats a été réalisée par un système rapporteur qui mesure l'activité luciférase sous le contrôle de la région régulatrice non codante 3'-UTR du gène ciblé dans la lignée cellulaire HEK293. Enfin, j'ai mis en place des tests fonctionnels afin de démontrer une modulation de l'activité biologique de la protéine ciblée par miR-342-3p.
Mon étude présente également un versant in vivo original, basé sur mes observations précédentes dans le contexte de l'arthrite auto-immune montrant que miR-342-3p est étroitement associé aux i-OCs dans l'arthrite. J'ai alors mis au point la modulation in vivo de l'expression de miR-342-3p dans les précurseurs OCs de souris arthritiques (Seeling et al. 2013; Jacome-Galarza et al. 2013; Hasegawa et al. 2019). Afin d'obtenir une action ciblée, j'ai utilisé un liposome cationique pour sur-exprimer le miARN d'intérêt ou son inhibiteur de façon sélective dans les monocytes circulants Ly6C<sup>high</sup>. Ce vecteur, appelé « lipoplex », a déjà été utilisé dans notre équipe lors d'essais de modulation in vivo de l'expression de miR-146a dans les monocytes circulants Ly6C<sup>high</sup> de souris arthritiques (Ammari et al. 2018). La formulation du lipoplex chargé du miARN est bien maitrisée par notre équipe, et se base sur des études publiées (Rhinn et al. 2009; Schlegel et al. 2011). Son efficacité et la sélectivité pour les monocytes Ly6C<sup>high</sup> ont déjà été démontrées avec un siARN (Présumey et al. 2013) et un miARN mimic (Ammari et al. 2018). Cependant, la neutralisation d'un miARN par son inhibiteur n'a encore jamais été réalisée avec cette approche. De plus, seule une approche systémique par injection intra-veineuse (IV) a été précédemment validée chez la souris. J'ai donc procédé à la preuve de concept du ciblage des cellules monocytaires en IV et en intra-articulaire (IA) chez la souris saine et arthritique, et mesuré l'efficacité de la modulation de l'expression de miR-342-3p in vivo dans les monocytes en utilisant soit un mimic soit un antagoniste. A terme, je souhaite évaluer l'impact de la modulation de l'expression de miR-342-3p sur la formation d'i-OCs et l'érosion osseuse dans le modèle d'arthrite auto-immune.

Mes résultats ont permis la rédaction d'un manuscrit que je signe en 1<sup>er</sup> auteure et qui est actuellement en préparation.

#### <u>Résumé</u>

La polyarthrite rhumatoïde est associée à une destruction osseuse par les ostéoclastes (OCs), qui dérivent de précurseurs myéloïdes. Dans des conditions arthritiques, les OCs proviennent de précurseurs distincts des précurseurs des OCs impliqués dans le remodelage osseux et l'homéostasie osseuse. Les micro-ARNs (miARNs) sont des régulateurs clés de l'expression des gènes qui contrôlent les processus cellulaires, y compris l'ostéoclastogenèse. Dans le but d'identifier les principaux régulateurs des OCs inflammatoires (i-OCs), nous avons étudié le rôle du miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse dans le contexte de l'arthrite.

Des études de gain et de perte de fonction ont été réalisées en utilisant la lignée myéloïde murine RAW264.7 et des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMMs) transfectés avec un pré-miR-342-3p ou un inhibiteur spécifique de miR-342-3p. La survie et la motilité des cellules ont été évaluées par la mesure de la densité cellulaire et de l'activité de la caspase 3/7 à 48 h. Après transfection des RAW264.7 avec un anti-miR-342-3p en condition pro-ostéoclastique, nous avons réalisé le transcriptome par séquençage à haut débit à 24h. Une analyse in silico de prédiction a ensuite été réalisée afin d'identifier des gènes potentiellement ciblés par miR-342-3p parmi les gènes sur-exprimés. L'expression de miR-342-3p a été modulée *in vivo*, soit dans les monocytes Ly6C<sup>high</sup> circulants, soit dans les monocytes/macrophages associés aux articulations. L'administration de miR-342-3p ou de son inhibiteur a été effectuée grâce au liposome cationique DMAPAP/DOPE lors d'injections intraveineuses ou intra-articulaires de souris arthritiques (dans le modèle serum-transfer arthritis, ou STA). La sévérité de l'arthrite et les paramètres histomorphométriques osseux ont été analysés.

J'ai observé une surexpression transitoire de miR-342-3p au début de l'ostéoclastogenèse. J'ai ensuite montré que la neutralisation de miR-342-3p inhibait significativement la motilité et la survie des précurseurs d'OC, entraînant une diminution du nombre d'OC et de l'activité de résorption. La neutralisation du miR-342-3p a modulé significativement l'expression de 1185 gènes ; et les voies biologiques associées incluaient notamment la locomotion cellulaire et l'apoptose. Parmi les gènes modulés, j'ai validé *Adam17* comme nouvelle cible de miR-342-3p. La neutralisation *in vivo* du miR-342-3p dans les précurseurs Ly6C<sup>high</sup> des souris arthritiques a augmenté le niveau d'expression d'*Adam17* dans les progéniteurs ostéoclastiques, bien que de façon non significative. Mes données suggèrent que l'axe miR-342-3p/*Adam17* favoriserait la phase précoce de l'ostéoclastogenèse en améliorant la survie cellulaire et la motilité des précurseurs d'OC. La neutralisation du miR-342-3p dans les précurseurs pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour atténuer l'érosion osseuse dans la polyarthrite rhumatoïde.

109

Article

### Mir-342-3p regulates osteoclastogenesis in arthritisassociated osteoclast precursors.

Claire Lozano<sup>1</sup>, Valentin Estibals<sup>1</sup>, Gabriel Courties<sup>1</sup>, Hortense Courot<sup>1</sup>, Léa Marinèche<sup>1</sup>, Claudine Blin-Wakkach<sup>2</sup>, Maria-Bernadette Madel<sup>2</sup>, Christophe Hue<sup>3</sup>, Hendrick Mambu-Mambueni<sup>3</sup>, Henri-Jean Garchon<sup>3</sup>, Virginie Escriou<sup>4</sup>, Isabelle Duroux-Richard<sup>1, \*, §</sup> and Florence Apparailly<sup>1, \*, §</sup>

- <sup>1</sup> IRMB, INSERM, Univ Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France
- <sup>2</sup> CNRS, UMR7370, Univ Côte d'Azur, Nice Sophia Antipolis, France
- <sup>3</sup> INSERM, Univ Versailles Saint-Quentin, Paris-Saclay, Montigny-Le-Bretonneux, France
- <sup>4</sup> UTCBS, CNRS, INSERM, Univ Paris Descartes, Paris, France
- § Correspondence: isabelle.richard@inserm.fr; Tel.: +33-467-335-697; florence.apparailly@inserm.fr; Tel.: +33-467-335-696
- \* These authors contributed equally to this work.

Abstract: Rheumatoid arthritis is associated with bone destruction by osteoclasts (OCs), which derive from myeloid precursors. Under arthritic conditions, OCs originate from precursors that are distinct from OC precursors in homeostatic bone remodeling. MicroRNAs (miRNAs) are key regulators of gene expression and control cellular processes, including osteoclastogenesis. Aiming at identifying key regulators of pathogenic OCs in arthritis, named inflammatory OCs (i-OCs), we investigated the role of miR-342-3p in osteoclastogenesis in the context of arthritis. Gain- and loss-of function studies were performed using the murine RAW264.7 cell line and primary bone marrow-derived macrophages (BMMs) transfected with either miR-342-3p mimics or inhibitors. Cell survival and motility of OC precursors were assessed at 48h using real-time acquisitions, cell density and caspase 3/7 activity. We used Illumina RNA-Seq and in silico approaches to identify putative targets of miR-342-3p, and dual luciferase assay to validate the binding. Anti-miR-342-3p was delivered in vivo to circulating or jointassociated Ly6Chigh monocytes using the DMAPAP/DOPE cationic liposome upon intravenous or intra-articular injections of mice with K/BxN serum-transfer arthritis (STA). Arthritis severity and bone histomorphometric parameters were analyzed. We found that the expression level of miR-342-3p was transiently up-regulated in the early phase of osteoclastogenesis. We showed that miR-342-3p neutralization significantly inhibited the motility and survival of OC precursors, resulting in decreased OC number and resorption activity. Upon miR-342-3p neutralization, 1185 genes were significantly deregulated, which were associated with locomotion and apoptosis pathways. In vitro assays validated Adam17 as a novel target for miR-342-3p. In vivo neutralization of miR-342-3p in Ly6Chigh precursors of STA mice increased Adam17 expression in OC progenitors. Our data suggest that the miR-342-3p/Adam17 axis promotes the early phase of osteoclastogenesis by enhancing the cell survival and motility of OC precursors. The miR-342-3p neutralization in OC precursors might be a therapeutic strategy to attenuate bone erosion in arthritis.

Keywords: miRNA; miR-342-3p; osteoclast; Adam17; arthritis; bone

#### 2. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease associated with joint pain and autoimmunity. Uncontrolled disease progression leads to severe joint damages and pathological bone erosion causing disability. A large panel of antirheumatic drugs is available to offer an effective therapy aiming at controlling disease activity and eventually at remission [1]. Currently, while most of targeted therapies developed are quite effective in controlling inflammation and disease progression [2] they are not satisfactory in terms of bone erosion.

Osteoclasts (OCs) are bone-resorbing cells directly involved in the bone destruction in RA. There is growing evidence that OCs are heterogeneous and that different OC subsets display distinct immune functions due to their myeloid origins. In particular, inflammatory OCs (i-OCs) are capable of polarizing CD4<sup>+</sup> T-cells towards an inflammatory Th1-type immune response while tolerogenic OCs (t-OCs) polarize CD4<sup>+</sup> T-cells towards regulatory phenotype [3,4]. Of note, a recent work shows that OCs from arthritic joints exclusively originate from circulating bone-marrow derived myeloid precursors [5], distinct from OC precursors giving rise to OCs involved in homeostatic bone remodeling and bone maintenance [4,6,7]. Among the mechanisms promoting the differentiation of myeloid precursors into i-OCs in the context of arthritis are the transcription factor FOXM1 in monocytes/macrophages [5] and the protein circullination in dendritic cells that enhance OC differentiation [8,9].

Micro-RNAs (miRNAs) are key regulators of biological processes such as cell proliferation, survival and differentiation. These small non coding RNAs of about 22 nucleotides act as fine tuners through a post-transcriptional regulation of protein-encoding genes. Because of an incomplete complementary binding sequence, a single miRNA potentially targets hundreds of mRNAs. True targets thus depend on the transcriptomic status of the cellular context and biological process studied. MiRNAs are involved in OC differentiation [10] and their abnormal expression is associated with bone disorders [11]. In RA, dysregulated miRNAs are involved in pathogenic inflammatory response and/or bone erosion [12,13]. For example, miR-155 is a well-known pro-inflammatory miRNA that shows aberrant expression in RA [14] and miR-155 deficient mice are resistant to arthritis [15,16]. MiR-146a/b is another famous miRNA highly expressed in RA [17], known to negatively regulate both inflammation and OC differentiation [18] by targeting TRAF6 [19] and RelB [20].

We previously found that miR-155, miR-146b and miR-342-3p are molecular markers of i-OCs (unpublished data). Since the miR-146 and miR-155 families have been already extensively studied in the context of arthritis and osteoclastogenesis, the present work aims at studying the role of miR-342-3p in OCs and arthritis bone erosion. So far, miR-342-3p is widely described as a tumor suppressor acting by inhibiting cell proliferation, migration and/or invasion of tumor cells in a wide range of cancers [21–27]. However, its role in osteoclastogenesis has never been addressed.

#### 3. Materials and Methods

#### 3.1 Animal experiments

C57Bl/6 male mice were purchased from Envigo and housed in our animal facility in accordance with the ethic statements and general guidelines of the Institute for Neurosciences Montpellier. Serumtransfer arthritis (STA) was induced in 7 to 10 weeks old males by daily i.p. injections of 100µl K/BxN serum on two successive days. Controls received 100µl of serum collected from non-immunized WT mice. We daily performed the clinical scoring based on the paw swelling measurement and on the number of inflamed joints. Bone histomorphometry was performed the day before STA induction and at day 10. Micro-computed tomography (µCT) was performed using the Skyscan 1176 microCT system on living mice (Bruker microCT). At indicated time, mice legs were scanned using the following settings: isotropic voxels size of 18 µm, voltage of 50 kV, current of 500 mA, 0.5 mm aluminum filter, 180 degrees with a 0.7 degree rotation step and a 210 ms exposure time. Data were reconstructed using NRecon software (Bruker microCT). Quantification of bone parameters such as bone volume fraction (BV/TV, %), specific bone surface (BS/BV, mm<sup>-1</sup>) and trabecular thickness (Tb.Th, mm) was performed on the trabecular region of the distal part of each femur (CT Analyzer software, Bruker microCT). For the in vivo delivery of small RNAs, we used the cationic lipid 2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]propylamino}-N- ditetradecyl carbamoyl-methyl-acetamide or DMAPAP (synthetized as previously described [28]) and DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, Avanti Polar Lipids), kindly provided by Virginie Escriou. We performed 200µl intravenous (i.v.) injection or 20µl intraarticular (i.a.) injection in the ankle joint of a mix containing DMAPAP/DOPE cationic liposome (lipoplex) processed as follows: for one i.v. injection, 3µl lipoplex 20mM diluted in NaCl 0,9% to 100µl was gently mixed with 0,5mg/kg of small RNA and equimolar DNA cargo (pcDNA3.1) diluted in NaCl 0,9% q.s.p 100µl. Both solutions are mixed 10 min before injection. We used the fluorescent miRIDIAN microRNA Transfection Control with dy547 for the biodistribution experiments (Horizon Discovery). MirVana<sup>™</sup> Mimic miR-342-3p, miRNA Negative Control and miR-342-3p Inhibitor (Thermofisher Scientific) were used for the in vivo functional studies. Sample collection was performed at euthanasia. Posterior paws were used for either histological assessment or for cellular sampling. Bone marrow cells were extracted by flushing the femur and tibia in sterile conditions with 2% SVF-supplemented PBS 1X. Blood samples were collected using heparinized capillaries by retro-orbital route. Red blood cell lysis was performed on blood, spleen and BM samples using ACK lysing buffer (Thermofisher). For the ankle joint sampling, we perfused animals with sterile PBS 1X to eliminate blood contamination prior to isolation of cells from ankle joint dissection and tissue digestion using type IV collagenase 1mg/ml (Gibco) in HBSS buffer (1h, 37°C, 900 rpm).

#### 3.2 Cell cultures

Osteoclasts (OCs) were generated from primary cells according to the protocol designed by Ibáñez and colleagues [3]. Briefly, mouse bone marrow (BM) cells were plated at 1.10<sup>6</sup> cells/ml and cultured 5 to 10 days until the generation of BM-OCs in pro-osteoclastic medium, *i.e.* enriched GlutaMax  $\alpha$ MEM medium with recombinant murine M-CSF (25 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) (Miltenyi Biotec) in controlled atmosphere (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Tolerogenic OCs (t-OCs) were generated from CD11b+ bone marrow cells sorted by magnetic separation (MACS) according to the manufacturer's instructions (CD11b microbeads, Miltenyi Biotec), plated at 4.10<sup>5</sup> cells/ml and cultured 5 days in pro-osteoclastic medium. To generate inflammatory OCs (i-OCs), we first plated BM cells at 1.106 cells/ml in supplemented RPMI1640 medium with recombinant murine IL-4 (10 ng/ml) and GM-CSF (10 ng/ml) (PeproTech) for 6 days to have an immature DC enrichment. Poorly-adherent CD11c+ cells were sorted by MACS (CD11c microbeads UltraPure, Miltenyi Biotec) and plated at 4.10<sup>4</sup> cells/ml in pro-osteoclastic medium for 5-6 days. Bone marrow-derived macrophages (BMMs) were generated from total BM cells incubated 2 days in  $\alpha$ MEM with 25 ng/ml M-CSF; non-adherent cells were removed by washing with PBS 1X. Adherent BMMs were detached after 10 min of incubation at 37°C using Accutase (Sigma-Aldrich), were plated at 1.10<sup>5</sup>/ml and cultured 5 days in pro-osteoclastic medium. Murine monocytic RAW264.7 cells were plated at 2.10<sup>4</sup>/ml and cultured 4-5 days in  $\alpha$ MEM with 50 ng/ml RANKL to generate OCs. Media were changed each 2-3 days. All media were supplemented with 5% fetal bovine serum (GE Healthcare Hyclone, Fisher Scientific), 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) and 0,1% 2mercaptoethanol 50mM (Gibco, Fisher Scientific).

Viability and apoptosis measurements of OC precursors were performed 48h after incubation in pro-osteoclastic condition. CellTiter-Glo® cell viability and Caspase-Glo® 3/7 activity luminescent assays (Promega) were used on cells plated in triplicate for each condition on blank opaque flat-bottom 96-well plates (Corning). Luminescence was acquired on Varioskan®Flash (Thermofisher) according to the manufacturer's instructions. Alternatively, real-time measurements of cell density and apoptosis were performed using Incucyte® Caspase 3/7 Green-Apoptosis Assay Reagent on cells incubated in Incucyte® S3 system (Sartorius). Incucyte® Software was used for data acquirement and analysis.

OC count was manually performed by two independent operators on whole wells. Mature OCs were considered as TRAP positive multinucleated cells with  $\geq$  3 nuclei. TRAP staining was performed using Acid Phosphatase, Leukocyte kit (Sigma-Aldrich). OC function assessement was based on the *in vitro* capacity of resorbing a mineralized matrix using Osteo-Assay plates (Corning). The resorbed pits were highlighted by toluidine blue staining. Pictures of whole wells were analyzed on Fiji ImageJ and total resorbed area was quantified using CellProfiler 3.0 software.

#### 3.3 Small RNA transfections

Cells were transfected with miRNAs mirVana® mimic miR-342-3p, mimic positive control, miR-342-3p inhibitor or negative control using transfection reagents such as Lipofectamine 2000 and LipoRNAiMAx (Thermofisher). Briefly, RAW264.7 cells were plated at 10<sup>4</sup> /well in 24-well plate and were transfected as follows (quantities are given for one well): Lipofectamine 2000 mix (1,6µl in 50µl OptiMEM) and RNA mix (40pmol in 50µl OptiMEM) were complexed 10min and added to the cells in 400µl OptiMEM. Transfected cells were incubated in OptiMEM (37°C, 5% CO2) during 2h prior to change the medium with pro-osteoclastic medium. BMMs were plated at 5.10<sup>4</sup>/well in 24-well plate and were transfected using LipoRNAiMax directly in complete medium. LipoRNAiMAx and oligoRNA mixes were prepared according to the manufacturer's instructions, i.e. 5pmol of oligoRNA and 1,5µl LipoRNAiMax in 50µl OptiMEM per well, and were added to the cell culture. Medium was changed after 4h of incubation for pro-osteoclastic medium. The transfection efficacy was systematically quantified using the fluorescent siRNA siGlo Green (Horizon Discovery) 6h after transfection. We classically obtain more than 90% of efficacy in RAW264.7 cells and 60% of efficacy in primary BMMs.

#### 3.4 RT-qPCR

Total RNA including miRNAs was extracted using miRNeasy kits (Qiagen), and quantified using the Nanodrop<sup>TM</sup> spectrophotometer (Thermofisher). Reverse transcription of total mRNAs or specific miRNAs was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit or Taqman<sup>TM</sup> microRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), respectively. We used TaqMan<sup>TM</sup> specific RT primers for miRNAs. For quantitative PCR (qPCR), we used FAM-labelled primers for miRNAs and mRNAs and the TaqMan<sup>TM</sup> Universal Master Mix II with no UNG; qPCR was run on the Viia7 System (Applied Biosystems) or on the Rotor-Gene Q (Qiagen). We measured the expression level of miR-342-3p, its putative targets and of the OC-associated genes *Nfatc1* and *Acp5*. Relative expressions of miRNAs and of mRNAs were normalized using sno202 and *Gapdh* expressions, respectively, using the 2^-(deltaCT) method.

#### 3.5 Motility of OC precursors

Cells were incubated in pro-osteoclastic medium after miRNA transfection in 24-well plates. Timelaps video was computed using a camera connected to an optical microscope with x4 magnification (Leica) placed in controlled atmosphere convenient for cell culture, in collaboration with Hassan Boukhaddaoui (INSERM U1051, INM, Montpellier, France). Each well was pictured using 16 images per well, 1 acquisition every 20 minutes for 48h. Data collection and analysis were performed using Imaris software (Imaging MRI platform, Montpellier, France). Each cell was tracked and motility parameters were automatically assessed, such as displacement length ( $\mu$ m) and speed ( $\mu$ m/s). Spatial displacement length was pictured using MatLab software in collaboration with Pierre Fontanaud (IGF, CNRS, Montpellier, France).

#### 3.6 RNA-Sequencing and transcriptome analysis

RAW264.7 cells were transfected with either miR-342-3p inhibitor or miRNA negative control and further differentiated into OCs as mentioned above. To depict the RNA profiling and to highlight the gene expression potentially regulated under the dependence of miR-342-3p in osteoclastogenesis, we collected cells for each condition 24h after RANKL stimulation. Total RNA (100 ng) was extracted using the miRNeasy kit (Qiagen) and processed for directional library preparation using the Truseq stranded total RNA library kit (Illumina). Libraries were performed on a Nextseq500 sequencer (Illumina) to generate 30-40 million fragments per sample. After quality controls, raw RNAseq fastQ reads were trimmed with Trimmomatic and aligned to the reference mouse transcriptome (Gencode mm10) using STAR (v. 2.6.1c) [29] on the National Institutes of Health high-performance computing Biowulf cluster. Gene assignment and estimate counts of RNA reads were performed with HTseq [30]. Gene expression

in biological replicates was compared between the different conditions to identify differentially expressed genes using Perseus software [31] using the Wald test (FDR < 0.05).

#### 3.7 Luciferase assay

HEK293 cells were plated at 2.10<sup>5</sup>/ml in DMEM supplemented with L-Glutamine 2mM and 10% SVF (Gibco). Cells were transfected using Lipofectamine 2000 with 50nM of miRNA (mimic miR-342-3p, miR-342-3p inhibitor or miRNA negative control) and 50ng of plasmid containing the luciferase gene under the control of the 3'UTR of interest, i.e. MmiT090828-MT05 miRNA 3'UTR target expression clone for Mouse Adam17 (NM\_009615.6) (Genecopoeia). We measured the luciferase activity in the supernatant collected 48h after transfection, using the Secrete-Pair Dual Luminescence Assay (Genecopoeia) and the luminometer Varioskan<sup>TM</sup> Flash (Thermofisher). GLuc/SEAP ratios were computed for each condition. Experiments were performed in triplicates.

#### 3.8 Protein assays

For western-blotting assays, total protein was extracted from 9.10<sup>5</sup> cells. Adherent cells were collected at the indicated times after medium removal by gentle scraping in cold PBS 1X. After centrifugation at 350 g, cells were suspended in CelLytic M Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) completed with cOmplete<sup>™</sup> EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) and incubated 20min on glass. After centrifugation at 8000 g, supernatant containing proteins was collected and stored at -80°C. Protein quantitation was performed using Pierce<sup>™</sup> BCA<sup>™</sup> kit and microplate photometer Multiskan<sup>™</sup> (Thermofisher). 80µg of denatured proteins and Chameleon<sup>™</sup> Duo pre-stained Protein Ladder (Li-Cor Biosciences) were separated in gradient polyacrylamide gel (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Midi Gel, Invitrogen). Electro-transfer was done on PVDF membrane (iBlot Gel Transfer Stacks PVDF Regular, Invitrogen). The protein staining used monoclonal unlabelled primary antibodies and fluorescent labelled secondary ones, diluted in PBS Blocking Buffer (Li-Cor Biosciences): IgG rabbit anti-ADAM17 1/500e (BosterBio), IgG mouse anti-GAPDH 1/400e (Abcam); AF800 donkey anti-rabbit IgG and AF680 donkey anti-mouse IgG 1/1500e (Invitrogen). Fluorometric signal was acquired on Odyssey® CLx Imaging System (Li-Cor Biosciences). We used ImageJ for data analysis and quantification.

#### 3.9 Immunofluorescent staining

RAW264.7 cells were cultured in pro-osteoclastic condition after miRNA transfection as described above in 24-well plate with sterile glass round coverslips included in each well. Cultures were stopped at 5 days (mature OCs) to analyze the podosome-belt and actin-ring formation. Cells were fixed with 4% PFA and permeabilized before staining. The podosome structure was assessed by staining vinculin and actin (monoclonal mouse IgG anti-vinculin 1/1000e (hVIN-1 clone), Sigma; 555-polyclonal donkey anti-mouse IgG 1/1000e, Life Technologies; AF488-phalloidin 1/1000e, Thermofisher; Antibody diluent, Dako). The nuclei were stained using Hoescht 33342 dye (Sigma-Aldrich). We performed data acquisition on confocal microscope (Leica) and data analysis using ImageJ Fiji software.

#### 3.10 Cell sorting and FACS analysis

To assess the efficacy and selectivity of the *in vivo* delivery of miRNAs, we collected blood, spleen and BM cells after i.v. injection and ankle joint-associated cells after i.a. injection experiments. The biodistribution study was performed 24h after injection of the miRNA-dye547-lipoplex emulsion. Modulation of miR-342-3p expression was quantified by RT-qPCR as described above after a step of monocyte enrichment. After collagenase digestion, cells were filtered and washed in cold FACS buffer. A negative selection of monocyte/macrophages was performed by magnetic cell separation (MACS<sup>TM</sup> Technology, Miltenyi Biotec) to eliminate Ly6G<sup>+</sup> neutrophils, siGlec-F<sup>+</sup> eosinophils and lymphoid cells using a panel of biotin-labelled antibodies (clones) anti-CD90.2 (30-H12), -Ter119 (TER-119), -Ly6G (1A8), -CD19 (6D5), -SiglecF (517007L) and -NKp46 (29A1.4) (10µl of each, BioLegend) and 10µl of streptavidin magnetic beads (Miltenyi Biotec). The enrichment was monitored by FACS. Fluorochromelabelled monoclonal antibodies (clones) used were anti-CD19 APC (1D3/CD19), -CD90.2 APC-Cy7 (30-H12), -CD115 BV421 (AFS98), -Ly6G FITC or PerCP5.5 (1A8), -Ly6C PeCy7 (HK1.4), -F4/80 APC-Cy7 (BM8), -I-A/I-E MHC-II BV421 (M5/114.15.2), , -CD45 APC or BV711 (30-F11) (BioLegend); anti-Ly6C AF700 (AL-21) and -CD11b V500 or BV510 (M1/70) (BD Biosciences). FACS acquisition and data analyses were performed using FACSymphony<sup>TM</sup> A3 system (BD Biosciences) and FlowJo<sup>TM</sup> software.

#### 3.11 Statistical analysis

We used GraphPad Prism 7 for statistical analysis. Unpaired Student t-test and non-parametric Mann-Whitney test were used to compare two independent groups. ANOVA with multiple comparisons was used for kinetic measurements. For RNAseq analysis, false discovery rate (FDR) was determined with threshold 0.01 and fold change < 0.8 and > 1.2 to identify differences in gene expression. Heatmaps and hierarchical clustering involved z-scores transformed from the original normalized values.

#### 4. Results

#### 4.1 MiR-342-3p is highly expressed in the early phase of osteoclastogenesis.

We previously found that miR-342-3p is a molecular marker of i-OCs and that it is upregulated in arthritic-associated OCs in arthritic mice compared to healthy mice (unpublished data). To complete these observations found in mature OCs, we performed kinetic experiments to investigate the expression of miR-342-3p during osteoclastogenesis. We used three types of myeloid precursors isolated from healthy mice (Figure 1A): BM-derived CD11b<sup>+</sup> monocytes and CD11c<sup>+</sup> immature dendritic cells (DC) that respectively give rise to tolerogenic OCs (t-OCs) and i-OCs [3], and BM-derived macrophages (BMMs). We also used the mouse monocytic RAW264.7 cell line. The OC differentiation was validated by the increased expression of the OC-associated genes *Nfatc1* and *Acp5* (Figure S1). During OC differentiation of CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup> myeloid precursors, miR-342-3p expression peaks at 24h and then progressively decrease (Figures 1B and 1C). BMMs and RAW264.7 cells already expressed high levels of miR-342-3p, which progressively decreased from day 1 of osteoclastogenesis to the mature OC stage (Figures 1D and 1E). In all cases, the expression levels of miR-342-3p reached at the end of the differentiation in mature OCs are lower than in OC precursors at day 0. These results suggest a potential role of miR-342-3p during early phases of osteoclastogenesis.



**Figure 1: Kinetic of expression of miR-342-3p during osteoclastogenic differentiation of various types of myeloid precursors. (A)** Schematic representation of the *ex vivo* OC generation from primary bone

marrow (BM) cell subsets isolated from healthy C57Bl/6 mice. **(B-E)** The osteoclastogenesis was induced from various types of OC precursors and the expression of miR-342-3p was quantified by RT-qPCR. Data from CD11b<sup>+</sup> monocytes **(B)**, CD11c<sup>+</sup> immature dentritic cells **(C)** and BM-derived macrophages **(D)** are representative of two independent experiments, and data from the mouse monocytic RAW264.7 cell line are representative of three independent experiments **(E)**. sno202 expression was used as endogenous control for miRNA data normalization. MN: monocytes; DC: dendritic cells; BMM: bone marrow-derived macrophages; OC: osteoclasts. Mean and SD are represented. Ordinary one-way ANOVA test p-values are annoted for kinetic experiments. Dunnett's multiple comparisons were performed relative to the starting time point: p-value \* < 0.05; \*\*<0.01; \*\*\* < 0.001.

#### 4.2 MiR-342-3p neutralization dramatically decreases the motility and viability of OC precursors.

To identify the biological functions regulated by miR-342-3p in osteoclastogenesis, we performed miR-342-3p loss- and gain-of-function experiments in RAW264.7 cells and in primary mouse BMMs. Transfection of OC precursors was performed prior to OC differentiation and efficacy monitored using a fluorescent siRNA. We classically observed more than 90% of efficacy in RAW264.7 cells and 50-60% in BMMs 6h after transfection.

Both in RAW264.7 cells (Figures 2A and 2B) and in BMMs (Figures 2C and 2D), the neutralization of miR-342-3p resulted in a significant decrease in the number of TRAP positive multinucleated OCs, associated with a decrease in the *in vitro* matrix-resorbing activity of OCs compared to controls. Conversely, enforced expression of miR-342-3p slightly increased OCs formation and function (Figures 2A-D). However, no significant difference was found in the expression level of OC-associated genes such as the transcription factor *Nfatc1* that is early expressed under RANKL stimulation (Figure S2A), and the late expressed gene *Acp5* coding for TRAP (Figure S2B). Modulation of miR-342-3p expression was stable during OC differentiation, as we measured a persistent increased expression with mimic miR-342-3p, and conversely, a decreased expression with miR-342-3p inhibitor, compared to the respective controls (Figure S2C). Mature OC stage is achieved in 5 days in all conditions (data not shown). Thus, the modulation of miR-342-3p expression did not impact on the kinetic of OC differentiation of RAW264.7 cells and of BMMs. Besides, the staining of F-actin and vinculin in mature OCs showed a conserved actin-ring structure that is necessary for podosome-belt formation and resorbing activity of OCs (Figure S3), suggesting that once formed, OCs are functional.



Figure 2: MiR-342-3p gain and loss-of-function modulates the survival and motility of OC precursors. RAW264.7 cells and primary bone marrow-derived macrophages (BMMs) were transfected prior to OC differentiation with either control miRNA mimics (miR-CT) and antagonists (anti-CT), or miR-342-3p mimics (miR-342-3p) and antagonists (anti-342-3p). Analyses were performed either at the mature OC stage (A-D) or in OC precursors committed to OC differentiation for 48h (E-I). (A, C) Representative TRAP staining pictures are shown (10x magnification) and numbers of TRAP-positive multinucleated OCs were quantified in RAW264.7 cells (n=11) (A) and in BMMs experiments (n=5) (C). (B, D) Resorption pit area in osteo-assay plates were quantified on whole wells using ImageJ and CellProfiler 3.0.0 softwares, in 3 independent experiments using RAW264.7 cells (B) or BMMs (D). (E, F) Cell survival and apoptosis of OC precursors were assessed by measuring cell viability and caspase-3/7 activity at 48h in RAW264.7 cells (n=8) (E) and in BMMs (n=4) (F). (G-I) Motility of OC precursors was assessed by cell tracking of RAW264.7 cells for 48h. For each cell tracked in each condition (miR-CT: 1826 cells; miR-342-3p: 1597 cells; anti-CT: 1432 cells; anti-342-3p: 806 cells) the 2D displacement (G); speed (H) and displacement length (I) of one experiment were quantified using Imaris software. Fold changes (FC) of miR-342-3p and anti-342-3p expression are presented relative to their respective controls (A-E). Mean and SD (A-G) or SEM (H, I) are plotted. Unpaired t test or Mann-Whitney test were performed for independent experiments (results given as FC); Ratio paired t test was used in matched experiments (F) \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001.

Interestingly, we observed a marked decrease of cell density in the anti-342-3p condition (Figure 2A). Cell density and viability were quantified at 48h in OC precursors using cell titer viability and

caspase 3/7 activity luminescence assays. The neutralization of miR-342-3p decreased cell viability and increased caspase-mediated cell apoptosis in both transfected RAW264.7 cells (Figure 2E) and primary BMMs (Figure 2F). To further investigate these data, we assessed the behavior of OC precursors using real time video during the early stages of OC differentiation. The individual tracking of transfected RAW264.7 cells under RANKL stimulation showed a dramatic decrease of cell motility in the anti-342-3p condition (Figure 2G), confirmed by speed and displacement lenght measurements (Figures 2H and 2I). We also measured cell apoptosis in real time using a fluorescent caspase 3-7 activity reagent in an Incucyte® incubator system. Consistently with our data, miR-342-3p neutralization progressively increased cell apoptosis throughout the early phase of osteoclastogenesis in RAW264.7 cells (Figure S2D).

Collectively, these results suggest that miR-342-3p globally impacts on motility and cell viability of OC precursors while the bone-resorbing function of the generated mature OCs was conserved.

#### 4.3 Transcriptome of OC precursors with reduced miR-342-3p reveals dysregulation of key pathways.

To identify genes and pathways regulated by miR-342-3p in OC precursors, we profiled the gene expression changes of OC precursors following miR-342-3p loss-of-function. The mRNA-seq analysis of 3 independent experiments yielded the transcriptomic profiles of 23,420 genes. We identified 1,675 differentially expressed genes in cells transfected with anti-miR-342-3p as compared with control conditions. We selected mRNAs with fold change (FC) higher than 1.2 and with a false discovery rate corrected p-value less than 1% (Figure 3A and Table S1). By using the bioinformatics web-based application "STRING" (search tool for recurring instances of neighboring genes) [32], the KEGG pathway analysis revealed high enrichment of specific biological processes including cell cycle, p53 signaling pathways, and OC differentiation (Figure 3B, Table S2). To identify putative target genes of miR-342-3p, we selected the 664 mRNAs that were significantly up-regulated in cells down-expressing miR-342-3p. We next performed an *in silico* analysis of prediction for miRNA-mRNA binding using the miRWalk software [33], a miRNA database which simultaneously interrogates several algorithms (TargetScan, Miranda, RNA22 and miRWalk). We stringently selected 44 genes predicted to be targeted by miR-342-3p by all 4 queried algorithms (Table S3). The pathway enrichment analysis for these 44 genes showed an involvement of the positive regulation of catalytic activity pathway (12 genes with FDR p-value = 0.005), of cellular protein metabolic process (12 genes with FDR p-value of 0.008), of protein modification process (12 genes with FDR p-value of 0.008), of locomotion and cell migration (10 and 9 genes respectively, with FDR p-values of 0.008) and apoptotic process (8 genes with FDR p-value of 0.008). Of note, the main networks identified are associated with cell locomotion and migration, including a recurrent cluster of genes: Adam17, Gsk3b, Igf1, Stk4, Tgfbr1 (Table S4).



**Figure 3: MiR-342-3p regulates osteoclastogenesis by controlling cell viability and mobility pathways. (A)** Heatmap of the hierarchical clustering analysis of 1,675 differentially expressed genes in RAW264.7 cells transfected with the antagomiR negative control (anti-CT) or the antagomiR-342-3p (anti-342-3p) in 3 independent experiments (FDR corrected p-value < 0.01). The RNA-Seq was performed 24h after RANKL stimulation. **(B)** Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes using the KEGG pathway database reveals key biological processes in cell survival and OC biology. **(C)** Pathway enrichment analysis of the 44 overexpressed genes in anti-342-3p condition and putatively targeted by miR-342-3p shows that they are mainly related to cell locomotion and catalytic activity (in red).

#### 4.4 Adam17/Tace is targeted by miR-342-3p in OC precursors.

ADAM17 is a metalloproteinase responsible for the ectodomain shedding and processing of a wide range of substrates, including cell adhesion proteins, cytokine and growth factor receptors. Of note, ADAM17 is also called TACE (TNF Alpha Converting Enzyme) because of the historical discovery of its direct involvement in the release of soluble TNF $\alpha$  from its membrane-bound precursor [34]. In the field of osteoclastogenesis, ADAM17 is involved in the shedding of the receptors CSF1R [35,36] and RANK [37], together with the cleavage of RANKL [38,39]. We thus investigated the possible direct regulation of *Adam17* by miR-342-3p in the early phase of osteoclastogenesis.

The *Adam17* mRNA carries a miR-342-3p putative binding site into the 3'UTR sequence (Figure 4A). To confirm the direct binding of miR-342-3p, we co-transfected HEK293 cells with a plasmid expression vector containing the *Adam17* 3'UTR downstream the luciferase gene and with the miRNA of interest (miR-342-3p mimic, inhibitor or negative control). Since the luciferase expression and activity were under the control of *Adam17* 3'UTR, the significant increase of the luciferase activity associated with anti-miR-342-3p was consistent with a direct binding of miR-342-3p to *Adam17* 3'UTR target sequence (Figure 4B). To determine whether miR-342-3p directly regulates *Adam17* in OCs precursors, we performed a gain- and loss-of-function experiment in RAW264.7 cells and monitored ADAM17 protein levels 24h after transfection using western blot analysis. We observed an increase in ADAM17 expression when neutralizing miR-342-3p (Figure 4C). In addition, in both primary and cell line OC precursors (Figure 4D-E), we found an inversed expression between *Adam17* mRNA and miR-342-3p, i.e. reflected the post-transcriptional upregulation of *Adam17* expression when miR-342-3p is neutralized.



**Figure 4:** *Adam17* is targeted by miR-342-3p in OC precursors. (A) The predicted binding site for miR-342-3p into the mouse *Adam17* 3'UTR (microRNA.org). (B) Luciferase reporter assays were performed in HEK293 cells transfected with miR-342-3p mimic (miR-342-3p), antagomiR-342-3p (anti-342-3p) or control miRNAs. The luciferase activity was normalized on SEAP activity. Results are shown as fold changes (FC) on the miR-negative control condition (n=4). (C) Protein level of ADAM17 24h after transfection of RAW264.7 cells with miR-342-3p mimics and inhibitors. (D, E) An inverse correlation between miR-342-3p and *Adam17* expression levels is significantly found in RAW264.7 cells (n=5) (D) and a similar trend is observed in BMMs (n=6) (E) after miR-342-3p neutralization. MiR-342-3p and *Adam17* expression levels were measured 24h after cell transfection with anti-CT or anti-342-3p under pro-osteoclastic conditions. Relative gene and miRNA expression were normalized with *Gapdh* and sno202, respectively. Mean and SD are plotted. Unpaired t test for independent experiments (results given as FC) and Ratio paired t tests for matched experiments were used: p-value \*\*<0.01.

#### 4.5 In vivo delivery of miR-342-3p using DMAPAP/DOPE lipoplex targets OC precursors

We next determined whether the *in vivo* modulation of miR-342-3p expression could impact on the pathological OC formation and bone erosion associated with arthritis. Since miR-342-3p is widely expressed, we chose to selectively target OC precursors using the DMAPAP/DOPE cationic liposome that we previously developed to deliver small RNA triggers to circulating Ly6C<sup>high</sup> monocytes, and not to Ly6C<sup>low</sup> monocytes, upon intravenous injection [20,40]. We first validated the cell targeting upon intravenous injection using a fluorescent miRNA-dye547 or a non-fluorescent control to healthy mice. As previously described [40], we observed a selective uptake of miRNA by CD115<sup>+</sup> Ly6C<sup>int/high</sup> monocytes, and not Ly6C<sup>low</sup> monocytes, ranging from 20 to 30% of cells from the blood and spleen (Figure 5A). We also observed a very poor uptake by bone marrow monocytes in healthy condition (< 5%). Neutrophils were poorly targeted (1-7%) and lymphoid cells were spared in all specimens (Figure S4). We then injected intra-articularly the lipoplex formulation 7 days after STA induction in each ankle joints. We observed a preferential targeting of the CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> joint-associated monocytes (20-30%) and a slight targeting of infiltrated neutrophils (5-6%) in the same ranges as observed in systemic delivery (Figure 5B). Tissue resident Ly6C<sup>neg</sup> F4/80<sup>hi</sup> macrophages were poorly targeted (< 10%) (Figure 5B).

To assess the efficacy of the *in vivo* modulation of miRNA expression in targeted cells, we measured the expression level of miR-342-3p 24h after i.a. administration of the lipoplexes to arthritic mice. We found a strong miR-342-3p expression in mice injected with the lipoplexed mimics (p<0,001) and a decreased expression in mice injected with the lipoplexed antagomiR-342-3p (Figure 5C, up panel) as compared to controls. These results demonstrate the efficiency of *in vivo* modulation of miR-342-3p in OC precursors. Importantly, we also observed a reduction of *Adam17* expression level upon injection of the miR-342-3p mimic lipoplexes, which however did not reach significance (Figure 5C, bottom panel).



Figure 5: Efficient in vivo delivery of miR-342-3p to arthritis-associated OC precursors. (A) Healthy mice (n=3) were injected intravenously with the DMAPAP/DOPE cationic liposome (0,3 mM) formulated with either the fluorescent miRNA-dye547 (middle and right panels) or the anti-miR negative control (left panels) (miRNA 0,5 mg/kg). The uptake of the miRNA by Ly6C<sup>+</sup> monocytes was monitored 24h after administration using FACS analysis. Cells were collected from blood, spleen and bone marrow. Monocytes were defined as CD115<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>neg</sup> cells and low to high Ly6C<sup>+</sup>. (B) Arthritis was induced by injection of 100µl serum from arthritic KRN mice on day 0 and 1. The fluorescent miRNA-dye547 (miR-dye547 P1 and P2 right panels) or anti-miR negative control (miR-CTL P1 and P2 left panels) lipoplexes were injected intra-articularly into ankle joints on day 7 (n=2). Joint-associated cells were collected from the posterior paws (P1 and P2) 24h after administration and miRNA uptake monitored by FACS. The gating strategy of cell subsets is shown. Monocytes were defined as CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>F4/80<sup>neg</sup> cells; tissue resident macrophages were Ly6C<sup>neg</sup>F4/80<sup>high</sup> cells. (C) MiR-342-3p and Adam17 expression levels were measured by RT-qPCR in monocyte/macrophage enriched cell compartment of joint-associated cells isolated from arthritic mice 24h after i.a. administration of either miR-342-3p mimic (miR-342-3p), antagomiR-342-3p (anti-342-3p) or antagomiR-negative control (anti-CT) (n=4 per group). Relative gene and miRNA expression were normalized on Gapdh and sno202, respectively. Mean and SD are represented. Ordinary one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test: p-value \*\*\*<0,001.

## 4.6 Adam17/miR-342-3p axis might modulate the osteoclastogenic potential of arthritis-associated OC precursors.

To evaluate the impact of the miR-342-3p neutralization on the pathogenic bone erosion in inflammatory arthritis, we first designed a line therapy based on two i.v. injections of antagomiR-342-3p or antagomiR-negative control (anti-CT) at day 0 and day 4 after STA induction (Figure 6A). Although there was a trend to have a delayed arthritis and less severe inflammation in the group injected with the antagomiR-342-3p lipoplex, there was no difference in disease severity between groups as shown by the arthritic score (Figure 6B). To determine the efficacy of miR-342-3p neutralization on *Adam17* expression in arthritis-associated OC precursors, mice were sacrificed on day 11 and BM cells harvested from femur and tibia. BM-derived OCs were generated using M-CSF/RANKL stimulation for 5 days of culture. Seven days after the last injection of antagomiR-342-3p lipoplex, although the expression of miR-342-3p was back to control levels, the expression of *Adam17* was still significantly higher than in the control group (Figure 6C).



Figure 6: Therapeutic efficacy of the in vivo neutralization of miR-342-3p in arthritis-associated OC precursors upon intravenous injection. K/BxN serum-transfer arthritis (STA) was induced in C57Bl/6 mice, which were then injected i.v. with either antagomiR-342-3p (anti-342-3p) or antagomiR-negative control (anti-CT) lipoplexes (miRNA 0,5mg/kg and liposome 0,3 mM) on day 0 and 4 after STA induction (n=5 per group). Micro-computed tomography ( $\mu$ CT) imaging of femoral bones was performed at baseline and 1 day before sacrifice. Bone marrow (BM) cells were collected on day 11 and ex vivo derived into OCs. (A) Schematic representation of the designed experiment. (B) The arthritic score was based on the paw swelling measurement and the count of inflamed joints. Black arrows represent the treatment injections. (C) miR-342-3p and Adam17 expression levels were quantified in collected BM cells prior to OC differentiation. Relative gene and miRNA expression were normalized with Gapdh and sno202, respectively. (D) Bone volume (BV/TV), bone specific surface (BS/BV) and trabecular thickness (Tb.Th) were assessed by µCT. Bone parameters are represented as fold changes (FC) of measurements in arthritic paws compared to the related baseline. (E) The resorbing capacity of BM-derived OCs was quantified in osteo-assay plates by measuring the total resorbed pit area per well using ImageJ and CellProfiler 3.0.0 softwares. Mean and SD or SEM (B) are represented. Mann-Whitney test: p-value \*<0.05; ns: no significant.

To evaluate the impact on bone erosion, a  $\mu$ CT imaging of femoral trabecular bone was performed prior to STA induction as baseline and at day 10 of arthritis, i.e. 7 days after last lipoplex injections. Bone parameters of each arthritic paws were compared to the related baseline. Although the bone volume density (BV/TV %) remained unchanged in the control group, the bone surface degradation (BS/BV mm<sup>-1</sup>) was increased and the trabecular thickness (Tb.Th mm) was decreased. These data confirmed that bone erosion is evidenced as early as 10 days after STA induction (Figure 6D). However, there was no significant differences upon antagomir-342-3p treatment. A greater heterogeneity was found in the group that received antagomiR-342-3p than antagomiR-CT, particularly for the bone degradation (BS/BV) parameter (Figure 6D). We monitored the bone-resorbing capacity of the BM-derived OCs using osteo-assays. Although not significant, we observed a trend to a decrease of bone resorptive pit area with the OCs generated *ex vivo* from animals treated with antagomiR-342-3p (Figure 6E). Collectively, these results suggested that *Adam17*/miR-342-3p might modulate the osteoclastogenic potential of arthritis-associated OC precursors, but required supplementary experiments to optimally evidence the effect of miR-342-3p neutralization on bone erosion in arthritis.

#### 5. Discussion

Osteoclastogenesis is known to be regulated by several miRNAs from the precursor cell commitment to the differentiation into mature osteoclast (OC) [10]. Several miRNAs are dysregulated in rheumatoid arthritis (RA), mainly due to their involvement in controlling inflammation and activation of immune cells [12,13], but also to their role in controlling myeloid osteoclastogenic precursors [20]. In RA, pathological bone erosion is mediated by exacerbated osteoclastogenesis that locally takes place at the junction between the pannus and bone in the inflamed joints [41]. Recently, in experimental arthritis, it has been evidenced that pathogenic OCs in the pannus originate exclusively from circulating Ly6C<sup>+</sup> bone marrow-derived cells and not from resident macrophages or conventional OC precursors responsible for homeostatic bone remodeling in healthy conditions [5]. We thus hypothesized that miRNAs expressed in those circulating arthritis-associated OC precursors might control their osteoclastogenic potential and represent potential therapeutic targets to interfere with bone erosion of inflamed joints.

In the present study, we demonstrated the critical role of miR-342-3p in regulating osteoclastogenesis, particularly in the early steps of this biological process where miR-342-3p is highly expressed in OC precursors. We showed that miR-342-3p positively regulates OC differentiation in both primary bone marrow-derived macrophages (BMMs) and RAW264.7 cells by increasing their motility, leading to increased OC formation and function. We also found that the overexpression of miR-342-3p enhanced cell viability of OC precursors while its neutralization decreased cell survival associated with caspase-dependent apoptosis. The discrepancy between our results and those of a previous study that showed a reduced cell viability and increased macrophage apoptosis by miR-342-3p overexpression in RAW264.7 cells [42] might be explained by different cell culture conditions.

Collectively, we found that miR-342-3p acts as a pro-osteoclastic factor involved in common cell biological processes such as cell survival, apoptosis and motility. Interestingly, miR-342-3p is widely described as a tumor suppressor by negatively regulating cell proliferation, migration and invasion of tumor cells, in which miR-342-3p is aberrantly under-expressed [21,23,24,27,43]. These apparent opposite effects might be due to that OC precursors are non-tumoral cells, and thus that miR-342-3p play distinct roles according to the cell type, the pathophysiological context and the species studied. In addition, the expression of the genes targeted by miR-342-3p in human cancer cells, such as *FOXM1* [21], *AEG1* [23], *AGR2* [24], *FOXQ1* [27] and *MCT1* [43], remained unchanged in RAW264.7 cells after miR-342-3p loss-of-function. These findings reflect that regulation of gene expression by miRNAs is cell context-dependent [44].

Our transcriptomic analysis of OC precursors transfected with antagomiR-342-3p revealed that the gene set of upregulated potential miR-342-3p targets is mainly related to cell locomotion, apoptosis and catabolic activity. Among them, there was a cluster of genes recurrently enriched these biological pathways that includes *Adam17*, which is included in the list of putative miR-342-3p-repressed genes in macrophages [42]. ADAM17 is a metalloprotease capable of shedding more than 80 substrates at the

cell surface, including cytokines, growth factors and receptors [45]. Notably, ADAM17 can cleave the receptor for CSF-1 (CSF1R) in activated macrophages [35] and the receptor RANK under RANKL stimulation in a negative feedback loop [37]. Thus, we hypothesized that miR-342-3p promotes the early phase of osteoclastogenesis by attenuating the ADAM17-mediated shedding of the two main osteoclastic receptors CSF1R and RANK. We confirmed that *Adam17* is a new target for miR-342-3p as miR-342-3p directly binds to the 3'UTR *Adam17* mRNA and miR-342-3p neutralization increased ADAM17 protein expression in OC precursors at the early phase of osteoclastogenesis.

However, many post-translational events are involved in the regulation of ADAM17 activity [46], explaining that a transgenic Adam17 overexpressing mouse did not display enhanced shedding activity despite increased protein level [47]. Particularly, the sheddase activity of ADAM17 requires the surface exposure of phosphatidylserine (PS) [48], that generally happens during apoptosis [49]. A transient membrane asymmetry with a local PS exposure is also described in activated immune cells [50,51], which promotes the shedding of adhesion molecules involved in the cell recruitment and migration. Furthermore, its activity seems to be selective in response to stimuli that drive the shedding of related substrates, through a reversible mechanism [52]. In our study, the pro-osteoclastic condition induces the two MCSF/CSF1R and RANKL/RANK signaling pathways that are required for osteoclastogenesis. Hence, further experiments are needed to validate the effect of miR-342-3p neutralization on ADAM17 activity in live cells committed to osteoclastogenesis.

Interestingly, ADAM17 is also involved in podosome disassembly in macrophages and dendritic cells upon LPS stimulation [53,54], leading to a transient loss of cell migration [53]. Cabron et al. recently suggested that the analysis of podosomes could be a physiological readout to validate ADAM17 function in myeloid cells [54]. Although we did not find alterations in the actin-ring formation and podosome-belt in miR-342-3p-neutralized mature OCs, it will be interesting to evaluate the podosome structures in early stages, i.e. OC precursors, since we evidenced the role of miR-342-3p on cell motility at this stage.

Based on our findings on the negative effect of miR-342-3p neutralization on OC formation in vitro, we next worked out the in vivo miR-342-3p modulation in order to assess the arthritis-associated bone loss. It is well known that small RNAs, such as siRNAs and miRNAs, undergo fast enzymatic degradation by nucleases. Moreover, the cellular uptake is very poor due to their polyanionic nature. Hence, various strategies were developed to enhance the stability, the safety and the efficacy of the *in* vivo delivery of small RNAs, including chemical modifications and vectorization of the delivery system, such as cationic lipids, polymers, polypeptides and nanoparticles [55]. In this study, we used the cationic lipid DMAPAP/DOPE added with a DNA cargo as described by Rhinn et al. [28]. We previously demonstrated that this liposomal vector selectively delivers siRNAs to the myeloid compartment upon systemic delivery [56], and more precisely to the Ly6Chigh monocyte subset [40], although the mechanisms underlying this selective targeting remains undefined. We confirmed these previous observations using both systemic i.v. injections in healthy mice and in intra-articular (i.a.) injections into inflamed ankle joints of arthritic mice. Of note, the systemic delivery in healthy mice did not target bone marrow (BM) cells at 24h, suggesting that BM-resident cells are not affected by i.v. delivery and that targeted circulating cells did not emigrate into BM compartment in steady state. Our experimental conditions allowed to approximately target 30% of Ly6C+ circulating joint-associated monocytes at 24h. Further experiments are needed to improve this performance. We also ensured that in vivo delivery of miRNA modulators (mimic, control and inhibitor) selectively targeted Ly6C<sup>+</sup> monocytes while sparing the other immune cells such as neutrophils and lymphocytes. Importantly, aiming at improving the miRNA-related molecules, we demonstrated a significant modulation of miR-342-3p expression in monocytic OC precursors, which was very effective with the miR-342-3p mimic upon i.a. injection (100fold compared to the miR-negative control), as expected for miRNA mimics [20]. We also observed a 10-fold decrease of miR-342-3p expression after i.a. injection of miR-342-3p inhibitor, suggesting that our delivery strategy is convenient for both miRNA mimic and inhibitor.

Our first *in vivo* experiment based on the i.v. delivery of miR-342-3p inhibitor in the context of arthritis (STA model) did not show significant changes in the inflammation score nor in bone erosion. We injected the miRNA inhibitor at day 0 and day 4 after STA induction in order to target the circulating Ly6C<sup>+</sup> monocytes before they infiltrate the inflamed joints. Thus this approach revealed some limitations: i) the dose-effect was too mild and might be improved by more injections and/or a higher dose of miRNA inhibitor; ii) despite a 100% incidence in the STA model, we observed a great heterogeneity in the miR-342-3p-neutralized group, requiring another experiment with more animals to be able to conclude; iii) trabecular bone erosion was evaluated at the peak of arthritis (day 10) while it could be more relevant to perform later bone histomorphometry analyses, around day 21 when bone erosion is more obvious [57]; iv) miR-342-3p mimic has not been evaluated.

#### 6. Conclusion

Recent advances in characterizing the arthritis-associated OC precursors highlighted that circulating OC precursors would be interesting targets in the therapeutic strategy aimed at attenuating focal bone erosion in RA. MiR-342-3p is a pro-osteoclastic factor overexpressed in such OC precursors. Future studies are needed to determine whether miR-342-3p blockade in OC precursors effectively helps to reduce arthritis-associated bone loss.

Author Contributions: C.L. performed the experiments, analyzed data, and contributed to the writing. Va.E, G.C., H.C., L.M., C.B-W and Vi.E. contributed to the *in vitro* and *in vivo* experiments. C.H., H.M-M. and H-J.G. performed RNA-seq and analysis. I.D-R. and F.A. supervised the work, designed the study, analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. All authors were involved in reading and editing the manuscript, and approved the final version.

**Fundings:** This research was funded by INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier, the ANR grant ORIOS (ANR-16-CE14-0030-02) and the Arthritis Fondation Courtin.

Acknowledgments: We acknowledged the MRI platform of imaging, particularly Hassan Boukhaddaoui (INSERM U1051, INM, Montpellier, France) for its help in the recording of cultured cells. We acknowledged Karine Toupet from the Ecell platform (INSERM U1183, IRMB, Montpellier, France) for her expertise in micro-CT scan and data analysis. We acknowledged Pierre Fontanaud (IGF, CNRS, Montpellier, France) for its help in the data analysis of cell 2D displacement using Matlab software.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

#### References

1. Smolen, J.S.; Aletaha, D.; Barton, A.; Burmester, G.R.; Emery, P.; Firestein, G.S.; Kavanaugh, A.; McInnes, I.B.; Solomon, D.H.; Strand, V.; et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* **2018**, *4*, 1–23, doi:10.1038/nrdp.2018.1.

2. Kerschbaumer, A.; Sepriano, A.; Smolen, J.S.; Heijde, D. van der; Dougados, M.; Vollenhoven, R. van; McInnes, I.B.; Bijlsma, J.W.J.; Burmester, G.R.; Wit, M. de; et al. Efficacy of pharmacological treatment in rheumatoid arthritis: a systematic literature research informing the 2019 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2020**, doi:10.1136/annrheumdis-2019-216656.

3. Ibáñez, L.; Abou-Ezzi, G.; Ciucci, T.; Amiot, V.; Belaïd, N.; Obino, D.; Mansour, A.; Rouleau, M.; Wakkach, A.; Blin-Wakkach, C. Inflammatory Osteoclasts Prime TNFα-Producing CD4+ T Cells and Express CX3 CR1. *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 1899–1908, doi:10.1002/jbmr.2868.

4. Madel, M.-B.; Ibáñez, L.; Wakkach, A.; de Vries, T.J.; Teti, A.; Apparailly, F.; Blin-Wakkach, C. Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. *Front Immunol* **2019**, *10*, 1408, doi:10.3389/fimmu.2019.01408.

5. Hasegawa, T.; Kikuta, J.; Sudo, T.; Matsuura, Y.; Matsui, T.; Simmons, S.; Ebina, K.; Hirao, M.; Okuzaki, D.; Yoshida, Y.; et al. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. *Nature Immunology* **2019**, *20*, 1631–1643, doi:10.1038/s41590-019-0526-7.

6. Jacome-Galarza, C.E.; Percin, G.I.; Muller, J.T.; Mass, E.; Lazarov, T.; Eitler, J.; Rauner, M.; Yadav, V.K.; Crozet, L.; Bohm, M.; et al. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature* **2019**, doi:10.1038/s41586-019-1105-7.

7. Yahara, Y.; Barrientos, T.; Tang, Y.J.; Puviindran, V.; Nadesan, P.; Zhang, H.; Gibson, J.R.; Gregory, S.G.; Diao, Y.; Xiang, Y.; et al. Erythromyeloid progenitors give rise to a population of osteoclasts that contribute to bone homeostasis and repair. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 49–59, doi:10.1038/s41556-019-0437-8.

8. Krishnamurthy, A.; Ytterberg, A.J.; Sun, M.; Sakuraba, K.; Steen, J.; Joshua, V.; Tarasova, N.K.; Malmström, V.; Wähämaa, H.; Réthi, B.; et al. Citrullination Controls Dendritic Cell Transdifferentiation into Osteoclasts. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 3143–3150, doi:10.4049/jimmunol.1800534.

9. Harre, U.; Georgess, D.; Bang, H.; Bozec, A.; Axmann, R.; Ossipova, E.; Jakobsson, P.-J.; Baum, W.; Nimmerjahn, F.; Szarka, E.; et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1791–1802, doi:10.1172/JCI60975.

10. Lozano, C.; Duroux-Richard, I.; Firat, H.; Schordan, E.; Apparailly, F. MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation? *Front Immunol* **2019**, *10*, 375, doi:10.3389/fimmu.2019.00375.

11. Gennari, L.; Bianciardi, S.; Merlotti, D. MicroRNAs in bone diseases. *Osteoporos Int* **2017**, *28*, 1191–1213, doi:10.1007/s00198-016-3847-5.

12. Tavasolian, F.; Abdollahi, E.; Rezaei, R.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Henrotin, Y.; Sahebkar, A. Altered Expression of MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 478–487, doi:10.1002/jcb.26205.

13. Evangelatos, G.; Fragoulis, G.E.; Koulouri, V.; Lambrou, G.I. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: From pathogenesis to clinical impact. *Autoimmun Rev* **2019**, *18*, 102391, doi:10.1016/j.autrev.2019.102391.

14. Su, L.-C.; Huang, A.-F.; Jia, H.; Liu, Y.; Xu, W.-D. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* **2017**, *20*, 1631–1637, doi:10.1111/1756-185X.13202.

15. Blüml, S.; Bonelli, M.; Niederreiter, B.; Puchner, A.; Mayr, G.; Hayer, S.; Koenders, M.I.; van den Berg, W.B.; Smolen, J.; Redlich, K. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* **2011**, *63*, 1281–1288, doi:10.1002/art.30281.

16. Kurowska-Stolarska, M.; Alivernini, S.; Ballantine, L.E.; Asquith, D.L.; Millar, N.L.; Gilchrist, D.S.; Reilly, J.; Ierna, M.; Fraser, A.R.; Stolarski, B.; et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 11193–11198, doi:10.1073/pnas.1019536108.

17. Pauley, K.M.; Satoh, M.; Chan, A.L.; Bubb, M.R.; Reeves, W.H.; Chan, E.K. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* **2008**, *10*, R101, doi:10.1186/ar2493.

18. Nakasa, T.; Shibuya, H.; Nagata, Y.; Niimoto, T.; Ochi, M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **2011**, *63*, 1582–1590, doi:10.1002/art.30321.

19. Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Chang, K.-J.; Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 12481–12486, doi:10.1073/pnas.0605298103.

20. Ammari, M.; Presumey, J.; Ponsolles, C.; Roussignol, G.; Roubert, C.; Escriou, V.; Toupet, K.; Mausset-Bonnefont, A.-L.; Cren, M.; Robin, M.; et al. Delivery of miR-146a to Ly6C <sup>high</sup> Monocytes Inhibits Pathogenic Bone Erosion in Inflammatory Arthritis. *Theranostics* **2018**, *8*, 5972–5985, doi:10.7150/thno.29313.

21. Li, X.-R.; Chu, H.-J.; Lv, T.; Wang, L.; Kong, S.-F.; Dai, S.-Z. miR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 3298–3307, doi:10.1016/j.febslet.2014.07.020.

22. Xie, X.; Liu, H.; Wang, M.; Ding, F.; Xiao, H.; Hu, F.; Hu, R.; Mei, J. miR-342-3p targets RAP2B to suppress proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 5031–5038, doi:10.1007/s13277-015-3154-3.

23. Zhang, S.; Liu, L.; Lv, Z.; Li, Q.; Gong, W.; Wu, H. MicroRNA-342-3p Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion of Osteosarcoma Cells by Targeting Astrocyte-Elevated Gene-1 (AEG-1). *Oncol. Res.* **2017**, *25*, 1505–1515, doi:10.3727/096504017X14886485417426.

24. Xue, X.; Fei, X.; Hou, W.; Zhang, Y.; Liu, L.; Hu, R. miR-342-3p suppresses cell proliferation and migration by targeting AGR2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **2018**, *412*, 170–178, doi:10.1016/j.canlet.2017.10.024.

25. Cui, Z.; Zhao, Y. microRNA-342-3p targets FOXQ1 to suppress the aggressive phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 104, doi:10.1186/s12885-018-5225-5.

26. Song, X.; Jin, Y.; Yan, M.; Zhang, Y.; Chen, B. MicroRNA-342-3p functions as a tumor suppressor by targeting LIM and SH3 protein 1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* **2019**, *17*, 688–696, doi:10.3892/ol.2018.9637.

27. Wang, C.; Zhang, W.; Xing, S.; Wang, Z.; Wang, J.; Qu, J. MiR-342-3p inhibits cell migration and invasion through suppressing forkhead box protein Q1 in ovarian carcinoma. *Anticancer Drugs* **2019**, *30*, 917–924, doi:10.1097/CAD.00000000000801.

28. Rhinn, H.; Largeau, C.; Bigey, P.; Kuen, R.L.; Richard, M.; Scherman, D.; Escriou, V. How to make siRNA lipoplexes efficient? Add a DNA cargo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2009**, 1790, 219–230, doi:10.1016/j.bbagen.2009.01.005.

29. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635.

30. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 166–169, doi:10.1093/bioinformatics/btu638.

31. Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M.Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 731–740, doi:10.1038/nmeth.3901.

32. Snel, B.; Lehmann, G.; Bork, P.; Huynen, M.A. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3442–3444, doi:10.1093/nar/28.18.3442.

33. Dweep, H.; Gretz, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 697, doi:10.1038/nmeth.3485.

34. Black, R.A.; Rauch, C.T.; Kozlosky, C.J.; Peschon, J.J.; Slack, J.L.; Wolfson, M.F.; Castner, B.J.; Stocking, K.L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **1997**, *385*, 729–733, doi:10.1038/385729a0.

35. Rovida, E.; Paccagnini, A.; Del Rosso, M.; Peschon, J.; Dello Sbarba, P. TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 1583–1589.

36. Horiuchi, K.; Miyamoto, T.; Takaishi, H.; Hakozaki, A.; Kosaki, N.; Miyauchi, Y.; Furukawa, M.; Takito, J.; Kaneko, H.; Matsuzaki, K.; et al. Cell Surface Colony-Stimulating Factor 1 Can Be Cleaved by TNF- Converting Enzyme or Endocytosed in a Clathrin-Dependent Manner. *The Journal of Immunology* **2007**, *179*, 6715–6724, doi:10.4049/jimmunol.179.10.6715.

37. Hakozaki, A.; Yoda, M.; Tohmonda, T.; Furukawa, M.; Hikata, T.; Uchikawa, S.; Takaishi, H.; Matsumoto, M.; Chiba, K.; Horiuchi, K.; et al. Receptor Activator of NF-κB (RANK) Ligand Induces Ectodomain Shedding of RANK in Murine RAW264.7 Macrophages. *The Journal of Immunology* **2010**, *184*, 2442–2448, doi:10.4049/jimmunol.0901188.

38. Kanzaki, H.; Makihira, S.; Suzuki, M.; Ishii, T.; Movila, A.; Hirschfeld, J.; Mawardi, H.; Lin, X.; Han, X.; Taubman, M.A.; et al. Soluble RANKL Cleaved from Activated Lymphocytes by TNF-α–Converting Enzyme Contributes to Osteoclastogenesis in Periodontitis. *The Journal of Immunology* **2016**, *197*, 3871–3883, doi:10.4049/jimmunol.1601114.

39. Lum, L.; Wong, B.R.; Erdjument-Bromage, H.; ndorff, J.S.; Tempst, P.; Choi, Y.; Blobel, C.P. Evidence for a Role of a Tumor Necrosis Factor-\_\_ (TNF-\_\_)-converting Enzyme-like Protease in Shedding of TRANCE, a TNF Family Member Involved in Osteoclastogenesis and Dendritic Cell Survival. **2018**, 7.

40. Présumey, J.; Courties, G.; Louis-Plence, P.; Escriou, V.; Scherman, D.; Pers, Y.-M.; Yssel, H.; Pène, J.; Kyburz, D.; Gay, S.; et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin expression by inflammatory monocytes mediates arthritis pathogenesis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2013**, *72*, 1717–1724, doi:10.1136/annrheumdis-2012-202403.

41. Schett, G.; Gravallese, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* **2012**, *8*, 656–664, doi:10.1038/nrrheum.2012.153.

42. Czimmerer, Z.; Varga, T.; Kiss, M.; Vázquez, C.O.; Doan-Xuan, Q.M.; Rückerl, D.; Tattikota, S.G.; Yan, X.; Nagy, Z.S.; Daniel, B.; et al. The IL-4/STAT6 signaling axis establishes a conserved microRNA signature in human

and mouse macrophages regulating cell survival via miR-342-3p. *Genome Med* **2016**, *8*, 63, doi:10.1186/s13073-016-0315-y.

43. Romero-Cordoba, S.L.; Rodriguez-Cuevas, S.; Bautista-Pina, V.; Maffuz-Aziz, A.; D'Ippolito, E.; Cosentino, G.; Baroni, S.; Iorio, M.V.; Hidalgo-Miranda, A. Loss of function of miR-342-3p results in MCT1 over-expression and contributes to oncogenic metabolic reprogramming in triple negative breast cancer. *Sci Rep* **2018**, *8*, 12252, doi:10.1038/s41598-018-29708-9.

44. Sun, Y.-M.; Lin, K.-Y.; Chen, Y.-Q. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol* **2013**, *6*, 6, doi:10.1186/1756-8722-6-6.

45. Zunke, F.; Rose-John, S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2017**, *1864*, 2059–2070, doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.001.

46. Düsterhöft, S.; Babendreyer, A.; Giese, A.A.; Flasshove, C.; Ludwig, A. Status update on iRhom and ADAM17: It's still complicated. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2019**, *1866*, 1567–1583, doi:10.1016/j.bbamcr.2019.06.017.

47. Yoda, M.; Kimura, T.; Tohmonda, T.; Morioka, H.; Matsumoto, M.; Okada, Y.; Toyama, Y.; Horiuchi, K. Systemic overexpression of TNF $\alpha$ -converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54412, doi:10.1371/journal.pone.0054412.

48. Sommer, A.; Kordowski, F.; Büch, J.; Maretzky, T.; Evers, A.; Andrä, J.; Düsterhöft, S.; Michalek, M.; Lorenzen, I.; Somasundaram, P.; et al. Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat Commun* **2016**, *7*, 11523, doi:10.1038/ncomms11523.

49. Segawa, K.; Nagata, S. An Apoptotic "Eat Me" Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* **2015**, 25, 639–650, doi:10.1016/j.tcb.2015.08.003.

50. Schaff, U.; Mattila, P.E.; Simon, S.I.; Walcheck, B. Neutrophil adhesion to E-selectin under shear promotes the redistribution and co-clustering of ADAM17 and its proteolytic substrate L-selectin. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *83*, 99–105, doi:10.1189/jlb.0507304.

51. Mishra, H.K.; Ma, J.; Walcheck, B. Ectodomain Shedding by ADAM17: Its Role in Neutrophil Recruitment and the Impairment of This Process during Sepsis. *Front Cell Infect Microbiol* **2017**, *7*, 138, doi:10.3389/fcimb.2017.00138.

52. Le Gall, S.M.; Maretzky, T.; Issuree, P.D.A.; Niu, X.-D.; Reiss, K.; Saftig, P.; Khokha, R.; Lundell, D.; Blobel, C.P. ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J. Cell. Sci.* **2010**, *123*, 3913–3922, doi:10.1242/jcs.069997.

53. West, M.A.; Prescott, A.R.; Chan, K.M.; Zhou, Z.; Rose-John, S.; Scheller, J.; Watts, C. TLR ligand–induced podosome disassembly in dendritic cells is ADAM17 dependent. *The Journal of Cell Biology* **2008**, *182*, 993–1005, doi:10.1083/jcb.200801022.

54. Cabron, A.-S.; El azzouzi, K.; Boss, M.; Arnold, P.; Schwarz, J.; Rosas, M.; Dobert, J.P.; Pavlenko, E.; Schumacher, N.; Renné, T.; et al. Structural and Functional Analyses of the Shedding Protease ADAM17 in HoxB8-Immortalized Macrophages and Dendritic-like Cells. *The Journal of Immunology* **2018**, 201, 3106–3118, doi:10.4049/jimmunol.1701556.

55. Higuchi, Y.; Kawakami, S.; Hashida, M. Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress. *BioDrugs* **2010**, 24, 195–205, doi:10.2165/11534450-00000000-00000.

56. Courties, G.; Seiffart, V.; Presumey, J.; Escriou, V.; Scherman, D.; Zwerina, J.; Ruiz, G.; Zietara, N.; Jablonska, J.; Weiss, S.; et al. In vivo RNAi-mediated silencing of TAK1 decreases inflammatory Th1 and Th17 cells through targeting of myeloid cells. *Blood* **2010**, *116*, 3505–3516, doi:10.1182/blood-2010-02-269605.

57. Pettit, A.R.; Ji, H.; von Stechow, D.; Müller, R.; Goldring, S.R.; Choi, Y.; Benoist, C.; Gravallese, E.M. TRANCE/RANKL Knockout Mice Are Protected from Bone Erosion in a Serum Transfer Model of Arthritis. *The American Journal of Pathology* **2001**, *159*, 1689–1699, doi:10.1016/S0002-9440(10)63016-7.

#### Supplementary Materials:



**Figure S1: Expression level of OC-associated genes** *Nfatc1* and *Acp5* during osteoclastogenesis. (A-D) The kinetic of expression of key genes *Nfatc1* and *Acp5* was measured in monocytes (MN, n=2) (A), immature dendritic cells (DC, n=2) (B), bone marrow-derived macrophages (BMM, n=2) (C) and monocytic RAW264.7 cells (RAW, n=7) (D) during osteoclast (OC) differentiation. The early induction of the transcription factor *Nfatc1* and the late increase of *Acp5* expression coding for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) confirmed a normal and achieved osteoclastogenesis in 4 to 5 days in all cell subsets studied. Relative expression was normalized with *Gapdh*. Mean and SD are plotted. Ordinary one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons relative to the starting time point were performed: p-value \*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0.001.



Figure S2: *In vitro* modulation of miR-342-3p expression: kinetic of gene expression and caspase activity during osteoclastogenesis. (A-B) Kinetic of expression of the key genes *Nfatc1* (A) and *Acp5* (B) during osteoclastogenesis in RAW264.7 cells in two independent experiments. Cells were transfected with either control miRNA mimics (miR-CT) and antagonists (anti-CT), or miR-342-3p mimics (miR-342-3p) and antagonists (anti-342-3p). (C) Persistent modulation of miR-342-3p in transfected RAW264.7 cells and BMMs. The fold change of miR-342-3p expression level compared to the respective miR-controls was measured at 120h in RAW264.7 cells (n=13) and at 48h in BMMs (n=6). (D) The recording of caspase 3/7 activity in transfected RAW264.7 cells under RANKL stimulation is indicated for miR-342-3p and anti-342-3p conditions for 72h (triplicates in one representative experiment). The image captures and data analysis were performed using the Incucyte system. Relative gene and miRNA expression were normalized with *Gapdh* and sno202, respectively. Mean and SD are plotted. Ordinary one-way ANOVA test was performed for the kinetic of gene expression. Mann-Whitney test was used for independent experiments. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used on the mean values of triplicates for caspase activity. P-value \*\*<0.01, \*\*\*\*<0.0001.



**Figure S3: The actin-ring formation is conserved in RAW-derived OCs. (A)** Immunofluorescent staining of podosome structures using vinculin (red) and F-actin (green) stainings highlighted the actin-ring formation that is stabilized into a podosome-belt structure at the cell periphery in multinucleated mature OCs in all conditions of miR-342-3p loss- and gain-of-functions (x10 magnification). (B) The podosome-belt consists in a peripheral circle of vinculin around the actin ring. The numerous actin columns depicted as irregular green points are classically observed when OCs evolve on glass (x63 magnification). Nuclei are stained with Hoechst dye (blue).



**Figure S4: Poor miRNA uptake by Ly6C**<sup>neg</sup> **immune cells after i.v. delivery of DMAPAP/DOPE lipoplex.** We i.v. injected 200µl of DMAPAP/DOPE liposome 20mM containing miRNA dosed at 0.5 mg/kg in 3 healthy C57Bl/6 mice. Samples were collected 24h after i.v. injection and monitored by FACS. The uptake of a fluorescent miRNA (miRNA-Dye547) was measured in blood, spleen and bone marrow Ly6C<sup>neg</sup> immune cells, i.e. Ly6G<sup>+</sup> neutrophils (upper panels), CD90<sup>+</sup> T lymphocytes and NK cells (medium panels) and CD19<sup>+</sup> B lymphocytes (bottom panels). One mouse received an unlabelled antagomiR-negative control to define thresholds (dot plots in left column for each of the 3 compartments). Percentages of positive labelled cells are shown.

#### Supplemental Table captions

**Table S1: Differentially expressed genes in RAW264.7 cells after miR-342-3p neutralization.** The transcriptomic analysis was performed 24h after the induction of osteoclastogenesis. Cells were transfected with a miR-342-3p inhibitor or a miR-negative control (n=3 per condition). The selection of significant differentially expressed genes was based on a fold change higher than 1.2 and a corrected false discovery rate (FDR) p-value less than 0.01.

**Table S2: Enrichment of biological processes for the differentially expressed genes after miR-342-3p neutralization.** The biological processes were found using the web-server STRING and the KEGG pathway database. The gene enrichment is detailed for each biological process and matching proteins are listed.

**Table S3: miR-342-3p putative targeted genes.** Among the 664 over-expressed genes in anti-miR-342-3p condition, we selected those that are putatively targeted by miR-342-3p according to all 4 queried algorithms (TargetScan, Miranda, RNA22 and miRWalk).

**Table S4: Pathway enrichment analysis for the 44 genes putatively targeted by miR-342-3p**. The gene enrichment is detailed for each pathway and false discovery rates are given. Biological pathways particularly of interest are depicted in bold.

## Résultats complémentaires sur la régulation fonctionnelle de miR-342-3p

#### Expression de miR-342-3p et de son gène hôte Evl

MiR-342-3p est un miARN intronique situé dans le gène *Evl* (Enah/Vasp-Like) et orienté dans le même sens de lecture, suggérant une co-expression miR-342/Evl (Figure 1A), comme cela est classiquement décrit dans la biogenèse des miARNs introniques (Kim and Kim 2007). J'ai mesuré l'expression de miR-342-3p et de son gène hôte *Evl* dans les t-OCs et i-OCs, ainsi que dans leurs précurseurs respectifs. Les résultats confirment une co-expression globale de miR-342-3p et d'*Evl*, avec une surexpression marquée dans les DC immatures comparée aux monocytes (Figure 1B). Cette surexpression persiste dans les i-OCs par rapport aux t-OCs, bien que la différence soit moins marquée en fin de différenciation (Figure 1C). Mes résultats préliminaires confortent l'hypothèse d'une « signature DC » des i-OCs.



**Figure 1. Co-expression de miR-342-3p et de son gène hôte** *Evl* dans les ostéoclastes et leurs **précurseurs.** La séquence intronique de miR-342 implique une co-expression de miR-342 et de son gène hôte *Evl* (A). Les niveaux d'expressions d'*Evl* et de miR-342-3p ont été mesurés par RT-qPCR dans les précurseurs ostéoclastiques de type monocytaire (MN) et de type cellules dendritiques immatures (DC) (B), et dans les ostéoclastes matures purifiés générés *in vitro* à partir de ces précurseurs (C). Expressions relatives de miR-342 et d'*Evl* respectivement normalisées sur sno202 et

*Gapdh*. MN : monocytes ; DC : cellules dendritiques immatures ; t-OCs : ostéoclastes tolérogènes dérivés des MN ; i-OCs : ostéoclastes inflammatoires dérivés des DC. Mann-Whitney test : p-value \*< 0,05 ; \*\*< 0,01.

La co-expression de miR-342-3p et de son gène hôte *Evl* amène la question de leur rôle respectif dans l'ostéoclastogenèse. En particulier l'existence possible d'un rôle prépondérant d'*Evl* qui induirait de façon collatérale l'expression de miR-342-3p lors de l'épissage de son ARN messager, l'intron contenant la séquence de miR-342-3p pouvant être pris en charge en parallèle par le complexe Drosha-DGCR8 (Kim and Kim 2007). EVL, Mena et VASP forment la famille des protéines Ena/Vasp. Ces protéines interagissent avec l'actine et se localisent à l'extrémité des filopodes et des lamellipodes. Elles régulent la formation et la motilité des lamellipodes (Krause et al. 2002), et sont particulièrement impliquées dans le développement du système nerveux, notamment dans l'initiation des neurites et la croissance des axones (Drees and Gertler 2008). Par similarité, EVL pourrait être impliqué dans la motilité et l'activation des cellules dendritiques, mais cela n'a encore jamais été rapporté.

La régulation de l'expression de miR-342-3p semble être clairement dépendante du promoteur du gène *Evl*, car il n'a pas été identifié de région régulatrice spécifique de miR-342-3p de type « micro-promoteur », comme cela a pu être retrouvé pour d'autres miARNs (Berezikov 2011). Une régulation négative de l'expression d'*EVL*/miR-342-3p a été décrite au niveau épigénétique par la méthylation du promoteur (intégré dans un ilôt CpG) dans le myélome multiple (Z. Li et al. 2018) et dans le cancer colorectal (Grady et al. 2008). Dans ce contexte, la suppression de miR-342-3p apparaît être un mécanisme d'échappement tumoral.

#### Régulation de miR-342-3p par les ARNs non codants endogènes

Une partie du génome est transcrite en ARNs qui ne sont jamais traduits en protéines. Ces ARN non codants (ARNnc) sont généralement classés en fonction de leur taille en utilisant un seuil arbitraire de 200 nucléotides. Les ARNnc courts comprennent les miARNs et les petits ARN interférents (ARNi). Les longs ARNnc (IncRNA en anglais) forment un groupe hétérogène de fonction largement inconnue, et sont généralement peu exprimés (de Hoon, Shin, and Carninci 2015). Certains sont des pseudogènes, c'est-à-dire des copies de gènes codants hébergeant des mutations les rendant non codants. Les séquences des IncRNA peuvent être soit chevauchantes au niveau des gènes codants, soit intergéniques (lincRNA) (Ransohoff, Wei, and Khavari 2018). La structure des IncRNA est généralement linéaire, mais peut aussi présenter une forme circulaire (circRNA) plus stable car résistante aux exonucléases. Les IncRNA joueraient un rôle de régulation post-transcriptionnel de l'expression des gènes par le

biais des miARNs. En effet, les IncRNA peuvent être une source de miARN, dont la séquence est intégrée au niveau intronique ou exonique du IncRNA (Dykes and Emanueli 2017). Un autre mécanisme de régulation récemment discuté est la capacité de séquestration des miARNs par les IncRNA qui portent des sites de liaison reconnus par les miARNs. Ce phénomène d' « éponge biologique » empêche ainsi le miARN de contrôler sa cible ARNm (Thomson and Dinger 2016). Une littérature récente décrit plusieurs IncRNA capables de séquestrer miR-342-3p et de réguler ses fonctions biologiques, en particulier dans le domaine de l'oncologie (Tableau 1). Une surexpression de ces IncRNA dans les cellules cancéreuses induit une perte de fonction de miR-342-3p et favorise ainsi le processus de tumorigenèse.

ARNnc endogènes	Pathologies	Source
IncRNA H19	Cancer de la vessie	(SH. Wang et al. 2016)
	Endométriose	(Z. Liu et al. 2019)
IncRNA SCARNA2	Cancer colorectal	(PF. Zhang et al. 2019)
	Carcinome épidermoïde cutané	(Z. Zhang et al. 2020)
IncRNA ZEB1-AS1	Cancer de la prostate	(Ma et al. 2020b)
IncRNA OIP5-AS1	Cancer du pancréas	(Meng et al. 2020)
IncRNA FTX	Gliome	(W. Zhang et al. 2017)
IncRNA SNHG7	Cancer du pancréas	(D. Cheng et al. 2019)
IncRNA SNHG16	Myélome multiple	(X. Yang et al. 2020)
linc00313	Glioblastome	(Shao et al. 2019)
	Ostéosarcome	(H. Chen et al. 2020)
linc00460	Cancer gastrique	(F. Wang et al. 2018)
	Carcinome hépatocellulaire	(Hong et al. 2020)
	Carcinome hépatocellulaire	(J. Yang et al. 2020)
linc01503	Cancer du col de l'utérus	(Peng et al. 2020)
linc00634	Carcinome épidermoïde de l'œsophage	(Xiaohong Zhang et al. 2020)
circSAMD4A	Ostéosarcome	(C. Xie et al. 2020)
circCCDC66	Anévrysme aortique	(R. Yang et al. 2020)

Tableau 1. Régulation de miR-342-3p par les ARNs non codants endogènes.

La question de la régulation fonctionnelle de miR-342-3p par les IncRNA n'a pas été abordée dans mon projet de thèse. Caractériser les IncRNA pendant la différenciation ostéoclastique permettrait d'intégrer plus d'éléments dans la compréhension du rôle de miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse. De plus, l'expression de certains IncRNA est dérégulée dans le contexte de l'arthrite (J. Wang et al. 2019). Leurs fonctions restent cependant très peu étudiées. Ils pourraient être impliqués dans l'engagement des précurseurs des i-OCs, mais cela n'a encore jamais été rapporté.

# Discussion générale

Les résultats obtenus dans ce projet de thèse ont déjà été discutés dans les articles en anglais correspondants. Cette partie est consacrée à une discussion plus générale sur les avancées obtenues et les limites de l'étude.

#### Signature moléculaire des ostéoclastes inflammatoires

Mon travail de thèse a reposé sur l'étude des miARNs dans l'ostéoclastogenèse et leur implication dans l'hétérogénéité fonctionnelle des OCs. Dans un premier temps, j'ai établi la signature miARN de deux sous-types d'OCs définis selon leurs propriétés immunologiques précédemment décrites chez la souris : les OCs tolérogènes (t-OCs) et les OCs inflammatoires (i-OCs) (Ibáñez et al. 2016). J'ai ensuite validé des miARNs discriminants entre les t-OCs et les i-OCs en condition physiologique (souris saine) et en condition inflammatoire (souris arthritiques). Il est apparu que miR-155, miR-146b et miR-342-3p sont très spécifiques des i-OCs où ils sont fortement exprimés. Ces premiers résultats ont permis de démarrer un deuxième projet sur l'étude de miR-342-3p dont le rôle dans l'ostéoclastogenèse était encore inconnu.

L'étude isolée du miRNome reste cependant assez limitée dans l'étude de l'hétérogénéité fonctionnelles des OCs. Une analyse transcriptomique avec les possibles relations entre les miARNs et les gènes dérégulés apporte une vue plus globale et intégrée des mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions cellulaires des t-OCs et des i-OCs. Dans le cadre de mon projet, j'ai établi une analyse transcriptomique par RNA-Seq et la mise en connexion avec les miARNs discriminants dans les t-OCs et les i-OCs issus de la souris saine. Cela m'a permis d'identifier certains réseaux de gènes et de miARNs distincts entre ces deux types d'OCs. De façon intéressante, les voies biologiques sur-exprimées dans les i-OCs seraient associées à leurs fonctions immunologiques, telles que la capacité de production de chimiokines et plus globalement les interactions avec les cellules du système immunitaire. Ce profil transcriptomique peut aussi être hérité des cellules dendritiques utilisées comme précurseurs des i-OCs dans notre modèle. Dans le futur, il serait intéressant d'explorer le rôle de ces miARNs dans les fonctions immunologiques des i-OCs.

Très récemment, Madel et al. ont démontré une hétérogénéité fonctionnelle au sein même des i-OCs (Madel et al. 2020). Dans cette étude, les i-OCs ont été produits à partir de cellules

dendritiques selon leur protocole précédemment établi (Ibáñez et al. 2016). Leur précédente observation d'une persistance non classique de l'expression du récepteur à la fractalkine CX3CR1 par une sous-population minoritaire d'i-OCs (environ 25%) (Ibáñez et al. 2016) les a conduits à étudier séparément les i-OCs CX3CR1<sup>pos</sup> et les i-OCs CX3CR1<sup>neg</sup>. Leurs analyses transcriptomiques et fonctionnelles ont montré que les i-OCs CXCR1<sup>neg</sup> sur-expriment les gènes clés des fonctions ostéoclastiques et ont une plus forte capacité de résorption *in vitro* ; ils conservent également les propriétés immunologiques des i-OCs CX3CR1<sup>pos</sup> ont une activité immunosuppressive expliquée par l'expression de PD-L1, impliqué dans l'inhibition de l'activation lymphocytaire T via l'axe PD-1/PD-L1 (Madel et al. 2020).

Il est apparu que les i-OCs CX3CR1<sup>pos</sup> sur-expriment les gènes Ncf1, Infgr1, Trem2, Lilrb4, Fosb, Socs3, Nfatc2 et Ccnd2, précédemment retrouvés associés aux i-OCs dans notre étude. Cependant, il serait nécessaire de faire une étude comparative globale intégrant les t-OCs et les deux sous-types d'i-OCs pour replacer la sous-population des i-OCs CX3CR1<sup>pos</sup> sur le plan transcriptionnel. De façon intéressante, les deux sous-types d'i-OCs conservent l'expression des gènes relatifs aux interactions immunitaires, et à la présentation antigénique ; les phénotypes très différents des i-OCs seraient principalement expliqués par l'expression de molécules inhibitrices telle que PD-L1 pour les i-OCs CX3CR1pos. Par ailleurs, dans notre étude, les t-OCs et les i-OCs présentent le même profil transcriptomique au niveau des gènes associés à l'ostéoclastogenèse, tandis que les i-OCs CX3CR1<sup>pos</sup> montrent clairement une sous-expression de ces gènes par rapport aux i-OCs CX3CR1<sup>neg</sup>, ce qui est corrélé à leur fonction de résorption diminuée. Notre vue globale des i-OCs n'a pas tenu compte des deux sous-types d'i-OCs nouvellement décrits. Enfin, l'expression de CX3CR1 est clairement insuffisante pour caractériser les OCs, d'autant que l'expression de cette molécule est classiquement diminuée durant l'ostéoclastogenèse, et que les t-OCs et les i-OCS fonctionnels sont CX3CR1<sup>neg</sup>. Une lecture attentive de nos données transcriptomiques montre toutefois que CX3CR1 est plus exprimé dans les i-OCs (-log(p-value) =1,10), ce qui pourrait refléter le contingent minoritaire de « i-OCs like » CX3CR1pos.

Cela illustre la diversité phénotypique et fonctionnelle des OCs, qui étaient, jusqu'il y a peu, considérés comme de simples macrophages « mangeurs d'os ».



<u>Figure 1 : L'hétérogénéité fonctionnelle des OCs se diversifie</u>. Depuis la première description fonctionnelle des t-OCs et des i-OCs à partir d'un modèle d'étude chez la souris (Ibáñez et al. 2016), des travaux récents ont décrit deux sous-types d'i-OCs (Madel et al. 2020). Les i-OCs majoritaires correspondent aux i-OCs fonctionnels, tandis que les « i-OCs like » CX3CR1<sup>pos</sup> présentent une action immunosuppressive et ont une activité de résorption diminuée. Notre analyse transcriptomique a retrouvé une plus forte expression de gènes associés aux interactions immunologiques dans les i-OCs (Immune system), mais n'a pas montré de différence d'expression des gènes de l'ostéoclastogenèse (OC genes) entre les t-OCs et les i-OCs totaux (le profil transcriptomique est décliné de l'orange au bleu sur ce schéma, représentant un gradient d'expression du plus fort au plus faible). Cela pourrait s'expliquer par le mélange des i-OCs fonctionnel fortement actifs avec des « i-OCs like » peu érosifs. Enfin, l'origine des « i-OCs like » n'est pas élucidée, et pourrait être un sous-type de cellules dendritiques plus prompt à développer des propriétés immunosuppressives.

Notre modèle d'étude des t-OCs et des i-OCs a permis de mieux caractériser au niveau moléculaire ces deux sous-types d'OCs, mais il reste assez dichotomique car il est basé sur des précurseurs issus de la souris saine. En effet, les i-OCs peuvent être dérivés de différents précurseurs en condition inflammatoire, et pas uniquement de cellules dendritiques. Il serait donc intéressant d'une part d'étudier l'ensemble des i-OCs produits en condition pathologique, et d'autre part de faire le lien avec leurs origines.

Une étude très récente chez la souris arthritique suggère que les précurseurs d'i-OCs présenteraient un profil inflammatoire associé à un fort potentiel ostéoclastogénique

(Hasegawa et al. 2019). Les auteurs ont mis en évidence des précurseurs des i-OCs de phénotype CX3CR1<sup>high</sup> Ly6C<sup>int</sup>, dénommés « AtoMs » (arthritis-associated osteoclastogenic macrophages). Ces AtoMs dériveraient de monocytes circulants inflammatoires CX3CR1<sup>low</sup> Ly6C<sup>high</sup> qui infiltrent l'articulation enflammée. L'analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule (« single cell RNA-Seq ») des « AtoMs » a montré une dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et dans l'ostéoclastogenèse, et a permis d'identifier une sous-population de pré-OCs qui ont un profil transcriptomique clairement engagé dans l'ostéoclastogenèse, avec notamment une surexpression des gènes associés aux OCs (*Mmp9, Itgb3, Ctsk, Atp6v0d2, Acp5*) (Hasegawa et al. 2019). L'analyse phénotypique et transcriptionnelle des OCs différenciés n'a pas été réalisée dans cette étude.

Ce travail a le grand avantage de se placer dans le contexte pathologique de l'arthrite autoimmune. Les auteurs se sont concentrés sur la recherche de précurseurs d'i-OCs parmi les populations monocytaires, d'après le niveau d'expression de CX<sub>3</sub>CR1 et de Ly6C. La démonstration *in vivo* de la transdifférenciation de cellules dendritiques en i-OCs n'a pas encore été réalisée dans le contexte de l'arthrite. Seule la preuve d'une différentiation ostéoclastique à partir de cellules dendritiques *in vivo* a été rapportée en 2008 dans la souris ostéopétrotique oc/oc. Celle-ci présente un micro-environnement osseux pro-inflammatoire enrichi en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> qui stimulent la production de RANKL par les ostéoblastes (Wakkach et al. 2008). Il serait intéressant d'évaluer la part de ce phénomène dans l'arthrite.

En conclusion, mon travail sur la signature moléculaire des t-OCs et des i-OCs a permis d'identifier des miARNs discriminants, potentiellement impliqués dans un profil transcriptomique relié à des fonctions immunologiques (et pas ostéoclastiques) différentes pour ces 2 types d'OCs. Une approche plus poussée dans le contexte de l'arthrite permettrait de mieux caractériser les sous-types d'OCs, en particulier les i-OCs, notamment l'analyse en « single cell » des OCs qui n'a encore jamais été faite apporterait beaucoup d'informations dans ce domaine.

#### miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse : impact sur les précurseurs OCs

Comme indiqué plus haut, mon travail sur les t-OCs et les i-OCs a permis d'identifier des miARNs discriminants. En particulier, miR-155, miR-146b et miR-342-3p qui sont fortement exprimés par les i-OCs. Je me suis alors interrogée sur le rôle de miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse car il n'avait jamais été décrit dans ce contexte biologique.
L'aspect fondamental de mon travail sur miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse a permis de décrire l'impact fonctionnel de ce miARN dans les précurseurs OCs et les conséquences sur la formation ostéoclastique. En particulier, l'inhibition de miR-342-3p dans les précurseurs monocytaires réduit la formation d'OCs. Les expériences in vitro dans la lignée murine monocytaire RAW 264.7 ont montré que l'inhibition de miR-342-3p entraîne une perte de motilité cellulaire et induit l'apoptose dans la phase précoce de l'ostéoclastogenèse. L'étude dans les précurseurs primaires (BMMs) n'a pas toujours reproduit ces résultats. Ceci s'explique peut-être par le fait que les BMMs sont plus hétérogènes que les RAW 264.7, présentent une plus faible motilité à l'état basal et que l'efficacité de transfection (et de modulation du miR-342-3p) est moindre (60% environ contre plus de 90% pour les RAW 264.7). Par ailleurs, la lignée RAW 264.7 a été établie à partir d'une leucémie induite par le virus de la leucémie murine Abelson (A-MuLV), chez une souris mâle adulte de fond génétique BALB/c, différent des BMMs issus de souris C57Bl/6. Aussi, les RAW 264.7 se différencient en OCs avec du RANKL seul, de façon indépendante au M-CSF classiquement ajouté pour les cellules primaires. Cela s'explique par une activation constitutive d'ERK1/2 et d'AKT impliqués dans la signalisation en aval de M-CSF/M-CSFR, qui dépend de l'activité de la tyrosine kinase Abelson, elle-même exprimée de façon constitutive sous sa forme virale (v-Abl) dans les RAW 264.7 (A. Y. Ng et al. 2018). Ces particularités suscitent une considération prudente pour l'utilisation des RAW 264.7 dans l'étude de la signalisation en aval de M-CSF. Toutefois, la facilité d'utilisation, l'efficacité de transfection et la reproductibilité des expériences sur la lignée RAW 264.7 ont été des arguments en faveur du choix de ce modèle d'étude dans l'ostéoclastogenèse. Les résultats obtenus devront être validés ultérieurement dans les cellules primaires.

#### miR-342-3p dans l'ostéoclastogenèse : identification des gènes cibles

La suite de mon travail a été de déterminer la ou les cibles de miR-342-3p dans le contexte de l'ostéoclastogenèse permettant d'expliquer le phénotype observé. Pour cela, j'ai effectué une analyse transcriptomique en condition pro-ostéoclastique dans les RAW 264.7 en tant que précurseurs d'OCs, 24h après avoir neutralisé miR-342-3p. Par cette approche, les gènes surexprimés reflètent les voies modulées en l'absence de miR-342-3p et contiennent potentiellement les cibles directes de miR-342-3p. Une première remarque porte sur le choix d'utiliser l'inhibition plutôt que la surexpression de miR-342-3p est spécifique et n'altère pas les voies de biogénèse des miARNs, contrairement au mimic miR-342-3p qui peut saturer le système, et donc perturber l'homéostasie des miARNs endogènes et leur fonction de régulation. Une autre raison est que l'impact fonctionnel le plus fort observé dans l'ostéoclastogenèse a été apporté par l'inhibition de miR-342-3p dans les précurseurs d'OCs (perte de motilité, induction de l'apoptose, diminution de la formation d'OCs), et je souhaitais particulièrement étudier les gènes impliqués dans ce phénotype.

Ensuite, parmi la liste des cibles de miR-342-3p déjà connues dans la littérature (cf tableau 1, résultats préliminaires, Axe 2), seuls *Atf3*, *Lasp1* et *Rap2b* ont été retrouvés sur-exprimés (d'après l'analyse du RNA-Seq). La surexpression d'*Atf3* (activating transcription factor 3) dans les BMMs a un effet pro-ostéoclastique (Jeong et al. 2017) ; l'inhibition d'*Atf3* dans les BMMs altère la signalisation en aval de RANKL, en particulier la prolifération des précurseurs OCs (Fukasawa et al. 2016), ce qui est à l'inverse du phénotype observé dans mon travail. *Lasp1* (LIM and SH3 domain protein 1) code pour une protéine liant l'actine au niveau des extensions de la membrane cellulaire (Schreiber et al. 1998). La surexpression de *Lasp1* favorise l'invasion tumorale (Orth et al. 2015) et est impliquée dans la migration cellulaire. La perte de motilité observée dans les RAW 264.7 après inhibition de miR-342-3p n'est *a priori* pas expliquée par la surexpression de *Lasp1*. *Rap2b* (Member of RAS oncogene family) est un facteur anti-apoptotique induit par la protéine p53 lors de la réparation de lésions de l'ADN et confère une résistance à l'apoptose dans certaines tumeurs (Xinyue Zhang et al. 2013). Là encore, l'effet pro-apoptotique de l'anti-miR-342-3p ne peut être expliqué par la surexpression de *Rap2b*.

L'absence des autres cibles validées dans la littérature dans les gènes sur-exprimés n'est pas étonnante, car les gènes cibles ont été décrits dans des contextes cellulaires très différents, principalement dans la cancérogenèse et dans des lignées humaines. Or, les miARNs jouent des rôles biologiques dépendants du contexte cellulaire (Y.-M. Sun, Lin, and Chen 2013). Au total, les cibles validées de miR-342-3p ne semblent pas être les cibles fonctionnelles dans notre contexte cellulaire. La recherche de nouvelles cibles de miR-342-3p a donc été l'étape suivante de ma démarche.

Ainsi, la sélection de gènes cibles potentiels a fait appel à une analyse *in silico* en utilisant des bases de données de prédiction telles que miRWalk, TargetScan, miRANDA, RNA22. J'ai sélectionné les gènes identifiés comme potentielles cibles de miR-342-3p par les 4 algorithmes, dans le contexte murin. Cette démarche semble rigoureuse, et peut être trop restrictive ; cependant j'ai ainsi obtenu une liste de 44 gènes, dans laquelle une seconde sélection est opérée en se basant sur l'intérêt mécanistique de ces gènes dans le contexte cellulaire étudié. J'ai ainsi repéré un cluster de gènes impliqués dans de nombreuses voies biologiques dérégulées et faisant sens avec le phénotype observé. Parmi eux, je peux citer *Adam17, Gsk3b, lgf1, Ncf1, lqgap1, Sash1, Sdcbp, Stk4, Tgfbr1*. Dans le cadre de mon travail,

j'ai validé *Adam17* comme nouvelle cible de miR-342-3p. Les expériences fonctionnelles nécessaires à la validation d'un axe miR-342-3p/*Adam17* dans l'ostéoclastogenèse des cellules primaires sont en cours. En cas d'invalidation, d'autres gènes candidats pourront être testés en se basant sur nos résultats de l'analyse transcriptomique. Le choix d'*Adam17* a été orienté par la littérature. En effet, *Adam17* code pour une métalloprotéase capable de cliver de nombreux substrats au niveau de la membrane cellulaire, et notamment les récepteurs RANK et CSF1R. Mon hypothèse est donc qu'une augmentation de l'expression de miR-342-3p dans les étapes précoces de l'ostéoclastogenèse diminuerait l'expression de ADAM17, et donc empêcherait le clivage de ces récepteurs pro-ostéoclastiques, favorisant ainsi la différenciation ostéoclastique.

Cependant, augmenter l'expression d'Adam17 en inhibant miR-342-3p pour atténuer la formation d'OCs et la perte osseuse dans le contexte de l'arthrite semble paradoxal si on considère les essais thérapeutiques basés sur des inhibiteurs d'ADAM17. En effet, l'enzyme ADAM17 a été proposée dès 2001 comme cible thérapeutique dans l'arthrite chez le rat (Conway et al. 2001). ADAM17 est responsable du clivage du TNF $\alpha$  membranaire en TNF $\alpha$ soluble. L'inhibition de l'activité d'ADAM17 permet de réduire la production de TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire majeure et contre laquelle des biothérapies ciblées anti-TNFα font partie du panel de traitements efficaces dans la polyarthrite rhumatoïde PR (Smolen et al. 2020). Les premiers essais thérapeutiques avec les inhibiteurs d'ADAM17 ont montré des résultats encourageants dans les études pré-cliniques mais n'ont pu aboutir en recherche clinique pour cause d'effets indésirables à type de toxicité hépatique (BMS-561392) ou un manque d'efficacité pour l'Apratastat (TMI-005) (Moss, Sklair-Tavron, and Nudelman 2008). Plus récemment, d'autres inhibiteurs plus sélectifs d'ADAM17 ont été testés dans des modèles murins de pathologies inflammatoires comme la PR et la maladie de Crohn (Wong et al. 2016) et dans de nombreuses études en cancérologie (Moss and Minond 2017). Dans notre modèle d'étude, l'inhibition de miR-342-3p dans les précurseurs OCs a pour objectif de diminuer leur différenciation en i-OCs, en passant par une surexpression d'Adam17. Si mon hypothèse de l'axe de régulation miR-342-3p/Adam17 dans les pré-OCs est validée, il faudra être attentif aux possibles effets indésirables causés par l'activité d'ADAM17 dans ces cellules, en particulier la production de TNFa qui pourrait être contre-productif.

En conclusion, les mécanismes de régulation conduits par miR-342-3p restent encore à être élucidés. Les cibles fonctionnelles de miR-342-3p dans le contexte des précurseurs OCs restent à valider dans les expériences *in vitro* et *in vivo* dans le modèle murin de l'arthrite, en particulier *Adam17* qui est impliqué dans la réponse inflammatoire.

### Modulation in vivo de l'expression de miR-342-3p dans les précurseurs des i-OCs

Le phénotype observé dans les expériences *in vitro* de modulation de l'expression de miR-342-3p suggère que l'inhibition de miR-342-3p dans les précurseurs OCs réduit *in fine* la formation d'OCs matures fonctionnels. Ces résultats intéressants m'ont amené à tester l'impact de la modulation du miR-342-3p dans des expérimentations animales sur modèle murin d'arthrite. Mon travail a confirmé le ciblage des monocytes circulants après injection en IV d'un miARN fluorescent chez la souris saine. J'ai également montré que cette sélectivité est conservée lors d'une injection en intra-articulaire (IA) dans les chevilles de souris arthritiques. Enfin, j'ai montré une modulation de l'expression de miR-342-3p après injection IA d'un miR-342-3p mimic, mais aussi d'un inhibiteur de miR-342-3p, ce qui n'avait pas encore été fait avec ce liposome. Ainsi, les voies IV et IA représentent deux voies possibles pour injecter l'inhibiteur de miR-342-3p afin de cibler les monocytes Ly6C<sup>high</sup>, considérés comme les précurseurs circulants/infiltrants des OCs générés dans le contexte de l'arthrite (Hasegawa et al. 2019) (Figure 2).



<u>Figure 2 : modulation du miR-342-3p dans les monocytes circulants/infiltrants Ly6C<sup>high</sup>, précurseurs des</u> <u>i-OCs.</u> La caractérisation des précurseurs des OCs dans le contexte de l'arthrite chez la souris a montré qu'ils proviennent principalement du compartiment circulant. Les monocytes Ly6C<sup>high</sup>, dits « inflammatoires », sont les précurseurs des macrophages associés à l'arthrite, nommés AtoMs, qui présentent un fort potentiel ostéoclastogénique (Hasegawa et al. 2019). Notre stratégie vise à cibler les précurseurs monocytaires Ly6C<sup>high</sup> selon une approche systémique (1) ou locale en intra-articulaire (2), afin de moduler la formation des i-OCs dans le contexte de l'arthrite. L'administration d'un inhibiteur de miR-342-3p s'effectue par injection de la molécule complexée avec le liposome cationique DMAPAP/DOPE connu pour cibler les monocytes Ly6C<sup>high</sup>.

La première expérience *in vivo* chez la souris arthritique (modèle STA) n'a pas montré d'effet significatif sur l'érosion osseuse associée à l'arthrite. Une des causes possibles discutées dans l'article correspondant est la dose injectée d'antagoniste (0,5 mg/kg) qui peut être insuffisante pour observer un effet clinique. La formulation du liposome cationique

DMAPAP/DOPE avec le miARN doit respecter un ratio entre la quantité de miARN et celle du liposome. Ainsi, une augmentation de la dose de miARN (initialement 0,5 mg/kg) induit une augmentation en liposome équivalente dans un même volume injectable. Dans une expérience ultérieure chez la souris arthritique, j'ai testé une dose trois fois plus importante de miARN, soit 1,5 mg/kg d'anti-miR-342-3p ou d'anti-CT (n=5 par groupe), Cette dose s'est révélée toxique et a causé une monocytopénie profonde et transitoire 24h après injection par voie IV : la toxicité a été d'ordre périphérique et n'a touché que les monocytes circulants ciblés par la formulation. La formation d'agrégats de liposome dans la solution injectable explique très probablement ce phénomène. La montée de l'arthrite a été plus faible comparée à des souris ayant reçu le même sérum K/BxN mais sans lipoplex. In fine, l'analyse par µCT a montré l'absence d'érosion osseuse dans les 2 groupes. La dose injectable de miARN est donc limitée par notre formulation. Cela m'a amenée à proposer une future expérience avec des injections locales en IA chez la souris arthritique, afin de cibler encore plus précisément les précurseurs des i-OCs déjà infiltrés dans l'articulation enflammée. Le nombre d'injections répétées et le schéma d'injection devront être optimisés dans de futures expériences avant de conclure sur un potentiel effet clinique de la modulation du miR-342-3p dans ce modèle.

D'autre part, nos résultats sur le ciblage des monocytes Ly6C<sup>high</sup> grâce au liposome DMAPAP/DOPE sont satisfaisants en termes de sélectivité, mais présentent une efficacité partielle avec seulement 20 à 30% de cellules ciblées. Une recirculation rapide des cellules monocytaires pourrait expliquer ce ciblage partiel observé 24h après injection du lipoplex. Toutefois, une cinétique de biodistribution a montré que le lipoplex est très rapidement assimilé par les monocytes et que le taux de cellules ciblées à 24h reste proche de celui observé 4h après injection par voie IV (Courties et al. 2010). D'autres formulations biocompatibles pourraient être développées afin d'améliorer l'efficacité de l'assimilation du miARN tout en conservant la sélectivité pour les précurseurs Ly6C<sup>high</sup>. Diverses stratégies basées sur des agents bioconjugués sont aujourd'hui développées dans l'administration de petits ARNs interférents, les siARN (Chernikov, Vlassov, and Chernolovskaya 2019). Par exemple, l'efficacité biologique d'un siARN a été démontrée lors de l'utilisation d'un anticorps spécifique de la cellule cible, soit associé au siARN par un système de liaison biotine-streptavidine dans la lignée HEK293 (C.-F. Xia, Boado, and Pardridge 2009), soit directement couplé au siARN dans une étude chez la souris (Sugo et al. 2016). Cette stratégie pourrait être intéressante à adapter dans mon projet, par exemple avec un anticorps spécifique du Ly6C. De plus, cette formulation permettrait d'augmenter la dose de miARN sans créer d'agrégats, contrairement au liposome actuellement utilisé.

Un autre point à discuter est la pertinence du modèle murin d'arthrite, en particulier sur le degré d'érosion osseuse. Les expériences *in vivo* ont été réalisées dans le modèle murin

d'arthrite STA. Ce modèle présente des manifestations histopathologiques similaires à celles observée dans la PR, à savoir une synovite avec formation d'un pannus au niveau des articulations distales, la destruction du cartilage et une érosion osseuse (Christensen et al. 2016). De plus, le modèle STA présente une incidence de 100% et à l'avantage d'initier rapidement l'arthrite en quelques jours avec un plateau autour du dixième jour. Ce modèle s'adapte bien au fond génétique C57BI/6, largement utilisé dans les lignées de souris génétiquement modifiées, ce qui peut être intéressant dans de futures applications. Le modèle STA est basé sur l'injection directe d'auto-anticorps, occultant la phase d'immunisation chez les animaux étudiés. Malgré cette différence avec la PR, les cellules de l'immunité innée (neutrophiles, monocytes/macrophages), qui sont les acteurs principaux de l'induction de l'arthrite dans ce modèle (Ditzel 2004), contiennent les précurseurs des i-OCs ; le modèle STA s'adapte a priori bien à ce projet. Bien que l'érosion osseuse ait été observée lors de la première expérience, le degré d'érosion était peut-être insuffisant pour voir une différence entre les groupes de souris arthritiques, et donc de conclure sur l'effet clinique de miR-342-3p. Toutefois, il est possible d'induire une arthrite sévère en injectant une dose plus importante de sérum K/BxN lors de l'induction. En outre, des doses répétées de sérum arthritogénique permettent de mimer la chronicité de l'arthrite. Ce schéma d'arthrite sévère conduit à une érosion osseuse plus importante, ce qui pourrait être intéressant pour mieux objectiver l'existence ou non d'un effet protecteur de l'antagoniste de miR-342-3p sur l'érosion osseuse.

En conclusion, les résultats préliminaires des expériences *in vivo* devront être complétés par l'optimisation du schéma d'injection et en testant la voie IA chez les souris arthritiques. D'autres formulations permettant un ciblage plus efficace des précurseurs Ly6C<sup>high</sup> pourraient être développées afin d'optimiser la stratégie d'administration *in vivo* de miARNs et ainsi d'obtenir une meilleure efficacité biologique.

# Perspectives

Les deux axes de recherche de mon travail de thèse présentent chacun des perspectives à court et moyen termes.

D'une part, la caractérisation moléculaire des t-OCs et des i-OCs a été effectué chez la souris saine, et la validation de miARNs discriminants a été poursuivie dans le contexte de l'arthrite. Il serait très intéressant d'établir le profil transcriptomique des i-OCs en condition pathologique. Dans le cadre de mon travail, une analyse préliminaire du transcriptome des OCs dérivés de la moelle osseuse de souris arthritiques a permis d'identifier un réseau de gènes et de miARNs dérégulés dans les i-OCs, fortement associé à l'arthrite auto-immune (Annexe 1).

La précision grandissante des technologies permet aujourd'hui d'analyser le profil moléculaire à l'échelle de la cellule, ce qui révèle encore plus de diversité dans une population cellulaire autrefois considérée comme homogène. Déjà, les i-OCs tels qu'ils ont été décrits en 2016 (Ibáñez et al. 2016) présentent eux-mêmes une hétérogénéité fonctionnelle décrite en 2020 (Madel et al. 2020). L'approche en « single-cell » permettrait d'établir une carte transcriptomique des différents sous-types d'OCs et d'évaluer leur répartition en condition arthritique. La découverte de nouveaux sous-types d'OCs définis par cette approche moléculaire sera une nouvelle base de travail pour leur caractérisation fonctionnelle.

D'autre part, l'établissement d'une signature moléculaire en fonction du type de précurseur d'OC pourrait également éclairer sur le déterminisme fonctionnel des OCs issus de ces différents précurseurs.

La découverte d'un nouveau miARN impliqué dans la régulation de l'ostéoclastogenèse a fait l'objet du second axe de recherche de ce travail. La description de ou des cibles fonctionnelles de miR-342-3p dans le contexte de l'ostéoclastogenèse reste à approfondir, que ce soit la validation de l'axe miR-342-3p/*Adam17* ou la découverte d'une autre cible pertinente dans ce contexte cellulaire. La poursuite des expérimentations animales dans le modèle murin de l'arthrite est une des perspectives prioritaires, dès lors que la stratégie d'administration *in vivo* a été mise au point dans la souris durant ce travail.

Une perspective à plus long terme serait la mise en place d'un modèle murin KO conditionnel pour miR-342-3p dans les précurseurs des i-OCs et d'analyser le phénotype osseux chez la souris saine et arthritique.

# Annexe

Annexe 1 : identification de réseaux moléculaires associés à la polyarthrite rhumatoïde dans les i-OCs. L'analyse des connexions ARNm-miARN dans les OCs dérivés de la moelle osseuse de souris arthritique a été réalisée avec l'outil Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Les transcrits et les miARNs associés à l'item « Rheumatoic disease » (croix bleue) sont identifiés par les pointillés en gras (violet).



© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

# Bibliographie

- Adams, Gregor B., Karissa T. Chabner, Ian R. Alley, Douglas P. Olson, Zbigniew M. Szczepiorkowski, Mark C. Poznansky, Claudine H. Kos, Martin R. Pollak, Edward M. Brown, and David T. Scadden. 2006. "Stem Cell Engraftment at the Endosteal Niche Is Specified by the Calcium-Sensing Receptor." *Nature* 439 (7076): 599–603. https://doi.org/10.1038/nature04247.
- Agarwal, Vikram, George W Bell, Jin-Wu Nam, and David P Bartel. 2015. "Predicting Effective MicroRNA Target Sites in Mammalian MRNAs." Edited by Elisa Izaurralde. *ELife* 4 (August): e05005. https://doi.org/10.7554/eLife.05005.
- Akhavani, Mohammed A., Leigh Madden, Ian Buysschaert, Branavan Sivakumar, Norbert Kang, and Ewa M. Paleolog. 2009. "Hypoxia Upregulates Angiogenesis and Synovial Cell Migration in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 11 (3): R64. https://doi.org/10.1186/ar2689.
- Alivernini, Stefano, Elisa Gremese, Charles McSharry, Barbara Tolusso, Gianfranco Ferraccioli, Iain B. McInnes, and Mariola Kurowska-Stolarska. 2017. "MicroRNA-155at the Critical Interface of Innate and Adaptive Immunity in Arthritis." *Frontiers in Immunology* 8: 1932. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01932.
- Alonso-Pérez, Ana, Eloi Franco-Trepat, María Guillán-Fresco, Alberto Jorge-Mora, Verónica López, Jesús Pino, Oreste Gualillo, and Rodolfo Gómez. 2018. "Role of Toll-Like Receptor 4 on Osteoblast Metabolism and Function." *Frontiers in Physiology* 9 (May). https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00504.
- Amarasekara, Dulshara Sachini, Hyeongseok Yun, Sumi Kim, Nari Lee, Hyunjong Kim, and Jaerang Rho. 2018. "Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks." *Immune Network* 18 (1): e8. https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8.
- Ammari, Meryem, Christian Jorgensen, and Florence Apparailly. 2013. "Impact of MicroRNAs on the Understanding and Treatment of Rheumatoid Arthritis." *Current Opinion in Rheumatology* 25 (2): 225–33. https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835d8385.
- Ammari, Meryem, Jessy Presumey, Clara Ponsolles, Gautier Roussignol, Christine Roubert, Virginie Escriou, Karine Toupet, et al. 2018. "Delivery of MiR-146a to Ly6C <sup>high</sup> Monocytes Inhibits Pathogenic Bone Erosion in Inflammatory Arthritis." *Theranostics* 8 (21): 5972–85. https://doi.org/10.7150/thno.29313.
- Arai, Fumio, Takeshi Miyamoto, Osamu Ohneda, Tomohisa Inada, Tetsuo Sudo, Kenneth Brasel, Takashi Miyata, Dirk Anderson, and Toshio Suda. 2000. "Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor b (Rank) Receptors." *The Journal of Experimental Medicine* 190 (January): 1741–54. https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1741.
- Arnett, Timothy R., and Isabel R. Orriss. 2018. "Metabolic Properties of the Osteoclast." *Bone* 115: 25–30. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.12.021.
- Arron, Joseph R., and Yongwon Choi. 2000. "Bone versus Immune System." *Nature* 408 (6812): 535–36. https://doi.org/10.1038/35046196.
- Atkins, Gerald J, Panagiota Kostakis, Cristina Vincent, Amanda N Farrugia, Jeffrey P Houchins, David M Findlay, Andreas Evdokiou, and Andrew CW Zannettino. 2006.
  "RANK Expression as a Cell Surface Marker of Human Osteoclast Precursors in Peripheral Blood, Bone Marrow, and Giant Cell Tumors of Bone." *Journal of Bone and Mineral Research* 21 (9): 1339–49. https://doi.org/10.1359/jbmr.060604.
- Azuma, Y., K. Kaji, R. Katogi, S. Takeshita, and A. Kudo. 2000. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Differentiation of and Bone Resorption by Osteoclasts." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (7): 4858–64. https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4858.

- Bae, Sang-Cheol, and Young H. Lee. 2018. "MiR-146a Levels in Rheumatoid Arthritis and Their Correlation with Disease Activity: A Meta-Analysis." *International Journal of Rheumatic Diseases* 21 (7): 1335–42. https://doi.org/10.1111/1756-185X.13338.
- Baron, Roland. 2001. "L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse." *médecine/sciences* 17 (12): 1260–69. https://doi.org/10.1051/medsci/200117121260.
- Baron, Roland, and Michaela Kneissel. 2013. "WNT Signaling in Bone Homeostasis and Disease: From Human Mutations to Treatments." *Nature Medicine* 19: 179–92. https://doi.org/10.1038/nm.3074.
- Bassett, J. H. Duncan, and Graham R. Williams. 2016. "Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance." *Endocrine Reviews* 37 (2): 135–87. https://doi.org/10.1210/er.2015-1106.
- Berezikov, Eugene. 2011. "Evolution of MicroRNA Diversity and Regulation in Animals." *Nature Reviews Genetics* 12 (12): 846–60. https://doi.org/10.1038/nrg3079.
- Boissy, Patrice, Frederic Saltel, Christine Bouniol, Pierre Jurdic, and Irma Machuca-Gayet. 2002. "Transcriptional Activity of Nuclei in Multinucleated Osteoclasts and Its Modulation by Calcitonin." *Endocrinology* 143 (5): 1913–21. https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8813.
- Bord, S, D. C Ireland, S. R Beavan, and J. E Compston. 2003. "The Effects of Estrogen on Osteoprotegerin, RANKL, and Estrogen Receptor Expression in Human Osteoblasts." *Bone* 32 (2): 136–41. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00953-5.
- Cannon, Joseph G., Barbara Kraj, and Gloria Sloan. 2011. "Follicle-Stimulating Hormone Promotes RANK Expression on Human Monocytes." *Cytokine* 53 (2): 141–44. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.11.011.
- Chellaiah, M., N. Kizer, M. Silva, U. Alvarez, D. Kwiatkowski, and K. A. Hruska. 2000. "Gelsolin Deficiency Blocks Podosome Assembly and Produces Increased Bone Mass and Strength." *The Journal of Cell Biology* 148 (4): 665–78. https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.665.
- Chen, Hongtao, Paerhati Wahafu, Leilei Wang, and Xuan Chen. 2020. "LncRNA LINC00313 Knockdown Inhibits Tumorigenesis and Metastasis in Human Osteosarcoma by Upregulating FOSL2 through Sponging MiR-342-3p." *Yonsei Medical Journal* 61 (5): 359–70. https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.5.359.
- Chen, Junying, Min Qiu, Ce Dou, Zhen Cao, and Shiwu Dong. 2015. "MicroRNAs in Bone Balance and Osteoporosis." *Drug Development Research* 76 (5): 235–45. https://doi.org/10.1002/ddr.21260.
- Cheng, Dongfeng, Juanjuan Fan, Yang Ma, Yiran Zhou, Kai Qin, Minmin Shi, and Jingrui Yang. 2019. "LncRNA SNHG7 Promotes Pancreatic Cancer Proliferation through ID4 by Sponging MiR-342-3p." *Cell & Bioscience* 9: 28. https://doi.org/10.1186/s13578-019-0290-2.
- Cheng, Shaoyun, Yanxiang Cui, Lin Fan, Xiaofeng Mu, and Yuzhong Hua. 2018. "T2DM Inhibition of Endothelial MiR-342-3p Facilitates Angiogenic Dysfunction via Repression of FGF11 Signaling." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (1): 71–78. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.179.
- Chernikov, Ivan V., Valentin V. Vlassov, and Elena L. Chernolovskaya. 2019. "Current Development of SiRNA Bioconjugates: From Research to the Clinic." *Frontiers in Pharmacology* 10: 444. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444.
- Chiu, Yahui Grace, and Christopher T. Ritchlin. 2017. "Denosumab: Targeting the RANKL Pathway to Treat Rheumatoid Arthritis." *Expert Opinion on Biological Therapy* 17 (1): 119–28. https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1263614.
- Christensen, Anne D., Claus Haase, Andrew D. Cook, and John A. Hamilton. 2016. "K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis." *Frontiers in Immunology* 7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00213.
- Churov, Alexey V., Eugenia K. Oleinik, and Mikael Knip. 2015. "MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis: Altered Expression and Diagnostic Potential." *Autoimmunity Reviews* 14 (11): 1029–37. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.07.005.

- Conway, J. G., R. C. Andrews, B. Beaudet, D. M. Bickett, V. Boncek, T. A. Brodie, R. L. Clark, et al. 2001. "Inhibition of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha) Production and Arthritis in the Rat by GW3333, a Dual Inhibitor of TNF-Alpha-Converting Enzyme and Matrix Metalloproteinases." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298 (3): 900–908.
- Courties, Gabriel, Virginia Seiffart, Jessy Presumey, Virginie Escriou, Daniel Scherman, Jochen Zwerina, Gisela Ruiz, et al. 2010. "In Vivo RNAi-Mediated Silencing of TAK1 Decreases Inflammatory Th1 and Th17 Cells through Targeting of Myeloid Cells." *Blood* 116 (18): 3505–16. https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-269605.
- Cui, Zheqing, and Yulin Zhao. 2019. "MicroRNA-342-3p Targets FOXQ1 to Suppress the Aggressive Phenotype of Nasopharyngeal Carcinoma Cells." *BMC Cancer* 19 (1): 104. https://doi.org/10.1186/s12885-018-5225-5.
- Czimmerer, Zsolt, Tamas Varga, Mate Kiss, Cesaré Ovando Vázquez, Quang Minh Doan-Xuan, Dominik Rückerl, Sudhir Gopal Tattikota, et al. 2016. "The IL-4/STAT6 Signaling Axis Establishes a Conserved MicroRNA Signature in Human and Mouse Macrophages Regulating Cell Survival via MiR-342-3p." *Genome Medicine* 8 (1): 63. https://doi.org/10.1186/s13073-016-0315-y.
- Dai, Xu-Ming, Gregory R. Ryan, Andrew J. Hapel, Melissa G. Dominguez, Robert G. Russell, Sara Kapp, Vonetta Sylvestre, and E. Richard Stanley. 2002. "Targeted Disruption of the Mouse Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Gene Results in Osteopetrosis, Mononuclear Phagocyte Deficiency, Increased Primitive Progenitor Cell Frequencies, and Reproductive Defects." *Blood* 99 (1): 111–20. https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.111.
- Datta, Sandeep Robert, Anne Brunet, and Michael E. Greenberg. 1999. "Cellular Survival: A Play in Three Akts." *Genes & Development* 13 (22): 2905–27.
- Davis, Daniel M., and Stefanie Sowinski. 2008. "Membrane Nanotubes: Dynamic Long-Distance Connections between Animal Cells." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (6): 431–36. https://doi.org/10.1038/nrm2399.
- Destaing, Olivier, Frédéric Saltel, Jean-Christophe Géminard, Pierre Jurdic, and Frédéric Bard. 2002. "Podosomes Display Actin Turnover and Dynamic Self-Organization in Osteoclasts Expressing Actin-Green Fluorescent Protein." *Molecular Biology of the Cell* 14 (2): 407–16. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0389.
- Ditzel, Henrik J. 2004. "The K/BxN Mouse: A Model of Human Inflammatory Arthritis." *Trends in Molecular Medicine* 10 (1): 40–45. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2003.11.004.
- Dougall, W. C., M. Glaccum, K. Charrier, K. Rohrbach, K. Brasel, T. De Smedt, E. Daro, et al. 1999. "RANK Is Essential for Osteoclast and Lymph Node Development." *Genes & Development* 13 (18): 2412–24. https://doi.org/10.1101/gad.13.18.2412.
- Drees, Frauke, and Frank B. Gertler. 2008. "Ena/VASP: Proteins at the Tip of the Nervous System." *Current Opinion in Neurobiology* 18 (1): 53–59. https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.05.007.
- Duroux-Richard, Isabelle, Maxime Robin, Cindy Peillex, and Florence Apparailly. 2019. "MicroRNAs: Fine Tuners of Monocyte Heterogeneity." *Frontiers in Immunology* 10: 2145. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02145.
- Dweep, Harsh, and Norbert Gretz. 2015. "MiRWalk2.0: A Comprehensive Atlas of MicroRNA-Target Interactions." *Nature Methods* 12 (8): 697. https://doi.org/10.1038/nmeth.3485.
- Dykes, Iain M., and Costanza Emanueli. 2017. "Transcriptional and Post-Transcriptional Gene Regulation by Long Non-Coding RNA." *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 15 (3): 177–86. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005.
- Elshabrawy, Hatem A., Zhenlong Chen, Michael V. Volin, Shalini Ravella, Shanti Virupannavar, and Shiva Shahrara. 2015. "The Pathogenic Role of Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis." *Angiogenesis* 18 (4): 433–48. https://doi.org/10.1007/s10456-015-9477-2.
- Evangelatos, Gerasimos, George E. Fragoulis, Vassiliki Koulouri, and George I. Lambrou. 2019. "MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis: From Pathogenesis to Clinical Impact." *Autoimmunity Reviews* 18 (11): 102391. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102391.

- Fang, Qinghua, Jiaxin Ou, and Kutty Selva Nandakumar. 2019. "Autoantibodies as Diagnostic Markers and Mediator of Joint Inflammation in Arthritis." *Mediators of Inflammation* 2019: 6363086. https://doi.org/10.1155/2019/6363086.
- Feng, Qianyun, Sheng Zheng, and Jia Zheng. 2018. "The Emerging Role of MicroRNAs in Bone Remodeling and Its Therapeutic Implications for Osteoporosis." *Bioscience Reports* 38 (3): BSR20180453. https://doi.org/10.1042/BSR20180453.
- Franz-Odendaal, Tamara A., Brian K. Hall, and P. Eckhard Witten. 2006. "Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235 (1): 176–90. https://doi.org/10.1002/dvdy.20603.
- Fu, Yin, Xiaoyang Hu, Chunyu Zheng, Guicai Sun, Jianyu Xu, Shanshan Luo, and Peigang Cao. 2019. "Intrahippocampal MiR-342-3p Inhibition Reduces β-Amyloid Plaques and Ameliorates Learning and Memory in Alzheimer's Disease." *Metabolic Brain Disease* 34 (5): 1355–63. https://doi.org/10.1007/s11011-019-00438-9.
- Fukasawa, Kazuya, Gyujin Park, Takashi lezaki, Tetsuhiro Horie, Takashi Kanayama, Kakeru Ozaki, Yuki Onishi, et al. 2016. "ATF3 Controls Proliferation of Osteoclast Precursor and Bone Remodeling." *Scientific Reports* 6 (1). https://doi.org/10.1038/srep30918.
- Fukata, Masaki, Masato Nakagawa, and Kozo Kaibuchi. 2003. "Roles of Rho-Family GTPases in Cell Polarisation and Directional Migration." *Current Opinion in Cell Biology* 15 (5): 590–97. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00097-8.
- Gallois, A., J. Lachuer, G. Yvert, A. Wierinckx, F. Brunet, C. Rabourdin-Combe, C. Delprat, P. Jurdic, and M. Mazzorana. 2010. "Genome-Wide Expression Analyses Establish Dendritic Cells as a New Osteoclast Precursor Able to Generate Bone-Resorbing Cells More Efficiently than Monocytes." *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (3): 661–72. https://doi.org/10.1359/jbmr.090829.
- Gennari, L., S. Bianciardi, and D. Merlotti. 2017. "MicroRNAs in Bone Diseases." Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA 28 (4): 1191–1213. https://doi.org/10.1007/s00198-016-3847-5.
- Georgess, Dan, Irma Machuca-Gayet, Anne Blangy, and Pierre Jurdic. 2014. "Podosome Organization Drives Osteoclast-Mediated Bone Resorption." *Cell Adhesion & Migration* 8 (3): 191–204.
- Ghani, Saeed, Pia Riemke, Jörg Schönheit, Dido Lenze, Jürgen Stumm, Maarten Hoogenkamp, Anne Lagendijk, et al. 2011. "Macrophage Development from HSCs Requires PU.1-Coordinated MicroRNA Expression." *Blood* 118 (8): 2275–84. https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-335141.
- Goh, Fui G., and Kim S. Midwood. 2012. "Intrinsic Danger: Activation of Toll-like Receptors in Rheumatoid Arthritis." *Rheumatology (Oxford, England)* 51 (1): 7–23. https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker257.
- Golden, Lauren H, and Karl L Insogna. 2004. "The Expanding Role of PI3-Kinase in Bone." Bone 34 (1): 3–12. https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.09.005.
- Gomez Perdiguero, Elisa, Kay Klapproth, Christian Schulz, Katrin Busch, Emanuele Azzoni, Lucile Crozet, Hannah Garner, et al. 2015. "Tissue-Resident Macrophages Originate from Yolk-Sac-Derived Erythro-Myeloid Progenitors." *Nature* 518 (7540): 547–51. https://doi.org/10.1038/nature13989.
- Grady, W. M., R. K. Parkin, P. S. Mitchell, J. H. Lee, Y.-H. Kim, K. D. Tsuchiya, M. K. Washington, et al. 2008. "Epigenetic Silencing of the Intronic MicroRNA Hsa-MiR-342 and Its Host Gene EVL in Colorectal Cancer." *Oncogene* 27 (27): 3880–88. https://doi.org/10.1038/onc.2008.10.
- Grassi, Francesco, Cristina Manferdini, Luca Cattini, Anna Piacentini, Elena Gabusi, Andrea Facchini, and Gina Lisignoli. 2011. "T Cell Suppression by Osteoclasts in Vitro." *Journal of Cellular Physiology* 226 (4): 982–90. https://doi.org/10.1002/jcp.22411.
- Han, Xiuhua, Chuanzhen Niu, Zhongli Zuo, Yuanmin Wang, Lanlan Yao, and Lili Sun. 2020. "MiR-342-3p Inhibition Promotes Cell Proliferation and Invasion by Directly Targeting

ID4 in Pre-Eclampsia." *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 46 (1): 49–57. https://doi.org/10.1111/jog.14150.

- Han, Yawei, Kun Zhang, Yuheng Hong, Jingzhao Wang, Qi Liu, Zhen Zhang, Han Xia, et al. 2018. "MiR-342-3p Promotes Osteogenic Differentiation via Targeting ATF3." *FEBS Letters* 592 (24): 4051–65. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13282.
- Harre, Ulrike, Dan Georgess, Holger Bang, Aline Bozec, Roland Axmann, Elena Ossipova, Per-Johan Jakobsson, et al. 2012. "Induction of Osteoclastogenesis and Bone Loss by Human Autoantibodies against Citrullinated Vimentin." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (5): 1791–1802. https://doi.org/10.1172/JCI60975.
- Hasegawa, Tetsuo, Junichi Kikuta, Takao Sudo, Yoshinobu Matsuura, Takahiro Matsui, Szandor Simmons, Kosuke Ebina, et al. 2019. "Identification of a Novel Arthritis-Associated Osteoclast Precursor Macrophage Regulated by FoxM1." *Nature Immunology* 20 (12): 1631–43. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0526-7.
- Hong, Han, Chengjun Sui, Tao Qian, Xiaoyong Xu, Xiang Zhu, Qiang Fei, Jiamei Yang, and Minhui Xu. 2020. "Long Noncoding RNA LINC00460 Conduces to Tumor Growth and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma through MiR-342-3p-Dependent AGR2 up-Regulation." *Aging* 12 (11): 10544–55. https://doi.org/10.18632/aging.103278.
- Honma, Masashi, Yuki Ikebuchi, Yoshiaki Kariya, Madoka Hayashi, Naoki Hayashi, Shigeki Aoki, and Hiroshi Suzuki. 2013. "RANKL Subcellular Trafficking and Regulatory Mechanisms in Osteocytes." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28 (9): 1936–49. https://doi.org/10.1002/jbmr.1941.
- Honma, Masashi, Yuki Ikebuchi, Yoshiaki Kariya, and Hiroshi Suzuki. 2014. "Regulatory Mechanisms of RANKL Presentation to Osteoclast Precursors." *Current Osteoporosis Reports* 12 (1): 115–20. https://doi.org/10.1007/s11914-014-0189-0.
- Hoon, Michiel de, Jay W. Shin, and Piero Carninci. 2015. "Paradigm Shifts in Genomics through the FANTOM Projects." *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 26 (9–10): 391–402. https://doi.org/10.1007/s00335-015-9593-8.
- Hu, Kebang, Xupeng Mu, Helena Kolibaba, Qinan Yin, Chune Liu, Xueqing Liang, and Ji Lu. 2018. "Metadherin Is an Apoptotic Modulator in Prostate Cancer through MiR-342-3p Regulation." *Saudi Journal of Biological Sciences* 25 (5): 975–81. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.015.
- Huang, Haobo, Liping Fan, Rong Zhan, Shunquan Wu, and Wenyan Niu. 2016. "Expression of MicroRNA-10a, MicroRNA-342-3p and Their Predicted Target Gene TIAM1 in Extranodal NK/T-Cell Lymphoma, Nasal Type." *Oncology Letters* 11 (1): 345–51. https://doi.org/10.3892/ol.2015.3831.
- Huang, Mengqi, Ying Qing, Qi Shi, Yingguang Cao, and Ke Song. 2017. "MiR-342-3p Elevates Osteogenic Differentiation of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells via Inhibiting Sufu in Vitro." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 491 (3): 571– 77. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.163.
- Huang, Y., and C. Chi. 2019. "Glioma Cell Proliferation Is Inhibited by MiR-342-3p, MiR-377 / E2F1 Signaling Pathway." *Neoplasma* 66 (4): 524–31. https://doi.org/10.4149/neo\_2018\_180805N574.
- Ibáñez, Lidia, Grazia Abou-Ezzi, Thomas Ciucci, Vanessa Amiot, Nourhène Belaïd, Dorian Obino, Anna Mansour, Matthieu Rouleau, Abdelilah Wakkach, and Claudine Blin-Wakkach. 2016. "Inflammatory Osteoclasts Prime TNFα-Producing CD4+ T Cells and Express CX3 CR1." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31 (10): 1899–1908. https://doi.org/10.1002/jbmr.2868.
- Ishii, Masaru, Jackson G. Egen, Frederick Klauschen, Martin Meier-Schellersheim, Yukihiko Saeki, Jean Vacher, Richard L. Proia, and Ronald N. Germain. 2009. "Sphingosine-1-Phosphate Mobilizes Osteoclast Precursors and Regulates Bone Homeostasis." *Nature* 458 (7237): 524–28. https://doi.org/10.1038/nature07713.

- Ishii, Masaru, and Junichi Kikuta. 2013. "Sphingosine-1-Phosphate Signaling Controlling Osteoclasts and Bone Homeostasis." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1831 (1): 223–27. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.06.002.
- Ishii, Masaru, Junichi Kikuta, Yutaka Shimazu, Martin Meier-Schellersheim, and Ronald N. Germain. 2010. "Chemorepulsion by Blood S1P Regulates Osteoclast Precursor Mobilization and Bone Remodeling in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (13): 2793–98. https://doi.org/10.1084/jem.20101474.
- Izawa, T., W. Zou, J. C. Chappel, J. W. Ashley, X. Feng, and S. L. Teitelbaum. 2012. "C-Src Links a RANK/ v 3 Integrin Complex to the Osteoclast Cytoskeleton." *Molecular and Cellular Biology* 32 (14): 2943–53. https://doi.org/10.1128/MCB.00077-12.
- Jacome-Galarza, Christian E., Sun-Kyeong Lee, Joseph A. Lorenzo, and Hector Leonardo Aguila. 2013. "Identification, Characterization, and Isolation of a Common Progenitor for Osteoclasts, Macrophages, and Dendritic Cells from Murine Bone Marrow and Periphery." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28 (5): 1203–13. https://doi.org/10.1002/jbmr.1822.
- Jacome-Galarza, Christian E., Gulce I. Percin, James T. Muller, Elvira Mass, Tomi Lazarov, Jiri Eitler, Martina Rauner, et al. 2019. "Developmental Origin, Functional Maintenance and Genetic Rescue of Osteoclasts." *Nature*, April. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1105-7.
- Jansen, Ineke D. C., Jenny A. F. Vermeer, Veerle Bloemen, Jan Stap, and Vincent Everts. 2012. "Osteoclast Fusion and Fission." *Calcified Tissue International* 90 (6): 515–22. https://doi.org/10.1007/s00223-012-9600-y.
- Jeong, Byung-Chul, Jung Ha Kim, Kabsun Kim, Inyoung Kim, Semun Seong, and Nacksung Kim. 2017. "ATF3 Modulates Calcium Signaling in Osteoclast Differentiation and Activity by Associating with C-Fos and NFATc1 Proteins." *Bone* 95 (February): 33–40. https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.11.005.
- Ji, Xiao, Xiang Chen, and Xijie Yu. 2016. "MicroRNAs in Osteoclastogenesis and Function: Potential Therapeutic Targets for Osteoporosis." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3): 349. https://doi.org/10.3390/ijms17030349.
- Jurdic, Pierre, Frédéric Saltel, Anne Chabadel, and Olivier Destaing. 2006. "Podosome and Sealing Zone: Specificity of the Osteoclast Model." *European Journal of Cell Biology* 85 (3–4): 195–202. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.09.008.
- Keller, Johannes, Philip Catala-Lehnen, Antje K. Huebner, Anke Jeschke, Timo Heckt, Anja Lueth, Matthias Krause, et al. 2014. "Calcitonin Controls Bone Formation by Inhibiting the Release of Sphingosine 1-Phosphate from Osteoclasts." *Nature Communications* 5 (October): 5215. https://doi.org/10.1038/ncomms6215.
- Kerschbaumer, Andreas, Alexandre Sepriano, Josef S. Smolen, Désirée van der Heijde, Maxime Dougados, Ronald van Vollenhoven, Iain B. McInnes, et al. 2020. "Efficacy of Pharmacological Treatment in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Research Informing the 2019 Update of the EULAR Recommendations for Management of Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases*, February. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216656.
- Kiener, Hans P., Birgit Niederreiter, David M. Lee, Esther Jimenez-Boj, Josef S. Smolen, and Michael B. Brenner. 2009. "Cadherin-11 Promotes Invasive Behavior of Fibroblast-like Synoviocytes." *Arthritis and Rheumatism* 60 (5): 1305–10. https://doi.org/10.1002/art.24453.
- Kiesel, Jennifer R., Zachary S. Buchwald, and Rajeev Aurora. 2009. "Cross-Presentation by Osteoclasts Induces FoxP3 in CD8+ T Cells." *The Journal of Immunology* 182 (9): 5477–87. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803897.
- Kim, Young-Kook, and V. Narry Kim. 2007. "Processing of Intronic MicroRNAs." *The EMBO Journal* 26 (3): 775–83. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512.
- Kitaura, Hideki, Keisuke Kimura, Masahiko Ishida, Haruka Kohara, Masako Yoshimatsu, and Teruko Takano-Yamamoto. 2013. "Immunological Reaction in TNF-α-Mediated

Osteoclast Formation and Bone Resorption in Vitro and in Vivo." *Clinical & Developmental Immunology* 2013: 181849. https://doi.org/10.1155/2013/181849.

- Knowles, Helen J. 2015. "Hypoxic Regulation of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Activity." *Hypoxia* (*Auckland, N.Z.*) 3: 73–82. https://doi.org/10.2147/HP.S95960.
- Kobayashi, K., N. Takahashi, E. Jimi, N. Udagawa, M. Takami, S. Kotake, N. Nakagawa, et al. 2000. "Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the ODF/RANKL-RANK Interaction." *The Journal of Experimental Medicine* 191 (2): 275–86. https://doi.org/10.1084/jem.191.2.275.
- Koide, Masanori, and Yasuhiro Kobayashi. 2019. "Regulatory Mechanisms of Sclerostin Expression during Bone Remodeling." *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 37 (1): 9–17. https://doi.org/10.1007/s00774-018-0971-7.
- Koide, Masanori, Yasuhiro Kobayashi, Teruhito Yamashita, Shunsuke Uehara, Midori Nakamura, B. Yukihiro Hiraoka, Yuki Ozaki, et al. 2017. "Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 32 (10): 2074–86. https://doi.org/10.1002/jbmr.3175.
- Kollet, Orit, Ayelet Dar, Shoham Shivtiel, Alexander Kalinkovich, Kfir Lapid, Yejezkel Sztainberg, Melania Tesio, et al. 2006. "Osteoclasts Degrade Endosteal Components and Promote Mobilization of Hematopoietic Progenitor Cells." *Nature Medicine* 12 (6): 657–64. https://doi.org/10.1038/nm1417.
- Komine, M., A. Kukita, T. Kukita, Y. Ogata, T. Hotokebuchi, and O. Kohashi. 2001. "Tumor Necrosis Factor-α Cooperates with Receptor Activator of Nuclear Factor KB Ligand in Generation of Osteoclasts in Stromal Cell-Depleted Rat Bone Marrow Cell Culture." *Bone* 28 (5): 474–83. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00420-3.
- Kousteni, S., T. Bellido, L. I. Plotkin, C. A. O'Brien, D. L. Bodenner, L. Han, K. Han, et al. 2001.
   "Nongenotropic, Sex-Nonspecific Signaling through the Estrogen or Androgen Receptors: Dissociation from Transcriptional Activity." *Cell* 104 (5): 719–30.
- Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, and Sam Griffiths-Jones. 2019. "MiRBase: From MicroRNA Sequences to Function." *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D155–62. https://doi.org/10.1093/nar/gky1141.
- Krause, Matthias, James E. Bear, Joseph J. Loureiro, and Frank B. Gertler. 2002. "The Ena/VASP Enigma." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 24): 4721–26. https://doi.org/10.1242/jcs.00218.
- Krishnamurthy, Akilan, A. Jimmy Ytterberg, Meng Sun, Koji Sakuraba, Johanna Steen, Vijay Joshua, Nataliya K. Tarasova, et al. 2019. "Citrullination Controls Dendritic Cell Transdifferentiation into Osteoclasts." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 202 (11): 3143–50. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800534.
- Krishnan, V. 2006. "Regulation of Bone Mass by Wnt Signaling." *Journal of Clinical Investigation* 116 (5): 1202–9. https://doi.org/10.1172/JCl28551.
- Lai, Xin, Shailendra K. Gupta, Ulf Schmitz, Stephan Marquardt, Susanne Knoll, Alf Spitschak, Olaf Wolkenhauer, Brigitte M. Pützer, and Julio Vera. 2018. "MiR-205-5p and MiR-342-3p Cooperate in the Repression of the E2F1 Transcription Factor in the Context of Anticancer Chemotherapy Resistance." *Theranostics* 8 (4): 1106–20. https://doi.org/10.7150/thno.19904.
- Li, Haiyan, Sungyoul Hong, Jianfei Qian, Yuhuan Zheng, Jing Yang, and Qing Yi. 2010. "Cross Talk between the Bone and Immune Systems: Osteoclasts Function as Antigen-Presenting Cells and Activate CD4+ and CD8+ T Cells." *Blood* 116 (2): 210–17. https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-255026.
- Li, J., I. Sarosi, X. Q. Yan, S. Morony, C. Capparelli, H. L. Tan, S. McCabe, et al. 2000. "RANK Is the Intrinsic Hematopoietic Cell Surface Receptor That Controls Osteoclastogenesis and Regulation of Bone Mass and Calcium Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4): 1566–71. https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1566.

- Li, Xu-Ri, Hui-Jun Chu, Teng Lv, Lei Wang, Shou-Fang Kong, and Shu-Zhen Dai. 2014. "MiR-342-3p Suppresses Proliferation, Migration and Invasion by Targeting FOXM1 in Human Cervical Cancer." *FEBS Letters* 588 (17): 3298–3307. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.07.020.
- Li, Zhenhai, Kwan Yeung Wong, Godfrey Chi-Fung Chan, Wee-Joo Chng, and Chor Sang Chim. 2018. "Epigenetic Silencing of EVL/MiR-342 in Multiple Myeloma." *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 192: 46–53. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.11.005.
- Liu, Jianzhong, Shunqing Wang, Ping Zhang, Nasser Said-Al-Naief, Suzanne M. Michalek, and Xu Feng. 2009. "Molecular Mechanism of the Bifunctional Role of Lipopolysaccharide in Osteoclastogenesis." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (18): 12512–23. https://doi.org/10.1074/jbc.M809789200.
- Liu, Wenpeng, Lei Kang, Juqiang Han, Yadong Wang, Chuan Shen, Zhifeng Yan, Yanhong Tai, and Caiyan Zhao. 2018. "MiR-342-3p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Proliferation through Inhibition of IGF-1R-Mediated Warburg Effect." *OncoTargets and Therapy* 11: 1643–53. https://doi.org/10.2147/OTT.S161586.
- Liu, Zheying, Liya Liu, Yun Zhong, Mingbo Cai, Junbi Gao, Chaoyue Tan, Xiaoxiao Han, Ruixia Guo, and Liping Han. 2019. "LncRNA H19 Over-Expression Inhibited Th17 Cell Differentiation to Relieve Endometriosis through MiR-342-3p/IER3 Pathway." *Cell & Bioscience* 9: 84. https://doi.org/10.1186/s13578-019-0346-3.
- Ma, Teng, Hua Chen, Peilong Wang, Ningqiang Yang, and Junsheng Bao. 2020a. "Downregulation of LncRNA ZEB1-AS1 Represses Cell Proliferation, Migration, and Invasion Through Mediating PI3K/AKT/MTOR Signaling by MiR-342-3p/CUL4B Axis in Prostate Cancer." *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, April. https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3123.
- 2020b. "Downregulation of LncRNA ZEB1-AS1 Represses Cell Proliferation, Migration, and Invasion Through Mediating PI3K/AKT/MTOR Signaling by MiR-342-3p/CUL4B Axis in Prostate Cancer." *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, April. https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3123.
- Madel, Maria-Bernadette, Lidia Ibáñez, Thomas Ciucci, Julia Halper, Matthieu Rouleau, Antoine Boutin, Christophe Hue, et al. 2020. "Dissecting the Phenotypic and Functional Heterogeneity of Mouse Inflammatory Osteoclasts by the Expression of Cx3cr1." *ELife* 9 (May). https://doi.org/10.7554/eLife.54493.
- Madel, Maria-Bernadette, Lidia Ibáñez, Abdelilah Wakkach, Teun J. de Vries, Anna Teti, Florence Apparailly, and Claudine Blin-Wakkach. 2019. "Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions." *Frontiers in Immunology* 10: 1408. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01408.
- Manolagas, S. C. 2000. "Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis." *Endocrine Reviews* 21 (2): 115–37. https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395.
- Mansour, Anna, Grazia Abou-Ezzi, Ewa Sitnicka, Sten Eirik W. Jacobsen, Abdelilah Wakkach, and Claudine Blin-Wakkach. 2012. "Osteoclasts Promote the Formation of Hematopoietic Stem Cell Niches in the Bone Marrow." *The Journal of Experimental Medicine* 209 (3): 537–49. https://doi.org/10.1084/jem.20110994.
- Marks, S. C., and M. F. Seifert. 1985. "The Lifespan of Osteoclasts: Experimental Studies Using the Giant Granule Cytoplasmic Marker Characteristic of Beige Mice." *Bone* 6 (6): 451–55. https://doi.org/10.1016/8756-3282(85)90223-6.
- Mattila, Pieta K., and Pekka Lappalainen. 2008. "Filopodia: Molecular Architecture and Cellular Functions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (6): 446–54. https://doi.org/10.1038/nrm2406.
- Meng, Xiangpeng, Jia Ma, Baosheng Wang, Xin Wu, and Zhen Liu. 2020. "Long Non-Coding RNA OIP5-AS1 Promotes Pancreatic Cancer Cell Growth through Sponging MiR-342-3p via AKT/ERK Signaling Pathway." *Journal of Physiology and Biochemistry* 76 (2): 301–15. https://doi.org/10.1007/s13105-020-00734-4.

- Merrild, Ditte Mh, Dinisha C. Pirapaharan, Christina M. Andreasen, Per Kjærsgaard-Andersen, Anaïs Mj Møller, Ming Ding, Jean-Marie Delaissé, and Kent Søe. 2015. "Pit- and Trench-Forming Osteoclasts: A Distinction That Matters." *Bone Research* 3: 15032. https://doi.org/10.1038/boneres.2015.32.
- Miyamoto, Hiroya, Takayuki Suzuki, Yoshiteru Miyauchi, Ryotaro Iwasaki, Tami Kobayashi, Yuiko Sato, Kana Miyamoto, et al. 2012. "Osteoclast Stimulatory Transmembrane Protein and Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein Cooperatively Modulate Cell-Cell Fusion to Form Osteoclasts and Foreign Body Giant Cells." *Journal of Bone and Mineral Research* 27 (6): 1289–97. https://doi.org/10.1002/jbmr.1575.
- Miyazaki, Yusuke, Shingo Nakayamada, Satoshi Kubo, Kazuhisa Nakano, Shigeru Iwata, Ippei Miyagawa, Xiaoxue Ma, Gulzhan Trimova, Kei Sakata, and Yoshiya Tanaka. 2018. "Th22 Cells Promote Osteoclast Differentiation via Production of IL-22 in Rheumatoid Arthritis." *Frontiers in Immunology* 9: 2901. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02901.
- Møller, Anaïs Marie Julie, Jean-Marie Delaissé, and Kent Søe. 2017. "Osteoclast Fusion: Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at Different Stages of Nuclearity." *Journal of Cellular Physiology* 232 (6): 1396–1403. https://doi.org/10.1002/jcp.25633.
- Momen-Heravi, Fatemeh, and Shashi Bala. 2018. "MiRNA Regulation of Innate Immunity." *Journal of Leukocyte Biology*, April. https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1117-459R.
- Moran-Moguel, Maria Cristina, Stefania Petarra-Del Rio, Evangelina E. Mayorquin-Galvan, and Maria G. Zavala-Cerna. 2018. "Rheumatoid Arthritis and MiRNAs: A Critical Review through a Functional View." *Journal of Immunology Research* 2018: 2474529. https://doi.org/10.1155/2018/2474529.
- Moss, Marcia L., and Dmitry Minond. 2017. "Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation." *Mediators of Inflammation* 2017: 9673537. https://doi.org/10.1155/2017/9673537.
- Moss, Marcia L., Liora Sklair-Tavron, and Raphael Nudelman. 2008. "Drug Insight: Tumor Necrosis Factor-Converting Enzyme as a Pharmaceutical Target for Rheumatoid Arthritis." *Nature Clinical Practice. Rheumatology* 4 (6): 300–309. https://doi.org/10.1038/ncprheum0797.
- Mousavi, Mohammad Javad, Ahmadreza Jamshidi, Arvind Chopra, Saeed Aslani, Massoomeh Akhlaghi, and Mahdi Mahmoudi. 2018. "Implications of the Noncoding RNAs in Rheumatoid Arthritis Pathogenesis." *Journal of Cellular Physiology* 234 (1): 335–47. https://doi.org/10.1002/jcp.26911.
- Murata, Koichi, Celestia Fang, Chikashi Terao, Eugenia G. Giannopoulou, Ye Ji Lee, Min Joon Lee, Se-Hwan Mun, et al. 2017. "Hypoxia-Sensitive COMMD1 Integrates Signaling and Cellular Metabolism in Human Macrophages and Suppresses Osteoclastogenesis." *Immunity* 47 (1): 66-79.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.018.
- Murphy, Elaine, and Graham R. Williams. 2004. "The Thyroid and the Skeleton." *Clinical Endocrinology* 61 (3): 285–98. https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02053.x.
- Muz, Barbara, Moddasar N. Khan, Serafim Kiriakidis, and Ewa M. Paleolog. 2009. "Hypoxia. The Role of Hypoxia and HIF-Dependent Signalling Events in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 11 (1): 201. https://doi.org/10.1186/ar2568.
- Ng, Andrew Yh, Chengjian Tu, Shichen Shen, Ding Xu, Merry J. Oursler, Jun Qu, and Shuying Yang. 2018. "Comparative Characterization of Osteoclasts Derived From Murine Bone Marrow Macrophages and RAW 264.7 Cells Using Quantitative Proteomics." *JBMR Plus* 2 (6): 328–40. https://doi.org/10.1002/jbm4.10058.
- Ng, C. T., M. Biniecka, A. Kennedy, J. McCormick, O. Fitzgerald, B. Bresnihan, D. Buggy, et al. 2010. "Synovial Tissue Hypoxia and Inflammation in Vivo." *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (7): 1389–95. https://doi.org/10.1136/ard.2009.119776.
- Nobes, C. D., and A. Hall. 1995. "Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia." *Cell* 81 (1): 53–62. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4.
- O'Brien, William, Brian M. Fissel, Yukiko Maeda, Jing Yan, Xianpeng Ge, Ellen M. Gravallese, Antonios O. Aliprantis, and Julia F. Charles. 2016. "RANK-Independent Osteoclast

Formation and Bone Erosion in Inflammatory Arthritis." *Arthritis & Rheumatology* (Hoboken, N.J.) 68 (12): 2889–2900. https://doi.org/10.1002/art.39837.

- Oh, Ju Hee, and Na Kyung Lee. 2017. "Up-Regulation of RANK Expression via ERK1/2 by Insulin Contributes to the Enhancement of Osteoclast Differentiation." *Molecules and Cells* 40 (5): 371–77. https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0025.
- Orth, Martin F., Alex Cazes, Elke Butt, and Thomas G. P. Grunewald. 2015. "An Update on the LIM and SH3 Domain Protein 1 (LASP1): A Versatile Structural, Signaling, and Biomarker Protein." *Oncotarget* 6 (1): 26–42. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3083.
- Parfitt, A. M. 1994. "Osteonal and Hemi-Osteonal Remodeling: The Spatial and Temporal Framework for Signal Traffic in Adult Human Bone." *Journal of Cellular Biochemistry* 55 (3): 273–86. https://doi.org/10.1002/jcb.240550303.
- Park, Jin Hee, Na Kyung Lee, and Soo Young Lee. 2017. "Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation." *Molecules and Cells* 40 (10): 706–13. https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0225.
- Peng, Xing, Jinyu Gao, Chunyan Cai, and Yumei Zhang. 2020. "LncRNA LINC01503 Aggravates the Progression of Cervical Cancer through Sponging MiR-342-3p to Mediate FXYD3 Expression." *Bioscience Reports* 40 (6). https://doi.org/10.1042/BSR20193371.
- Piper, Kim, Alan Boyde, and Sheila J. Jones. 1992. "The Relationship between the Number of Nuclei of an Osteoclast and Its Resorptive Capability in Vitro." *Anatomy and Embryology* 186 (4): 291–99. https://doi.org/10.1007/BF00185977.
- Pixley, Fiona J., and E. Richard Stanley. 2004. "CSF-1 Regulation of the Wandering Macrophage: Complexity in Action." *Trends in Cell Biology* 14 (11): 628–38. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.016.
- Présumey, Jessy, Gabriel Courties, Pascale Louis-Plence, Virginie Escriou, Daniel Scherman, Yves-Marie Pers, Hans Yssel, et al. 2013. "Nicotinamide Phosphoribosyltransferase/Visfatin Expression by Inflammatory Monocytes Mediates Arthritis Pathogenesis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 72 (10): 1717–24. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202403.
- Raftopoulou, Myrto, and Alan Hall. 2004. "Cell Migration: Rho GTPases Lead the Way." *Developmental Biology* 265 (1): 23–32. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.06.003.
- Ransohoff, Julia D., Yuning Wei, and Paul A. Khavari. 2018. "The Functions and Unique Features of Long Intergenic Non-Coding RNA." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (3): 143–57. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.104.
- Reinholt, F. P., K. Hultenby, A. Oldberg, and D. Heinegård. 1990. "Osteopontin--a Possible Anchor of Osteoclasts to Bone." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12): 4473–75. https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4473.
- Rhinn, Hervé, Céline Largeau, Pascal Bigey, René Lai Kuen, Magali Richard, Daniel Scherman, and Virginie Escriou. 2009. "How to Make SiRNA Lipoplexes Efficient? Add a DNA Cargo." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (4): 219– 30. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.01.005.
- Rivollier, Aymeric, Marlène Mazzorana, Jacques Tebib, Muriel Piperno, Tarik Aitsiselmi, Chantal Rabourdin-Combe, Pierre Jurdic, and Christine Servet-Delprat. 2004. "Immature Dendritic Cell Transdifferentiation into Osteoclasts: A Novel Pathway Sustained by the Rheumatoid Arthritis Microenvironment." *Blood* 104 (13): 4029–37. https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0041.
- Romero-Cordoba, Sandra L., Sergio Rodriguez-Cuevas, Veronica Bautista-Pina, Antonio Maffuz-Aziz, Elvira D'Ippolito, Giulia Cosentino, Sara Baroni, Marilena V. Iorio, and Alfredo Hidalgo-Miranda. 2018. "Loss of Function of MiR-342-3p Results in MCT1 over-Expression and Contributes to Oncogenic Metabolic Reprogramming in Triple Negative Breast Cancer." *Scientific Reports* 8 (1): 12252. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29708-9.
- Ross, F. P., J. Chappel, J. I. Alvarez, D. Sander, W. T. Butler, M. C. Farach-Carson, K. A. Mintz, P. G. Robey, S. L. Teitelbaum, and D. A. Cheresh. 1993. "Interactions between

the Bone Matrix Proteins Osteopontin and Bone Sialoprotein and the Osteoclast Integrin Alpha v Beta 3 Potentiate Bone Resorption." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (13): 9901–7.

- Ruef, Nina, Silvia Dolder, Daniel Aeberli, Michal Seitz, Deepak Balani, and Willy Hofstetter. 2017. "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Dependent CD11c-Positive Cells Differentiate into Active Osteoclasts." *Bone* 97: 267–77. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.036.
- Salehi, Eisa, Rahil Eftekhari, Mona Oraei, Alvand Gharib, and Katayoon Bidad. 2015. "MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis." *Clinical Rheumatology* 34 (4): 615–28. https://doi.org/10.1007/s10067-015-2898-x.
- Saltel, Frédéric, Olivier Destaing, Frédéric Bard, Diane Eichert, and Pierre Jurdic. 2004. "Apatite-Mediated Actin Dynamics in Resorbing Osteoclasts." *Molecular Biology of the Cell* 15 (12): 5231–41. https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0522.
- Sapir-Koren, R., and G. Livshits. 2014. "Osteocyte Control of Bone Remodeling: Is Sclerostin a Key Molecular Coordinator of the Balanced Bone Resorption-Formation Cycles?" Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA 25 (12): 2685–2700. https://doi.org/10.1007/s00198-014-2808-0.
- Sato, Chieri, Tsuyoshi Iwasaki, Sachie Kitano, Sachi Tsunemi, and Hajime Sano. 2012. "Sphingosine 1-Phosphate Receptor Activation Enhances BMP-2-Induced Osteoblast Differentiation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423 (1): 200– 205. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.130.
- Schett, Georg, and Ellen Gravallese. 2012. "Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms, Diagnosis and Treatment." *Nature Reviews. Rheumatology* 8 (11): 656–64. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.153.
- Schlegel, Anne, Céline Largeau, Pascal Bigey, Michel Bessodes, Kristell Lebozec, Daniel Scherman, and Virginie Escriou. 2011. "Anionic Polymers for Decreased Toxicity and Enhanced in Vivo Delivery of SiRNA Complexed with Cationic Liposomes." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 152 (3): 393– 401. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.031.
- Schneider, Marlon R., Maria Sibilia, and Reinhold G. Erben. 2009. "The EGFR Network in Bone Biology and Pathology." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 20 (10): 517–24. https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.008.
- Schreiber, V., C. Moog-Lutz, C. H. Régnier, M. P. Chenard, H. Boeuf, J. L. Vonesch, C. Tomasetto, and M. C. Rio. 1998. "Lasp-1, a Novel Type of Actin-Binding Protein Accumulating in Cell Membrane Extensions." *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 4 (10): 675–87.
- Seeling, Michaela, Ulrike Hillenhoff, Jean Pierre David, Georg Schett, Jan Tuckermann, Anja Lux, and Falk Nimmerjahn. 2013. "Inflammatory Monocytes and Fcγ Receptor IV on Osteoclasts Are Critical for Bone Destruction during Inflammatory Arthritis in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26): 10729–34. https://doi.org/10.1073/pnas.1301001110.
- Shao, Lianqi, Qianru He, Yunhui Liu, Xiaobai Liu, Jian Zheng, Jun Ma, Libo Liu, Han Li, Zhen Li, and Yixue Xue. 2019. "UPF1 Regulates the Malignant Biological Behaviors of Glioblastoma Cells via Enhancing the Stability of Linc-00313." *Cell Death & Disease* 10 (9): 629. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1845-1.
- Sharma, Ashish Ranjan, Garima Sharma, Sang-Soo Lee, and Chiranjib Chakraborty. 2016. "MiRNA-Regulated Key Components of Cytokine Signaling Pathways and Inflammation in Rheumatoid Arthritis." *Medicinal Research Reviews* 36 (3): 425–39. https://doi.org/10.1002/med.21384.
- Shashkova, Elena V., Jahnavi Trivedi, Anna B. Cline-Smith, Chloe Ferris, Zachary S. Buchwald, Jesse Gibbs, Deborah Novack, and Rajeev Aurora. 2016. "Osteoclast-Primed Foxp3+ CD8 T Cells Induce T-Bet, Eomesodermin, and IFN-γ To Regulate Bone Resorption." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 197 (3): 726–35. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600253.

- Siddiqui, Jawed A., and Nicola C. Partridge. 2016. "Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement." *Physiology (Bethesda, Md.)* 31 (3): 233–45. https://doi.org/10.1152/physiol.00061.2014.
- Smolen, Josef S., Daniel Aletaha, Anne Barton, Gerd R. Burmester, Paul Emery, Gary S. Firestein, Arthur Kavanaugh, et al. 2018. "Rheumatoid Arthritis." *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1): 1–23. https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1.
- Smolen, Josef S., Robert B. M. Landewé, Johannes W. J. Bijlsma, Gerd R. Burmester, Maxime Dougados, Andreas Kerschbaumer, Iain B. McInnes, et al. 2020. "EULAR Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis with Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2019 Update." Annals of the Rheumatic Diseases, January. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216655.
- Søe, Kent, and Jean-Marie Delaissé. 2017. "Time-Lapse Reveals That Osteoclasts Can Move across the Bone Surface While Resorbing." *Journal of Cell Science* 130 (12): 2026–35. https://doi.org/10.1242/jcs.202036.
- Søe, Kent, Anne-Sofie Hobolt-Pedersen, and Jean-Marie Delaisse. 2015. "The Elementary Fusion Modalities of Osteoclasts." *Bone* 73 (April): 181–89. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.12.010.
- Song, Xiaoyan, Yong Jin, Mingyu Yan, Yonggang Zhang, and Bing Chen. 2019. "MicroRNA-342-3p Functions as a Tumor Suppressor by Targeting LIM and SH3 Protein 1 in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Oncology Letters* 17 (1): 688–96. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9637.
- Sowers, M. R., J. S. Finkelstein, B. Ettinger, I. Bondarenko, R. M. Neer, J. A. Cauley, S. Sherman, G. A. Greendale, and Study of Women's Health Across the Nation. 2003.
  "The Association of Endogenous Hormone Concentrations and Bone Mineral Density Measures in Pre- and Perimenopausal Women of Four Ethnic Groups: SWAN." Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA 14 (1): 44–52. https://doi.org/10.1007/s00198-002-1307-x.
- Spencer, Joel A., Francesca Ferraro, Emmanuel Roussakis, Alyssa Klein, Juwell Wu, Judith M. Runnels, Walid Zaher, et al. 2014. "Direct Measurement of Local Oxygen Concentration in the Bone Marrow of Live Animals." *Nature* 508 (7495): 269–73. https://doi.org/10.1038/nature13034.
- Steffen, Ülrike, Georg Schett, and Aline Bozec. 2019. "How Autoantibodies Regulate Osteoclast Induced Bone Loss in Rheumatoid Arthritis." *Frontiers in Immunology* 10: 1483. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01483.
- Sticht, Carsten, Carolina De La Torre, Alisha Parveen, and Norbert Gretz. 2018. "MiRWalk: An Online Resource for Prediction of MicroRNA Binding Sites." *PloS One* 13 (10): e0206239. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239.
- Su, Lin-Chong, An-Fang Huang, Hong Jia, Yi Liu, and Wang-Dong Xu. 2017. "Role of MicroRNA-155 in Rheumatoid Arthritis." *International Journal of Rheumatic Diseases* 20 (11): 1631–37. https://doi.org/10.1111/1756-185X.13202.
- Suarez-Bregua, Paula, Pedro Miguel Guerreiro, and Josep Rotllant. 2018. "Stress, Glucocorticoids and Bone: A Review From Mammals and Fish." *Frontiers in Endocrinology* 9: 526. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00526.
- Sugo, Tsukasa, Michiko Terada, Tatsuo Oikawa, Kenichi Miyata, Satoshi Nishimura, Eriya Kenjo, Mari Ogasawara-Shimizu, et al. 2016. "Development of Antibody-SiRNA Conjugate Targeted to Cardiac and Skeletal Muscles." *Journal of Controlled Release* 237 (September): 1–13. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.036.
- Sun, Mengge, Xiaoya Zhou, Lili Chen, Shishu Huang, Victor Leung, Nan Wu, Haobo Pan, Wanxin Zhen, William Lu, and Songlin Peng. 2016. "The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis." *BioMed Research International* 2016: 1652417. https://doi.org/10.1155/2016/1652417.
- Sun, Yu-Meng, Kang-Yu Lin, and Yue-Qin Chen. 2013. "Diverse Functions of MiR-125 Family in Different Cell Contexts." *Journal of Hematology & Oncology* 6 (January): 6. https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-6.

- Tai, Mei Chee, Taisuke Kajino, Masahiro Nakatochi, Chinatsu Arima, Yukako Shimada, Motoshi Suzuki, Hiroyuki Miyoshi, Yasushi Yatabe, Kiyoshi Yanagisawa, and Takashi Takahashi. 2015. "MiR-342-3p Regulates MYC Transcriptional Activity via Direct Repression of E2F1 in Human Lung Cancer." *Carcinogenesis* 36 (12): 1464–73. https://doi.org/10.1093/carcin/bgv152.
- Takayanagi, H., K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata, K. Sato, A. Takaoka, et al. 2000. "T-Cell-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis by Signalling Cross-Talk between RANKL and IFN-Gamma." *Nature* 408 (6812): 600–605. https://doi.org/10.1038/35046102.
- Tang, Peifu, Qi Xiong, Wei Ge, and Lihai Zhang. 2014. "The Role of MicroRNAs in Osteoclasts and Osteoporosis." *RNA Biology* 11 (11): 1355–63. https://doi.org/10.1080/15476286.2014.996462.
- Targan, S. R., S. B. Hanauer, S. J. van Deventer, L. Mayer, D. H. Present, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible, and P. J. Rutgeerts. 1997. "A Short-Term Study of Chimeric Monoclonal Antibody CA2 to Tumor Necrosis Factor Alpha for Crohn's Disease. Crohn's Disease CA2 Study Group." *The New England Journal of Medicine* 337 (15): 1029–35. https://doi.org/10.1056/NEJM199710093371502.
- Tatsumi, Sawako, Kiyoaki Ishii, Norio Amizuka, Minqi Li, Toshihiro Kobayashi, Kenji Kohno, Masako Ito, Sunao Takeshita, and Kyoji Ikeda. 2007. "Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction." *Cell Metabolism* 5 (6): 464–75. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.001.
- Tavasolian, Fataneh, Elham Abdollahi, Ramin Rezaei, Amir Abbas Momtazi-Borojeni, Yves Henrotin, and Amirhossein Sahebkar. 2018. "Altered Expression of MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis." *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (1): 478–87. https://doi.org/10.1002/jcb.26205.
- Taylor, Peter C. 2019. "Clinical Efficacy of Launched JAK Inhibitors in Rheumatoid Arthritis."Rheumatology(Oxford, England)58(Suppl 1):i17–26.https://doi.org/10.1093/rheumatology/key225.
- Thomson, Daniel W., and Marcel E. Dinger. 2016. "Endogenous MicroRNA Sponges: Evidence and Controversy." *Nature Reviews. Genetics* 17 (5): 272–83. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.20.
- Tobón, Gabriel J., Pierre Youinou, and Alain Saraux. 2010. "The Environment, Geo-Epidemiology, and Autoimmune Disease: Rheumatoid Arthritis." *Journal of Autoimmunity* 35 (1): 10–14. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.12.009.
- Tokunaga, Tadahiro, Sho Mokuda, Hiroki Kohno, Kazutoshi Yukawa, Tatsuomi Kuranobu, Katsuhiro Oi, Yusuke Yoshida, Shintaro Hirata, and Eiji Sugiyama. 2020. "TGFβ1 Regulates Human RANKL-Induced Osteoclastogenesis via Suppression of NFATc1 Expression." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3). https://doi.org/10.3390/ijms21030800.
- Udagawa, N., N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T. J. Martin, and T. Suda. 1990. "Origin of Osteoclasts: Mature Monocytes and Macrophages Are Capable of Differentiating into Osteoclasts under a Suitable Microenvironment Prepared by Bone Marrow-Derived Stromal Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (18): 7260–64. https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7260.
- Utting, Jennifer C., Adrienne M. Flanagan, Andrea Brandao-Burch, Isabel R. Orriss, and Timothy R. Arnett. 2010. "Hypoxia Stimulates Osteoclast Formation from Human Peripheral Blood." *Cell Biochemistry and Function* 28 (5): 374–80. https://doi.org/10.1002/cbf.1660.
- Väänänen, H Kalervo, and Mike Horton. n.d. "The Osteoclast Clear Zone Is a Specialized Cell-Extracellular Matrix Adhesion Structure," 4.
- Verma, Santosh K., Evgenia Leikina, Kamran Melikov, and Leonid V. Chernomordik. 2014. "Late Stages of the Synchronized Macrophage Fusion in Osteoclast Formation Depend on Dynamin." *Biochemical Journal* 464 (3): 293–300. https://doi.org/10.1042/BJ20141233.

- Wakkach, Abdelilah, Anna Mansour, Romain Dacquin, Emmanuel Coste, Pierre Jurdic, Georges F. Carle, and Claudine Blin-Wakkach. 2008. "Bone Marrow Microenvironment Controls the in Vivo Differentiation of Murine Dendritic Cells into Osteoclasts." *Blood* 112 (13): 5074–83. https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132787.
- Wang, Changhe, Weimin Zhang, Shouli Xing, Zhaoxia Wang, Ju Wang, and Jin Qu. 2019. "MiR-342-3p Inhibits Cell Migration and Invasion through Suppressing Forkhead Box Protein Q1 in Ovarian Carcinoma." *Anti-Cancer Drugs* 30 (9): 917–24. https://doi.org/10.1097/CAD.000000000000801.
- Wang, Fang, Shaobo Liang, Xiaowei Liu, Lei Han, Junye Wang, and Qin Du. 2018. "LINC00460 Modulates KDM2A to Promote Cell Proliferation and Migration by Targeting MiR-342-3p in Gastric Cancer." *OncoTargets and Therapy* 11: 6383–94. https://doi.org/10.2147/OTT.S169307.
- Wang, Jinghua, Shushan Yan, Jinghan Yang, Hongying Lu, Donghua Xu, and Zengyan Wang. 2019. "Non-Coding RNAs in Rheumatoid Arthritis: From Bench to Bedside." *Frontiers in Immunology* 10: 3129. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03129.
- Wang, Lei, Jing-Wen Xia, Zun-Ping Ke, and Bing-Hong Zhang. 2019. "Blockade of NEAT1 Represses Inflammation Response and Lipid Uptake via Modulating MiR-342-3p in Human Macrophages THP-1 Cells." *Journal of Cellular Physiology* 234 (4): 5319–26. https://doi.org/10.1002/jcp.27340.
- Wang, Liang, Lei Xu, Min Xu, Guoqiang Liu, Jian Xing, Caifeng Sun, and Huifang Ding. 2015.
   "Obesity-Associated MiR-342-3p Promotes Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells by Suppressing CtBP2 and Releasing C/EBPα from CtBP2 Binding." *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 35 (6): 2285–98. https://doi.org/10.1159/000374032.
- Wang, Shou-Hua, Fei Ma, Zhao-Hui Tang, Xiao-Cai Wu, Qiang Cai, Ming-Di Zhang, Ming-Zhe Weng, Di Zhou, Jian-Dong Wang, and Zhi-Wei Quan. 2016. "Long Non-Coding RNA H19 Regulates FOXM1 Expression by Competitively Binding Endogenous MiR-342-3p in Gallbladder Cancer." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 35 (1): 160. https://doi.org/10.1186/s13046-016-0436-6.
- Wang, Yongmei, Shigeki Nishida, Hashem Z. Elalieh, Roger K. Long, Bernard P. Halloran, and Daniel D. Bikle. 2006. "Role of IGF-I Signaling in Regulating Osteoclastogenesis." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society* for Bone and Mineral Research 21 (9): 1350–58. https://doi.org/10.1359/jbmr.060610.
- Wein, Marc N., and Henry M. Kronenberg. 2018. "Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (8). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031237.
- Westendorf, Jennifer J., Rachel A. Kahler, and Tania M. Schroeder. 2004. "Wnt Signaling in Osteoblasts and Bone Diseases." *Gene* 341 (October): 19–39. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.044.
- Wong, Eitan, Tal Cohen, Erez Romi, Maxim Levin, Yoav Peleg, Uri Arad, Avraham Yaron, Marcos E. Milla, and Irit Sagi. 2016. "Harnessing the Natural Inhibitory Domain to Control TNFα Converting Enzyme (TACE) Activity in Vivo." *Scientific Reports* 6: 35598. https://doi.org/10.1038/srep35598.
- Wu, Dong-Mei, Shan Wang, Xin Wen, Xin-Rui Han, Yong-Jian Wang, Min Shen, Shao-Hua Fan, et al. 2019. "Suppression of MicroRNA-342-3p Increases Glutamate Transporters and Prevents Dopaminergic Neuron Loss through Activating the Wnt Signaling Pathway via P21-Activated Kinase 1 in Mice with Parkinson's Disease." Journal of Cellular Physiology 234 (6): 9033–44. https://doi.org/10.1002/jcp.27577.
- Wu, Mengrui, Guiqian Chen, and Yi-Ping Li. 2016. "TGF-β and BMP Signaling in Osteoblast, Skeletal Development, and Bone Formation, Homeostasis and Disease." Bone Research 4: 16009. https://doi.org/10.1038/boneres.2016.9.
- Xia, Chun-Fang, Ruben J. Boado, and William M. Pardridge. 2009. "Antibody-Mediated Targeting of SiRNA via the Human Insulin Receptor Using Avidin-Biotin Technology." *Molecular Pharmaceutics* 6 (3): 747–51. https://doi.org/10.1021/mp800194y.

- Xia, Zhuying, Chao Chen, Peng Chen, Hui Xie, and Xianghang Luo. 2011. "MicroRNAs and Their Roles in Osteoclast Differentiation." *Frontiers of Medicine* 5 (4): 414–19. https://doi.org/10.1007/s11684-011-0168-0.
- Xiao, Yanling, Jara Palomero, Joanna Grabowska, Liqin Wang, Iris de Rink, Luuk van Helvert, and Jannie Borst. 2017. "Macrophages and Osteoclasts Stem from a Bipotent Progenitor Downstream of a Macrophage/Osteoclast/Dendritic Cell Progenitor." *Blood Advances* 1 (23): 1993–2006. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017008540.
- Xie, Chuhai, Binwei Chen, Boyi Wu, Jianhong Guo, Yulong Shi, and Yanming Cao. 2020. "CircSAMD4A Regulates Cell Progression and Epithelial-mesenchymal Transition by Sponging MiR-342-3p via the Regulation of FZD7 Expression in Osteosarcoma." *International Journal of Molecular Medicine* 46 (1): 107–18. https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4585.
- Xie, Xiao, Hongtao Liu, Mingsong Wang, Fangbao Ding, Haibo Xiao, Fengqing Hu, Rui Hu, and Ju Mei. 2015. "MiR-342-3p Targets RAP2B to Suppress Proliferation and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (7): 5031–38. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3154-3.
- Xiong, Jinhu, Melda Onal, Robert L. Jilka, Robert S. Weinstein, Stavros C. Manolagas, and Charles A. O'Brien. 2011. "Matrix-Embedded Cells Control Osteoclast Formation." *Nature Medicine* 17 (10): 1235–41. https://doi.org/10.1038/nm.2448.
- Xue, Xiaofeng, Xiaoyan Fei, Wenjie Hou, Yajie Zhang, Liu Liu, and Rongkuan Hu. 2018. "MiR-342-3p Suppresses Cell Proliferation and Migration by Targeting AGR2 in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancer Letters* 412: 170–78. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.024.
- Yahara, Yasuhito, Tomasa Barrientos, Yuning J. Tang, Vijitha Puviindran, Puviindran Nadesan, Hongyuan Zhang, Jason R. Gibson, et al. 2020. "Erythromyeloid Progenitors Give Rise to a Population of Osteoclasts That Contribute to Bone Homeostasis and Repair." *Nature Cell Biology* 22 (1): 49–59. https://doi.org/10.1038/s41556-019-0437-8.
- Yang, Jing, Kun Li, Jian Chen, Xiaoxiong Hu, He Wang, and Xuan Zhu. 2020. "Long Noncoding RNA LINC00460 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression via Regulation of MiR-342-3p/AGR2 Axis." *OncoTargets and Therapy* 13: 1979–91. https://doi.org/10.2147/OTT.S239258.
- Yang, Rui, Zhiwei Wang, Guangran Meng, and Li Hua. 2020. "Circular RNA CCDC66 Facilitates Abdominal Aortic Aneurysm through the Overexpression of CCDC66." *Cell Biochemistry and Function*, January. https://doi.org/10.1002/cbf.3494.
- Yang, Xi, Hongming Huang, Xinfeng Wang, Haiyan Liu, Hong Liu, and Zenghua Lin. 2020. "Knockdown of LncRNA SNHG16 Suppresses Multiple Myeloma Cell Proliferation by Sponging MiR-342-3p." *Cancer Cell International* 20: 38. https://doi.org/10.1186/s12935-020-1118-1.
- Zallone, Alberta. 2006. "Direct and Indirect Estrogen Actions on Osteoblasts and Osteoclasts." Annals of the New York Academy of Sciences 1068 (April): 173–79. https://doi.org/10.1196/annals.1346.019.
- Zhang, Peng-Fei, Jing Wu, Yin Wu, Wei Huang, Min Liu, Zhao-Ru Dong, Bai-Ying Xu, Yong Jin, Fei Wang, and Xue-Mei Zhang. 2019. "The LncRNA SCARNA2 Mediates Colorectal Cancer Chemoresistance through a Conserved MicroRNA-342-3p Target Sequence." *Journal of Cellular Physiology* 234 (7): 10157–65. https://doi.org/10.1002/jcp.27684.
- Zhang, Shaokun, Lidi Liu, Zhenshan Lv, Qiao Li, Weiquan Gong, and Hong Wu. 2017. "MicroRNA-342-3p Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion of Osteosarcoma Cells by Targeting Astrocyte-Elevated Gene-1 (AEG-1)." *Oncology Research* 25 (9): 1505–15. https://doi.org/10.3727/096504017X14886485417426.
- Zhang, Weiguang, Yunke Bi, Jianhua Li, Fei Peng, Hui Li, Chenguang Li, Laizang Wang, et al. 2017. "Long Noncoding RNA FTX Is Upregulated in Gliomas and Promotes Proliferation and Invasion of Glioma Cells by Negatively Regulating MiR-342-3p."

*Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 97 (4): 447–57. https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.152.

- Zhang, Xiaohong, Yinman Feng, Yanli Gao, and Jun Hu. 2020. "Long Noncoding RNA LINC00634 Functions as an Oncogene in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Through the MiR-342-3p/Bcl2L1 Axis." *Technology in Cancer Research & Treatment* 19 (December): 1533033820928508. https://doi.org/10.1177/1533033820928508.
- Zhang, Xinyue, Yunlong He, Kyoung-Hwa Lee, Wendy Dubois, Ziqing Li, Xiaolin Wu, Alexander Kovalchuk, Weimin Zhang, and Jing Huang. 2013. "Rap2b, a Novel P53 Target, Regulates P53-Mediated pro-Survival Function." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (8): 1279–91. https://doi.org/10.4161/cc.24364.
- Zhang, Zhongzhao, Min Jia, Changhui Wen, Aijuan He, and Zunfeng Ma. 2020. "LncRNA SCARNA2 Induces Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Progression via Modulating MiR-342-3p Expression." *The Journal of Gene Medicine*, June, e3242. https://doi.org/10.1002/jgm.3242.
- Zhao, Liang, and Yubao Zhang. 2015. "MiR-342-3p Affects Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation via Regulating NF-KB Pathway." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457 (3): 370–77. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.119.
- Zhou, Hong, Mark S. Cooper, and Markus J. Seibel. 2013. "Endogenous Glucocorticoids and Bone." *Bone Research* 1 (2): 107–19. https://doi.org/10.4248/BR201302001.
- Zhu, Siliang, Wenke Song, Yanqi Sun, Yongqin Zhou, and Fanpo Kong. 2020. "MiR-342 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting MAPK1 Expression." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, April. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13315.

## Résumé

Les micro-ARNs (miARNs) sont de petits ARN simples brins non codants qui contrôlent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, dans de nombreux processus cellulaires. Ils jouent un rôle clé dans la régulation de l'ostéoclastogenèse, un processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la formation d'ostéoclastes (OCs). Les OCs sont des cellules multinucléées du tissu osseux issus de précurseurs myéloïdes. Ce sont les seules cellules de l'organisme capables de résorption osseuse, donc essentielles à l'homéostasie osseuse et au renouvellement osseux. Toute anomalie de leur fonctionnement est associée à des pathologies osseuses. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (PR), les OCs participent activement à l'érosion osseuse. La PR est une maladie auto-immune invalidante caractérisée par une atteinte articulaire inflammatoire associée à une destruction du cartilage et de l'os. Il a été décrit différents types d'OCs sur la base de leurs propriétés immunologiques : les OC tolérogènes (t-OCs) et les OC inflammatoires (i-OCs). Des études récentes ont montré que les i-OCs dérivent exclusivement de précurseurs circulants qui infiltrent les articulations arthritiques. Mon travail a consisté à combiner les analyses du miRNome et du transcriptome des sous-types t-OCs et i-OCs, en contexte physiologique et arthritique, afin d'identifier des miARNs spécifiques de chaque type d'OCs et les voies biologiques associées. Parmi les miARNs associés aux i-OCs, j'ai identifié miR-342-3p, encore non décrit dans l'ostéoclastogenèse ou l'arthrite. J'ai montré que miR-342-3p a un effet proostéoclastique in vitro en soutenant la phase précoce de l'ostéoclastogenèse par induction de la survie et de la motilité des précurseurs myéloïdes. J'ai optimisé l'inhibition de miR-342-3p dans les précurseurs des i-OCs dans le modèle murin de l'arthrite auto-immune (K/BxN serum-transfer arthritis, STA) par l'administration systémique ou locale d'un inhibiteur ou agoniste de miR-342-3p formulé avec le liposome cationique DMAPAP/DOPE. J'ai montré le ciblage des monocytes inflammatoires Ly6C<sup>high</sup> du sang et de l'articulation, associée à l'inhibition d'Adam17 quand un lipoplex miR-342-3p est injecté. J'ai enfin montré qu'Adam17 est une nouvelle cible de miR-342-3p dans les précurseurs OCs. Mes travaux suggèrent que la modulation in vivo de l'expression de miR-342-3p dans les précurseurs des i-OCs pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour réduire l'érosion osseuse liée à l'arthrite.

Mots-clés : micro-ARNs ; miR-342-3p ; ostéoclastes ; arthrite

## Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small, single-strand non-coding RNAs that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level in many cellular processes. They play a key role in the regulation of osteoclastogenesis, a process of cell differentiation that leads to the formation of osteoclasts (OCs). OCs are multinucleated cells located in bone tissue that derived from myeloid precursors. OCs are the only cells capable of bone resorption, which role is essential to bone homeostasis and turnover. However, they actively participate in bone erosion in rheumatoid arthritis (RA), an autoimmune disease characterized by chronic joint inflammation associated with destruction of cartilage and bone. Based on their immunological properties, two OC subsets have been identified, the so called tolerogenic OCs (t-OCs) and inflammatory OCs (i-OCs). Recent studies have shown that the i-OCs associated with arthritis exclusively derive from circulating Ly6Chigh precursors that infiltrate inflamed joints. Combining miRNome and RNA-Seg analyses of t-OC and i-OC subsets, I aimed at identifying miRNAs markers specific for each subset and associated biological pathways. Among the miRNAs associated with i-OCs, I identified miR-342-3p, neither described yet in osteoclastogenesis or in arthritis. I demonstrated that miR-342-3p has a pro-osteoclastic effect in vitro by supporting the early phase of osteoclastogenesis, through the control of survival and motility of the precursors. I optimized the delivery of miR-342-3p agonist or neutralizing molecules in the precursors of i-OCs using the mouse model of autoimmune arthritis (K/BxN serum-transfer arthritis, STA) and the cationic liposome DMAPAP/DOPE. I showed that the systemic or intra-articular administration of miR-342-3p lipoplex selectively targets blood and joint inflammatory Ly6Chigh monocytes, and that in vivo neutralization of miR-342-3p in Ly6Chigh OC precursors of STA mice increased Adam17 expression. I identified Adam17 as a novel target for miR-342-3p. Overall, my data indicate that the *in vivo* modulation of miR-342-3p. expression in i-OC precursors could be a potential therapeutic strategy to reduce bone erosion in arthritis.

Keywords: microRNAs; miR-342-3p; osteoclasts; arthritis