

Mémoire

Auteur : Cremers, Sébastien

Promoteur(s) : NJOCK, Makon-Sébastien; Sadzot, Catherine

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/20943>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Etude de micro-RNAs exosomaux altérés dans la sclérodermie systémique avec atteinte pulmonaire

Mémoire en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie et Biologie
Moléculaire et cellulaire, finalité approfondie

Université de Liège

Faculté des sciences

Département des Science de la Vie

Mémorant : Sébastien Cremers

Promoteur : Docteur Makon-Sébastien Njock, Chercheur Qualifié CHU Liège

Co-promotrice : Professeur Catherine Sadzot, ULiège

Septembre 2024

Laboratoire de Pneumologie, GIGA-RESEARCH, CHU de Liège, Université de Liège

Septembre 2024

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Dr Julien Guiot pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de cette période.

Je tiens également à remercier chaleureusement le Dr Makon-Sébastien Njock, qui m'a encadré, formé et soutenu durant toute la durée de mon stage et de la rédaction de ce mémoire. Son expertise, sa disponibilité et son soutien constant m'ont permis d'acquérir de précieuses connaissances, tant sur le plan scientifique que personnel.

Un grand merci à toi, Latifa, pour m'avoir appris avec patience et pédagogie les différentes techniques de laboratoire, et pour ton dynamisme contagieux ainsi que tes nombreuses histoires qui ont rendu cette expérience encore plus enrichissante.

Je souhaite également remercier Adrien, Hadrien, Noémie, Romane, Joey, Catherine, Adeline et France pour leur accueil chaleureux et l'ambiance conviviale qui ont marqué mon passage au laboratoire.

Merci à toi Sophie de m'avoir soutenu dans les moments difficiles tout au long de mes études. Tu as grandement contribué à rendre ces années agréables.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mes parents et mon frère, qui m'ont soutenu sans relâche tout au long de mes études. C'est en grande partie grâce à leur amour, leur encouragement et leur soutien que j'ai pu arriver jusqu'ici.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	1
1 La sclérodermie systémique.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Classification de la sclérodermie systémique.....	2
2 Sclérodermie systémique avec atteinte pulmonaire	3
3 Mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la sclérodermie systémique	4
3.1 Activation de l'endothélium et des péricytes.....	4
3.2 Inflammation et activation des cellules immunitaires	5
3.3 Activation des fibroblastes	7
3.4 Rôle de la matrice extracellulaire	8
4 Les exosomes	11
4.1 Les exosomes, un type de vésicule extracellulaire.....	11
4.2 Biogenèse et mécanisme de sécrétion des exosomes	11
4.3 Composition des exosomes.....	13
4.4 Les exosomes comme moyen de communication intercellulaire	14
4.5 Les exosomes comme biomarqueurs.....	15
5 Les micro-RNAs.....	16
5.1 Généralités.....	16
5.2 Biogénèse des micro-RNAs.....	16
5.3 Mécanismes de régulation des gènes par les micro-RNAs.....	18
5.4 Sécrétion et absorption de micro-RNAs	19
5.5 Les miRNAs exosomaux dans la fibrose pulmonaire	19
Objectifs de l'étude	20
Matériels et méthodes	21
1 Solutions et tampons	21

2	Mimics et inhibiteurs des micro-RNAs	21
3	Culture cellulaire de la lignée MRC5	21
4	Isolation des exosomes par ultracentrifugation	22
5	Diffusion dynamique de la lumière	22
6	Traitement des cellules MRC5 avec des exosomes.....	22
7	Transfection des fibroblastes MRC5 avec des mimics ou des inhibiteurs	23
8	Extraction des protéines	23
9	<i>Western Blot</i>	23
10	Tri cellulaire activé par fluorescence.....	24
11	Extraction de RNA	24
12	Traitement à la DNase.....	25
13	Analyse quantitative de l'expression des miRNA par RT-qPCR.....	25
14	Analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT-PCR	25
15	Prédiction des voies de signalisation modulées par les micro-RNAs.....	26
16	Caractéristiques cliniques de la cohorte	26
17	Statistiques.....	27
	Résultats	28
1	Caractérisation des exosomes.....	28
2	Transfert des micro-RNAs miR-584-5p et miR-744-5p.....	29
3	Voies moléculaires associées aux micro-RNAs spécifiques de la SSc-ILD : miR-584-5p et miR-744-5p	31
4	Impact de miR-584-5p et miR-744-5p sur la fibrose dans la SSc	32
5	Impact des exosomes sur la fibrose	34
6	Confirmation du rôle du miR-584-5p transféré par les exosomes sur la fibrose.....	36
	Discussion	37
	Bibliographie	41
	Annexes	46

TABLEAU DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Signification
ARNm	RNA messenger
BAFF	Facteur d'activation des cellules B
CE	Cellules endothéliales
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COL	Collagène
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif
DcSSc	Sclérodermie systémique cutanée diffuse
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
EMEM	Milieu minimum essentiel d'Eagle
ET1	Endothéline 1
FACS	Tri cellulaire activé par fluorescence
FBS	Sérum de bovin fœtal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	Taux de fausses découvertes
FN	Fibronectine
FP	Fibrose pulmonaire
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HRP	Peroxydase de raifort
HTAP	Hypertension pulmonaire
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
ILD	Atteinte pulmonaire interstitielle
IQR	Ecart interquartile
LBreg	Lymphocytes B régulateurs
LcSSc	Sclérodermie systémique cutanée limitée
ME	Matrice extracellulaire
miRISC	Complexe minimal de gène induit par les miRNAs
miRNA	micro-RNA
MMPs	Métalloprotéinase matricielle
MREs	Éléments de réponse aux miRNA
PBS	Solution tampon saline au phosphate
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes

Septembre 2024

ROS	Espèces réactives d'oxygène
SSc	Sclérodermie systémique
SSc-ILD	Pneumopathie interstitielle avec atteinte pulmonaire
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
Th	Lymphocyte T-helper
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UTR	Région non traduite
VE	Vésicule extracellulaire
WB	<i>Western Blot</i>
α -SMA	Actine des muscles lisses α

INTRODUCTION

1 La sclérodémie systémique

1.1 Introduction

La sclérodémie est une maladie rare du tissu conjonctif, son nom dérive du latin *scleros* (dur) et *derma* (derme). Elle fut décrite pour la première fois en 1753 par Carlo Curzio. La pathogénèse de la maladie est complexe et reste inconnue [1]. La sclérodémie peut être divisée en deux formes, la sclérodémie localisée ou systémique. La sclérodémie localisée ne touche que la peau et les tissus sous-cutanés. D'un autre côté, la sclérodémie systémique (SSc) affecte plusieurs systèmes et organes internes, y compris la peau, les poumons, les reins, le cœur, les muscles et le tractus gastro-intestinal [1–3]. Maladie auto-immune, la SSc se caractérise par un dysfonctionnement du système immunitaire, une vasculopathie, une inflammation cellulaire et une fibrose de la peau et de plusieurs organes internes (figure 1) [2, 4]. En Europe, le taux de survie dix ans après le diagnostic varie de 65% à 73%. La prévalence varie de 1 à 1,3 cas pour 100 000 individus en Belgique en 2018 [5]. Cette pathologie touche trois à quatre fois plus les femmes que les hommes [6].

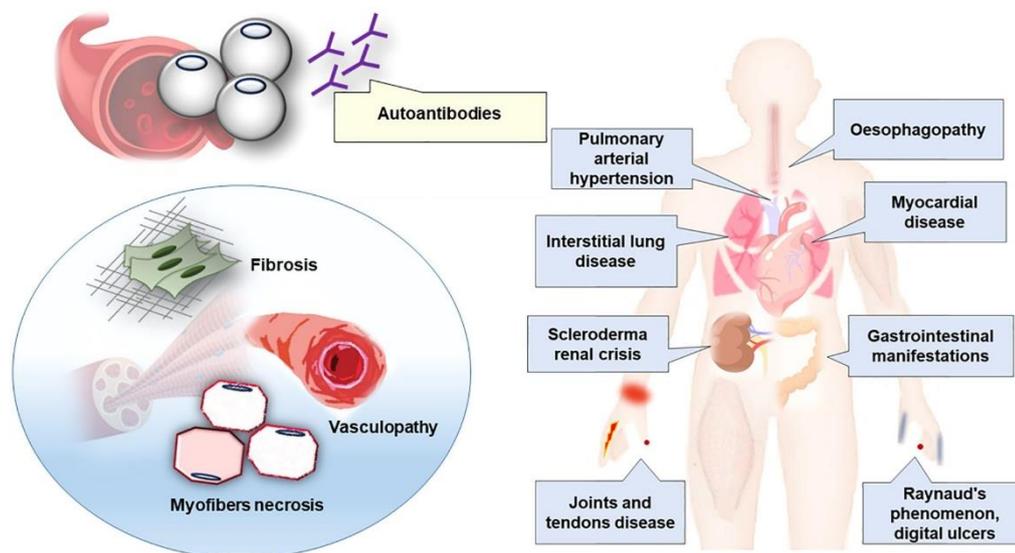


Figure 1 : Différentes manifestations cliniques de la SSc [2].

1.2 Classification de la sclérodémie systémique

Le diagnostic de la SSc est complexe à cause du phénotype hétérogène présenté par les patients. Le diagnostic repose sur des examens cliniques ou paracliniques. L'examen clinique consiste essentiellement en des symptômes physiques, dont le phénomène de Raynaud (lié à la vasculopathie) ou d'autres signes cutanés. Les examens paracliniques font intervenir la détection d'auto-anticorps anti-nucléaires [7, 8]. Parmi les auto-anticorps sériques spécifiques analysés, il y a l'anti-topoisomérase I (ou Anti-Scl-70), l'anti-centromère et l'anti-RNA polymérase III [9, 10]. La maladie est subdivisée classiquement en trois sous-catégories classiques (figure 2) et sont :

- ✚ La SSc sinusale, qui se traduit par une absence d'atteinte de la peau. Seuls les organes internes sont impactés. Il s'agit de la forme la plus rare de SSc (1,9% des patients atteints de SSc). Elle semble reliée étiologiquement à la SSc cutanée limitée (LcSSc). En effet, les profils d'anticorps spécifiques présents dans le sérum sont similaires [9].
- ✚ La LcSSc présente une atteinte cutanée qui affecte les membres distaux sans dépasser les genoux ou les coudes. Il peut y avoir une atteinte au niveau du visage et du cou [11]. La LcSSc se caractérise par la présence d'anticorps anti-centromère et par une prévalence plus importante de l'hypertension pulmonaire (HTAP) [12]. Dans la cohorte d'étude de Diab et al., la LcSSc représente 61,6% des patients atteints de SSc [9].
- ✚ La SSc cutanée diffuse (DcSSc) affecte la partie proximale aux coudes, aux genoux, au visage et au tronc. Cette forme de la maladie est souvent plus grave, avec un risque de mortalité plus élevé. Elle entraîne une implication plus sévère et rapide des organes internes [1, 11]. La DcSSc est associée à la présence d'anticorps anti-Scl-70 et en l'absence d'anticorps anti-centromère [4]. La prévalence de l'atteinte pulmonaire interstitielle (ou ILD pour *interstitial lung disease*)

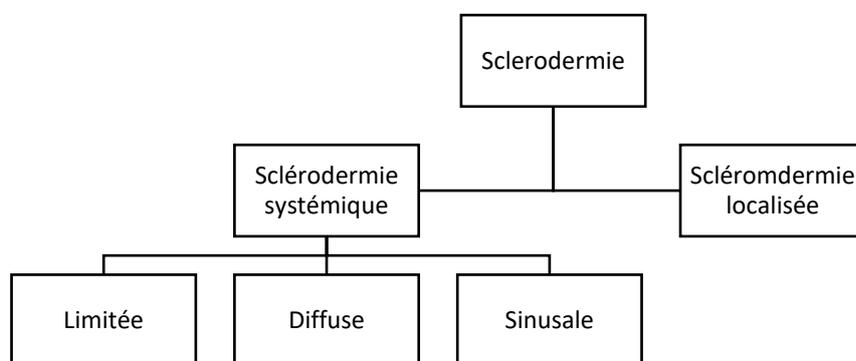


Figure 2 : Schéma général de la classification de la sclérodémie. La sclérodémie est classée selon différents critères dont l'atteinte cutanée (ou non) ainsi que le profil d'anticorps sérique permettant de discriminer la sclérodémie systémique et localisée. Au niveau de la SSc, on retrouve la forme limitée, diffuse et sinusale de la maladie.

est plus grande que dans les autres sous-catégories (40%) [9, 12]. La DcSSc représente 36,5% des patients atteints de SSc [9].

2 Sclérodémie systémique avec atteinte pulmonaire

La SSc avec atteinte pulmonaire (SSc-ILD pour *Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis*) est une manifestation commune de la SSc. La SSc-ILD peut aboutir à la fibrose du tissu pulmonaire et/ou à l'hypertension des artérielles pulmonaires qui sont tous deux associés à un mauvais pronostic pour le patient. En effet, ces pathologies entraînent une diminution des fonctions pulmonaires pouvant se conclure par une insuffisance respiratoire terminale [12–14].

A elle seule, la SSc-ILD est responsable de la plus grande part (35%) des décès reliés à la SSc [15]. La SSc-ILD est dépistée par l'identification de caractéristiques fibrotiques visibles à la tomodensitométrie à haute résolution ou à la radiographie pulmonaire. La fibrose est plus prononcée dans les parties basales des poumons [10]. La présence d'anticorps anti-SCI-70 et anti-Th/To (anti complexe protéique RNase P, sous-unité Rpp25) augmente le risque de contracter une fibrose pulmonaire (FP) [8].

Il n'existe qu'une poignée de médicaments approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour traiter la SSc-ILD. Les plus courants sont le Nintedanib et Tocilizumab. D'autres traitements existent comme la greffe de cellules souches hématopoïétiques ou la transplantation de poumons dans les cas les plus graves. Les traitements actuels permettent de retarder l'avancement de la maladie et de réduire la mortalité mais pas de guérir. C'est pourquoi l'étude et la recherche de nouveaux biomarqueurs précoces de la maladie sont essentiels à l'établissement de nouvelles thérapies plus efficaces [4, 12, 16].

3 Mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la sclérodermie systémique

La SSc est une maladie multifactorielle qui est due à des facteurs environnementaux et un fond génétique de susceptibilité. La séquence pathogénique associe des désordres vasculaires (microangiopathie), inflammatoires et immunologiques (auto-immunité), ce qui aboutit à une fibrose excessive de différents organes, notamment des poumons (figure 5, page 10) [16, 17].

3.1 Activation de l'endothélium et des péricytes

Les lésions vasculaires suivies de processus de réparation perturbés ou inappropriés comptent parmi les événements précoces de la pathogénèse de la SSc [3]. Parmi les manifestations vasculaires cliniques, on retrouve l'HTAP et le syndrome de Raynaud. Au niveau tissulaire, la dérégulation du remodelage vasculaire se caractérise par une hyperplasie de l'intima qui affecte toutes les couches des vaisseaux [18]. Dans les cas les plus avancés, les cellules endothéliales (CE) entrent en apoptose [19].

D'un point de vue cellulaire, le dysfonctionnement des CE entraîne une vasoconstriction par la synthèse d'un vasoconstricteur puissant : l'endothéline 1 (ET1), et en parallèle la réduction de la production de vasodilatateurs tels que la prostacycline et monoxyde d'azote (NO) (figure 5, page 10)[18]. La vasoconstriction conduira à une réduction de l'oxygénation des tissus, et l'hypoxie qui en résulte sera à l'origine de l'activation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) [20]. ET1 joue un rôle prépondérant dans la production de protéines de la matrice extracellulaire (ME). Cette protéine favorise l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium, la prolifération des muscles lisses vasculaires et l'activation des fibroblastes [19].

L'activation des CE est également responsable du recrutement des cellules inflammatoires grâce à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion ICAM (molécule d'adhésion intercellulaire) et VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) (figure 5, page 10). Ces cellules inflammatoires sont des sources de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1 et l'IL6, et de molécules profibrosantes, telles que le TGF- β (facteur de croissance transformant bêta 1) ou le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) [16, 19]. La conséquence de ces lésions est une raréfaction capillaire, un épaississement de la paroi des vaisseaux dû à une prolifération de l'intima et des cellules musculaires lisses conduisant le plus souvent à une HTAP.

3.2 Inflammation et activation des cellules immunitaires

L'inflammation et l'activation des cellules immunitaires occupent une fonction importante dans la pathogénicité de la fibrose. L'endothélium altéré recrute et active les fibroblastes et les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes T et B, monocytes et mastocytes). Ces cellules produisent alors des marqueurs de l'inflammation tels que des cytokines, chimiokines et des facteurs de croissance qui activent des fibroblastes. Une inflammation chronique ainsi que la présence systémique de facteurs profibrotiques facilitent l'activation des fibroblastes provoquant un dépôt important de ME (figure 5, page10) [18, 21].

Dans le cas de la SSc-ILD, l'inflammation pulmonaire est caractérisée par l'infiltration de cellules inflammatoires dans les espaces alvéolaires et les tissus interstitiels pulmonaires. Après une lésion de l'endothélium, les cellules épithéliales alvéolaires vont induire la polarisation des macrophages résidents en macrophages M1 pro-inflammatoires, responsables du recrutement des cellules inflammatoires (Lymphocytes T, macrophages, éosinophiles et neutrophiles). Ces cellules vont produire des médiateurs pro-inflammatoires (IL-8, IL-6) qui amplifient l'inflammation. En effet, la cytokine IL-6 induit la transcription de nombreux gènes contribuant aux réponses inflammatoires et immunitaires de type Th2. Les lymphocytes T polarisés en Th2 produisent des médiateurs chimiotactiques (IL-4 et IL-5) responsables du recrutement des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes. Il existe une forte corrélation entre la présence de cellules inflammatoires et la sévérité de la fibrose de la peau et des poumons [19, 21, 22].

3.2.1 Rôles des lymphocytes T

Lorsque la réponse adaptative du système immunitaire est activée, les lymphocytes T se polarisent en cellules T-helper (Th) 1 ou 2. Cependant, dans la sclérose systémique, il y a un déséquilibre de la balance cellulaire Th1/Th2 [19]. En effet, il y a plus de Th2 qui produisent un profil de cytokines (IL-4, IL-5 et IL-13) conduisant au processus de fibrose. L'IL4 induit la production de TGF- β par les macrophages et les fibroblastes, ce qui conduira à une production accrue de collagène (COL) par les fibroblastes. De plus, l'IL13 participe à la mise en place de la fibrose de la SSc en induisant la production de TGF- β [22].

Au niveau des stades précoces de la SSc-ILD, il y a une augmentation du niveau de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 α , TNF- α (facteur de nécrose tumorale- α), MIP-1 α , IL-8 et la thrombine dans les fluides du lavage broncho-alvéolaire. Dans un stade plus tardif de la maladie, il y a de fortes concentrations de cytokines pro-inflammatoires comprenant IL-4, IL-6, IL-8 et CCL2. Le profil d'expression de cytokines varie au cours de la progression de la maladie [22].

3.2.2 Rôles des lymphocytes B

Les lymphocytes B jouent un rôle important dans la pathophysiologie de la SSc. Un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire naît entre les lymphocytes B pro-inflammatoires (producteurs d'IL-6 et d'auto-anticorps) et les lymphocytes B régulateurs (LBreg). En effet, on observe un déséquilibre en faveur de la population des lymphocytes B producteurs d'IL-6 au détriment de la population des LBreg [23]. Il existe plusieurs marqueurs à la surface des lymphocytes B pouvant induire la production d'auto-anticorps. Un marqueur en particulier permet d'activer les lymphocytes B et stimuler la production d'auto-anticorps, il s'agit de la protéine de surface CD19. Un nombre élevé de cellules CD19+ est corrélé avec un titre élevé d'auto-anticorps et la gravité de la maladie au cours de la SSc [24].

Les anticorps spécifiques et impliqués directement dans la SSc sont les auto-anticorps dirigés contre les CE ou contre les fibroblastes. Les auto-anticorps anti-CE conduisent à l'apoptose des cellules progénitrices des CE. Ils sont responsables du dysfonctionnement des CE, de l'inflammation et de l'activation du système immunitaire. D'un autre côté, les auto-anticorps dirigés contre les fibroblastes activent ces derniers qui produisent alors des marqueurs pro-inflammatoires et profibrotiques [3, 22]. La production du facteur d'activation des cellules B (BAFF) par les monocytes et les cellules dendritiques, ainsi que l'expression des récepteurs correspondants, sont corrélées positivement à la gravité de la maladie. Les lymphocytes B activés par BAAF produisent plus d'IL-6 et d'IgG [25]. Les auto-anticorps moins spécifiques de cette maladie, tels que les anti-centromères et anti-topoisomérase-I, permettent de diriger le diagnostic de la SSc vers la forme diffuse ou localisée. En revanche, il n'y a pas de lien entre la sévérité de la maladie et le taux d'expression de ces anticorps [4, 22].

3.2.3 Rôles des macrophages/monocytes

L'immunité innée occupe une place centrale dans la pathogénèse de la SSc et la progression de la fibrose via les macrophages. Il existe plusieurs populations de macrophages : les macrophages M1 qui ont un profil de sécrétion pro-inflammatoire et les macrophages M2, qui ont un profil anti-inflammatoire et libèrent des médiateurs fibrotiques tels que TGF- β [22]. Au cours d'un processus de cicatrisation normale, les tissus lésés sont réparés via le recrutement des cellules immunitaires et les fibroblastes sur le site. Lors de la phase inflammatoire aiguë et précoce, les cellules épithéliales alvéolaires vont induire la polarisation des macrophages en macrophages pro-inflammatoires M1. Ensuite, les cytokines IL-4 et IL-13 vont induire la polarisation des macrophages en M2 qui vont participer au remodelage tissulaire et à la cicatrisation. Les macrophages M2 vont activer les fibroblastes en produisant divers facteurs de croissance comme le TGF- β . En cas d'inflammation chronique, la persistance de ces facteurs de croissance conduira à une activation prolongée des fibroblastes, de leur différenciation en myofibroblastes et à la fibrose du poumon [22, 26].

3.2.4 Rôles des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques occupent une place stratégique dans le système immunitaire du poumon. Ces cellules fixent le seuil et la qualité de la réponse immunitaire et jouent un rôle clé dans la pathologie de la SSc [22]. La quantité plasmatique de la chimiokine CXCL4, largement produite par les cellules dendritiques, corrèle avec l'atteinte de la peau et des poumons. Une étude a démontré que cette chimiokine peut servir d'élément prédicteur de la progression de la maladie [27].

3.3 Activation des fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules appartenant au tissu conjonctif et jouent un rôle central dans l'élaboration de la ME. Les fibroblastes issus des patients SSc sont résistants à l'apoptose, présentent des caractéristiques proches de celles des myofibroblastes, caractérisés par une augmentation de l'expression de l' α -SMA, une production excessive de COL (COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2) et d'autres macromolécules de la ME (COL (COL), fibronectine (FN), élastine) (figure5, page10)[28].

Plusieurs cytokines, chémokines et facteurs de croissance contribuent à l'activation des fibroblastes, à leur différenciation en myofibroblastes et à l'accumulation de la ME responsable de la fibrose dans la SSc. Parmi ceux-ci, il y a le TGF- β qui joue un rôle essentiel dans la fibrose. Au niveau des poumons, les cellules produisant la plus grande quantité de TGF- β sont les macrophages M2 et les fibroblastes [16]. L'interaction du TGF- β avec deux récepteurs sérine/thréonine kinase (TGF- β -RI and TGF- β -RII) entraîne la formation du complexe Smad qui régule de nombreux gènes associés à la fibrose (figure 3, page 8)[16, 29]. Chez les patients atteints de SSc-ILD, il y a des anomalies au niveau du complexe Smad et une diminution relative de l'expression de Smad-7, qui a un effet antagoniste de TGF- β . La sensibilité des cellules par rapport à TGF- β est par conséquent accrue [30]. La surproduction de COL est corrélée à l'augmentation de TGF- β et de ses récepteurs (TGF- β -RI and TGF- β -RII). Ensuite, les fibroblastes produisent eux-mêmes du TGF- β , les maintenant dans un état activé à la manière d'un mécanisme autocrine positif. L'exposition chronique au TGF- β aboutit à une résistance à l'apoptose au niveau des fibroblastes des patients atteints de la SSc [28].

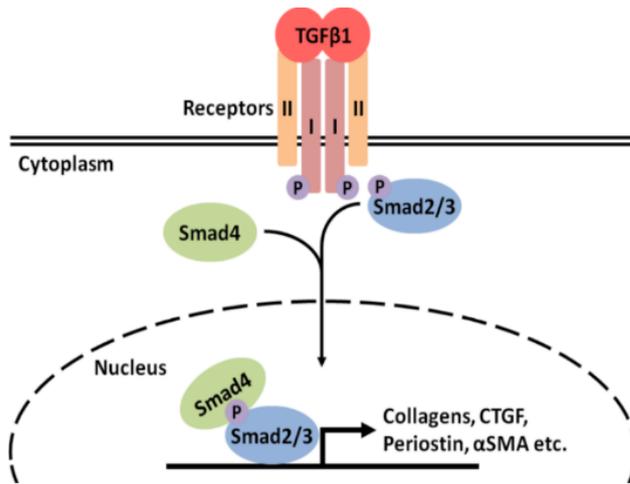


Figure 3 : Voie de signalisation canonique du TGF- β . La signalisation canonique du TGF- β commence par l'interaction de celui-ci avec deux récepteurs sérine/thréonine kinases appelés récepteurs de type I (TGF- β -RI) et de type II (TGF- β -RII). Ces récepteurs subissent une autophosphorylation, entraînant ainsi le recrutement et la phosphorylation des protéines Smad 2/3. Ces dernières interagissent ensuite avec Smad 4 pour former un complexe transcriptionnel. Ce complexe migre vers le noyau où il module l'expression de gènes cibles en les activant ou en les réprimant [28].

3.4 Rôle de la matrice extracellulaire

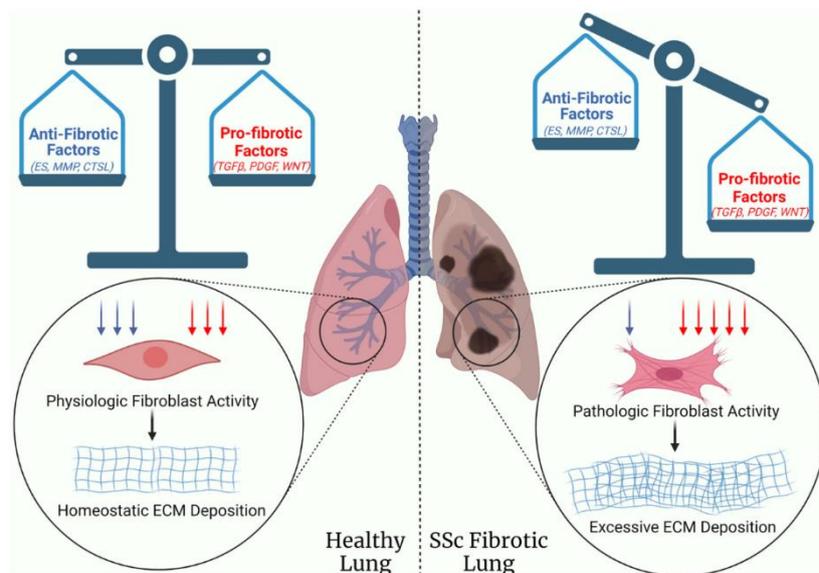


Figure 4 : La fibrose pulmonaire dans la SSc est le résultat d'un déséquilibre entre les facteurs anti-fibrotiques et pro-fibrotiques, favorisant ces derniers, et entraînant l'activation des fibroblastes et le dépôt excessif de ME. ES, endostatine ; MMP, métalloprotéinase matricielle ; CTSL, cathepsine L ; TGF- β , facteur de croissance transformant bêta ; PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes ; WNT, site d'intégration lié aux ailes ; ECM, ME ; SSc, sclérose systémique [16].

La ME est une structure en 3D complexe et dynamique intervenant dans le soutien et la fonction des cellules. Elle est composée de COL, de protéoglycanes/glycosaminoglycanes, d'élastine, de FN, de laminines et de plusieurs autres glycoprotéines. Les fibroblastes synthétisent une quantité importante de ME et leur état physiologique dépend de nombreux facteurs. Un déséquilibre entre les

facteurs anti- et profibrotiques conduit à l'activation des fibroblastes et le dépôt excessif de ME (figure 4) [16].

La quantité de ME est régulée grâce à la balance entre fabrication et dégradation de la matrice. La dégradation de la ME est réalisée par des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui sont régulées par des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases. Dans la SSc, des auto-anticorps peuvent cibler les MMPs, ce qui provoque une accumulation de la ME [16, 18, 31]. De plus, au niveau de la SSc, la prolifération anormale des fibroblastes et leur activation par TGF- β et PDGF a pour conséquence d'entraîner une surproduction de ME plus rigide (accumulation de COL et de FN) créant ainsi des cicatrices fibrotiques [18].

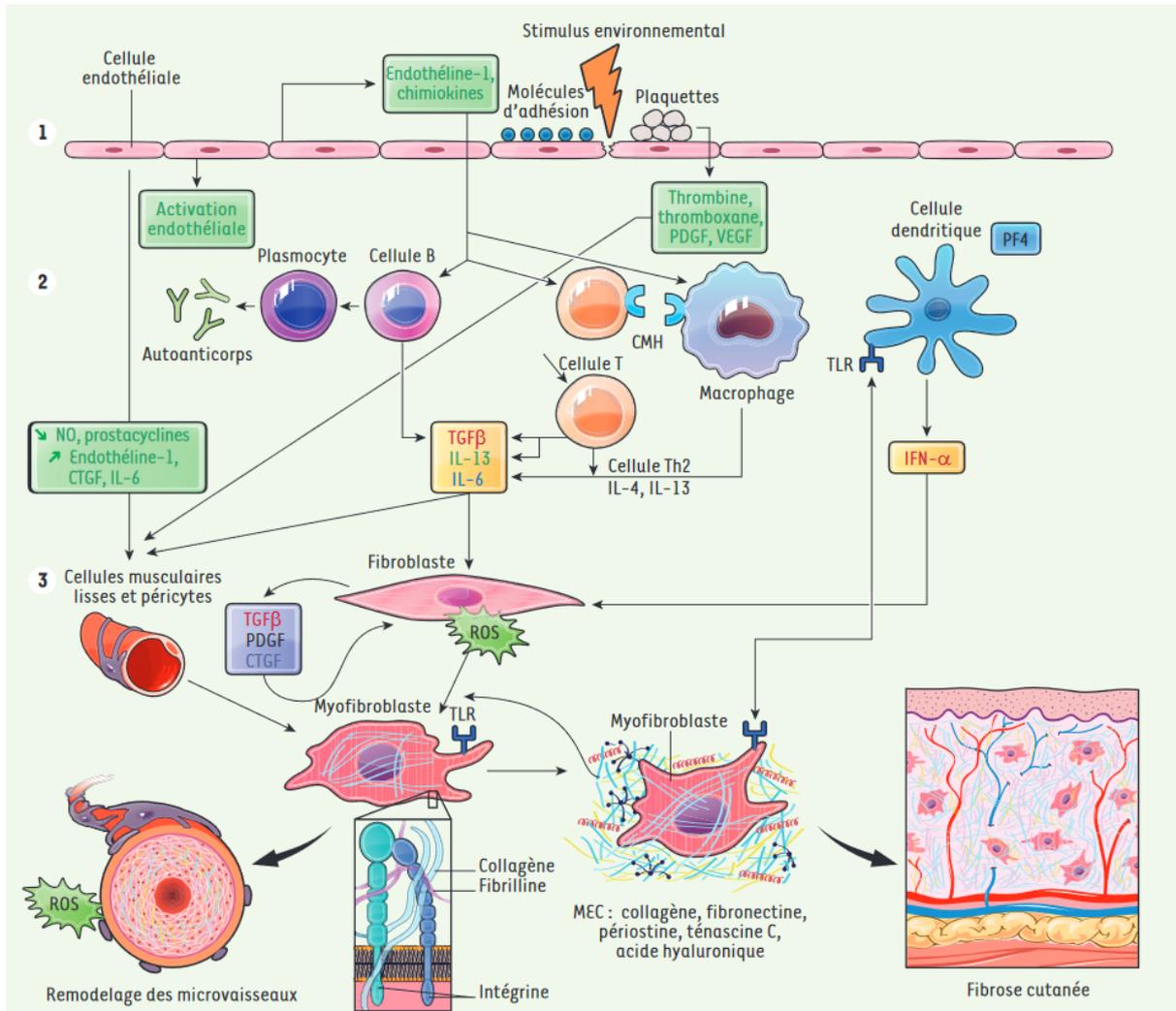


Figure 5 : Mécanismes cellulaires de la physiopathologie de la SSc. Au cours des différentes phases de la maladie, de nombreux mécanismes interconnectés interviennent. Ainsi l'interaction entre les CE, immunitaires et les fibroblastes aboutit à des phénomènes d'inflammation puis de fibrose. (1) L'activation des cellules endothéliales, la perméabilité vis-à-vis des cellules immunitaires, l'expression de molécules d'adhésion et le dépôt de plaquettes conduisent à la synthèse de vasomodulateurs, de cytokines, de facteurs de croissance et de chimiokines. (2) Différentes cellules inflammatoires et immunitaires sont recrutées et activées. Elles produisent de l'interféron de type 1, des cytokines Th2, de l'interleukine 6, des facteurs de croissance et des auto-anticorps. (3) Les fibroblastes sont activés par ces stimuli, produisent de la matrice de façon dérégulée et se différencient en myofibroblastes. Ceci entretient la pathologie avec une matrice désorganisée, des troubles métaboliques en réponse au stress mécanique et à l'hypoxie, une production d'espèces réactives de l'oxygène et de facteurs de croissance amenant au remodelage vasculaire et à la fibrose tissulaire. PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif ; TGF-β : facteur de croissance transformant-bêta ; TLR : récepteur de type Toll ; ME : matrice extra-cellulaire ; PF4 : facteur plaquettaire 4 ; IFN-α : interféron alpha ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; IL : interleukine ; NO : monoxyde d'azote [24].

4 Les exosomes

4.1 Les exosomes, un type de vésicule extracellulaire

Les vésicules extracellulaires (VEs) sont sécrétées par tous les types cellulaires tant eucaryotes que procaryotes [32]. Considérées auparavant comme des déchets cellulaires, les VEs sont le sujet de nombreuses études car elles participent à de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Elles interviennent au niveau de la communication intercellulaire et possèdent une composition complexe de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et de métabolites [33]. Le classement de ces vésicules est réalisé sur la base de leur taille et de leur biogenèse. On retrouve dans la littérature trois groupes de VEs : les exosomes (30-150 nm, d'origine endocytaire), les microvésicules (100-1000 nm, produit par bourgeonnement de la membrane plasmique) et les corps apoptotiques (de 500-5000 nm, libérés par des cellules subissant une mort cellulaire programmée) [32]. D'autres caractéristiques permettent de différencier les VEs tels que leur densité, composition ou fonction. Cependant, le chevauchement de taille et de marqueur des VEs peut rendre leur caractérisation moins évidente [32, 34].

4.2 Biogenèse et mécanisme de sécrétion des exosomes

La synthèse des exosomes débute par la formation d'un endosome par invagination de la membrane plasmique (figure 6, page 12). Le système endosomal est complexe et joue un rôle important dans le tri des molécules incorporées dans les exosomes [33]. Le système endosomal comprend les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les endosomes de recyclage. Lorsque le contenu des endosomes précoces n'est pas destiné à la dégradation, à la sécrétion ou au recyclage, l'endosome précoce devient un endosome tardif. L'invagination des membranes des endosomes tardifs entraîne la formation de vésicules intraluminales (ILVs) à l'intérieur des corps multivésiculaires (MVBs). C'est au niveau des ILVs que s'effectue le triage des protéines, lipides et acides nucléiques destinés à être transportés par les exosomes [34]. Les tétraspanines, une famille de protéines d'échafaudages membranaires, interviennent dans le triage de cargo ainsi que la formation d'IVL. Les tétraspanines typiques des vésicules intracellulaires sont CD63, CD9 et CD81. Ces protéines sont enrichies dans les exosomes et peuvent être utilisées pour leur caractérisation [32, 34].

La maturation des MVBs est un processus complexe au cours duquel les MVBs fusionnent entre elles ou communiquent avec d'autres organites tels que le réticulum endoplasmique, le réseau trans-golgi, les mitochondries, l'endosome de recyclage et les granules d'RNA. L'activité de la GTPase Rab7 est déterminante dans le devenir des MVBs. En effet, lorsque Rab7 est inactive ou absente de la surface des corps multi-vésiculaires, ceux-ci sont destinés à être sécrétés. En revanche, lorsque la protéine est active et présente sur la membrane du MVB, celui-ci est alors dégradé par fusion avec un lysosome [35]. Le transport des MVBs est réalisé via le réseau de microtubule et de cytosquelette régulé par des protéines Rab (tels que Rab27a) et le complexe SNARE. Rab27a et le complexe SNARE interviennent dans la fusion des MVBs avec la membrane plasmique et l'exocytose des exosomes [32, 34, 35].

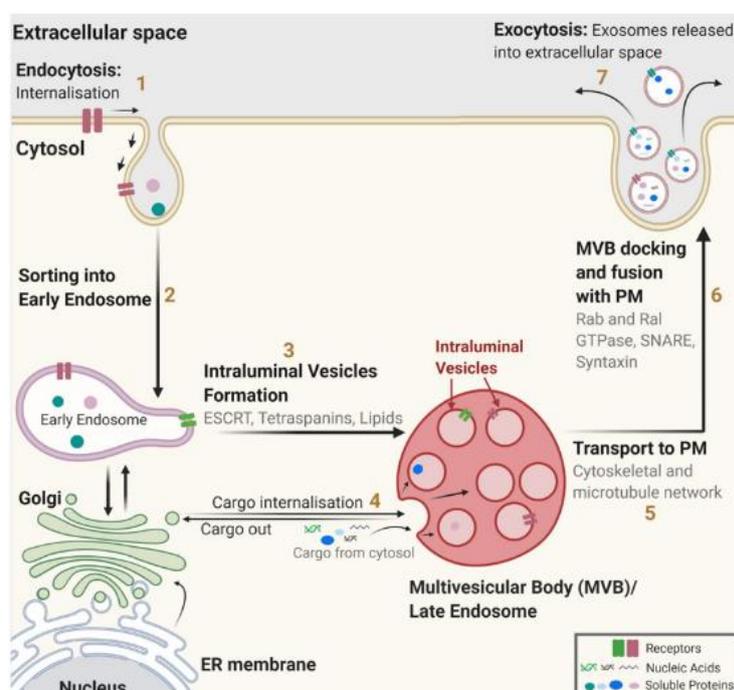


Figure 6 : Biogénèse des exosomes. La biogénèse des exosomes débute par l'internalisation des futurs exosomes (1) qui sont triés dans l'endosomes précoce (2) avant de murir en endosomes tardifs ou en corps multivésiculaires (3). Les corps multivésiculaires contiennent de nombreuses vésicules intraluminales (ILVs) qui séquestrent les protéines, lipides et les acides nucléiques provenant du cytosol et du réseau trans-Golgi (4). Les ILVs sont transportées vers la membrane plasmique (5) puis sécrétées pour former des exosomes. ER : Réticulum Endoplasmique ; MVB : Corps Multivésiculaires ; PM : Membrane plasmique [33].

4.3 Composition des exosomes

Les exosomes sont délimitées par une bicouche lipidique et possèdent une forme sphéroïde en solution (figure 7). Certains lipides comme la sphingomyéline, le cholestérol et les céramides influencent le tri des biomolécules transportées, la sécrétion, la structure et la signalisation des exosomes [36, 37]. Les protéines transportées par ces vésicules peuvent être liées à la membrane ou cytotologiques. Les protéines exosomales les plus courantes sont celles de la famille des aspanines, du complexe de tri endosomal requis pour les protéines de transport (ESCRT, ALIX, TSG101), les intégrines, les protéines hsp, actine et flotilline et tétraspanines (CD9, CD63 et CD81) [36]. Ces protéines sont communes à tous les exosomes en opposition à d'autres protéines tels que celles du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) I et II qui sont spécifiques du type de la cellule donneuse [38].

Les glycoprotéines présentes à la surface des exosomes peuvent intervenir dans l'adressage des exosomes à des cellules cibles. Il y a aussi bien de l'ADN que de RNA messagers (ARNm) ou de RNA non-codant. Les RNAs non-codants transportés comprennent : les RNAs ribosomiques (RNA), les longs RNAs non-codants (RNAnc), les RNAs de transfert (RNAt), petit RNAs nucléaires (RNAsb), les petits RNAs nucléolaires, les RNAs piwi et les plus abondants, les micro-RNAs (miRNAs) [32, 39]. Des cytokines (TNF- α , TGF- β) et leurs récepteurs correspondants participent aussi à la composition des exosomes. Tous ces éléments, en particulier les miRNAs, interviennent dans de nombreux processus biologiques comme l'angiogenèse ou la fibrose [36].

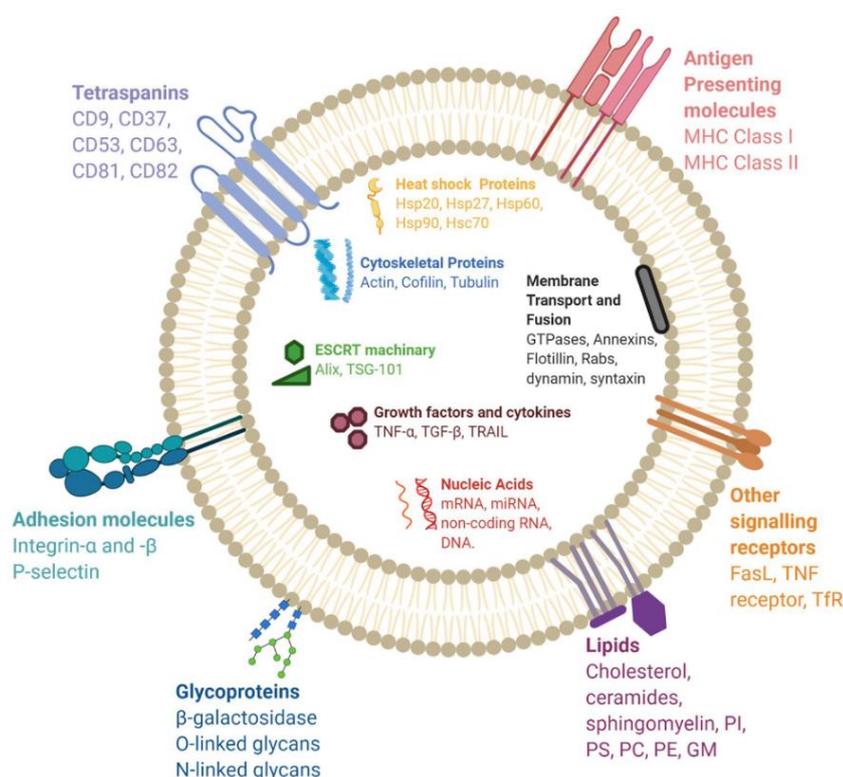


Figure 7 : Composition des exosomes. Les exosomes sont composés de diverses protéines : des protéines transmembranaires telles que les tétraspanines, des molécules présentatrices d'antigènes, des glycoprotéines et des molécules d'adhésion ; protéines dans la lumière des exosomes telles que les protéines de choc thermique (Hsp), les protéines du cytosquelette, les composants ESCRT, le transport membranaire, les protéines de fusion, les facteurs de croissance et les cytokines. Les exosomes comprennent également plusieurs lipides tels que le cholestérol, les céramides, la sphingomyéline, le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et les gangliosides (GM), ainsi que des acides nucléiques tels que de l'ARNm, le miRNA, les non-codant de RNA et l'ADN dans leur lumière. Hsc = apparenté à un choc thermique ; TSG = gène de suspicion de tumeur ; TNF = facteur de nécrose tumorale ; TGF = Facteur de croissance transformateur ; TRAIL = ligand induisant l'apoptose lié au TNF ; FasL = ligand Fas ; Tfr = récepteur de la transferrine [32].

4.4 Les exosomes comme moyen de communication intercellulaire

Les exosomes sont produits par la plupart des cellules et sont présents dans de nombreux fluides biologiques. Lorsqu'ils se trouvent dans le système circulatoire, les exosomes ont tendance à s'accumuler dans le foie, les poumons, le côlon, les reins, le pancréas, la rate et les ovaires [32]. La taille des exosomes intervient dans leur biodistribution. Si une absorption aspécifique existe entre toutes les cellules, le ciblage de cellule réceptrice est primordial pour délivrer le contenu de l'exosome et exercer sa fonction. L'adressage des exosomes à une cellule spécifique est lié à la composition protéique et lipidique de la surface de l'exosome. Il y a une conservation du tropisme entre les cellules donneuses et receveuses. Par exemple, les cellules du neuroblastome libèrent simultanément des exosomes CD63 positifs ciblant spécifiquement les dendrites neuronales et des exosomes CD63 négatifs ciblant l'ensemble des neurones et des cellules gliales [40]. Le ciblage lipidique est également utilisé dans certains cas. En effet, les cellules dendritiques possèdent une composition réduite en sphingolipides qui régule négativement la capacité d'absorption des exosomes [41].

Une fois que les exosomes atteignent leurs cellules cibles, ils régulent de nombreux processus biologiques, soit en incorporant leur contenu directement dans le cytoplasme (fusion des membranes) ou en induisant certaines voies par interaction avec la cellule cible (ex : endocytose, interactions ligand-récepteur de surface) [33]. Il y a ainsi plusieurs mécanismes différents possibles (figure 8, page 15) : la fusion des membranes (1), l'endocytose (2), la phagocytose (3) et l'interaction avec les protéines membranaires de la cellule cible (4) [33, 38, 42]. Les exosomes internalisés sont destinés à suivre la voie endosomale pour être dégradés et libérer leur contenu [32]. Les cellules receveuses peuvent alors voir leur état physiologique modifié suite à la modulation de voies biologiques. Le transfert de miRNAs par des exosomes semble être un élément important dans la régulation de processus fibrotiques au niveau des poumons. Par exemple, le miR-154 favorise la prolifération, la migration et l'induction des gènes profibrotiques des fibroblastes pulmonaires [43, 44]. Une précédente étude du laboratoire suggère que les exosomes dérivés des macrophages pourraient lutter contre la progression de la FP en délivrant le miR-142-3p anti-fibrotique aux cellules épithéliales alvéolaires et aux fibroblastes pulmonaires [45].

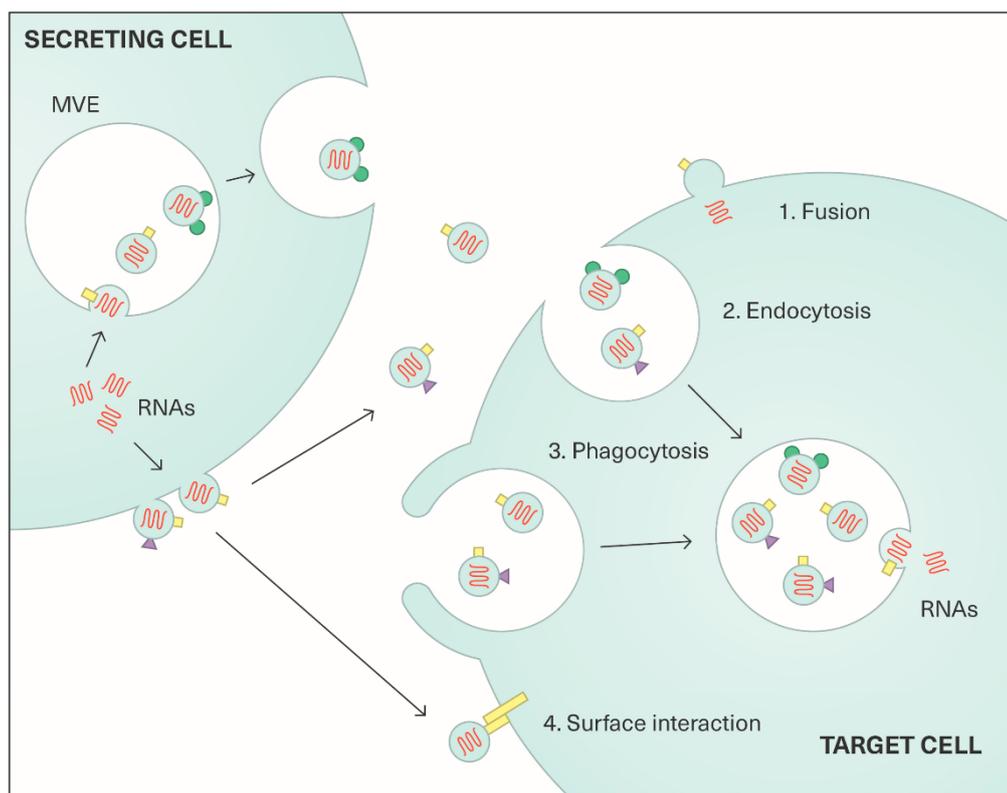


Figure 8 : Les quatre différents modes de communication par exosomes et microvésicules. Les vésicules extracellulaires servent de véhicules à la communication de cellule à cellule grâce au transfert horizontal de molécules bioactives telles que les protéines, lipides et acides nucléiques. Les vésicules extracellulaires (microvésicules ou exosomes) produites par une cellule sécrétrice peuvent être internalisées par quatre mécanismes : fusion membranaire (1), endocytose (2), phagocytose (3) ou interaction avec les protéines membranaires de la cellule cible (4). Les carrés, triangles et cercles représentent les différentes protéines associées à la membrane [38].

4.5 Les exosomes comme biomarqueurs

Par leur composition et leur origine, les exosomes présentent une immunogénicité réduite et une biocompatibilité remarquable. Étant donné leur structure lipidique, les biomolécules au sein de l'exosome sont protégées et restent stables. La détection de certaines molécules transportées par les exosomes, en particulier les miRNAs, peut permettre le suivi de l'avancée de maladies notamment au niveau des poumons comme l'asthme ou la FP interstitielle [32, 43]. Par exemple, trois miRNAs (miR-142-3p, miR-33a-5p, let-7d-5p) ont été identifiés comme signature pour discriminer les patients atteints de la FP idiopathique des individus sains [46].

La potentielle spécificité des exosomes peut permettre de cibler des cellules d'intérêt. De plus, leur petite taille et la composition de leur membrane leur permettent de passer la plupart des membranes biologiques. Les molécules transportées par les exosomes depuis un tissu peuvent alors moduler de nombreux mécanismes biologiques d'un autre tissu. Les exosomes sont donc de potentiels vecteurs thérapeutiques intéressants [34].

5 Les micro-RNAs

5.1 Généralités

Les miRNAs sont de courtes séquences d'RNA non codantes d'environ 22 nucléotides. Ils régulent l'expression de leurs ARNm cibles, impactant divers processus biologiques. Chaque miRNA peut cibler plusieurs ARNm. Les miRNAs interagissent avec la région 3' UTR (région non traduite 3') des ARNm cibles, entraînant une inhibition de l'expression du gène ciblé. Les miRNAs sont utilisés comme biomarqueurs de certaines maladies [47, 48]. La structure des miRNAs est particulière et évolue selon le degré de maturation. En effet, un pri-miRNA est synthétisé à partir de l'ADN génomique puis est maturé en pré-miRNA avant de devenir un miRNA mature capable de s'associer à un complexe protéique pour réguler l'expression de gènes cibles [49].

5.2 Biogénèse des micro-RNAs

Les miRNAs sont formés soit à partir de régions intergéniques ou le plus souvent depuis des introns. La transcription est réalisée grâce à de RNA polymérase II ou III. Certains miRNAs sont synthétisés en un long transcrit appelé « *cluster* ». Ils sont alors considérés comme appartenant à une même famille. Il existe deux types voies de biogénèse des miRNAs : la voie canonique et les voies non canoniques (figure 9, page 17) [50].

5.2.1 La voie canonique

La voie canonique est le mécanisme principal de maturation des miRNAs. Les miRNAs primaires (pri-miRNA) sont synthétisés à partir de leur séquence d'ADN génomique. Les pri-miRNA ont une structure en épingle à cheveux caractéristique qui possède plusieurs boucles, dont la boucle terminale. Lors de la première étape de maturation, le complexe de microprocesseurs, composé de Drosha et DDGCR8, clive le pri-miRNA pour produire le précurseur miRNA (pré-miRNA) [51].

Ce précurseur est alors exporté dans le cytoplasme par un complexe d'export constitué d'une exportine 5 (XPO5) associée à une RanGTP. Une fois dans le cytoplasme, la RNase III Dicer enlève la boucle terminale, ce qui implique la libération d'un duplex de miRNA mature [50]. Le brin 5p du duplex provient de l'extrémité 5' du brin du pre-miRNA tandis que celui originaire de l'extrémité 3' est défini comme le brin 3p du duplex. Pour chaque miRNA, la proportion de brin 5p ou 3p incorporé dans la protéine ARGO dépend du type cellulaire ou de l'environnement cellulaire [52]. C'est le brin guide associé à ARGO qui intervient dans la régulation du gène cible tandis que le brin passager est destiné à être dégradé [50, 51].

5.2.2 Les voies non-canoniques

Globalement, on peut regrouper les voies non canoniques en deux groupes. Un groupe indépendant de Drosha/DGCR8 et un autre indépendant de Dicer. Les pre-miRNAs formés par la voie indépendante de Drosha/DGCR8 ressemblent aux substrats de Dicer. Les RNA en forme de petite boucle en épingle à cheveux (shRNA) doivent être maturés dans le cytoplasme par AGO2. En effet, ces pre-miRNA sont trop petits pour être des substrats de Dicer. C'est l'entièreté du pre-miRNA qui est chargé dans AGO2. La maturation se termine par le clivage du brin 3p et 5p. Il existe aussi des pre-miRNA néotranscrit qui possèdent une coiffe de 7-méthylguanosine (m⁷G). Ces RNAs sont directement exportés dans le cytoplasme par une Exportine 1 sans avoir besoin d'être clivés par Drosha [51, 52].

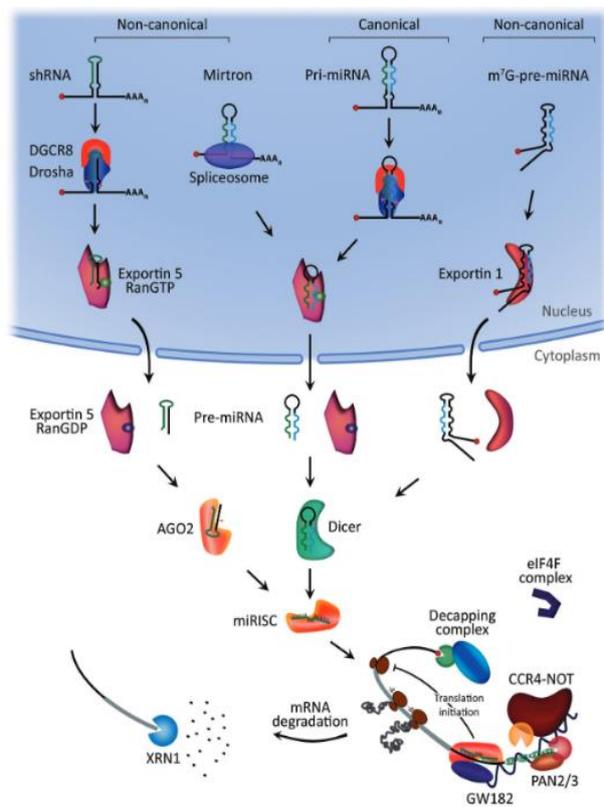


Figure 9 : Biogenèse des micro-RNA. La biogenèse canonique des miRNA commence par la génération du transcrit pri-miRNA. Le complexe de microprocesseurs, composé de Drosha et DGCR8, clive le pri-miRNA pour produire le précurseur-miRNA (pré-miRNA). Le pré-miRNA est exporté vers le cytoplasme de manière dépendante de Exportin5/RanGTP et mûri pour produire le duplex de miRNA mature. Enfin, les brins 5p ou 3p du duplex de miRNA mature sont chargés dans la famille de protéines Argonaute (AGO) pour former un complexe de silençage induit par les miRNA (miRISC). Dans les voies non canoniques, les petits RNA en épingle à cheveux (shRNA) sont initialement clivés par le complexe du microprocesseur et exportés vers le cytoplasme via Exportin5/RanGTP. Ils sont ensuite maturés par un clivage dépendant d'AGO2, mais indépendant de Dicer. Les Mirtrons et les pré-miRNA coiffés par la 7-méthylguanine (m⁷G) dépendent de Dicer pour achever leur maturation cytoplasmique, mais ils diffèrent par leur navette nucléocytoplasmique. Les Mirtrons sont exportés via Exportin5/RanGTP tandis que les m⁷G-pre-miRNA sont exportés via Exportin1. Toutes les voies mènent finalement à un complexe miRISC fonctionnel. Dans la plupart des cas, miRISC se lie aux ARNm cibles pour induire une inhibition de la traduction, probablement en interférant avec le complexe eIF4F. Ensuite, les protéines de la famille GW182 liées à Argonaute recrutent les poly(A)-déadénylases PAN2/3 et CCR4-NOT. PAN2/3 initie la désadénylation tandis que le complexe CCR4-NOT termine le processus, conduisant à l'élimination de la cape m⁷G sur l'ARNm cible. L'ARNm décapé peut alors subir une dégradation en 5' vers 3' via l'exoribonucléase XRN1 [52].

5.3 Mécanismes de régulation des gènes par les micro-RNAs

Les miRNAs reconnaissent le plus souvent une séquence spécifique dans la région 3'UTR. Mais d'autres régions peuvent être reconnues, les régions 5'UTR, codantes et promotrices. La reconnaissance des régions 3' UTR, 5'UTR et codantes est associée à un effet de répression de l'expression des gènes cibles [52].

5.3.1 Inhibition de l'expression des gènes via le complexe miRISC

Le complexe minimal de gène induit par les miRNAs (miRISC) est notamment composé du brin guide et de AGO [53]. Le miRISC cible spécifiquement un ARNm grâce à son RNA guide, complémentaire à des séquences situées sur l'ARNm appelés éléments de réponse aux miRNA (MREs). Au niveau du miRNA, c'est le plus souvent la région d'amorçage (nucléotides 2 à 8) qui intervient dans l'interaction miRNA-MRE. Un appariement en 3' du brin guide favorise la stabilité et la spécificité de l'interaction miRNA-ARNm. Une complémentarité parfaite entre miRNA et MRE induit l'activité d'endonucléase de AGO mais déstabilise le complexe entraînant la dégradation du miRNA.

Au niveau des cellules animales, la plupart des interactions miRNA-MRE sont partiellement complémentaires, empêchant l'activité d'endonucléase de AGO. Plus l'affinité d'un MRE pour un miRNA est importante, plus l'ARNm est sensible au miRNA considéré. De plus, les MRE à haute affinité ont tendance à retenir plus longtemps les miRNAs. Ainsi la quantité de MRE disponible peut aussi influencer le nombre de miRNA complémentaire libre pouvant intervenir au niveau d'autres ARNm. L'inhibition de l'expression du gène cible est alors due à l'inhibition de la traduction de l'ARNm du gène cible par encombrement stérique [52, 54]. Ainsi, AGO agit en tant que médiateur de l'inhibition de l'ARNm cible via la formation d'un complexe de silençage miRISC. L'ARNm cible dé-adénylé est ensuite délivré de sa coiffe par la protéine de décoiffage DCP2 et ses protéines associées. L'ARNm est ensuite dégradé par l'exoribonucléase XRN1 [55].

5.3.2 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes par les micro-RNAs dans le noyau

Le complexe miRISC se déplace entre le cytoplasme et le noyau grâce à l'importine-8 et l'exportine-1. Une fois dans le noyau, le miRISC régule à la fois les taux de transcription et les niveaux post-transcriptionnels de l'ARNm, et s'associe à l'euchromatine au niveau des loci génétiques où la transcription est active. Le complexe miRISC peut dégrader l'ARNm transcrit ou réguler directement la transcription et réguler négativement l'expression des ARNm cible [52].

5.4 Sécrétion et absorption de micro-RNAs

Les miRNAs se trouvent dans de nombreux fluides biologiques dont le plasma, le sérum, la salive, l'urine ou le lavage bronchique. Les miRNAs extracellulaires sont très stables. En effet, ils peuvent résister à la dégradation jusqu'à 4 jours à température ambiante ainsi qu'à des conditions plus extrêmes. Une partie des miRNAs libérées sont encapsulés dans les VEs comme les exosomes [51].

Le contenu des exosomes peut être délivré de différentes façons : phagocytose, fusion directe avec la membrane plasmique, endocytose ou pinocytose. Les miRNAs ingérés par les cellules receveuses vont impacter l'activité de celles-ci à la façon de molécules de signalisation intercellulaire. Les miRNAs associés à des protéines ou des HDL (lipoprotéines de haute densité) sont intégrés à la cellule par interaction avec des récepteurs présents à la surface de la cellule [52].

5.5 Les miRNAs exosomaux dans la fibrose pulmonaire

Au niveau physiologique, les exosomes protègent les poumons des signaux de stress en participant à l'homéostasie des poumons. En revanche, divers facteurs peuvent entraîner une dérégulation de la composition en miRNAs transportés par les exosomes ainsi que de la quantité produite de ces vésicules. De nombreux processus physiopathologiques sont alors dérégulés tels que l'inflammation ou la fibrose. Les miRNAs dérégulés induisent la progression des maladies pulmonaires [42, 43]. Dans le laboratoire, trois miRNAs ont été identifiés comme acteur potentiel de la pathologie de la SSc-ILD : miR-744-5p, miR-584-5p et miR1307-3p. Ces derniers seraient transférés dans des fibroblastes pulmonaires via des exosomes [58].

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'atteinte pulmonaire (ILD) est la principale cause de mortalité chez les patients SSc, représentant 30 à 35% des décès dans ce groupe. En raison de la complexité de la maladie, l'un des plus grands défis actuels est de diagnostiquer spécifiquement et le plus rapidement possible l'atteinte pulmonaire afin de garantir le meilleur suivi possible pour les patients. Pour ce faire, la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques à l'atteinte pulmonaire chez les patients SSc est cruciale. Récemment, une signature moléculaire composée de quatre miRNAs exosomaux (miR-584-5p, miR-744-5p, miR-1307-3p et miR-10b-5p) caractéristique de l'atteinte pulmonaire chez les patients SSc a été identifiée dans le laboratoire.

L'hypothèse de travail est que les exosomes issus du plasma de patients SSc avec atteinte pulmonaire (SSc-ILD) participent à la progression de la FP notamment via le transfert de miRNAs.

L'objectif de ce travail est d'étudier les propriétés fonctionnelles des exosomes/miRNAs exosomaux (miR-584-5p, miR-744-5p et miR1307) dérivés de patients SSc (avec vs sans ILD) afin de déterminer l'impact de ces VEs sur la progression de la FP dans le contexte SSc.

Pour y parvenir, nous allons : 1) déterminer si les exosomes de patients SSc-ILD sont capables de transférer les miRNAs associés à l'atteinte pulmonaire (miR-584-5p, miR-744-5p et miR1307) dans les fibroblastes pulmonaires (MRC5) ; 2) établir l'impact de ces miRNAs sur l'expression de marqueurs fibrotiques ; et 3) déterminer l'impact des exosomes/miRNAs exosomaux de patients SSc-ILD sur la FP.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Solutions et tampons

- PBS Solution tampon saline au phosphate-, 10X (1L, pH 7,3) : 70,128g NaCl, 100,3g Na₂HPO₄.12H₂O, 3,4g KH₂PO₄
- Trypsine-EDTA (1L, pH 7,3) : 0,5% trypsine (Difco, Mi, USA), 0,2% EDTA, PBS, pH 7,6
- Tampon de lyse RIPA (89900, ThermoFisher)
- Tampon de transfert : Tris-HCl 25mM, glycine 192 mM (#1610734, Biorad)
- Tampon d'électrophorèse : Tris-HCl 25mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8.3 (#1610732, Biorad)
- Solution à 30% d'acrylamide et de bis-acrylamide (#1610156, Biorad)

2 Mimics et inhibiteurs des micro-RNAs

La séquence des mimics et des inhibiteurs des miR-744-5p, miR-584-5p ainsi que du miR contrôle se trouvent dans l'annexe 1 page 49 et proviennent de chez Qiagen. Un mimic est une séquence d'RNA double synthétique qui imite le miRNA d'intérêt. Les inhibiteurs des miRNAs sont des séquences d'RNA double brin partiellement complémentaire au miRNA cible empêchant la fonctionnalité du miRNA.

3 Culture cellulaire de la lignée MRC5

Les cellules adhérentes MRC-5 sont issues d'une lignée de cellules de type fibroblastes pulmonaires d'origine embryonnaire et humaine. Elles sont cultivées dans un incubateur à 37°C avec un taux de CO₂ de 5%. Les cellules MRC5 sont cultivées dans du milieu EMEM (Milieu minimum essentiel d'Eagle). Ce milieu est enrichi avec 2 mM de L-glutamine (GIBCO™), 10% de sérum de veau fœtal (Fetal Calf Serum ou FCS), 1% d'acides aminés non essentiels (GIBCO™), 0,1% de fungizone (fourni par GIBCO™), ainsi que 100 unités/mL de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine (fournis par GIBCO™).

Les cellules sont cultivées dans des flasques T75 (flacons de culture cellulaire standards CELLSTAR® de Greiner) avec 12 mL de milieu. Tous les deux à trois jours, les cellules sont arrivées à confluence et doivent être passées dans de nouvelles flasques. Pour ce faire, l'ancien milieu est évacué de la flasque. Les cellules adhérentes à la flasque sont ensuite rincées deux fois avec 8 mL de PBS (phosphate-buffered saline de GIBCO™). Ce dernier est jeté après chaque rinçage. De la trypsine est

ajoutée (2 mL) et répartie sur le tapis de cellules. Après une incubation d'une minute à 37°C, le détachement des cellules est vérifié au microscope. Les cellules décrochées sont suspendues dans 8 mL de milieu, puis centrifugées dans un tube à centrifuger conique à 400 x g pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et le culot cellulaire est suspendu dans 10 mL de nouveau milieu. En fonction du nombre de cellules, des dilutions sont réalisées et les cellules sont disposées dans 12 mL de milieu. La flasque est placée dans l'incubateur pour le stockage.

4 Isolation des exosomes par ultracentrifugation

La première centrifugation est réalisée à 400 g pendant 5 minutes afin de retirer les cellules. Le surnageant est récupéré et une deuxième centrifugation à 2000 g est effectuée pendant 20 minutes, de manière à éliminer les débris cellulaires résiduels. Une troisième centrifugation est faite à 12 000 g durant 45 minutes, de façon à se débarrasser des microvésicules. Le surnageant est alors filtré avec un filtre de 0,22 µm afin d'éliminer les EVs (supérieures à 200 nm). Les échantillons filtrés sont ensuite ultracentrifugés à 110 000 g pendant 2 heures. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec du PBS (GIBCO™) par le biais d'une seconde ultracentrifugation est réalisée à 110 000 g durant 2 heures. Les exosomes sont suspendus dans 150 µL de PBS et conservés à -80°C.

5 Diffusion dynamique de la lumière

Les exosomes ont été suspendus dans du PBS à une concentration de 50 µg/ml et analysés à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.). Les données relatives à l'intensité, au volume et à la distribution de chaque échantillon ont été recueillies de manière continue pendant 4 minutes, en séries de 3.

6 Traitement des cellules MRC5 avec des exosomes

Les cellules MRC5 sont cultivées dans une plaque 12 puits avec 100 000 cellules par puits dans 1 mL de EMEM 10% de FBS (sérum de bovin foetal) et incubées à 37°C la nuit. Les cellules sont ensuite « affamées » dans du milieu EMEM 0,5% FBS dépourvu d'exosome pendant la journée après un rinçage au PBS. Les cellules sont ensuite traitées avec des exosomes de patients (5µg) ou avec du PBS durant 24h (aussi 8h, 4h, 2h et 1h pour la cinétique). Les cellules sont alors lysées pour arrêter le traitement.

7 Transfection des fibroblastes MRC5 avec des mimics ou des inhibiteurs

Les cellules destinées à la transfection sont cultivées dans une plaque 12 puits avec 60 000 cellules par puit dans du 1 mL milieu EMEM à 10% de FBS. Après au moins une nuit de culture, lorsque les cellules ne sont pas encore confluentes, l'ancien milieu est remplacé par du EMEM 2% FBS. Les mimics ou les inhibiteurs sont mis en contact en parallèle avec le réactif de transfection HiPerfect (Qiagen) pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite transfectées pendant 24h avant de remplacer l'ancien milieu par du nouveau EMEM 2% FBS afin de se débarrasser des débris cellulaires. Après avoir laissé reposer les cellules, elles sont stimulées avec du TGF- β (20 ng/mL) ou du PBS (avec un même volume que le TGF- β) pendant 4h. Ensuite, la stimulation est stoppée en jetant le milieu, puis en rinçant deux fois au PBS avant la lyse des cellules avec 500 μ L de Qiazol (Qiagen). Les cellules lysées peuvent être stockées à -20°C avant l'extraction d'acide nucléique. Pour les protéines, la lyse est effectuée avec du tampon de lyse RIPA (Thermo Scientific™) froid (4°C).

8 Extraction des protéines

Les protéines cellulaires sont obtenues après deux lavages des cellules au PBS froid et une lyse dans du tampon de lyse RIPA (Thermo Scientific™) froid (4°C). Les cellules sont agitées en chambre froide à 4°C pendant 20 minutes. Les cellules sont alors grattées et récupérées dans des tubes coniques de centrifugation de 1,5 mL. Le lysat est centrifugé à 5 000 g durant 5 minutes à 4°C afin de se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL. Le stockage se fait à -20°C.

9 *Western Blot*

La technique du *western blot* (WB) est utilisée pour la détection spécifique de protéines sur une membrane après séparation sur gel d'électrophorèse. Une fois extraites et dosées, les protéines sont d'abord dénaturées dans du Laemmli Buffer (Bio-Rad) et β -mercaptoéthanol (Bio-Rad) à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines dénaturées sont chargées sur le gel en quantités équivalentes. Elles sont alors séparées selon leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). La concentration est réalisée sous une tension électrique constante à une intensité de 40 mA. La migration est effectuée à voltage constant sous 80 mA.

Après la séparation sur gel, les protéines sont transférées sur une membrane hydrophobe de nitrocellulose (Immobilon, Milliporree, Bedford, USA). La membrane a été préalablement activée dans du tampon de transfert. Le transfert des protéines du gel sur la membrane est pratiqué à 300 mA pendant 2 heures dans du tampon de transfert. Le transfert est vérifié en révélant les protéines de manière aspécifique par incubation de 10 minutes avec du rouge de Ponceau après trois lavages à l'eau déminéralisée de la membrane.

La membrane est bloquée dans une solution de blocage contenant du TBST (TBS 1X-Tween 20 0,1%) et 5% de solution de poudre de lait après rinçage de la membrane avec du TBST. La membrane est alors incubée la nuit à 4°C avec un anticorps primaire ciblant la protéine d'intérêt. Après 3 lavages de 5 minutes au TBS-T, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (peroxydase de raifort). La membrane contenant les protéines d'intérêt est révélée grâce aux kits *ECL western Blotting Substrate* ou *ECL Plus western Blotting Substrate* de Thermo Fisher Scientific qui imprègnent un film photographique Fuji Medical X-ray (Fuji, Clichy, France). L'oxydation du luminol est catalysée par la HRP en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La chimiluminescence engendrée par cette réaction permet la détection des protéines sur le film photographique. Les analyses de quantification sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ V1.54f. Les anticorps utilisés pour mettre en évidence des protéines lors du Western Blot sont repris dans l'annexe 2 page 49.

10 Tri cellulaire activé par fluorescence

Pour la quantification de la FN, les cellules ont été fixées avec du PBS 4% PFA, perméabilisées avec du triton et incubées avec des anticorps anti-FN humains (#14-9869-82, Invitrogen). Les cellules ont été lavées et incubées avec le conjugué anti-souris IgG Alexa fluor 488 et ont été analysées à l'aide du BD FACS Canto 2.

11 Extraction de RNA

Les cellules, cultivées dans des plaques 12 puits, sont lavées deux fois au PBS puis lysées dans 500 µL de réactif de lyse Qiazol (Qiagen). Le lysat est ensuite transféré dans un tube conique de 1,5 mL. Un volume de 100 µL de Chloroforme (99%) est ajouté. Après homogénéisation et une incubation de 3 minutes, la solution est centrifugée 15 minutes à 14 000 g afin de permettre l'apparition d'une émulsion biphasique comportant : une phase hydrophile et l'autre hydrophobe. Les protéines, lipides, glucides et les débris cellulaires (phase hydrophobe) sont éliminés par extraction dans un nouveau tube de la phase aqueuse (contenant de l'ADN et de RNA). La phase hydrophobe éliminée contient un

mélange organique de phénol et de chloroforme. Dans le but de précipiter et purifier les acides nucléiques extraits, 250 μ L d'isopropanol (100%) sont ajoutés. Après avoir homogénéisé et laissé reposer 10 minutes, la solution est centrifugée 10 minutes à 14 000 g. Le surnageant est jeté. L'excès de sel est éliminé avec de l'ajout de 500 μ L d'éthanol (70%) et à une centrifugation de 10 minutes à 14 000 g. Le surnageant est enlevé et les culots sont séchés à température ambiante avant d'être resolubilisé dans de l'eau bidistillée exempte de DNase et de RNase. Les échantillons sont stockés à -80°C.

12 Traitement à la DNase

Avant d'effectuer une RT-qPCR, il est possible de se débarrasser de l'ADN génomique par traitement des échantillons avec de la DNase. Les échantillons sont traités avec 1 μ L de DNase I (Thermo Scientific™) à 2,5 nM et 1 μ L de tampon « buffer 10x » (Thermo Scientific™) pour 8 μ L d'échantillon d'acide nucléique. La réaction de dégradation de l'ADN se déroule à 3°C pendant 35 minutes. La réaction est arrêtée en ajoutant 2 μ L d'EDTA (50mM) suivi d'une incubation 10 minutes à 75°C.

13 Analyse quantitative de l'expression des miRNA par RT-qPCR

Les extraits d'RNA dosés sont rétro-transcrits en cDNA via le kit qScript cDNA synthesis kit (Quantbio) d'après le protocole du fabricant. La rétro-transcription se déroule en deux étapes : ajout d'une queue polyA au niveau de RNA, puis la synthèse d'ADNc par l'intermédiaire d'amorces adaptées. Les ADNc sont utilisés pour la PCR quantitative. Cette dernière est réalisée à l'aide du kit Takyon MasterMix de Eurogentec. Deux primers sont utilisés pour l'amplification. L'un est un primer spécifique au miRNA ciblé et l'autre est un primer universel (annexe 3 page 50). Le thermocycleur utilisé est le LC480 de Roche. La quantité relative du niveau d'expression du miRNA est déterminée par la méthode $2^{\Delta\Delta CT}$. Une normalisation est réalisée par rapport à un miR constitutif (miR-16-5p).

14 Analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT-PCR

La synthèse d'ADNc à partir d'RNA est réalisée à partir du kit iScript cDNA synthesis (BioRad, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. Les ADNc synthétisés sont utilisés pour la réaction PCR quantitative. L'amplification est réalisée à l'aide de deux primers spécifiques au gène cible. Le thermocycleur utilisé est le LC480 de Roche. La quantité relative du niveau d'expression du miRNA est déterminée par la méthode $2^{\Delta\Delta CT}$. Une normalisation est réalisée par rapport à un gène de ménage (GAPDH). La liste des primers et leurs séquences sont reprises dans l'annexe 4 page 50.

15 Prédiction des voies de signalisation modulées par les micro-RNAs

Pour prédire les voies potentiellement modulées par les miRNAs liés à la SSc-ILD, une analyse bioinformatique a été effectuée via DIANA-miRPath v4.0 grâce à la base de données TarBase v8.0.

16 Caractéristiques cliniques de la cohorte

La cohorte de patients atteints de SSc recrutés au CHU de Liège (SSc-ILD, n=23 ; SSc-no-ILD, n = 23 ; des sujets sains (HS), n = 22), appariés en âge et en sexe, a été utilisée pour étudier les propriétés fonctionnelles des exosomes dans le contexte de la SSc-ILD. Les patients devaient répondre aux critères de classification ACR/EULAR 2013 pour la SSc. Le tableau 1 donne un aperçu des caractéristiques démographiques et cliniques de la cohorte de SSc.

	HS	SSc-no-ILD	SSc-ILD	p-value
Caractéristiques démographiques				
Age (années)	53.9	60.5	61.6	0.11
Genre (H/F)	13/10	11/12	9/13	0.57
Caractéristiques fonctionnelles et traitement				
FEV1, %pred.	-	86.8 (±22.2)	79.8 (±19.9)	0.27
FVC, %pred.	-	93.7 (±17.6)	80.6 (±20.1)	0.02
FEV1/FVC, %pred.	-	72.8 (10.3)	78.3 (7.9)	0.05
DLCO, %	-	72.1 (±16.0)	52.4 (±13.5)	<0.0001
KCO, %	-	79.1 (±15.3)	70.0 (±14.3)	0.04

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques des patients atteints de SSc (+/-ILD) et des volontaires sains. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. DLCO, capacité de diffusion du monoxyde de carbone dans les poumons ; F, femme ; H, homme ; VEMS, volume expiratoire forcé en une seconde ; CVF, capacité vitale forcée ; HS, sujet sain ; KCO, coefficient de transfert ; SSc-ILD, patients SSc atteints de ILD ; SSc-pas de ILD, patients SSc sans ILD. Les comparaisons entre deux groupes de variables continues ont été effectuées à l'aide d'un test t paramétrique bilatéral de Student non apparié (pour les données normalement distribuées) ou d'un test bilatéral non paramétrique de Mann-Whitney (pour les données non distribuées normalement). La signification entre plus de deux groupes de variables continues a été évaluée à l'aide d'une ANOVA ordinaire à un facteur avec correction de Tukey (pour les données normalement distribuées). Les différences dans les données catégorielles ont été comparées à l'aide du test χ^2 .

17 Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées via le logiciel GraphPrims version 10.2.2. Lorsque la valeur de la p-value d'un test est inférieure à 0,05, le test statistique est considéré comme statistiquement significatif. Dans les résultats, les valeurs sont exprimées en médiane avec l'écart interquartile apparent (IQR). La normalité des différentes expériences est testée par le test de Shapiro-Wilk. Les tests appliqués aux données sont les tests Anova lors de la comparaison des niveaux d'expression des miRNAs ou t-test pour comparer l'impact des miRNAs sur l'expression de gènes impliqués dans la fibrose.

RÉSULTATS

1 Caractérisation des exosomes

En vue d'étudier les propriétés fonctionnelles des exosomes dans le contexte SSc-ILD, nous avons isolé des exosomes à partir du plasma de patients sains (HS) (n=23), de patients SSc sans atteinte pulmonaire (SSc-no-ILD) (n=23), et de patients SSc avec atteinte pulmonaire (SSc-ILD) (n=22) via un protocole standard d'ultracentrifugation (tableau 1, page 26).

Afin de vérifier la pureté des exosomes isolés, nous avons tout d'abord déterminé l'enrichissement en marqueurs exosomaux par Western Blot. Nous constatons un enrichissement en tétraspanines CD9 et CD81 et l'absence de cytochrome c dans nos échantillons exosomaux (figure 10b). De plus, les vésicules isolées présentent une taille moyenne de 93,6 nm (n=3) (figure 10c), ce qui confirme la pureté de nos échantillons d'exosomes. Nous n'observons pas de différence de taille entre les exosomes de patients SSc (+/- ILD) et les sujets sains.

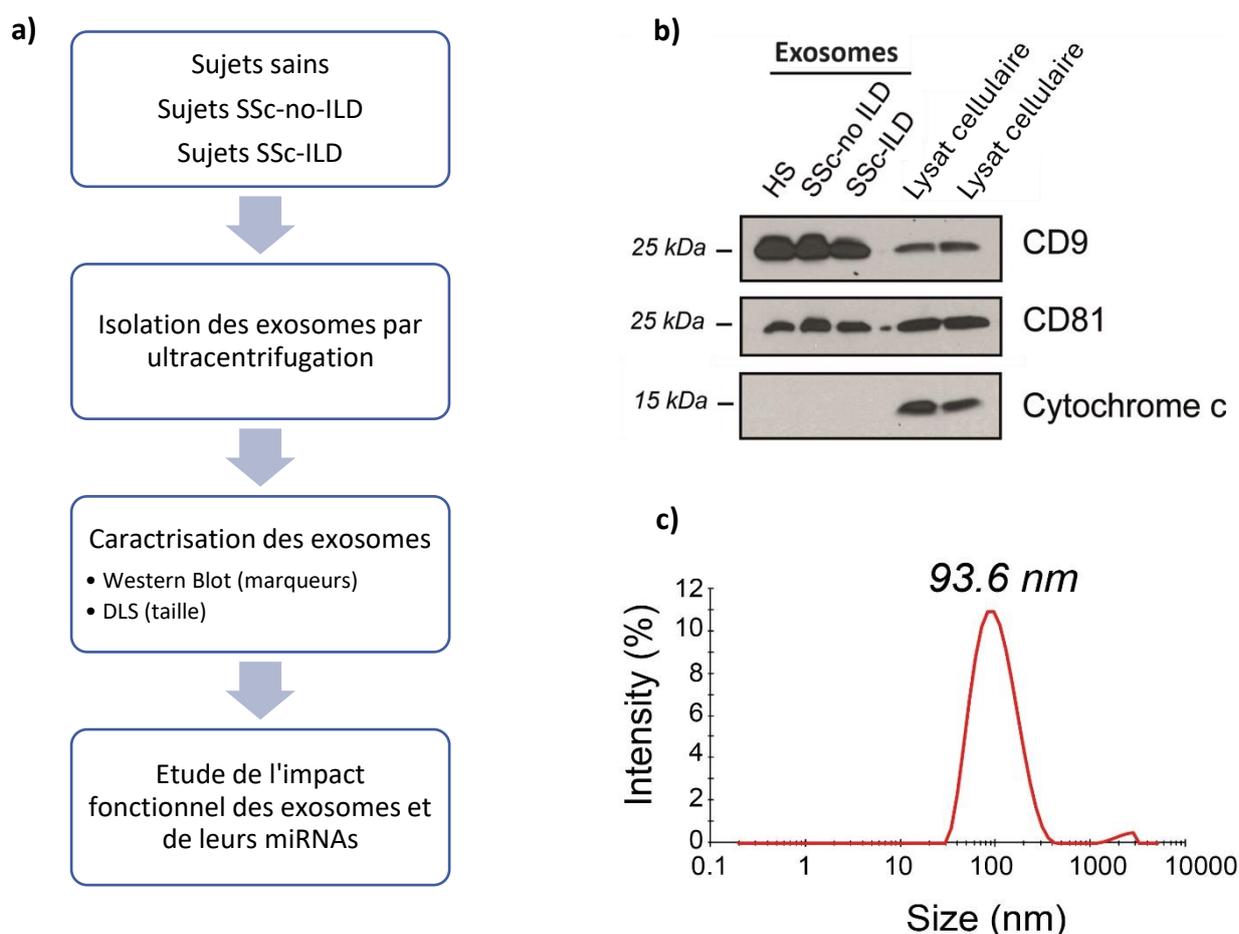


Figure 10 : La pureté des exosomes isolés par ultracentrifugation a été confirmée en vérifiant la présence de marqueurs spécifiques des exosomes et en confirmant leurs tailles. (a) Procédure générale de l'utilisation des exosomes. (b) L'expression des tétraspanines CD9 et CD81 ainsi que du cytochrome C dans les échantillons a été visualisée par Western Blot. (c) La taille des exosomes a été définies par DLS.

2 Transfert des micro-RNAs miR-584-5p et miR-744-5p

Au cours d'une étude précédente au sein du laboratoire, des miRNAs exosomaux spécifiques à la SSc-ILD (miR-584-5p, miR-744-5p et miR-1307-3p) ont été identifiés. Dans le but de vérifier que ces miRNAs sont bien transférés dans la cellule cible, les fibroblastes pulmonaires (MRC5) ont été incubés avec les exosomes dérivés de patients avec ILD (SSc-ILD ; n=8), sans ILD (SSc-no-ILD ; n=9) ou sujets sains (HS ; n=12) pendant 24h (figure 11a). Les niveaux d'expression de miR-584-5p et miR-744-5p augmentent significativement dans les cellules MRC5 après traitement avec des exosomes SSc-ILD par rapport à celui avec SSc-no-ILD (*p<0,05) (figure 11b, c).

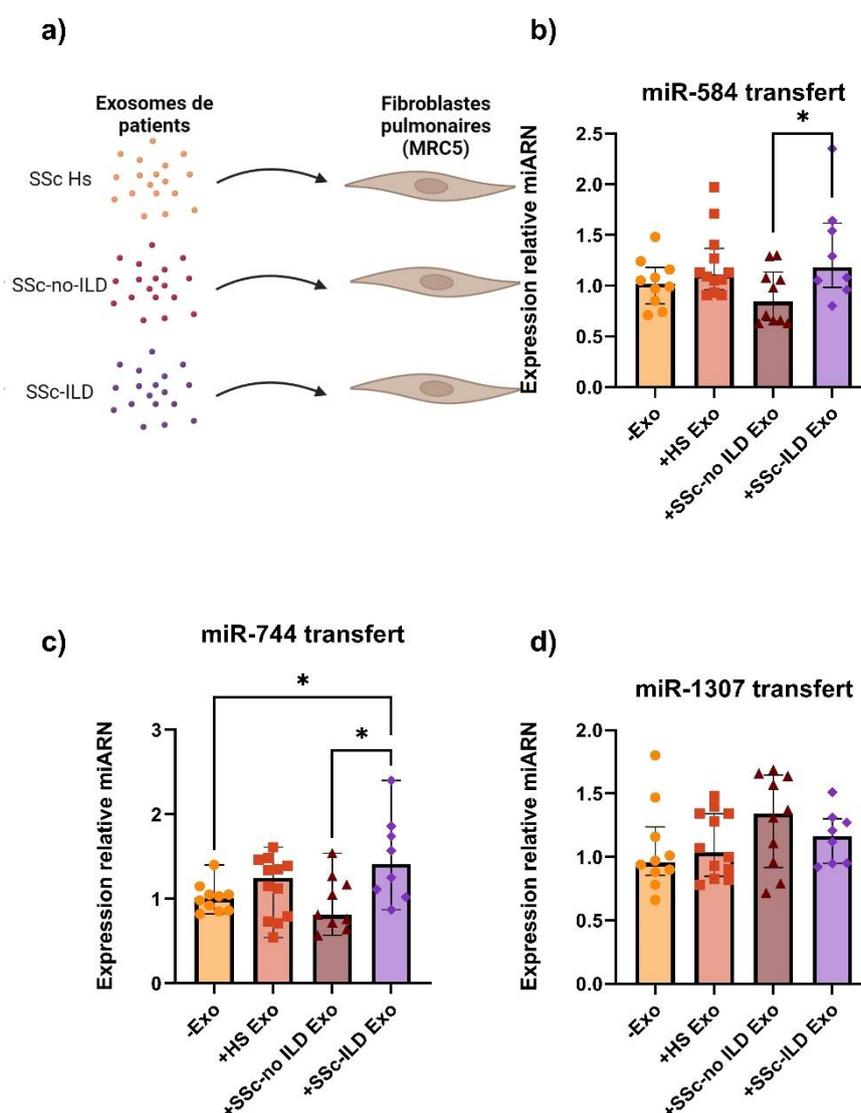


Figure 11: Transfert des miRNAs provenant des exosomes du plasma de patients. (a) Représentation schématique de la mise en culture et du traitement des fibroblastes pulmonaires MRC5. Les cellules ont été traitées 24h avec les exosomes (5µg, sEVs) ou non (-sEVs). Les exosomes dérivent de patients sains (HS), malade sans atteinte pulmonaire (SSc-no-ILD) ou avec atteinte pulmonaire (SSc-ILD). (b, c, d) Niveaux d'expression de miR 584-5p, miR 744-5p et miR 1307-3p déterminés par RT-qPCR au niveau de fibroblastes pulmonaires MRC5 traités avec les exosomes provenant de patients HS, SSc-no-ILD, SSc-ILD ou sans traitement d'exosome. Les données ont passées le test de normalité de Shapiro-Wilk et son exprimés en médiane (+/-IQR). Les données présentant une distribution normale (c et d) sont analysées à l'aide d'un test ordinaire ANOVA. Les données qui ne sont pas distribuées normalement sont analysées par un test de Kruskal-Wallis. *p<0.05.

Afin de vérifier qu'il s'agisse bien d'un transfert des miRNAs des exosomes et non une induction de leur transcription, l'analyse de l'expression des miRNAs matures ou de pre-miRNA à différents temps après traitement avec des exosomes de patients SSc-ILD (T=0h, T=1h, T=2h et T=4h) est réalisée (figure 12). Pour éviter l'amplification de l'ADN génomique lors de l'analyse de pre-miRNAs, les échantillons sont traités à la DNase. Les niveaux d'expression des miRNAs matures miR-584-5p et miR-744-5p augmentent rapidement en présence des exosomes SSc-ILD (à partir de T=1h). En revanche, les niveaux d'expression des précurseurs pre-miR-744 et Pre-miR-584 ne varient pas significativement au cours du temps (n=3). Ces résultats montrent que les exosomes de patients SSc-ILD transfèrent miR-584-5p et miR744-5p dans les fibroblastes pulmonaires.

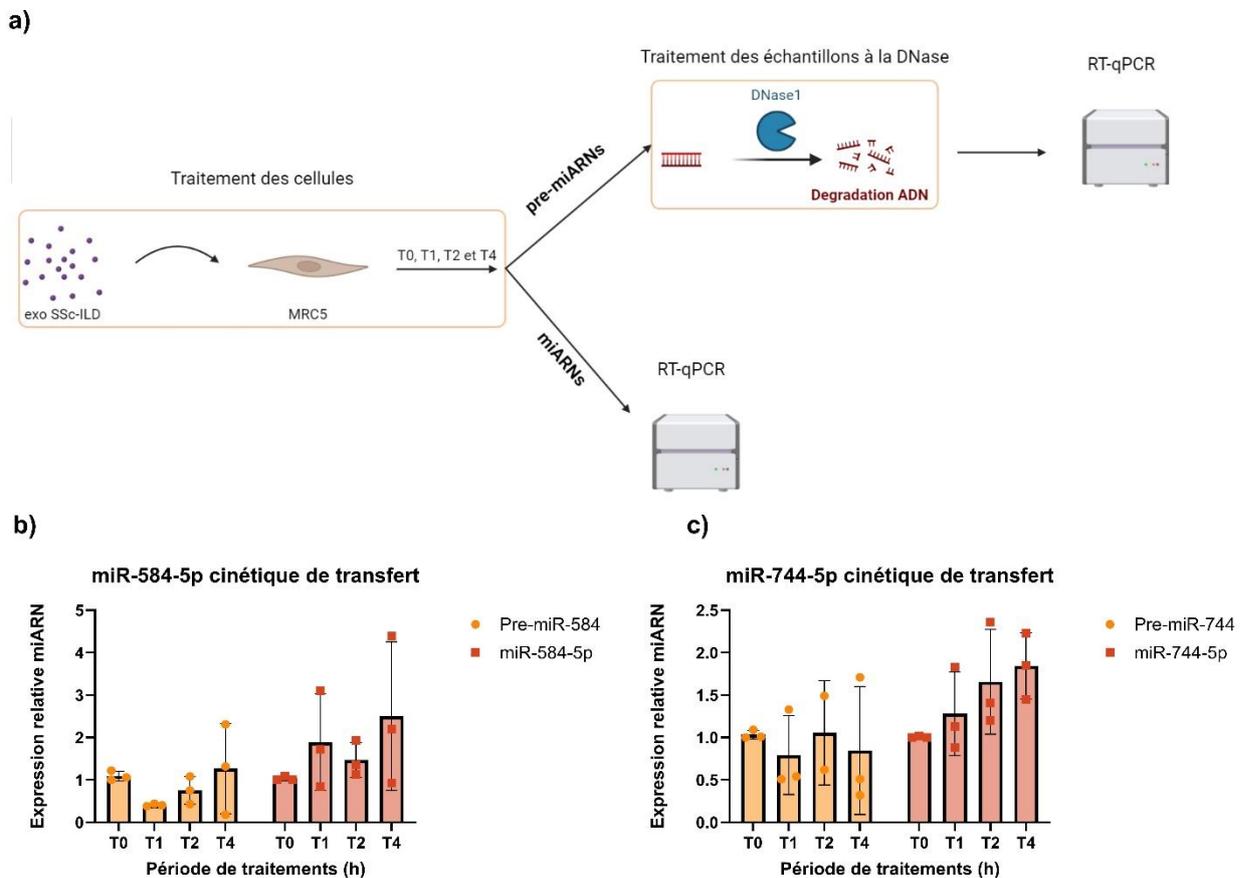


Figure 12 : Les exosomes transfèrent les miR-584-5p et miR-744-5p. (a) Représentation schématique des traitements appliqués aux fibroblastes MRC5 et aux échantillons pour analyser la cinétique du transfert des miRNAs. Les fibroblastes MRC5 ont été traités pendant différents temps (T0, T1, T2 et T4 heures) avec des exosomes de patients SSc-ILD. Les échantillons destinés à l'analyse des pre-miRNAs ont été traités à la DNase avant la RT-qPCR afin d'éviter les interférences avec l'ADN génomique lors de la PCR. (b) Les niveaux d'expressions du pre-miR-584-5p et miR-584-5p après traitement des cellules avec des exosomes de patients atteints de SSc-ILD. (c) Les niveaux d'expressions du pre-miR-744-5p et miR-744-5p après traitement des cellules avec des exosomes de patients atteints de SSc-ILD. Les résultats sont exprimés en médiane (+/-IQR).

3 Voies moléculaires associées aux micro-RNAs spécifiques de la SSc-ILD : miR-584-5p et miR-744-5p

Dans le but d'étudier les processus biologiques associés aux miRNAs transférés par les exosomes de patients SSc-ILD, nous avons soumis miR-584-5p et miR-744-5p à une analyse bioinformatique *via* l'outil *DIANA-miRPath v4.0*. Cet outil utilise la base de données *target scan* pour prédire les cibles potentielles des miRNAs d'intérêts. Les processus biologiques mis en évidence dans cette analyse bio-informatique sont en accord avec la physiopathologie de la SSc-ILD. En effet, ces miRNAs ciblent différentes voies moléculaires liées à la fibrose telles que la transition épithélio-mésenchymateuse ($FDR < 0,01$), l'apoptose ($FDR < 0,01$) et la voie de signalisation du TGF- β ($FDR < 0,05$) (figure 13). D'après cette analyse bioinformatique, ces miRNAs (miR-584-5p et miR-744-5p) seraient impliqués dans la progression de la FP chez les patients SSc.

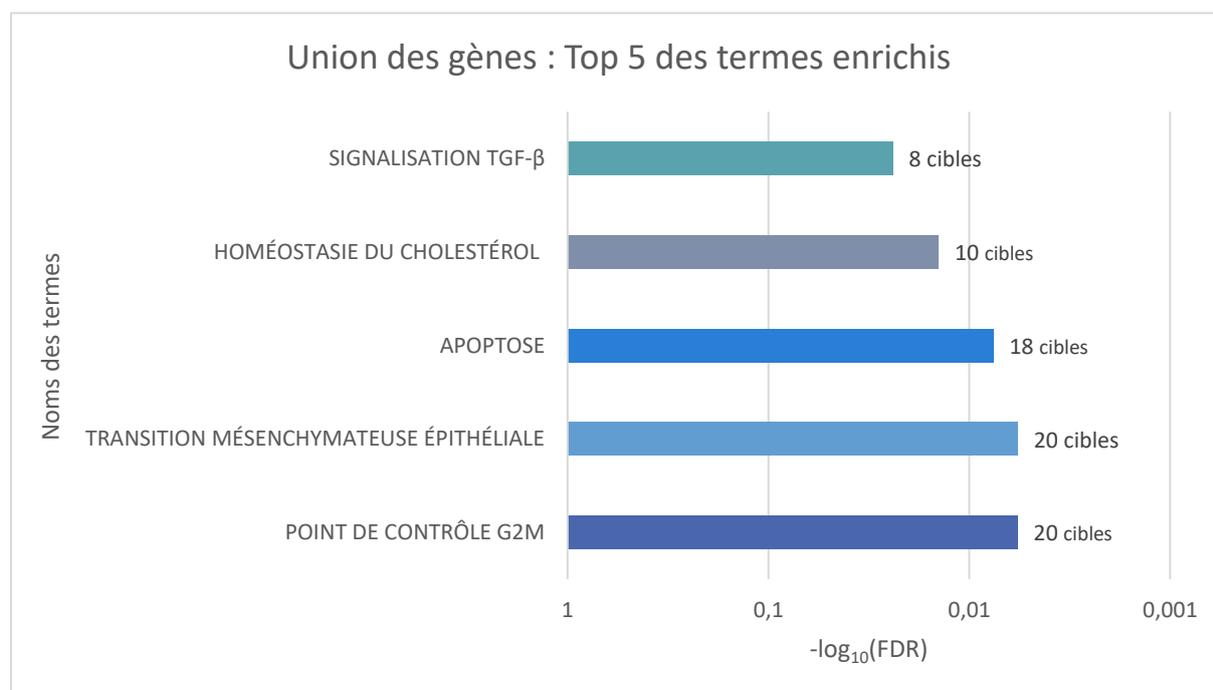


Figure 13 : Analyse bioinformatique mettant en évidence les voies biologiques potentiellement régulées par miR-584-5p et miR744-5p. le logiciel informatique DIANA-miRPath v4.0 montre une implication potentielle de ces miRs dans la modulation de voies biologiques potentiellement en lien avec la fibrose. Le nombre de gènes ciblés sont également indiqués pour chacune de ces voies. Les résultats sont exprimés $-\log_{10}$ de la valeur de p ajustée par la méthode FDR.

4 Impact de miR-584-5p et miR-744-5p sur la fibrose dans la SSc

L'étape suivante a été d'étudier l'impact des miRNAs associés à la SSc-ILD (miR-584-5p et miR-744-5p) sur la réponse profibrotique des fibroblastes pulmonaires. Pour cela, les cellules MRC5 ont été transfectées avec des miRNAs mimics (20 nM) afin de surexprimer les miRNAs d'intérêts et d'analyser leur impact sur l'expression des gènes profibrotiques (figure 14). En présence de miR-584-5p mimic, nous observons une augmentation significative de l'expression de FN ($p < 0,05$), COL1A1 ($p < 0,05$) et COL3A1 ($p < 0,05$) et ACTA2 ($p = 0,055$) ($n=3$). Ensuite, nous avons diminué l'expression de miR-584-5p par transfection d'inhibiteur (50 nM) ce qui induit une diminution de l'expression de FN ($p < 0,05$) et de ACTA2 ($n=3$). Nous n'observons aucun effet au niveau des marqueurs fibrotiques lors de la surexpression ou inhibition du miR-744-5p.

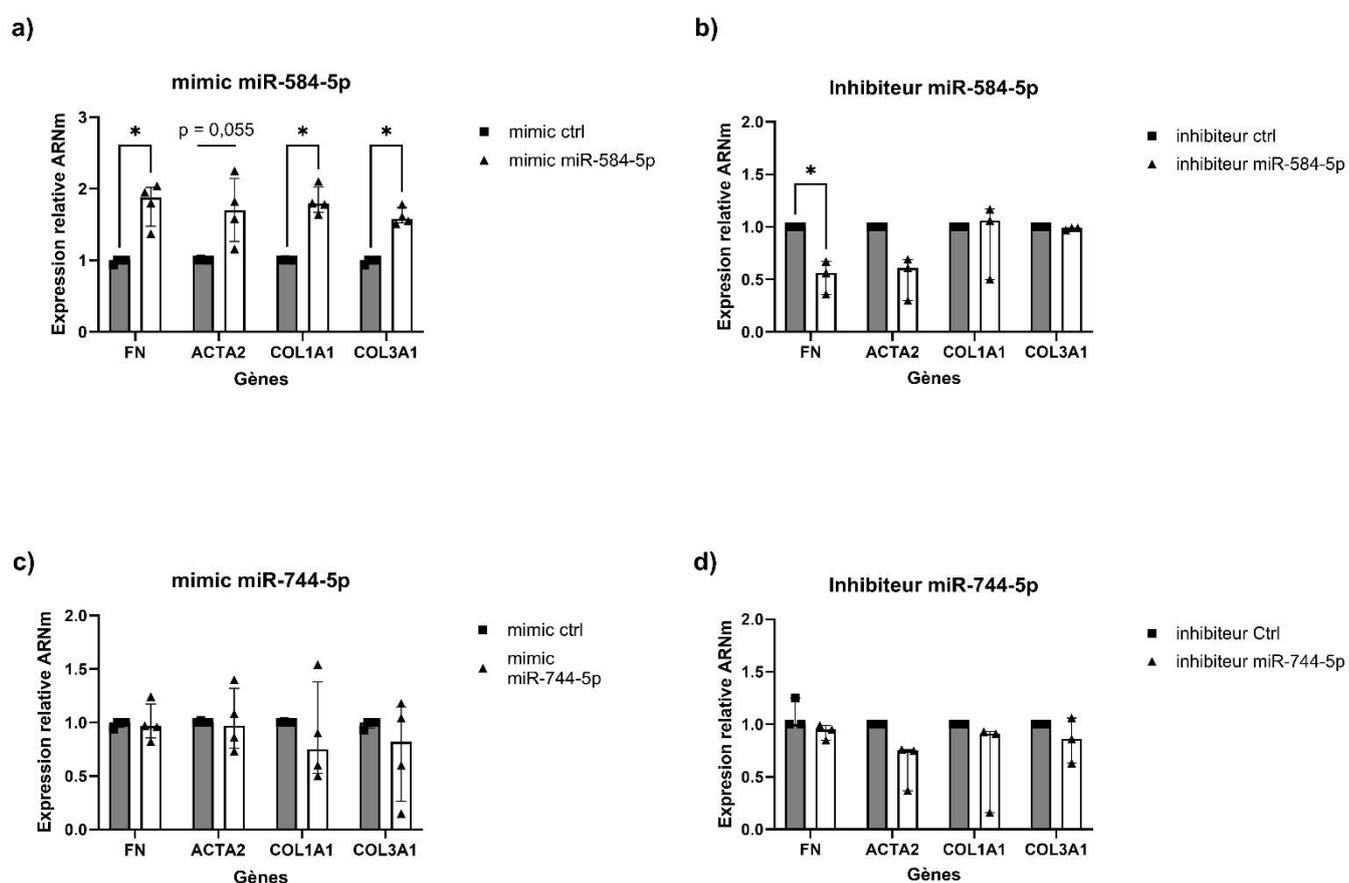


Figure 14 : Impact des miR 584-5p et miR 744-5p sur l'expression de gènes fibrotiques dans des fibroblastes pulmonaires MRC5. Les niveaux d'expression des gènes codant la fibronectine (FN), l'alpha smooth muscle actin (α -SMA) et le collagènes (COL1A1 et COL3A1) sont déterminés par RT-qPCR au niveau de fibroblastes pulmonaires MRC5 traités 48h avec le mimic ou inhibiteur du miR 584-5p (a et b) et miR 744-5p (c et d). Les données suivent une distribution normale selon le test de normalité de Shapiro-Wilk et sont exprimés en médiane (+/-IQR). Les données sont analysées par un t-test multiple pairé. * $p < 0.05$.

Afin de confirmer l'effet profibrotique du miR-584-5p au niveau protéique, nous avons mesuré par FACS l'expression de la FN dans les fibroblastes MRC5 transfectés avec le mimic correspondant. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de la FN dans les cellules transfectées avec le miR-584-5p mimic par rapport à la condition comportant le mimic contrôle (n=3) (figure 15). L'ensemble de ces résultats montre un effet profibrotique de miR-584-5p dans les fibroblastes pulmonaires

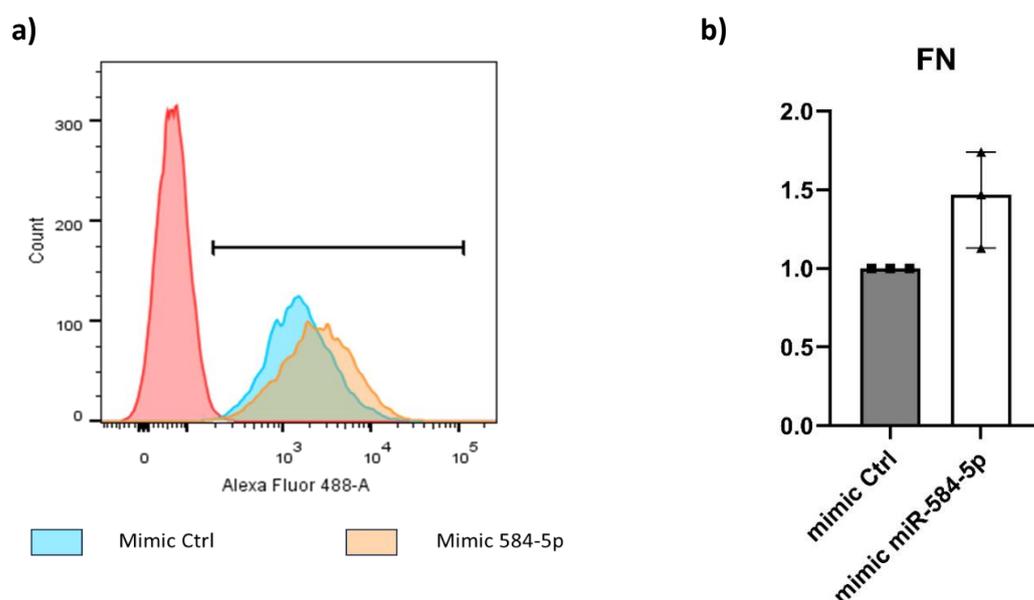


Figure 15 : L'augmentation de l'expression de la fibronectine au niveau des fibroblastes MRC5 après transfection a été déterminée par FACS. (a) Graphique d'une mesure obtenus par FACS mettant en évidence le comptage de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence qui est corrélé au niveau d'expression de la protéine marquée. (b) Histogramme montrant les médianes (n=3) obtenues par FACS. Les données suivent une distribution normale selon le test de normalité de Shapiro-Wilk et sont exprimés en médiane (+/-IQR). Les données sont analysées par un t-test non-pairé.

5 Impact des exosomes sur la fibrose

Les exosomes SSc-ILD étant capables de transférer le miRNA profibrotique miR-584-5p dans les cellules cibles, cela suggère que ces vésicules possèdent des propriétés profibrotiques. Afin de vérifier cela, les cellules MRC5 ont été traitées 48h avec des exosomes de patients SSc (+/-ILD) et HS, puis stimulées avec du TGF- β (+).

Il existe une tendance des sEV dérivés de patients atteints d'HS et de SSc sans ILD à diminuer l'expression des gènes profibrotiques (FN, COL1A1 et COL3A1) en présence de TGF- β (figure 16d). En revanche, les sEV SSc-ILD ont pu augmenter l'expression de gènes profibrotiques dans les fibroblastes traités au TGF- β par rapport à ceux de SSc-no ILD (FN, $p < 0,05$; ACTA2, $p < 0,05$; COL1A1, $p = 0,053$) (figure 16). Ces résultats montrent clairement que les sEV plasmatiques des patients SSc-ILD présentent une propriété profibrotique.

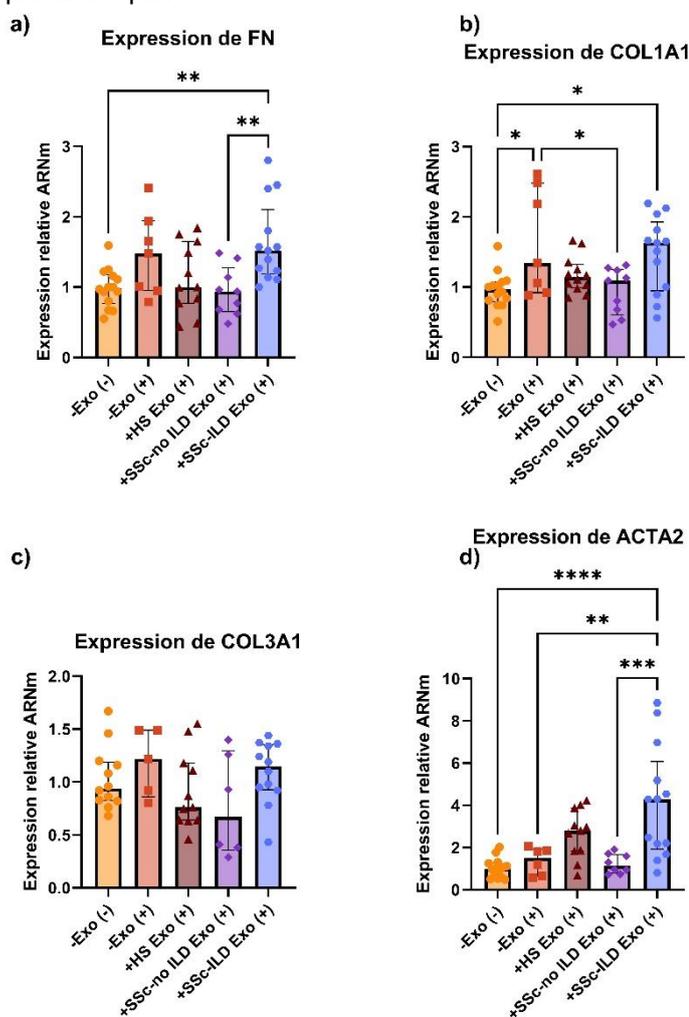


Figure 16 : Impact des exosomes de patients sur l'expression de gènes fibrotiques dans des fibroblastes pulmonaires MRC5. Les niveaux d'expression des gènes sont déterminés par RT-qPCR au niveau de fibroblastes pulmonaires MRC5 traités 48h avec des exosomes de patients sains (HS), malade sans atteinte pulmonaire (SSc-no ILD) ou avec atteinte pulmonaire (SSc-ILD). Les gènes analysés sont : (a) la fibronectine (FN) ; (b, c) le collagène (respectivement COL1A1 et COL3A1) ; (d) l'alpha smooth muscle actin (α -SMA). Les données suivent une distribution normale selon le test de normalité de Shapiro-Wilk et sont exprimés en médiane (+/-IQR). Les données sont analysées par un test Anova one-way. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Les résultats de *Western Blot* confirment cette augmentation de l'expression de la FN dans les cellules traitées avec des exosomes de patients atteints SSc-ILD (25,39%) par rapport aux exosomes de patients HS (2,38%) et de patients atteints de SSc-no-ILD (6,88%) (figure 17). Ces résultats confirment le rôle profibrotique des exosomes SSc-ILD enrichis en miR-584-5p.

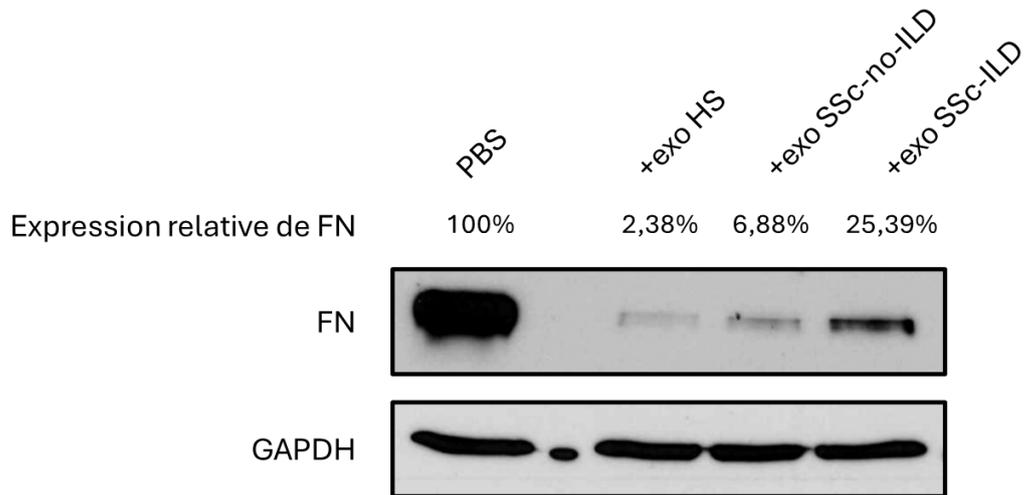


Figure 17 : Expression des la fibronectine analysée par *Western Blot*. L'expression relative a été déterminée à l'aide du logiciel ImageJ V1.54f.

6 Confirmation du rôle du miR-584-5p transféré par les exosomes sur la fibrose

Afin d'attester le rôle profibrotique du miR-584-5p présent dans les exosomes, l'expression de gènes liés à la fibrose est mesurée dans des fibroblastes MRC5 transfectés avec l'inhibiteur du miR-584-5p avant traitement avec des exosomes de patients atteints de SSc-ILD. Les niveaux d'expression sont comparés à ceux des cellules sans traitement avec des exosomes (figure 18a).

L'inhibition de miR-584-5p a permis aux exosomes SSc-ILD de diminuer significativement l'expression des gènes profibrotiques dans les cellules MRC-5 traitées par le TGF- β (figure 18b). Ce résultat démontre que miR-584-5p contribue à la propriété profibrotique des exosomes SSc-ILD.

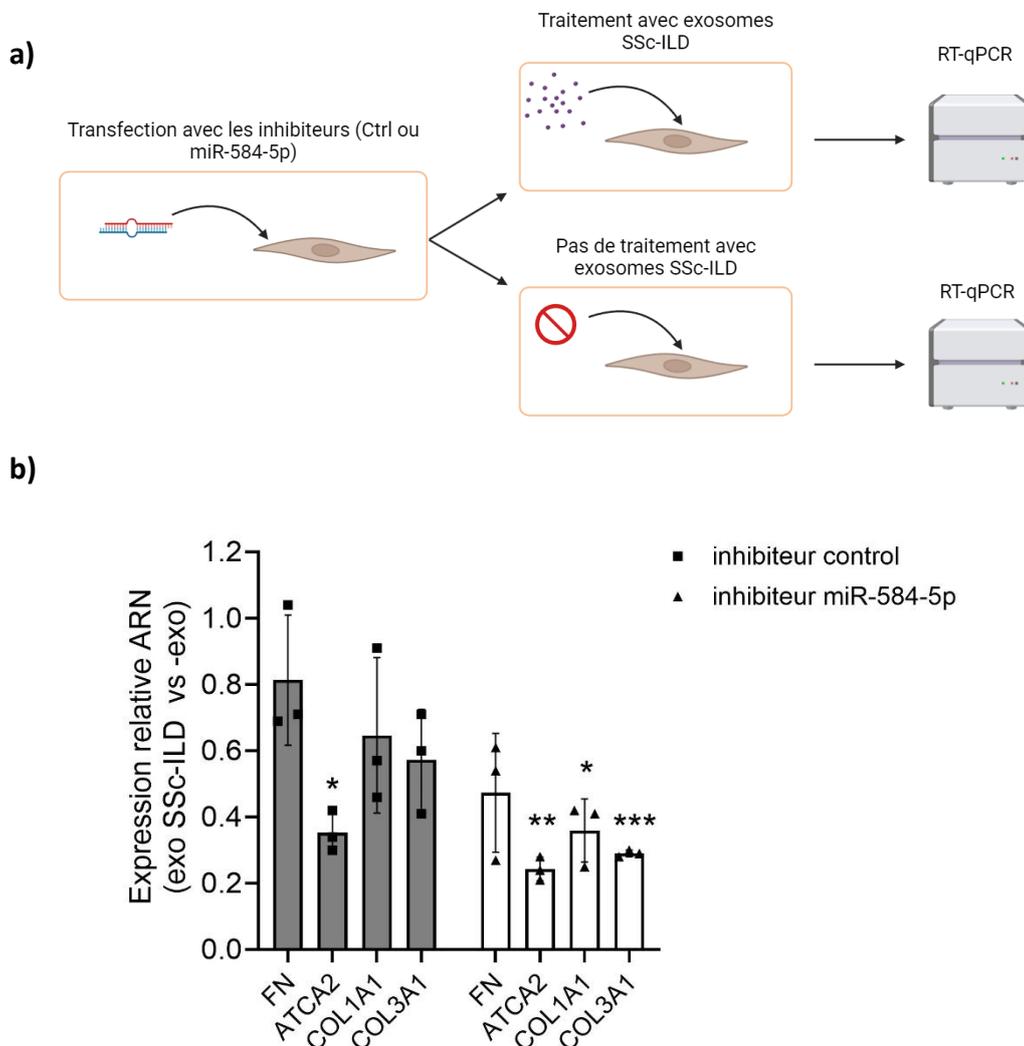


Figure 18 : Impact du miR-584-5p exosomal sur la fibrose. (a) Les fibroblastes MRC5 ont été transfectés avec les inhibiteurs des miRNAs control ou 584-5p puis traités avec des exosomes 24h et stimulés 4h au TGF- β avant de mesurer l'expression des gènes (FN ; ATCA2, COL1A1 et COL3A1 par RT-qPCR (b).

DISCUSSION

La SSc est une maladie auto-immune à l'étiologie peu connue dont les mécanismes impliqués sont complexes. La maladie débute par l'activation de CE qui vont induire un phénomène d'inflammation suivi par la fibrose de différents organes, dont les reins ou les poumons [26]. Lorsque les poumons sont atteints, on parle de SSc avec atteinte pulmonaire (ILD), une des pathologies les plus sévères [1]. Actuellement, le diagnostic de la SSc se base sur des critères cliniques vasculaires (ex. phénomène de Raynaud) et cutanés (localisation et gravité de la sclérodémie cutanée) ou paracliniques avec la détection d'auto-anticorps sériques. Les traitements utilisés à ce jour ne permettent que de ralentir la progression de la maladie. Un diagnostic spécifique et précoce permettrait d'assurer un suivi plus rapide et efficace des patients.

Les exosomes sont des nanovésicules qui jouent un rôle majeur dans la communication intercellulaire et sont impliqués dans de nombreuses pathologies. Les exosomes contiennent des lipides, protéines ainsi que des acides nucléiques, et leur composition varie selon la cellule d'origine et en condition pathologique. En particulier, la modification du contenu en miRNAs captive de plus en plus de chercheurs. Par exemple, des chercheurs ont démontré que la surexpression du miR-328 exosomal ciblant FAM13A provoque une surproduction des marqueurs profibrotiques (COL1A1, COL3A1 et de l' α -SMA) et induit la prolifération des fibroblastes pulmonaires [59].

Depuis deux décennies, de nombreuses études s'intéressent à l'impact des miRNAs sur l'initiation et la progression de différentes pathologies [51]. Petits RNAs non-codants, ils sont présents dans les biofluides (ex : sang, salive, sputum...) [51, 60]. En situation pathologique, il y a une modification de leur expression, ce qui entraîne une dérégulation de différents procédés biologiques, tels que l'inflammation ou la fibrose. En effet, l'implication du miR-181a dans le processus de fibrose et la modulation de la réponse inflammatoire via les voies TLR4 ou TGF- β démontre l'importance de ce miRNA dans la progression de la SSc [61]. Milosevic et al. ont révélé que le mir-154 joue un rôle dans la régulation de la prolifération et de la migration des fibroblastes. Les auteurs pensent que le miRNA peut entraîner la transcription de marqueurs profibrotiques chez les fibroblastes pulmonaires [44].

Les miRNAs encapsulés dans les exosomes sont particulièrement intéressants car ils sont délivrés à distance de la cellule d'origine et jouent ainsi un rôle clé dans la communication intercellulaire. Ces RNAs encapsulés offrent de nombreuses possibilités d'application clinique en tant que biomarqueurs diagnostiques/pronostiques et cibles thérapeutiques [42]. Dans le contexte SSc, une étude réalisée par Szabo et al. montre une différence significative des niveaux d'expression de huit miRNAs anti-fibrotiques (miRlet-7a, miR-290, miR-92a, miR-1250, miR-133, miR-140, miR-146a, miR-

200a) dans le sous-groupe dcSSc par rapport au sous-groupe lcSSc [56]. Ces marqueurs peuvent permettre de discriminer ces deux sous-groupes [56]. En revanche, aucun miRNAs exosomaux spécifiques à la SSc-ILD n'ont été décrits à ce jour. D'autres marqueurs transportés dans d'autres types de vésicules ont été identifiés dans le cadre de la SSc-ILD. C'est le cas notamment des microparticules dérivées des plaquettes (PDMP), responsables de l'activation des monocytes se liant aux fibroblastes favorisant la progression de la SSc-ILD. Les PDMPs sont enrichis dans le plasma des patients atteints de SSc-ILD. Un taux élevé en PDMP dans le plasma peut être associé à des complications vasculaires chez les patients atteints de la SSc-ILD [62].

Récemment, le laboratoire a identifié quatre miRNAs associés à l'atteinte pulmonaire chez les patients SSc, dont trois présentant une surexpression chez les patients SSc-ILD comparé aux patients SSc-no ILD (miR-584-5p, miR-744-5p et miR-1307-3p). Plusieurs études suggèrent leur implication dans l'inflammation/la fibrose des poumons. Dans les cellules épithéliales pulmonaires A549, la surexpression de miR-584-5p ou la suppression de l'expression de RAB23 (cible du miRNA) diminuent l'expression de facteurs inflammatoires et augmentent la viabilité cellulaire [63]. Suppresseur de tumeur, le miR-584-5p régule aussi YKT6, une des protéines de reconnaissance SNARE qui contrôle la migration et l'invasion cellulaire [64]. Des études ont décrit le rôle anti-fibrotique de miR-744-5p. En effet, miR-744-5p inhibe la FP en ciblant notamment la protéine PTBP1 dont l'expression est corrélée à la FP idiopathique, une maladie fibrosante du poumon [65, 66]. MiR-1307-3p est impliqué dans la gravité de l'HTAP dans le contexte SSc, symptôme précoce de la maladie. Ce miRNA régule aussi la voie de signalisation de la croissance et la prolifération cellulaire en ciblant la voie PI3K [67, 68]. PI3K est induit par le TGF- β et entraîne la phosphorylation de protéines kinase impliquées dans la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes [69].

La première partie du travail consistait à déterminer si les miRNAs exosomaux identifiés sont impliqués dans l'initiation/progression de la SSc-ILD. Pour ce faire, l'expression de ces miRNAs a été mesurée après le traitement de fibroblastes pulmonaires MRC5 avec des exosomes isolées du plasma de patients SSc avec ou sans ILD, et de sujets sains. L'expression des miR-584-5p et miR-744-5p augmente après 24h d'incubation avec des exosomes de patients SSc-ILD, ce qui suggère un transfert de ces miRNAs exosomaux dans les fibroblastes. Cependant, l'expression du miR-1307-3p ne varie pas dans les fibroblastes pulmonaires. Afin de confirmer le transfert de ces 2 miRNAs (miR-584-5p et miR-744-5p) dans la cellule cible, nous avons réalisé une cinétique d'incubation avec les exosomes de patients SSc-ILD. Les formes matures des miRNAs augmentent rapidement (à partir de 1h d'incubation), en revanche leurs formes précurseurs restent stables, ce qui démontre un transfert direct des exosomes à la cellule cible.

Afin d'identifier les voies biologiques susceptibles d'être modulées par miR-584-5p et miR-744-5p, une étude *in silico* a été menée via le logiciel *DIANA-miRPath v4.0*. Les miR-584-5p et miR-744-5p interviennent dans la régulation de voies moléculaires associées à la fibrose telles que la transition mésenchymateuse, l'apoptose ainsi que la voie de signalisation du TGF- β [70]. De plus, ces miRNAs interviennent dans la régulation du cycle cellulaire (phase G2/M). Dans le cas de la fibrose rénale, un arrêt prolongé de la phase G2/M des cellules épithéliales du tube proximal favorise une mauvaise cicatrisation du tissu et la synthèse des facteurs profibrotiques dont TGF- β et CTFG [71].

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux propriétés fonctionnelles de miR-584-5p et miR-744-5p en étudiant leur impact sur l'expression de marqueurs profibrotiques *in vitro*. La surexpression du miR-584-5p dans les fibroblastes pulmonaires via la transfection de mimics a pour conséquence d'augmenter l'expression des gènes codant le collagène (COL1A1 et COL3A1), la FN et l'actine α -SMA (gène ACTA2). L'inhibition du miR-584-5p montre une diminution de l'expression de la FN et ACTA2, confirmant la propriété profibrotique de miR-584-5p. L'induction de FN est confirmée au niveau protéique par FACS. D'un autre côté, la modulation de l'expression de miR-744-5p (surexpression ou inhibition) n'a aucun effet sur l'expression des gènes profibrotiques.

Enfin, nous avons étudié l'impact des exosomes sur la progression de la FP chez les patients atteints de SSc. Nous avons observé des propriétés profibrotiques différentielles des exosomes plasmatiques des patients SSc en fonction de la gravité de la maladie, avec une propriété profibrotique plus élevée des exosomes des patients SSc-ILD par rapport à ceux des patients SSc-no ILD et de HS. De plus, nos résultats ont démontré que miRNA-584-5p exosomal contribue à la propriété profibrotique des exosomes SSc-ILD. À notre connaissance, il s'agit de la première étude mettant en évidence la propriété profibrotique des exosomes associés à l'implication pulmonaire dans la maladie SSc. Ces résultats sont intéressants, car actuellement, les études pionnières concernant les fonctionnalités des VEs dans la SSc-ILD sont limitées et concernent principalement les microparticules [72]. En effet, il a été montré que les PDMPs sont présents en grande quantité dans le plasma et activent les monocytes chez les patients atteints de SSc-ILD. Les monocytes ainsi activés peuvent se lier aux fibroblastes et contribueraient au développement de la fibrose dans SSc-ILD [62]. Une autre étude de Wermuth et al. a montré que les exosomes purifiés chez les patients atteints de SSc induisaient un phénotype profibrotique dans les fibroblastes dermiques normaux en culture, avec une plus grande induction de l'expression des gènes profibrotiques avec les exosomes des patients atteints de SSc diffuse par rapport à ceux des patients atteints de SSc limitée [73].

Septembre 2024

En conclusion, les exosomes de patients atteints de SSc-ILD présentent des propriétés profibrotiques en partie dû au transfert de miR-584-5p dans les cellules cibles. Des expériences complémentaires devront être effectuées pour étudier les cibles moléculaires du miRNA dans le contexte de la SSc-ILD et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Adigun R, Goyal A, Hariz A. Systemic Sclerosis. *StatPearls* [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Feb 26]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430875/>.
- 2 Giannini M, Ellezam B, Leclair V, *et al.* Scleromyositis: A distinct novel entity within the systemic sclerosis and autoimmune myositis spectrum. Implications for care and pathogenesis. *Front Immunol* 2023; 13: 974078.
- 3 Jimenez SA, Derk CT. Following the Molecular Pathways toward an Understanding of the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Ann Intern Med* American College of Physicians; 2004; 140: 37–50.
- 4 Cottin V, Brown KK. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). *Respir Res* 2019; 20: 13.
- 5 Hilberg O, Hoffmann-Vold A-M, Smith V, *et al.* Epidemiology of interstitial lung diseases and their progressive-fibrosing behaviour in six European countries. *ERJ Open Res* 2022; 8: 00597–02021.
- 6 Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, *et al.* Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin Epidemiol* Dove Press; 2019; 11: 257–273.
- 7 Kahaleh MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma: *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 718–722.
- 8 Nihtyanova SI, Denton CP. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 112–116.
- 9 Diab S, Dostrovsky N, Hudson M, *et al.* Systemic Sclerosis Sine Scleroderma: A Multicenter Study of 1417 Subjects. *J Rheumatol* The Journal of Rheumatology; 2014; 41: 2179–2185.
- 10 Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, *et al.* 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 2737–2747.
- 11 Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *The Lancet* 2017; 390: 1685–1699.
- 12 Posa M, Stelle M, Chizzolini C, *et al.* Manifestations pulmonaires de la SSc. *Rev Med Suisse* 2015; 469: 802–806.
- 13 White B. Interstitial lung disease in scleroderma. *Rheum Dis Clin N Am* 2003; 29: 371–390.
- 14 Perelas A, Silver RM, Arrossi AV, *et al.* Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 304–320.
- 15 Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, *et al.* Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1809–1815.
- 16 Mouawad JE, Feghali-Bostwick C. The Molecular Mechanisms of Systemic Sclerosis-Associated Lung Fibrosis. *Int J Mol Sci* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023; 24: 2963.

- 17 Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012; 18: 1028–1040.
- 18 Ho YY, Lagares D, Tager AM, *et al.* Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10: 390–402.
- 19 Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117: 557–567.
- 20 Volkmann ER, Andréasson K, Smith V. Systemic sclerosis. *The Lancet* 2023; 401: 304–318.
- 21 Khedoe P, Marges E, Hiemstra P, *et al.* Interstitial Lung Disease in Patients With Systemic Sclerosis: Toward Personalized-Medicine-Based Prediction and Drug Screening Models of Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease (SSc-ILD). *Front Immunol* [Internet] Frontiers; 2020 [cited 2024 Apr 28]; 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.01990/full>.
- 22 Hua-Huy T, Dinh-Xuan AT. Cellular and molecular mechanisms in the pathophysiology of systemic sclerosis. *Pathol Biol* 2015; 63: 61–68.
- 23 Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, *et al.* Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117: 530–541.
- 24 Sato S, Ono N, Steeber DA, *et al.* CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950* 1996; 157: 4371–4378.
- 25 Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, *et al.* Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 192–201.
- 26 Allanore Y. Physiopathologie de la SSc. *médecine/sciences* Éditions EDK, Groupe EDP Sciences; 2016; 32: 183–191.
- 27 Van Bon L, Affandi AJ, Broen J, *et al.* Proteome-wide Analysis and CXCL4 as a Biomarker in Systemic Sclerosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 433–443.
- 28 Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, *et al.* New developments in fibroblast and myofibroblast biology: Implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9: 136–143.
- 29 March JT, Golshirazi G, Cernisova V, *et al.* Targeting TGF- β Signaling to Address Fibrosis Using Antisense Oligonucleotides. *Biomedicines* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018; 6: 74.
- 30 Atamas SP, White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 537–550.
- 31 Åhrman E, Hallgren O, Malmström L, *et al.* Quantitative proteomic characterization of the lung extracellular matrix in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Proteomics* 2018; 189: 23–33.
- 32 Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, *et al.* The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* 2021; 19: 47.

- 33 Zhang Y, Liu Y, Liu H, *et al.* Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 2019; 9: 19.
- 34 Han Q-F, Li W-J, Hu K-S, *et al.* Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer* 2022; 21: 207.
- 35 Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, *et al.* Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 467–480.
- 36 Burtenshaw D, Regan B, Owen K, *et al.* Exosomal Composition, Biogenesis and Profiling Using Point-of-Care Diagnostics—Implications for Cardiovascular Disease. *Front Cell Dev Biol* [Internet] Frontiers; 2022 [cited 2024 Jun 7]; 10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.853451>.
- 37 Khan NA, Asim M, Biswas KH, *et al.* Exosome nanovesicles as potential biomarkers and immune checkpoint signaling modulators in lung cancer microenvironment: recent advances and emerging concepts. *J Exp Clin Cancer Res* 2023; 42: 221.
- 38 Guenat D, Hermetet F, Pr etet J-L, *et al.* Exosomes and Other Extracellular Vesicles in HPV Transmission and Carcinogenesis. *Viruses Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2017; 9: 211.
- 39 Zhang Y, Liu Q, Zhang X, *et al.* Recent advances in exosome-mediated nucleic acid delivery for cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 2022; 20: 279.
- 40 Laulagnier K, Javalet C, Hemming FJ, *et al.* Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2018; 75: 757–773.
- 41 Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Morishita M, *et al.* Cell type-specific and common characteristics of exosomes derived from mouse cell lines: Yield, physicochemical properties, and pharmacokinetics. *Eur J Pharm Sci* 2017; 96: 316–322.
- 42 Khalyfa A, Gozal D. Exosomal miRNAs as potential biomarkers of cardiovascular risk in children. *J Transl Med* 2014; 12: 162.
- 43 Guiot J, Struman I, Louis E, *et al.* Exosomal miRNAs in Lung Diseases: From Biologic Function to Therapeutic Targets. *J Clin Med* 2019; 8: 1345.
- 44 Milosevic J, Pandit K, Magister M, *et al.* Profibrotic Role of miR-154 in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47: 879–887.
- 45 Guiot J, Cambier M, Boeckx A, *et al.* Macrophage-derived exosomes attenuate fibrosis in airway epithelial cells through delivery of antifibrotic miR-142-3p. *Thorax* 2020; 75: 870–881.
- 46 Njock M-S, Guiot J, Henket MA, *et al.* Sputum exosomes: promising biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2019; 74: 309–312.
- 47 Bartel DP. Micro-RNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; 116: 281–297.
- 48 Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, *et al.* Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol* 2018; 233: 2007–2018.
- 49 Koturbash I, Tolleson WH, Guo L, *et al.* Micro-RNAs as Pharmacogenomic Biomarkers for Drug Efficacy and Drug Safety Assessment. *Biomark Med* Taylor & Francis; 2015; 9: 1153–1176.

- 50 MacFarlane L-A, Murphy PR. Micro-RNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 2010; 11: 537–561.
- 51 Shang R, Lee S, Senavirathne G, *et al.* micro-RNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet* Nature Publishing Group; 2023; 24: 816–833.
- 52 O’Brien J, Hayder H, Zayed Y, *et al.* Overview of Micro-RNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* [Internet] 2018 [cited 2024 Feb 8]; 9. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2018.00402>.
- 53 Davis BN, Hata A. Regulation of Micro-RNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 2009; 7: 18.
- 54 Denzler R, McGeary SE, Title AC, *et al.* Impact of Micro-RNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. *Mol Cell* 2016; 64: 565–579.
- 55 Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of micro-RNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* Nature Publishing Group; 2015; 16: 421–433.
- 56 Szabo I, Muntean L, Crisan T, *et al.* Novel Concepts in Systemic Sclerosis Pathogenesis: Role for miRNAs. *Biomedicines* 2021; 9: 1471.
- 57 Li Y, Huang J, Hu C, *et al.* Micro-RNA-320a: an important regulator in the fibrotic process in interstitial lung disease of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2021; 23: 21.
- 58 Njock M, Henket M, Jacquerie P, *et al.* Plasma-derived exosomal miRNAs as non-invasive biomarkers for lung involvement in systemic sclerosis. *Eur Respir J* [Internet] European Respiratory Society; 2022 [cited 2024 May 31]; 60. Available from: https://erj.ersjournals.com/content/60/suppl_66/2918.
- 59 Yao M-Y, Zhang W-H, Ma W-T, *et al.* micro-RNA-328 in exosomes derived from M2 macrophages exerts a promotive effect on the progression of pulmonary fibrosis via FAM13A in a rat model. *Exp Mol Med* Nature Publishing Group; 2019; 51: 1–16.
- 60 Parzibut G, Henket M, Moermans C, *et al.* A Blood Exosomal miRNA Signature in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 640042.
- 61 Xie W, Li M, Xu N, *et al.* miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages. *PLOS ONE* Public Library of Science; 2013; 8: e58639.
- 62 Nomura S, Inami N, Ozaki Y, *et al.* Significance of microparticles in progressive systemic sclerosis with interstitial pneumonia. *Platelets* Taylor & Francis; 2008; 19: 192–198.
- 63 Yang E, Hong Y, Xuan C, *et al.* Biomarker of Pulmonary Inflammatory Response in LUAD: miR-584-5p Targets RAB23 to Suppress Inflammation Induced by LPS in A549 Cells. *Protein Pept Lett* 2023; 30: 877–890.
- 64 Lee SB, Park YS, Sung JS, *et al.* Tumor Suppressor miR-584-5p Inhibits Migration and Invasion in Smoking Related Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting YKT6. *Cancers* 2021; 13: 1159.
- 65 King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* Elsevier; 2011; 378: 1949–1961.

- 66 Li J, Chai W, Zhao Z, *et al.* Long non-coding RNA HOTTIP enhances the fibrosis of lung tissues by regulating the miR-744-5p/PTBP1 signaling axis. *Mol Med Rep Spandidos Publications*; 2021; 24: 1–10.
- 67 Balme N, Mahmoudi S, Mohammadi N, *et al.* Predicted therapeutic targets for COVID-19 disease by inhibiting SARS-CoV-2 and its related receptors. *Inform Med Unlocked* 2020; 20: 100407.
- 68 Herrera-Rivero M, Zhang R, Heilmann-Heimbach S, *et al.* Circulating micro-RNAs are associated with Pulmonary Hypertension and Development of Chronic Lung Disease in Congenital Diaphragmatic Hernia. *Sci Rep* 2018; 8: 10735.
- 69 Wang J, Hu K, Cai X, *et al.* Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Acta Pharm Sin B* 2022; 12: 18–32.
- 70 Hanmandlu A, Zhu L, Mertens TCJ, *et al.* Transcriptomic and Epigenetic Profiling of Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020; 66: 53–63.
- 71 Zhang Y, Yang Y, Yang F, *et al.* HDAC9-mediated epithelial cell cycle arrest in G2/M contributes to kidney fibrosis in male mice. *Nat Commun* Nature Publishing Group; 2023; 14: 3007.
- 72 De Lorenzis E, Rindone A, Di Donato S, *et al.* Circulating extracellular vesicles in the context of interstitial lung disease related to systemic sclerosis: A scoping literature review. *Autoimmun Rev* 2023; 22: 103401.
- 73 Wermuth PJ, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Exosomes isolated from serum of systemic sclerosis patients display alterations in their content of profibrotic and antifibrotic micro-RNA and induce a profibrotic phenotype in cultured normal dermal fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35 Suppl 106: 21–30.

ANNEXES

RNA	Séquences (5'-3')	Références
Hsa-miR-584-5p (mimic)	UUAUGGUUUUGCCUGGGACUGAG	MSY0003249
Hsa-miR-744-5p (mimic)	UGC GGGGCUAGGGCUAACAGCA	MSY0004945
miR-Ctrl (mimic)	non-fournie	1027280
Hsa-miR-584-5p (inhibiteur)	TCAGTCCCAGGCAAACCATA	339121 YI04100451
Hsa-miR-744-5p (inhibiteur)	TTAGCCCTAGCCCCGCA	339121 YI04103536-ADA
miR-Ctrl (inhibiteur)	TAACACGTCTATACGCCCA	339126 YI00199006-ADA

Annexe 1 : Séquences et références des mimics et inhibiteurs utilisés.

Anticorps	Classe/Isotype	Organisme d'origine	Firmes	Concentration stock (dilution pour le WB)	Références
Anti-GAPDH	Monoclonal/IgG	Souris	Invitrogen	1 mg/mL (1/1000)	MAC-15738
Anti-FN	Monoclonal/IgG	Souris	Invitrogen	0,5 mg/mL (1/1000)	14-9869-82
Anti-α-Smooth Muscle Actin	Monoclonal/IgG	Souris	Invitrogen	Non-déterminée (1/500)	MA5-15806
Anti-souris conjugué à la HRP	IgG	Cheval	Cell signaling	184 μ g/mL (1/3000)	7076S

Annexe 2 : Énumération et caractéristiques des anticorps employés pour le Western Blot.

Primers pour l'expression des miRNAs	Séquences (5'-3')
HSA-miR-1307-3p	TGGCGTCGGTCGTGA
HSA-miR-16-5p	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
HSA-miR-584-5p	TTATGGTTTGCCTGGGACTG
HSA-miR-744-5p	GGCTAGGGCTAACAGCAAAA
HSA-pre-miR-584-5p (F)	GGA CTGAGGAATTTGCTGGG
HSA-pre-miR-584-5p (R)	GGAGACCAACCAGCCTGG
HSA-pre-miR-744-5p (F)	AGCGCTAACAGCAGTCTTACT
HSA-pre-miR-744-5p (R)	AAGGTTGAGGTTAGTGCAAC
HSA-pri-miR-584-5p (F)	GTTGGTCTCCCTGAAGCAAC
HSA-pri-miR-584-5p (R)	GGCCCTACCTTGATTCTCT
HSA-pri-miR-744-5p (F)	ACATGCTGTTGCCACTAACC
HSA-pri-miR-744-5p (R)	AAACAAACAGAAGCCGAGCC
Universal primer	GCATAGACCTGAATGGCGGTA

Annexe 3 : Séquences des primers utilisés pour analyser l'expression des miRNAs et de leurs précurseurs.

Primers pour l'expression des gènes	Séquences (5'-3')
COLA1A1 (F)	TGTT CAGCTTTGTGGACCTC
COLA1A1 (R)	CGTTCTGTACGCAGGTGATT
COLA1A1 (F)	TGTGAATCATGCCCTZCTGG
COLA1A1 (R)	ATAGCCTGCGAGTCCTCCTA
GAPDH (F)	AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC
GAPDH (R)	GAGGTCAATGAAGGGGTCAT
FN-1 (F)	ACCTCTGTGCAGACCACATC
FN-1 (B)	CATCCCCACAGAGTAGACCA
ACTA2 (F)	ACTGAGCGTGGCTATTCCTT
ACTA2 (R)	TGGCCATCTCATTTTCAAAG

Annexe 4 : Séquences des primers utilisés pour analyser l'expression des gènes corrélés à la fibrose.

Septembre 2024

Etude de miRNAs exosomaux altérés dans la sclérodémie systémique avec atteinte pulmonaire

La sclérodémie systémique (SSc) est une maladie auto-immune complexe caractérisée par un dysfonctionnement du système immunitaire, une vasculopathie, une inflammation cellulaire et une fibrose de la peau et de plusieurs organes internes. Lorsque les poumons sont atteints, on parle de SSc avec atteinte pulmonaire interstitielle (SSc-ILD). L'atteinte pulmonaire (ILD) est la principale cause de mortalité chez les patients SSc, représentant 30 à 35% des décès dans ce groupe. Actuellement, le défi est de diagnostiquer spécifiquement et le plus rapidement possible l'atteinte pulmonaire afin de garantir un meilleur suivi des patients. Dès lors, la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques de l'atteinte pulmonaire chez les patients SSc est cruciale.

Depuis quelques décennies, les vésicules extracellulaires, notamment les exosomes, suscitent un intérêt croissant dans l'identification de biomarqueurs de différentes pathologies. Une étude menée récemment dans le laboratoire a permis l'identification de micro-RNAs (miRNAs) enrichis dans les exosomes de patients SSc-ILD (miR-584-5p, miR-744-5p et miR-1307-3p). L'objectif de mon mémoire a été d'étudier les propriétés fonctionnelles des exosomes/miRNAs exosomaux associés à la SSc-ILD.

Pour cela, nous avons isolé des exosomes par ultracentrifugation à partir du plasma de patients SSc avec ILD (SSc-ILD, n=22), SSc sans ILD (SSc-no ILD, n=23) et de sujets sains (n=23). Tout d'abord, nous avons étudié l'impact des exosomes de patients SSc-ILD sur l'expression de miRNAs dans les fibroblastes pulmonaires. Nos résultats montrent que les exosomes de patients SSc-ILD sont capables de transférer les miRNAs, miR-584-5p et miR-744-5p, dans les fibroblastes pulmonaires. Une analyse *in silico* a révélé que ces miRNAs ciblent les processus cellulaires associés à la physiopathologie de la SSc-ILD, tels que la transition épithélio-mésenchymateuse et la voie de signalisation du TGF- β . Ensuite, l'étude fonctionnelle de ces deux miRNAs associés à la SSc-ILD démontre la propriété profibrotique de miRNA-584-5p. Enfin, nous avons étudié l'impact des exosomes sur la progression de la FP chez les patients atteints de SSc. Les exosomes de patients SSc présentent des propriétés profibrotiques caractéristiques de la progression de la maladie. En effet, les exosomes de patients SSc-ILD présentent des propriétés profibrotiques plus élevées que ceux de patients SSc-no ILD et de sujets sains. L'inhibition de miR-584-5p avant le traitement avec les exosomes SSc-ILD diminue l'effet profibrotique de ces vésicules, ce qui montre que miR-584-5p contribue aux propriétés profibrotiques des exosomes SSc-ILD.

En conclusion, les propriétés profibrotiques des exosomes SSc-ILD suggèrent un rôle majeur de ces vésicules sur l'apparition et la progression de l'atteinte pulmonaire chez les patients SSc. Ces propriétés seraient en partie dues au transfert de miR-584-5p dans les cellules cibles.

Mémorant : Sébastien Cremers

Promoteur : Makon-Sébastien Njock, Chercheur Qualifié CHU Liège

Co-promotrice : Professeur Catherine Sadzot, ULiège

Laboratoire de Pneumologie, GIGA-RESEARCH, CHU de Liège, ULiège