



HAL
open science

Implication des microARN dans le développement des maladies pulmonaires à composante environnementale : exemple de le fibrose pulmonaire idiopathique

Elisabeth Ngoubo Ngangue-Courcot

► To cite this version:

Elisabeth Ngoubo Ngangue-Courcot. Implication des microARN dans le développement des maladies pulmonaires à composante environnementale : exemple de le fibrose pulmonaire idiopathique. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S051 . tel-01927224

HAL Id: tel-01927224

<https://theses.hal.science/tel-01927224>

Submitted on 19 Nov 2018

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

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

UNIVERSITE de LILLE 2 - DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Thèse pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement le 12 Novembre 2012 par
Elisabeth COURCOT- NGOUBO NGANGUE

Sujet de thèse

**Implication des microARN dans le développement des maladies
pulmonaires à composante environnementale
Exemple de le fibrose pulmonaire idiopathique**

Membres du Jury

Rapporteurs	Mr le Professeur Philippe Bonniaud Mr le Professeur Paul de Vuyst
Examineurs	Mr le Professeur Jean-Jacques Lafitte (Directeur de thèse) Mr le Docteur Jean-Marc Lo Guidice

Remerciements

Je remercie Monsieur le Professeur Franck Broly, le directeur de l'EA4483, de m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Je remercie également Monsieur le Professeur Jean-Jacques Lafitte, mon directeur de thèse, ainsi que Monsieur le Professeur Paul de Vuyst et Monsieur le Professeur Philippe Bonniaud, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie le Docteur Jean-Marc Lo-Guidice et le Docteur Nicolas Pottier, au contact desquels j'ai beaucoup appris.

Je remercie le Docteur Ingrid Billaut pour ses précieux conseils.

Je remercie les autres membres de l'équipe EA4483, en particulier Mélanie et Anne Engels, que j'ai souvent sollicitées pour leurs connaissances pratiques et techniques.

Je remercie mes compagnons de paillasse et co-thésards, pour leur soutien que j'espère mutuel, tout au long de la thèse.

Je remercie les membres de ma famille qui m'ont soutenue.

Je remercie enfin mon Mari et ma fille, Sarah, qui m'ont accompagnée au cours de ces années de recherche.

Publications

miR-214-3p targets COX-2 in lung fibroblasts and contributes to resistance to apoptosis.

Courcot E, Lafitte JJ, Mari B, Pottier N and Lo-Guidice JM.

Soumis à Am J Resp Cell Mol Biol

miR-199a-5p is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1.

Lino Cardenas CL *, Henaoui IS *, **Courcot E**, Roderburg C, Cauffiez C, Aubert S, Copin MC, Wallaert B, Glowacki F, Milosevic J, Maurizio J, Tedrow J, Marcet B, Lo-guidice JM, Kaminski N, Barbry P, Luedde T, Perrais M, Mari B and Pottier N.

* *Contribution égale*

En révision à PloS Genetics

Xenobiotic Metabolism and Disposition in Human Lung Cell Models: Comparison with In Vivo Expression Profiles.

Courcot E, Leclerc J, Lafitte JJ, Mensier E, Jaillard S, Gosset P, Shirali P, Pottier N, Broly F, Lo-Guidice JM.

Drug Metab Dispos. 2012 Jul 13

Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues.

Leclerc J, **Courcot-Ngoubo Ngangue E**, Cauffiez C, Allorge D, Pottier N, Lafitte JJ, Debaert M, Jaillard S, Broly F, Lo-Guidice JM.

Biochimie. 2011 Jun;93(6):1012-27

Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral lung tissues: Differential expression in non-small cell lung cancers.

Leclerc J, Tournel G, **Courcot-Ngoubo Ngangue E**, Pottier N, Lafitte JJ, Jaillard S, Mensier E, Lhermitte M, Broly F, Lo-Guidice JM.

Biochimie. 2010 92: 292-306

Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions.

Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puisséguer MP, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, Bertero T, Lino Cardenas CL, **Courcot E**, Rios G, Fourre S, Lo-Guidice JM, Marcet B, Cardinaud B, Barbry P, Mari B.

PLoS One. 2009 Aug 24

Table des matières

Introduction générale	6
Première partie : les microARN	11
I. Découverte des microARN.....	12
II. Biogenèse des microARN.....	13
III. Rôle des microARN.....	15
IV. MicroARN et thérapeutique.....	17
Deuxième partie: MicroARN et maladies respiratoires à composante environnementale	20
I. Maladies pulmonaires et environnement.....	23
II. Métabolisation des substances exogènes environnementales.....	26
III. Toxicité des substances exogènes environnementales.....	28
IV. MicroARN et environnement.....	28
1. MicroARN et tabac.....	29
2. MicroARN et pollution atmosphérique.....	31
a) <i>MicroARN et pollution particulaire</i>	32
b) <i>MicroARN et benzo(a)pyrène</i>	32
3. Hypothèses du lien entre environnement et modifications des microARN.....	32
Troisième partie : MicroARN et fibrose pulmonaire idiopathique	34
I. La fibrose pulmonaire idiopathique.....	35
1. Définition et classification.....	35
2. Aspects clinique et paraclinique de la FPI.....	36
3. Physiopathologie de la Fibrose pulmonaire	37
a) <i>Etiologie de la FPI</i>	37
b) <i>FPI et inflammation</i>	37
c) <i>Apoptose des cellules épithéliales</i>	38
d) <i>Activation aberrante des cellules épithéliales alvéolaires</i>	39
e) <i>Facteurs de croissance et médiateurs cellulaires dans la FPI</i>	40
f) <i>Fibroblastes et inhibition de l'apoptose</i>	40

II. Génétique et fibrose pulmonaire Idiopathique.....	43
III. Thérapeutiques et FPI.....	45
1. Essais thérapeutiques dans la FPI.....	45
2. Nouvelles voies thérapeutiques.....	46
IV. MicroARN et fibrose pulmonaire idiopathique.....	48
1. Let-7d et FPI.....	48
2. miR-21 et FPI.....	49
3. miR-155 et FPI.....	50
4. miR-29 et FPI.....	50

Travaux personnels

Articles 1 et 2 : Implication des microARN dans le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique.....	53
Article 3 : Identification d'un modèle d'étude cellulaire pulmonaire d'exposition aux xénobiotiques.....	116
Discussion générale et perspectives	131
Conclusion	142
Bibliographie	143
Resumé	159

Introduction générale

Notre organisme est constamment exposé à de nombreuses substances exogènes. Ces substances, regroupées sous le terme de xénobiotiques, peuvent être des solvants ou autres produits de synthèse chimique, des polluants atmosphériques, des composants de la fumée de cigarette, des additifs alimentaires, des médicaments. Le poumon, dont la fonction première est de permettre les échanges gazeux est un organe en contact direct avec les composés chimiques inhalables. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de l'environnement chimique sur le développement de maladies pulmonaires, parmi lesquelles le cancer broncho-pulmonaire ou les broncho-pneumopathies chroniques. Certaines maladies, dont la cause était initialement inconnue sont suspectées d'être favorisées, voire provoquées par les toxiques environnementaux. C'est le cas en particulier de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique (Taskar et Coultas 2006).

Les mécanismes conduisant à la pathogenèse des maladies pulmonaires à composante environnementale sont complexes. L'effet des composés toxiques sur le poumon est en partie dépendant de leur prise en charge par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) qui sont capables de les rendre inoffensifs ou au contraire de les bioactiver et d'induire des lésions cellulaires graves (Gram 1997). Le profil d'expression des systèmes de prise en charge des xénobiotiques varie en fonction des tissus, mais également en fonction des individus. En effet, les gènes codant ces systèmes sont souvent polymorphes et peuvent présenter des mutations ponctuelles, des délétions partielles ou totales, ou encore des amplifications. Ces anomalies peuvent être à l'origine d'altérations de l'expression ou de la fonction des EMX et des protéines de transport au sein des tissus et, par conséquent, être responsables d'importantes variations interindividuelles de réponse aux xénobiotiques et constituer, seules ou en association, des facteurs de prédisposition à des affections locales (Kelada et al. 2003).

Les polymorphismes génétiques ne peuvent expliquer qu'une partie des maladies à composante environnementale. En effet, les toxiques de l'environnement ainsi que les modifications du micro-environnement cellulaire peuvent aussi modifier l'expression des gènes indépendamment de leur séquence primaire grâce à un processus connu sous le terme d'épigénétique. L'épigénétique est le domaine qui étudie comment l'environnement et l'histoire individuelle influe sur l'expression des gènes. Les modifications épigénétiques sont les modifications réversibles de l'expression génique transmissibles d'une génération à l'autre, sans altération des séquences nucléotidiques de l'ADN (Holliday 2006; Jirtle et Skinner 2007). La séquence primaire de l'ADN est généralement fixée à la conception, mais les marqueurs épigénétiques sont dynamiques et modifiables au cours de la vie de l'individu, sous l'influence de son environnement. Il existe trois principaux mécanismes de régulation

épigénétique : la méthylation de l'ADN, les modifications d'histone (en particulier l'acétylation des histones), et les voies de régulation associées aux ARN non codants, parmi lesquelles les microARN (Figure 1). Des études préliminaires ont pu suggérer que l'épigénome était sensible aux effets d'un environnement néfaste. Ainsi, Li et ses collaborateurs ont montré que le tabagisme de la grand-mère durant la grossesse de la mère augmentait le risque de développer de l'asthme chez l'enfant, indépendamment du tabagisme de la mère. Le risque d'asthme chez l'enfant était encore accru quand la mère et la grand-mère fumaient durant la grossesse (Li et al. 2000). Ces études mettent en évidence un mécanisme où l'information génétique de départ a été reprogrammée, impliquant des mécanismes épigénétiques, et suggèrent que l'exposition précoce à des contaminants peut avoir un effet sur la susceptibilité de l'individu à développer des maladies au cours de l'âge adulte.

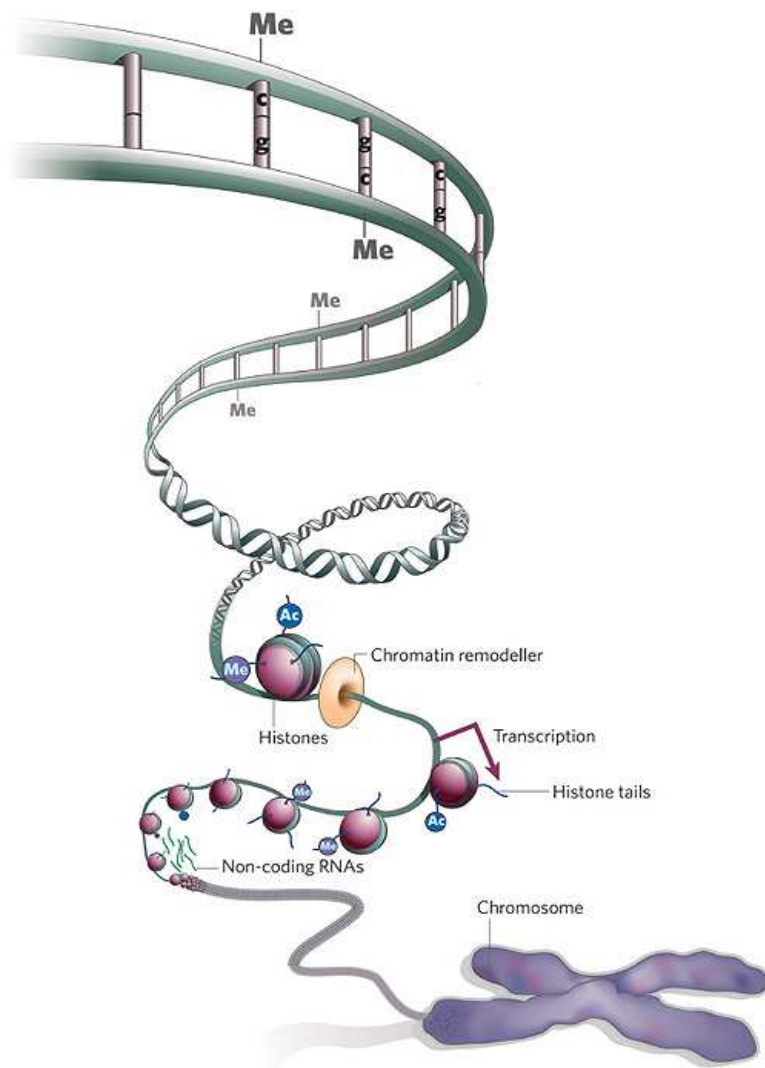


Figure 1 D'après Qiu J. *Nature*, 2008.

Schéma montrant les principaux mécanismes épigénétiques : la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones, et les ARN non codant parmi lesquels les microARN. Les processus épigénétiques sont essentiels à l'interprétation du génome et sont reconnus dans l'implication de maladies chez l'homme.

Les microARN qui représentent l'un des mécanismes majeurs de régulation épigénétique, sont des petits ARN non codant d'une vingtaine de nucléotides exerçant une régulation post-transcriptionnelle sur l'expression des gènes. Chez l'homme, les microARN contrôleraient l'expression de plus de 60% des gènes codant pour des protéines. Depuis leur découverte, de nombreuses études ont montré l'implication des microARN dans divers processus physiologiques et pathologiques (Yi et al 2006 ; Calin et Croce 2006). Il a été démontré que la dérégulation d'expression de microARN observée dans de nombreuses maladies pouvait avoir un effet sur l'expression de gènes ou sur la régulation de voies biologiques ayant un rôle crucial dans le développement de ces maladies. Par ailleurs, les microARN présentent un intérêt particulier puisque de nombreuses données suggèrent qu'ils pourraient avoir un potentiel thérapeutique ou diagnostique (Brown et Naldini 2009; Kota et al. 2009; Bader, Brown, et Winkler 2010).

La Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI) appartient au groupe des pneumopathies interstitielles diffuses idiopathiques dont elle est la forme la plus fréquente et se caractérise par une fibrose progressive et irréversible de l'interstitium pulmonaire. Il n'existe à ce jour aucun traitement réellement efficace contre l'évolution de cette maladie dont le pronostic reste péjoratif. L'étude des microARN et de leur implication dans le développement de la FPI ou d'autres maladies fibrotiques est limitée, contrairement à d'autres domaines comme la cancérologie.

Le premier objectif de mes travaux de recherche a été d'identifier des microARN susceptibles de jouer un rôle dans le développement de la FPI, et d'identifier leurs fonctions dans les mécanismes de fibrogenèse. Ces microARN pourraient à plus long terme constituer des cibles thérapeutiques dans la FPI.

Le second objectif a été d'identifier le modèle cellulaire pulmonaire le plus adapté pour analyser l'impact des polluants atmosphérique sur l'expression des microARN. Cette analyse devrait nous aider à mieux comprendre l'impact global de la pollution particulaire sur l'appareil respiratoire et son implication dans le développement des maladies pulmonaires à composante environnementale dont fait partie la Fibrose Pulmonaire Idiopathique.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Equipe d'Accueil 4483 de l'Université de Lille 2. Cette équipe, dirigée par le Professeur Franck Broly, s'intéresse à l'implication de l'environnement chimique sur la santé humaine.

Ce manuscrit est organisé en deux grandes parties. La première expose l'état des principales connaissances actuelles sur les microARN, leur implication dans la réponse aux toxiques de l'environnement ainsi que dans la pathogenèse de la FPI. La seconde partie présente, sous forme d'articles acceptés ou soumis pour publication, les résultats de mes travaux concernant l'étude du rôle des microARN miR-199a-5p et miR-214-3p dans la FPI (**Articles 1 et 2**), et la caractérisation du modèle cellulaire pulmonaire le mieux adapté à l'analyse de l'influence des polluants aériens sur la santé respiratoire (**Article 3**).

Première partie
Les MicroARN

I. Découverte des microARN

Le premier microARN *lin-4* a été identifié en 1993, chez le nématode *C. elegans*, par une équipe qui tentait de décrypter les mécanismes moléculaires régissant le développement de cet organisme modèle. Le cycle de développement de ce petit ver comporte six stades successifs : l'embryogénèse, quatre stades larvaires (L1 à L4) et le stade adulte. Chez le mutant *lin-4*, qui réitère en permanence la phase larvaire L1, le phénotype sauvage peut être restauré par un ADN de 693 paires de bases ne codant pour aucune protéine. Ce fragment d'ADN comporte un gène codant pour un petit ARN de 22 nucléotides qui, à lui seul, est capable de restaurer le phénotype sauvage en se fixant, par hybridation moléculaire, sur plusieurs sites de la région 3' non codante (3'UTR) des ARNm codant pour la protéine LIN-14. Cette fixation provoque un arrêt de la synthèse de la protéine LIN-14, dont la fonction est de réprimer la transition du stade larvaire L1 vers le stade L2. (Lee, Feinbaum, et Ambros 1993). Ce mode de régulation avait été catalogué alors comme une bizarrerie spécifique du développement des nématodes.

En 2000, un nouveau microARN, *let-7*, a été identifié chez *C. elegans* ; il contrôle la transition entre le stade larvaire L4 et le stade adulte. Cette découverte a permis de généraliser le mode d'action de *lin-4*. En effet, le gène *let-7* code pour un ARN de 21 nucléotides qui inhibe l'accumulation des protéines LIN-41 et LIN-42 en se fixant sur la région 3'UTR des ARNm correspondants (Reinhart et al. 2000). Des séquences homologues du gène *let-7* ont été identifiées chez l'homme ainsi que chez de nombreuses espèces d'invertébrés et vertébrés (Pasquinelli et al. 2000). Cette conservation de séquence et de mode de régulation au sein d'espèces très éloignées suppose une forte pression de sélection sur ce gène. Ainsi, l'identification de gènes homologues de *let-7* est à l'origine d'une recherche systématique de microARN chez les métazoaires et chez les plantes. Actuellement, environ 1500 microARN ont été mis en évidence chez l'homme (miRbase v18) (Griffiths-Jones 2006), même si pour la plupart, leur fonction reste encore à élucider.

II. Biogenèse des microARN et mode d'action

Certains microARN sont codés par des gènes uniques dans des régions intergéniques (Woods, Thomson, et Hammond 2007; Wang et Li 2010; Ofir, Hacoheh, et Ginsberg 2011) ; d'autres sont situés dans des régions introniques de gènes codant pour des protéines (Ma et al. 2011; Levy et al. 2010). Un exemple de microARN intergénique est le miR-21, dont le gène est situé sur le chromosome 17. Dans ce cas, la transcription est contrôlée, comme les gènes codant pour les protéines, par un promoteur régulé par des facteurs de transcription qui lui sont propres. Un exemple de microARN intragénique est le miR-301. Sa séquence génomique est localisée dans les régions introniques de *ska2* (Cao et al. 2010). Dans ce cas, la transcription du microARN dépend du promoteur du gène hôte.

La majorité des gènes codant les microARN sont transcrits par l'ARN polymérase II, qui produit une molécule d'ARN pro-précurseur en forme de tige-boucle d'une centaine de nucléotides, appelé pri-microARN (Lee et al. 2004) (Figure 2). Cette molécule est ensuite prise en charge par un complexe multiprotéique appelé Microprocessor composé des protéines Drosha et DGCR8 (Seitz et Zamore 2006). Drosha est une ribonucléase de type III qui agit à l'aide de DGCR8 (protéine de liaison à l'ARN) pour libérer un précurseur d'environ 70 nucléotides : le pre-microARN. Ce précurseur possède une structure en tige-boucle avec une extrémité 3' sortante (avec 2 nucléotides qui dépassent, *2-nt 3' overhang*). Ce précurseur est ensuite activement exporté dans le cytoplasme par l'Exportine-5. Celle-ci reconnaît le pré-microARN grâce à son extrémité 3' sortante, et l'exporte vers le cytoplasme via un mécanisme Ran-GTP- dépendant (Lund et al. 2004).

Dans le cytoplasme, le pré-microARN va subir sa dernière étape de maturation, catalysée par Dicer, une autre ribonucléase de type III, assistée de la protéine TRBP (pour TAR RNA binding protein). Le microARN résultant est un duplexe de 21 nucléotides en moyenne avec deux extrémités 3' sortantes. Le miARN mature est issu du brin de ce duplexe, qui aurait l'extrémité 5' la moins stable du point de vue thermodynamique. Ce miARN simple brin sera ensuite intégré dans le complexe ribonucléique appelé RISC (pour RNA-induced silencing complex). Le complexe RISC est un complexe ribonucléoprotéique qui contient le miARN mature, les protéines Dicer et TRBP auxquelles sont venues se joindre les protéines argonautes (AGO1-4) (Peters et Meister 2007). Lorsqu'il existe une complémentarité parfaite entre le microARN et l'ARNm cible, le complexe RISC induit le clivage et la dégradation de l'ARNm. Une complémentarité partielle entre le microARN et la partie 3'UTR de son ARNm

cible conduit à un blocage de la traduction et/ou la déadénylation (suppression de la queue poly(A)) de l'ARNm, suivi d'une dégradation de l'ARNm qui survient dans les P-bodies (Ameres, Martinez, et Schroeder 2007; Pillai, Bhattacharyya, et Filipowicz 2007; P. Y. Chen et Meister 2005).

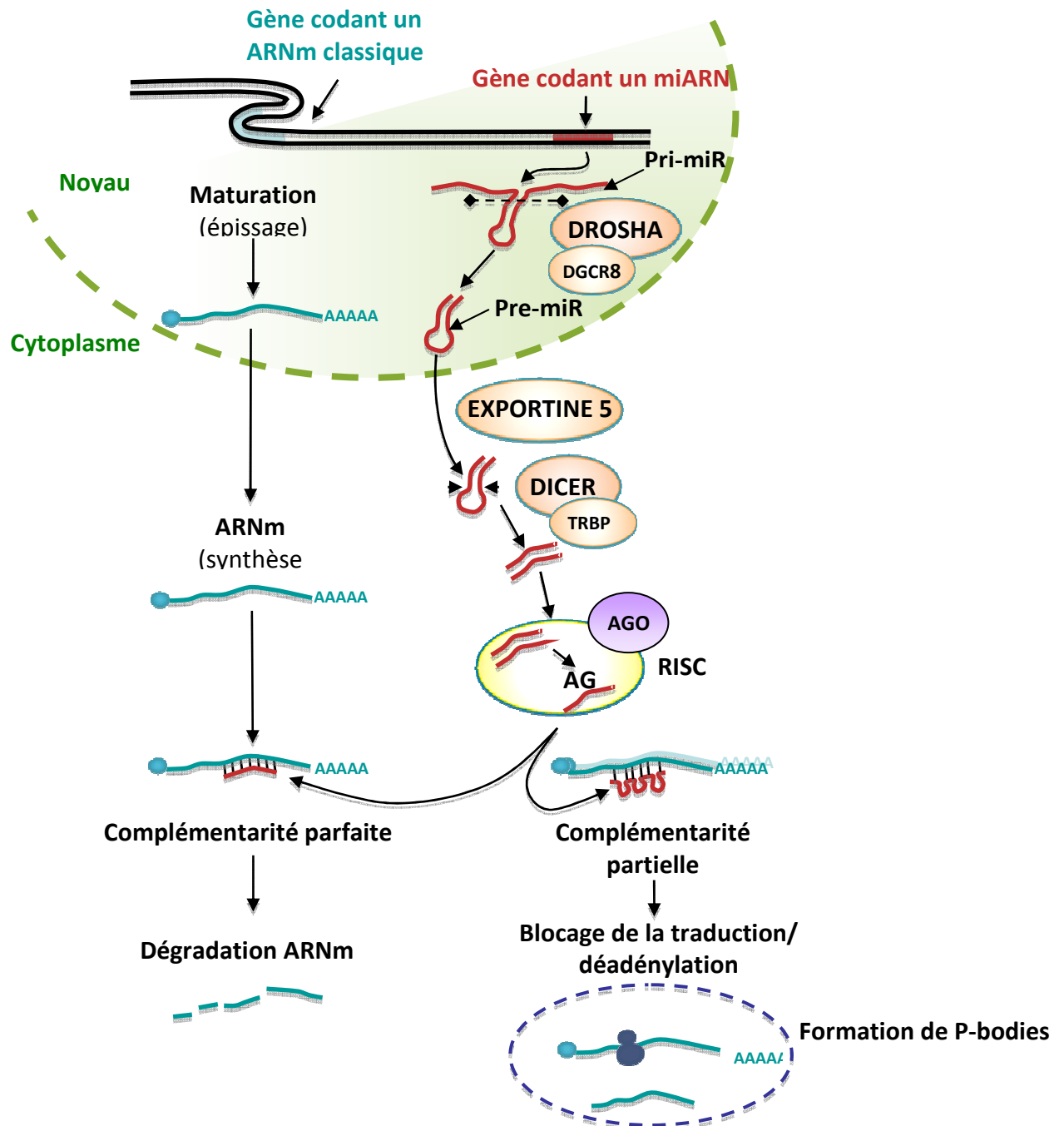


Figure 2 : Mécanisme général de la biogénèse des microARN.

III. Rôle des microARN

En raison de leur fonction de régulateurs de l'expression des gènes, les microARN sont suspectés d'être impliqués dans divers processus physiologiques ou pathologiques. Des études ont rapporté leur rôle dans la différenciation cellulaire et le développement tissulaire. A titre d'exemple, certains microARN sont impliqués dans la différenciation épithéliale des cellules progénitrices embryonnaires au cours de la formation de la peau (Yi et al. 2006). Les microARN sont également capables de contrôler des gènes impliqués dans la différenciation tissulaire. En particulier, deux microARN, le miR-1 et le miR-133 issus d'un même cluster, ont été associés à la prolifération et à la différenciation du tissu musculaire squelettique. D'une part, miR-1 est capable de promouvoir la différenciation des cellules progénitrices musculaires, les myoblastes, en myotubes en ciblant l'ARNm de l'histone deacetylase 4 (HDAC4) qui réprime la différenciation du muscle squelettique. D'autre part, miR-133 qui cible le serum response factor (SRF), favorise la prolifération des myoblastes. (J.-F. Chen et al. 2006) (Figure 3).

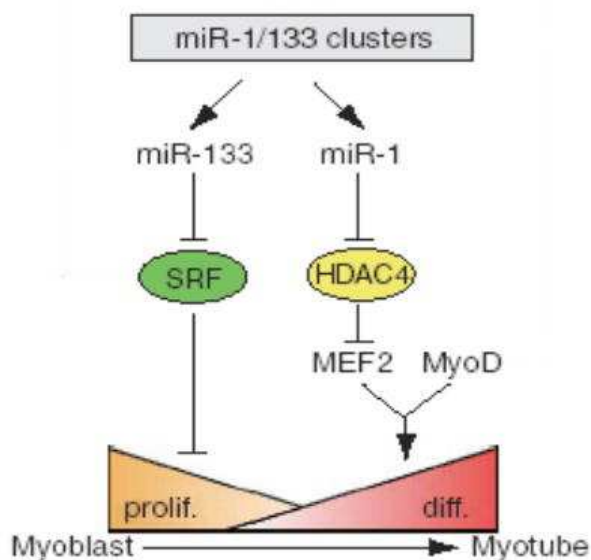


Figure 3 D'après Chen et al. 2006

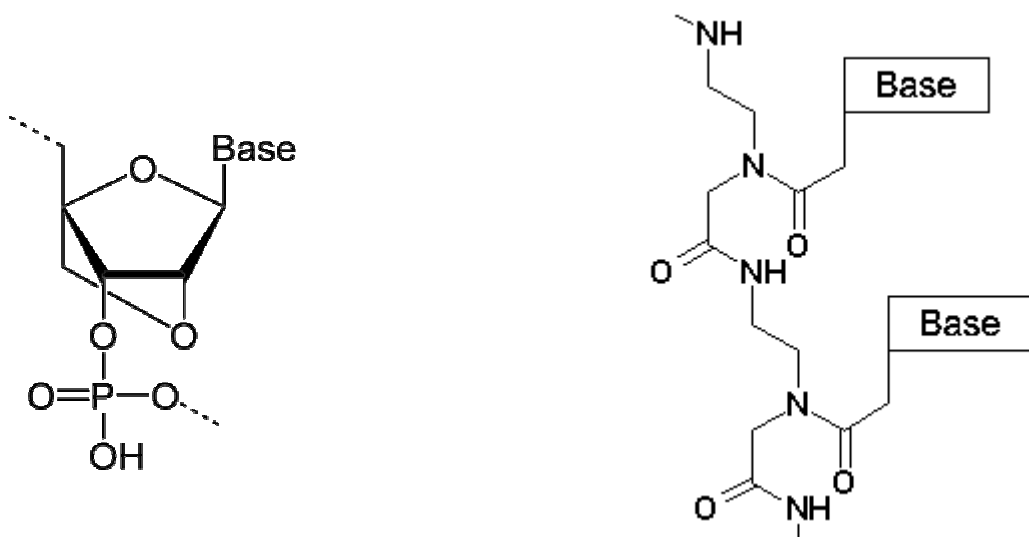
Schéma montrant le rôle régulateur de miR-133 et de miR-1 dans la prolifération et la différenciation du muscle squelettique.

Les microARN ont un rôle dans d'autres processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire ou l'apoptose. Par exemple, les microARN miR-15 et miR-16 induisent l'apoptose en inhibant l'ARNm de *BCL2* dans des modèles de cellules sanguines leucémiques (Cimmino et al. 2005; Bartel 2004).

De nombreuses études ont mis en évidence l'association entre le cancer (Calin et Croce 2006; Edmonds, Hurst, et Welch 2009; Cho 2007; Kumar et al. 2008) ou autres processus pathologiques (Shafi, Aliya, et Munshi 2010; Saugstad 2010; Kolfshoten et al. 2009; Li et al. 2010) avec l'expression inappropriée de microARN. Par exemple, le microARN let-7 prévient le développement des tumeurs pulmonaires non à petites cellules (Kumar et al. 2008); d'autres microARN ont un rôle dans l'obésité (Heneghan, Miller, et Kerin 2010), le diabète (Ferland-McCollough et al. 2010), la surdité (Kuhn et al. 2011), le développement des maladies hépatiques (Kerr, Korenblat, et Davidson 2011), les maladies pulmonaires (Nana-Sinkam et al. 2009), la schizophrénie (Hansen et al. 2007), le psoriasis (Xu et al. 2011), le SIDA (Hariharan et al. 2005; Noorbakhsh et al. 2010), mais aussi dans les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives (Taft et al. 2010). Les informations concernant l'association des microARN avec des maladies humaines sont répertoriées dans la base de données HMDD (HumanMicroRNADiseaseDatabase <http://202.38.126.151/hmdd/mirna/md/>)

IV. MicroARN et thérapeutique

Etant donné leur rôle dans la régulation négative de l'expression des gènes et de leur implication dans de nombreux processus pathologiques chez l'homme, les microARN ont été proposés comme cibles thérapeutiques dans le but de modifier l'expression d'ARNm spécifiques. Les microARN matures simple brin peuvent être ciblés par des courtes séquences d'ARN complémentaire, des oligodeoxyribonucléotides (ODN) ou des analogues des ODN. Ces oligonucléotides sont regroupés sous le terme d'anti-miR ou antagomiR. Les complexes Drosha et Dicer peuvent également être des cibles thérapeutiques. Enfin, la transcription des microARN peut être également modulée grâce à l'utilisation de stratégies capables d'inhiber ou d'activer les facteurs de transcription reconnaissant le promoteur des microARN d'intérêt.



Acide nucléique bloqué (LNA)

Acides nucléiques peptidiques (PNAs)

Figure 4. Représentation schématique de la structure chimique d'analogues d'oligodeoxyribonucléotides (ODN) ou antagomiR.

Les acides nucléiques bloqués (ou locked nucleic acid, LNA) contiennent un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2 et l'atome de carbone 4 du ribose qui favorise l'appariement des bases et augmente la stabilité du duplex miR/antagomiR. Les acides nucléiques peptidiques (ou Peptide Nucleic Acid, PNA) sont des molécules aux bases similaires à l'ADN ou à l'ARN mais dont le squelette est composé d'une répétition d'unités N-(2-aminoéthyl) glycine reliées par une liaison peptidique. Les PNAs présentent une grande spécificité d'appariement et sont résistants aux RNAses et aux protéases.

A ce jour, la méthode la plus couramment utilisée et la plus efficace est celle des antagomiR. De manière générale, les ARN sont sensibles à la dégradation chimique et enzymatique à cause de la présence du groupement 2'-OH. Pour cette raison, la plupart des antagomiR disponibles commercialement subissent une alkylation de l'oxygène en position 2 qui a pour effet de produire un dérivé plus stable, tout en conservant une forte affinité pour le miR complémentaire. Les acides nucléiques bloqués (ou locked nucleic acid, LNA) sont des analogues des ODN contenant un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2 et l'atome de carbone 4 du ribose (Figure 4). Cette conformation bloquée favorise l'appariement des bases et augmente la stabilité thermique du duplex miR/antagomiR. D'autres modifications plus importantes des dérivés oligonucléotidiques comme celles des acides nucléiques peptidiques (ou Peptide Nucleic Acid, PNA) ont également montré leur efficacité dans le ciblage des microARN. Les acides nucléiques peptidiques sont des molécules aux bases similaires à l'ADN ou à l'ARN mais dont le squelette est composé d'une répétition d'unités N-(2-aminoéthyl) glycine reliées par une liaison peptidique (Figure 4). Les PNAs présentent une grande spécificité d'appariement et sont résistants aux RNAses et aux protéases. Cependant, le squelette du PNA ne contient pas de groupement phosphate chargés ce qui est un facteur limitant pour la pénétration cellulaire de cette molécule. Pour pallier cet inconvénient, plusieurs approches ont été testées avec succès, en particulier la délivrance des PNA dans des liposomes et des microsphères.

De nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* chez des modèles animaux ont mis en évidence l'efficacité des antagomiR et leur potentiel thérapeutique dans diverses maladies (Brown et Naldini 2009; Kota et al. 2009; Bader, Brown, et Winkler 2010). Un nombre croissant de compagnies pharmaceutiques (Mirna Therapeutics, Miragen Therapeutics, ActiGenics, Santaris Pharma etc...) orientent leur recherche vers les microARN dans le but de les utiliser à but thérapeutique ou diagnostique. A l'heure actuelle, les essais cliniques les plus avancés (phase IIa) concernent l'antagomiR 122 (Miravirsén ou SPC3649) proposé dans le traitement de l'hépatite C. Le miR-122 est un microARN spécifique du foie qui régule l'expression de gènes principalement impliqués dans le métabolisme des lipides et du cholestérol. Au cours de l'infection du foie par le virus de l'hépatite C, le virus interagit avec le miR-122 de la cellule hépatique hôte par complémentarité de bases avec des sites de fixation situés à l'extrémité 5' de l'ARN viral (Figure 5). Cette fixation permet au virus de se répliquer et de créer de nouvelles copies, contribuant ainsi à l'extension de l'infection dans le foie. Miravirsén est un antagomiR de type acide nucléique bloqué (LNA) anti-miR-122. Il

permet la reconnaissance et la séquestration du miR-122, le rendant inaccessible au virus de l'hépatite C. Il en résulte une inhibition de la réplication du virus (Jopling, Norman, et Sarnow 2006; Jopling, Schütz, et Sarnow 2008; Jopling 2008; Eriksen et al. 2012; Hu et al. 2012). Les données de la phase I d'essai clinique du miravirsén ont montré une bonne tolérance du produit chez les volontaires sains. Chez les chimpanzés infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C, le miravirsén a provoqué une réduction significative (350 fois) et à long terme de la charge virale. Par ailleurs, aucune résistance virale au produit n'a été constatée au cours de cette étude. Les données récentes de la phase IIa d'essai clinique ont démontré que 4 patients sur 9 traités à des doses élevées (7mg/kg) de miravirsén avaient un ARN viral indétectable après seulement 4 semaines de traitement. De plus, le traitement a été bien toléré chez les patients atteints d'hépatite C. Ces premiers résultats mettent en évidence l'efficacité du miravirsén en monothérapie dans le traitement de l'hépatite C et sont prometteurs quant aux possibilités thérapeutiques à venir des microARN dans d'autres maladies humaines.

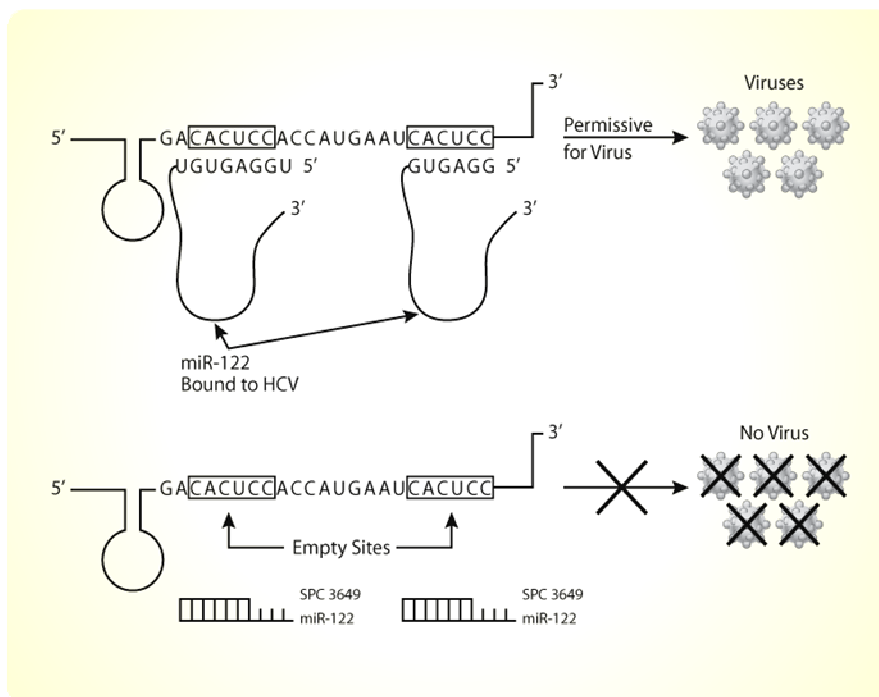


Figure 5. D'après Santaris Pharma. **Représentation schématique de la fonction du miR-122 dans la réplication du virus VHC (schéma du haut) et mode d'action du miravirsén (schéma du bas).** Le virus de l'hépatite C se sert du miR-122 de la cellule hôte, qui se fixe sur l'ARN viral par complémentarité de bases, pour permettre sa réplication. L'antagomiR anti-miR-122 (miravirsén) reconnaît le miR-122 et le séquestre, le rendant inaccessible au virus de l'hépatite C et inhibant ainsi sa réplication.

2^{ème} partie
MicroARN et
Maladies respiratoires à composante environnementale

I. Maladies pulmonaires et environnement

De nombreux facteurs environnementaux ont été mis en cause dans la survenue ou l'aggravation de maladies respiratoires.

La consommation de tabac est fortement impliquée dans les deux principales affections rencontrées en pneumologie, à savoir les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et le cancer du poumon. La fumée résultant de la combustion du tabac contient de nombreuses substances toxiques dont les effets sur la santé pour les fumeurs et son entourage sont actuellement bien établis. On estime habituellement que 90 % des cancers bronchiques sont directement liés à la consommation de tabac. Deux grandes études initiales, conduites aux Etats-Unis (Wynder et Graham 1950) et en Grande-Bretagne (Doll et Hill 1952), ont démontré l'existence d'une relation directe entre la consommation de tabac et la survenue d'un cancer bronchique. De même, le tabac est admis comme étant le principal facteur de risque dans la BPCO (Celli et al. 2004), qui est une maladie chronique, lentement progressive et caractérisée par une diminution non réversible des débits aériens. Le tabac est également fortement suspecté dans le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique. (Taskar et Coultas 2006; Baumgartner et al. 1997). La prévalence de fumeurs ou d'ex-fumeurs dans les séries de fibroses pulmonaires idiopathiques est de l'ordre de 40% à 80%.

Le tabagisme environnemental, ou tabagisme passif est lié à l'inhalation des courants latéral et tertiaire de la fumée de cigarette. A volume égal, le courant latéral est plus concentré en toxiques que le courant primaire inhalé par le fumeur. La quantification du tabagisme environnemental est difficile mais néanmoins démontrée, en particulier par la présence de cotinine urinaire chez les non fumeurs proches des fumeurs. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a reconnu l'exposition au tabagisme passif comme cancérigène pour l'homme. La fréquence des cancers bronchiques chez les non-fumeurs exposés au tabagisme passif est plus élevée que chez les non-exposés (Trédaniel et al. 1994; Boffetta et al. 1998). De plus, l'exposition au tabagisme passif, comme le tabagisme actif, est un facteur à la fois de déclenchement et d'aggravation des crises d'asthme (Dahms, Bolin, et Slavin 1981).

D'autres facteurs liés à l'environnement professionnel sont reconnus ou fortement suspectés dans la survenue de maladies respiratoires. Les cancers respiratoires représentent la plus grande majorité des cancers d'origine professionnelle. En effet, il est admis que la majorité des mésothéliomes pleuraux est liée à des expositions antérieures à l'amiante professionnelle, avec une fraction attribuable estimée à près de 85% chez l'homme pour le

Programme national de surveillance du mésothéliome pleural (PNSM). Le caractère multifactoriel des cancers bronchopulmonaires (CBP) ne doit pas faire méconnaître la fréquence des CBP liés à des expositions professionnelles antérieures, chez un sujet la plupart du temps fumeur. Les principaux agents d'exposition professionnelle cancérogènes certains, responsables d'un excès de CBP et reconnus par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) sont les suivants : l'amiante(+++), l'arsenic, le béryllium, le bis(chlorométhyl)éther et chlorométhylméthyléther, le cadmium, les dérivés du chrome hexavalent, les goudrons de houille, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, certains dérivés du Nickel, les poussières ou gaz radioactifs (dont le radon), la silice cristalline et le tabagisme passif.

Des épisodes de pollution atmosphérique inhabituellement sévères ont entraîné une forte mortalité au siècle dernier, mettant pour la première fois en évidence l'effet de la pollution atmosphérique sur la santé humaine (Vallée de la Meuse 1930, Donora en Pennsylvanie 1948, Londres 1952). Depuis, de très nombreux travaux ont établi que la pollution atmosphérique exerçait des effets délétères sur la santé humaine et, plus particulièrement, sur le système respiratoire.

La pollution atmosphérique pourrait être à l'origine d'une toux chronique sans autre maladie respiratoire associée. Cette relation repose sur des observations cliniques, épidémiologiques mais aussi sur la connaissance des mécanismes neurophysiologiques de la toux réflexe (Groneberg-Kloft et al. 2006; Tarlo 2006). La pollution atmosphérique exacerbe les crises d'asthme et pourraient même les induire. En effet, des études épidémiologiques montrent que les pics de pollution atmosphérique, notamment à l'ozone, aux oxydes d'azote, aux particules (Particulate Matter ou PM) et au SO₂, augmentent les recours en urgence pour crise d'asthme (Sunyer et al. 1997). Par ailleurs, le stress oxydatif induit par les PM, et en particulier les particules de Diesel, pourrait être responsable d'une inflammation bronchique avec hyperréactivité bronchique qui sont des marqueurs et possiblement des précurseurs du développement de l'asthme (Takizawa 2011; Kenyon et Liu 2011). Les pics de pollution atmosphérique sont également associés aux exacerbations des BPCO. Ainsi, six à 9 % des admissions hospitalières pour exacerbation de BPCO pourraient trouver leur origine dans la pollution atmosphérique (Sapey et Stockley 2006; Peacock et al. 2011; B Brunekreef et Forsberg 2005). De plus, les données actuelles indiquent que l'exposition chronique à la pollution atmosphérique pourrait être une cause de BPCO. Une étude allemande a, par exemple, mis en évidence chez des femmes âgées de 55 ans habitant la région industrielle de

la Ruhr, une augmentation du risque de développer une BPCO en raison de l'exposition chronique aux PM_{10} (PM inhalables de taille inférieure à $10\mu m$) (Schikowski et al. 2005). Par ailleurs, une étude ultérieure menée par la même équipe a constaté une diminution de la prévalence de la BPCO chez les femmes de 55 ans parallèlement à la diminution de la pollution atmosphérique et de la teneur en PM_{10} au cours des vingt dernières années. (Schikowski et al. 2010).

Cerner les effets à long terme de la pollution atmosphérique est plus complexe. En effet, il est difficile dans les études à long terme de faire la part d'un effet aggravant de la pollution sur des maladies ou des facteurs de risque préexistants, avec un effet intrinsèque de l'exposition chronique aux agents polluants sur le développement de maladies, c'est à dire, de distinguer les effets aigus des effets chroniques. Néanmoins, certaines études de cohortes et études cas-témoins ont permis de démontrer que la pollution atmosphérique, notamment la pollution résultant du trafic automobile, est associée à une augmentation de la mortalité cardiorespiratoire, en particulier par cancer bronchique et à une diminution de la croissance pulmonaire chez l'enfant (Bert Brunekreef et Holgate 2002; Gauderman et al. 2004). Une étude récente sur le rôle de l'exposition chronique aux PM dans l'étiologie du cancer du poumon a notamment montré qu'une augmentation de $10\mu g/m^3$ en $PM_{2.5}$ dans l'air ambiant augmentait le risque de mortalité par cancer pulmonaire chez les non-fumeurs de 15 à 27% (Turner et al. 2011).

II. Métabolisation des substances exogènes environnementales

Les polluants atmosphériques, les composants de la fumée de cigarette, tout comme les additifs alimentaires, les médicaments ou tout autre composé chimique environnemental sont regroupés sous le terme de xénobiotiques. Ces composés sont fréquemment hydrophobes et/ou comportent des groupements chimiques réactifs. Leur métabolisme est nécessaire pour les rendre plus hydrophiles donc plus faciles à éliminer dans la bile ou les urines, et/ou pour neutraliser leurs groupements réactifs.

Compte tenu de l'immense variabilité des structures chimiques existantes et des réactions à catalyser, il existe une grande diversité d'enzymes et de transporteurs contribuant à la détoxification des xénobiotiques. Le processus de détoxification des xénobiotiques se décompose classiquement en trois phases : une phase I dite de fonctionnalisation, une phase II dite de conjugaison et une phase III dite de transport ou d'élimination (Figure 6). Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) de phase I catalysent essentiellement des

réactions d'oxydoréduction et d'hydrolyse qui rendent les molécules plus polaires et plus à même d'être conjuguées (d'où le terme de fonctionnalisation). Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (CYP) réalisent la grande majorité de ces réactions. Les EMX de phase II sont des transférases qui catalysent des réactions de conjugaison et rendent les métabolites plus hydrophiles par greffage d'un composé endogène : glutathion (glutathion-S-transférases), glucuronate (UDP glycosyltransférases), sulfate (sulfotransférases), méthyle (méthyltransférases), acétyle (acétyltransférases)... Les protéines de phase III transportent les xénobiotiques et surtout leurs dérivés conjugués au travers des membranes pour permettre leur élimination. Les principaux transporteurs membranaires appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*) ou à la superfamille des SLC (*Solute Carrier*). L'ensemble de ces processus est finement régulé et coordonné par des récepteurs activés par des ligands endogènes (stéroïdes, acides gras, eicosanoïdes, acides biliaires...) ou exogènes. Ces récepteurs sont aussi des facteurs de transcription capables de moduler l'expression de nombreux gènes d'EMX et de transporteurs (Nakata et al. 2006). Trois principaux récepteurs (AhR, PXR and CAR) sont activés essentiellement par les xénobiotiques et sont ainsi appelés des xénosenseurs (Pascussi et al. 2008).

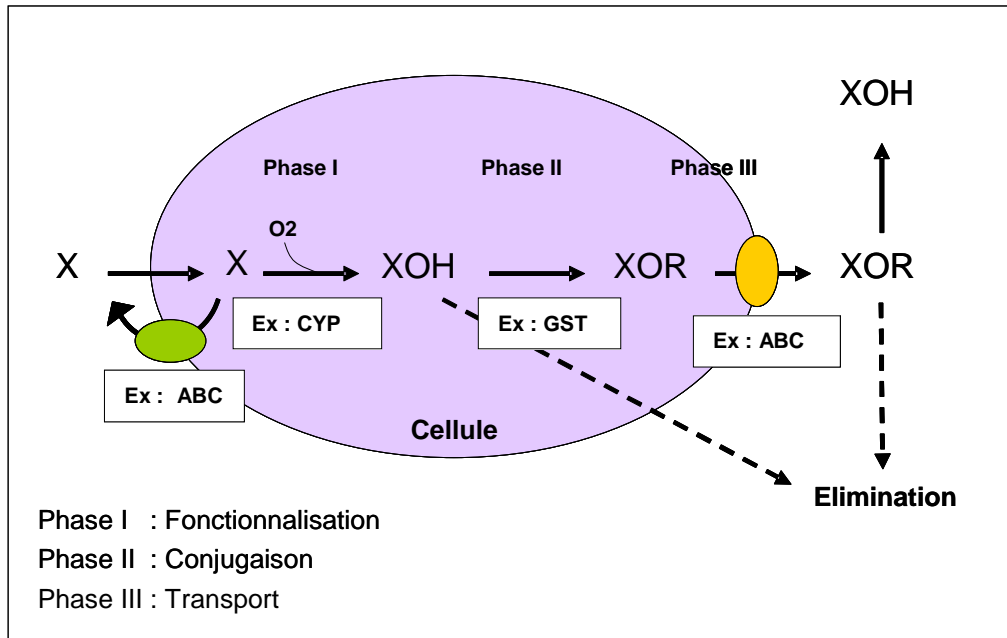


Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques. D'après Anne Garat, Thèse d'Université, Lille, septembre 2009).

(X : xénobiotique hydrophobe ; XOH : métabolite plus polaire du xénobiotique ; XOR : xénobiotique conjugué ; ABC : *ATP-binding cassette* ; CYP : cytochromes P450 ; GST : glutathion-S-transférases) (d'après Anne Garat, Thèse d'Université, Lille, septembre 2009).

Comme le foie ou d'autres tissus situés à l'interface avec l'environnement, le poumon a également la capacité de métaboliser et désactiver de nombreux xénobiotiques. Différentes études ont démontré la présence de transcrits d'enzymes de phase I, de phase II, de transporteurs et de xénosenseurs dans le poumon humain, parfois même en quantité importante. Des travaux effectués au sein de notre équipe ont permis de caractériser le profil d'expression pulmonaire de la quasi-totalité des gènes (380 gènes) codant pour les enzymes, les transporteurs, les récepteurs nucléaires et les facteurs de transcription impliqués dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques. (Leclerc et al. 2010; Leclerc et al. 2011) . Globalement, les résultats obtenus ont montré que la majorité des gènes codant pour les EMX et les transporteurs étaient exprimés dans la muqueuse bronchique et le parenchyme pulmonaire, confirmant ainsi la capacité de ces tissus à métaboliser *in situ* les composés toxiques environnementaux. Plus particulièrement, parmi les gènes les plus exprimés, on retrouve ceux codant des enzymes impliquées dans le métabolisme de polluants atmosphériques ou de composés toxiques présents dans la fumée de tabac. C'est le cas, en particulier, de plusieurs gènes de cytochromes P450, comme les gènes CYP1B1, CYP2F1, CYP2S1 et CYP4B1, dont l'expression est, de plus, supérieure à celle mesurée dans le foie, voire quasi spécifique des tissus pulmonaires pour les gènes CYP2F1 et CYP4B1. De manière intéressante, des variants alléliques non fonctionnels relativement fréquents ont été décrits pour ces deux gènes. L'impact de ces variants sur la susceptibilité individuelle aux composés pneumotoxiques pourrait être déterminant dans la survenue d'affections locales.

D'autres gènes codant des protéines impliquées dans la détoxification et l'élimination de composés oxydants ou électrophiles présentent également un niveau d'expression significatif dans les tissus broncho-pulmonaires humains. Il s'agit, en particulier, de gènes de glutathion-S-transférases (GSTA1, GSTA2, GSTK1, GSTP1, MGST) dont le rôle dans la désactivation des xénobiotiques ou de leurs métabolites réactifs, et dans la défense contre le stress oxydant est largement reconnu.

Les résultats de cette étude indiquent également l'expression prédominante du récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR dans le poumon humain, attestant le rôle exclusif de ce xénosenseur dans la régulation de l'expression pulmonaire des EMX et des transporteurs.

Des profils d'expression distincts ont été mis en évidence entre la muqueuse bronchique et le parenchyme pulmonaire. En particulier, de nombreux gènes d'EMX de phase I et de phase II présentent un niveau d'expression supérieur dans les tissus bronchiques par rapport aux tissus pulmonaires périphériques, indiquant des différences majeures dans les

processus initiaux de prise en charge des xénobiotiques entre ces deux tissus et, par conséquent des différences de susceptibilité vis-à-vis des effets délétères des xénobiotiques inhalés.

III. Toxicité des substances exogènes environnementales

Les mécanismes par lesquels les xénobiotiques induisent des effets délétères sur le poumon sont complexes et partiellement caractérisés, du fait de l'hétérogénéité des cellules pulmonaires (plus de 40 types cellulaires coexistent) et de la grande variabilité fonctionnelle de ces cellules (Yost 1999). Les cellules les plus sensibles aux agressions chimiques sont les cellules endothéliales, les macrophages alvéolaires, les cellules de Clara, les cellules épithéliales ciliées et les cellules alvéolaires épithéliales de type I et de type II (Hecht 1999).

Les réactions de biotransformation sont généralement bénéfiques car elles aident normalement les tissus pulmonaires à désactiver et éliminer les composés pneumotoxiques. Cependant, de nombreux composés induisant une toxicité pulmonaire ne sont pas intrinsèquement pneumotoxiques, mais causent des dommages cellulaires après activation métabolique. Comme les intermédiaires métaboliques sont hautement réactifs et instables, ils tendent à exercer leur toxicité *in situ* plutôt qu'à distance. Le site et l'importance des lésions pulmonaires dépendent de facteurs comme la concentration des composés réactifs dans le poumon et l'existence de voies de détoxification et de bioactivation (Boyd 1984). Ainsi, la toxicité locale reflète un déséquilibre entre les réactions de bioactivation et les réactions d'élimination du métabolite intermédiaire réactif catalysées généralement par des enzymes de phase II. L'implication des P450 dans les mécanismes de toxicité d'une grande variété de composés pneumotoxiques a été bien documentée (Gram 1997). Les réactions de biotransformation par oxydation aboutissent à la formation d'espèces électrophiles réactives comme des époxydes, des quinones, des quinone-imines, des méthylène-imines et des radicaux acyls qui réagissent avec les macromolécules cellulaires en les modifiant ou en formant des adduits. Le métabolisme du benzo(a)pyrène par le CYP1A1 dans le poumon constitue un exemple représentatif d'un processus de bioactivation de métabolites génotoxiques. Plusieurs autres CYPs exprimés dans le poumon humain (CYP1B1, CYP2A13, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A5) sont également impliqués dans la bioactivation de composés pneumotoxiques (T Shimada et al. 1997; Piipari et al. 2000; Jalas, Ding, et Murphy 2003; Nichols et al. 2003; Smith et al. 2003). Par ailleurs, les réactions de conjugaison qui sont généralement associées à un processus de détoxification, permettant notamment de désactiver les intermédiaires réactifs produits par des enzymes de phase 1,

peuvent être également, dans certains cas, à l'origine d'une toxicité pulmonaire. En effet, des exemples de xénobiotiques bioactivés en métabolites chimiquement réactifs après des réactions de sulfo- ou glucuronoconjugaison sont décrits (Glatt 2000; Ritter 2000).

D'autres effets toxiques sont communs à de nombreux agents polluants : stress oxydatif, inflammation, induction d'un état procoagulant, dysfonction du système nerveux autonome...(Künzli et Tager 2005). L'ozone, les oxydes d'azote, la fumée de cigarette et les particules possèdent en particulier des propriétés oxydantes puissantes (Rahman et MacNee 2000). Certaines études ont montré, par exemple, que les HAP adsorbés à la surface des particules atmosphériques pouvaient induire l'expression du CYP1A1 et générer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Ma et Ma 2002). Initialement, quand le stress oxydatif est bas, divers facteurs de transcriptions, tel que le nuclear factor erythroid-2 (Nrf2) induisent une série d'enzymes antioxydantes et de détoxification (catalases, superoxide dismutases et glutathione S-transferases) qui protègent la cellule des effets nocifs de la formation des ERO (Kang, Lee, et Kim 2005). Dans un second temps, si le système de protection antioxydant échoue ou est dépassé par une production accrue des ERO, il en résulte l'initiation d'une réaction inflammatoire qui aboutit à divers effets cytotoxiques conduisant, à un stade ultime, à l'apoptose cellulaire (Chirino et al. 2010). Ces effets sont médiés par la voie de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) et le facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor Kappa B) qui régule l'expression de cytokines et chimiokines impliquées dans le processus inflammatoire (Shukla et al. 2000).

IV. MicroARN et environnement

Des études pangénomiques ont permis de mettre en évidence l'association entre des polymorphismes de gènes du métabolisme des xénobiotiques impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*NQO1*, *GSTM1*, *GSTP1*) ou d'autres gènes impliqués dans l'inflammation (*TNF*) avec la réponse individuelle aux polluants atmosphériques (Isabelle Romieu, Moreno-Macias, et London 2010; Yang et al. 2008; Kelada et al. 2003). Une étude clinique réalisée à Mexico City où les concentrations en ozone sont élevées toute l'année, a montré que les enfants asthmatiques exposés à des concentrations fortes en ozone avec un génotype null de *GSTM1* étaient plus susceptibles de développer une symptomatologie asthmatique (I Romieu et al. 2006), et que la supplémentation en vitamines C et E antioxydantes pouvait améliorer leurs fonctions respiratoires (I Romieu et al. 2004). Cependant, les polymorphismes génétiques ne peuvent expliquer qu'une partie des maladies à composante environnementale et ne suffisent pas à appréhender l'ensemble des changements consécutifs à l'exposition aux polluants, en particulier toutes les modifications d'expression des gènes. Les composés chimiques environnementaux peuvent modifier l'expression des gènes indépendamment de la séquence primaire d'ADN grâce à des modifications épigénétiques, dont celles impliquant les microARN (Figure 7).

L'étude des microARN en toxicologie est relativement récente. Zhang et Pan furent les premiers à montrer les changements d'expression des microARN dans le foie et le cerveau de souris exposées à de l'eau contaminée au RDX (hexahydro-1, 3,5-trinitro-1,3,5-triazine) (Zhang et Pan 2009). Le RDX est contenu dans les munitions provenant d'activités civiles et militaires et est parfois retrouvé dans des eaux de source. L'exposition au RDX et à ses métabolites peuvent engendrer une neurotoxicité ainsi que des cancers. Les résultats de cette étude ont montré que sur les 113 microARN montrant des modifications d'expression, 10 étaient significativement surexprimés et 3 sous-exprimés ($p < 0,01$), à la fois dans le cerveau et dans le foie des souris exposées. La plupart des microARN qui montraient des modifications d'expression, en particulier let-7, miR-17-92, miR-10b, miR-15, miR-16, miR-26, et miR-181 étaient liés à des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, dans la carcinogenèse et la neurotoxicité.

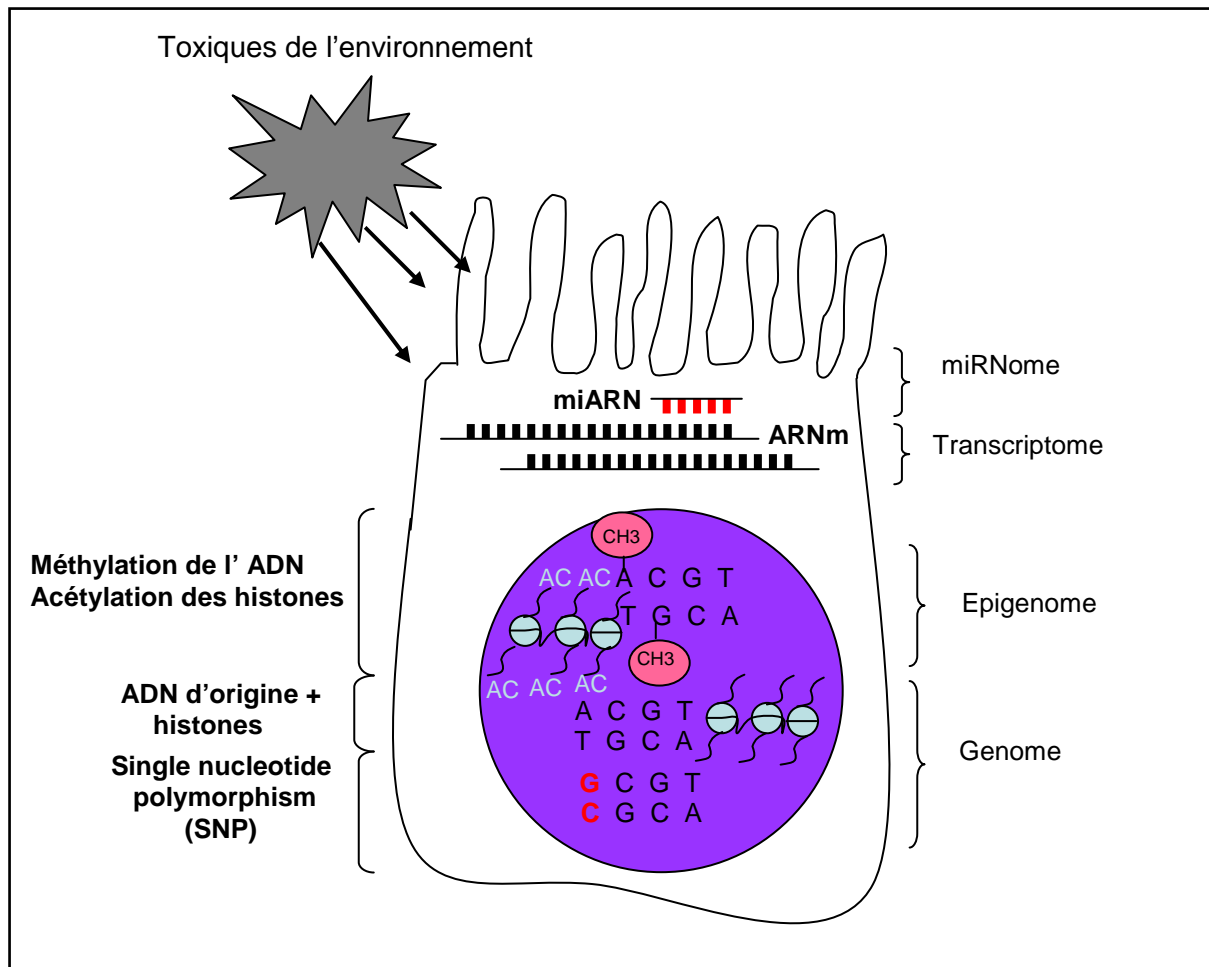


Figure 7 Schéma représentant la réponse globale du poumon à son environnement chimique.

La réponse peut varier en fonction de la variabilité interindividuelle de certains gènes (SNP), de différences dans la méthylation de l'ADN ou dans l'acétylation des histones ; mais également dans l'expression des ARNm et dans la dérégulation des microARN. Ces changements génomiques résultant de l'interaction entre les gènes et l'environnement vont influencer la production protéique et un certain nombre de voies biologiques, qui vont avoir un impact sur la fonction de la cellule en réponse à l'environnement chimique.

1. MicroARN et tabac

Des études récentes ont montré que les composants de la fumée de cigarette engendraient des modifications des niveaux d'expression des microARN, à la fois chez l'homme et l'animal.

Izzotti et al ont exposé des rats à la fumée de cigarette pendant quatre semaines avant d'analyser l'expression pulmonaire des microARN (Izzotti et al. 2009). Les auteurs ont ainsi trouvé que, sur les 484 microARN mesurés à l'aide de microarrays, environ 25% (126 microARN) présentaient une diminution d'expression d'au moins deux fois dans les poumons de rats exposés, alors que seulement 7 microARN étaient surexprimés. Une majorité de

microARN les plus sous-exprimés contribuait à la régulation de la réponse au stress cellulaire, la prolifération cellulaire ainsi que dans les voies de signalisation oncogénique et suppresseur de tumeurs. Plusieurs microARN sous-exprimés tels que miR-30a, miR-146-prec, miR-132 ou miR-155 étaient déjà connus pour cibler et activer des éléments de la voie NF-kB. Une étude menée par le même groupe a montré par ailleurs les relations entre l'expression des microARN et l'effet de la fumée de cigarette sur des poumons à différents stades de développement (Izzotti, Calin, Steele, et al. 2009). Des souris adultes et d'autres récemment sevrées ont été exposées à de la fumée de cigarette pendant 5 semaines. Les auteurs ont montré une fois encore une tendance à la sous-expression des microARN dans les poumons des souris exposées. Cet effet était plus prononcé chez les souris récemment sevrées que chez les souris adultes malgré une exposition identique. L'analyse bioinformatique des cibles des microARN les plus significativement sous-exprimés a montré leur implication dans le développement des cellules épithéliales de l'appareil respiratoire, la formation du surfactant, l'inflammation, la régulation des facteurs de croissance, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

Les études réalisées chez l'homme montrent également une sous-expression globale des microARN sous l'effet de la fumée de cigarette. Schembri et al. ont analysé les changements d'expression des microARNs dans l'épithélium respiratoire humain en réponse à une exposition à la fumée de cigarette (Schembri et al. 2009). Les niveaux d'expression des ARNm et des microARN ont été mesurés dans les cellules épithéliales bronchiques chez 20 sujets sains : 10 fumeurs actifs et 10 sujets n'ayant jamais fumé. La comparaison entre fumeurs et non-fumeurs a révélé que 28 microARN étaient différentiellement exprimés de façon significative, dont 80% sous-exprimés. Le microARN le plus différentiellement exprimé dans l'épithélium respiratoire des fumeurs était le miR-218, avec une expression réduite de plus de 4 fois. Par ailleurs, une corrélation entre le niveau d'expression des microARN dérégulés et celui des ARNm cibles prédits, a été établie. Ces résultats suggèrent qu'un nombre réduit de microARN est capable de moduler l'expression d'un nombre plus important de gènes induits par la fumée de cigarette. L'analyse d'enrichissement d'un ensemble de gènes (Gene Set Enrichment Analysis) a montré que les cibles prédites du miR-218 étaient significativement surreprésentées parmi les gènes surexprimés dans l'épithélium bronchique des fumeurs ainsi que dans les cellules bronchiques humaines exposées à des condensats de fumée de cigarette. L'une des cibles du miR-218 est l'ARNm du facteur de transcription MAFG. Associé à des co-facteurs, ce facteur de transcription se lie à des séquences promotrices ARE (Antioxydant Responsive Element are), favorisant ainsi la

transcription de gènes antioxydant impliqués dans la réponse de l'épithélium respiratoire à l'exposition tabagique (Katsuoka et al. 2005).

Mascaux et al. ont utilisé la broncoscopie en autofluorescence afin de récupérer des biopsies bronchiques à différents stades de carcinogenèse bronchique : de l'épithélium normal au carcinome épidermoïde, en passant par des zones d'hyperplasie, de métaplasie ou de dysplasies épithéliales (Mascaux et al.). L'expression des microARN a été quantifiée à l'aide de qRT-PCR arrays. La comparaison entre l'épithélium normal et l'épithélium dysplasique ou métaplasique a montré que 19 microARN étaient différentiellement exprimés, dont une majorité sous-exprimée, et en particulier le miR-218.

2. MicroARN et pollution atmosphérique

a) MicroARN et pollution particulaire

Peu de données sont actuellement disponibles concernant l'impact de la pollution atmosphérique sur l'expression pulmonaire des microARN. La première étude a été réalisée sur des cellules bronchiques primaires exposées à des particules de diesel (Jardim et al. 2009). Les résultats ont révélé que sur les 197 microARN qui présentaient des variations d'expression supérieures à 1,5 fois, 130 étaient surexprimés et seulement 67 sous-exprimés. L'utilisation de logiciels informatiques a permis de montrer que la plupart des microARN dérégulés pouvaient être impliqués dans la régulation de l'inflammation mais aussi dans les voies de signalisation oncogénique. Les résultats de cette étude contrastent avec ceux obtenus lors de l'exposition de l'épithélium respiratoire à la fumée de cigarette qui se caractérisaient par une sous-expression globale des microARN. Ces données suggèrent que les changements d'expression des microARN de l'épithélium respiratoire varient selon la nature de l'exposition.

Des travaux ont montré que l'exposition à la pollution métallique était responsable de changements dans l'expression de gènes de cellules du sang périphérique des individus exposés, en particulier les gènes impliqués dans l'inflammation et le stress oxydant (Wang et al. 2005). Bollati et al. ont tenté de déterminer si l'exposition à des particules riches en métaux pouvait induire des modifications d'expression des microARN miR-21, miR-222 et miR-146a dans les leucocytes du sang circulant de travailleurs exposés (Bollati et al. 2010). Les résultats ont montré que, après 3 jours d'exposition, l'expression des microARN miR-222 et miR-21 augmentait alors que celle du miR-146a restait stable. Etant donné l'association des microARN miR-222 et miR-21 à la réponse cellulaire au stress oxydatif, ces résultats suggèrent que le stress oxydatif pourrait être à l'origine des modifications d'expression de ces microARN et montrent l'impact systémique de l'exposition particulaire chez l'homme.

b) MicroARN et Benzo(a)pyrène (B(a)P)

Le Benzo(a)pyrène appartient à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Il est reconnu pour son pouvoir mutagène et cancérigène, et est associé à un risque accru de cancer du poumon (Li et al. 2001). Les études menées sur des cellules bronchiques humaines et chez des modèles murins ont mis en évidence des modifications d'expression des microARN après exposition au B(a)P (Shen et al. 2009; Duan et al. 2010). L'un des microARN retrouvé surexprimé dans le modèle de cellules bronchiques humaines était le miR-494 (Shen et al. 2009). Une étude récente a montré que la surexpression de miR-494 dans un modèle cellulaire entraînait la répression du suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) (Duan et al. 2010). Comme le miR-494 est surexprimé dans le cancer pulmonaire à petites cellules (Miko et al. 2009) et que PTEN, connu pour être sous-exprimé dans le cancer du poumon est corrélé à la survie des patients, la dérégulation du miR-494 et son action inhibitrice sur le suppresseur de tumeur PTEN pourrait être un des mécanismes favorisant l'action cancérigène du B(a)P.

3. Hypothèses du lien entre environnement et modifications des microARN

Les mécanismes précis d'altération de l'expression des microARN par des facteurs environnementaux sont à ce jour peu compris. Les facteurs de l'inflammation et le stress oxydatif, déjà connus pour altérer directement l'expression des microARN, pourraient être à l'origine des variations d'expression des microARN en réponse aux composés chimiques environnementaux. Ce modèle serait néanmoins limité aux polluants connus pour déclencher une réponse inflammatoire et/ou un stress oxydatif en réponse à l'agression de départ. (Figure 8)

La régulation d'expression des microARN passe par des promoteurs qui leur sont propres ou par des promoteurs communs à d'autres gènes. Il est également envisageable que des récepteurs activés par des xénobiotiques comme AhR, déjà connus pour réguler des gènes du métabolisme des xénobiotiques, régulent également la transcription des microARN.

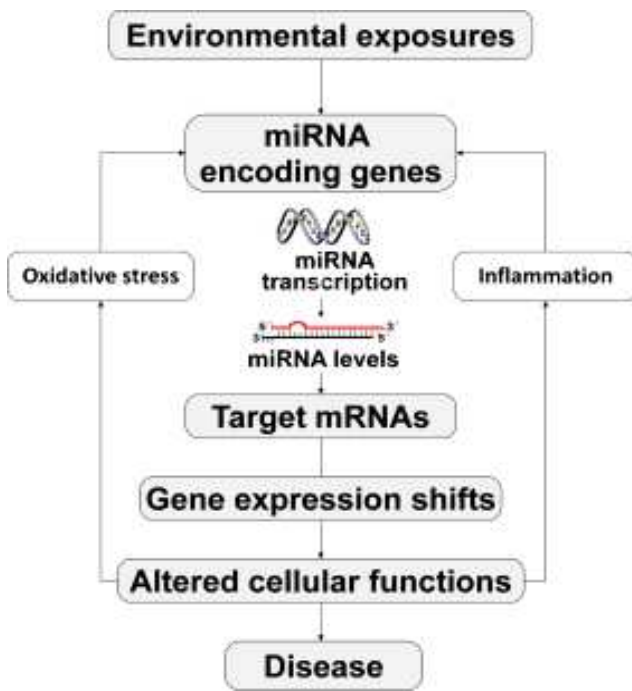


Figure 8. D'après Hou et al. 2011.

Schéma hypothétique de l'action des chimiques environnementaux sur la régulation de l'expression des microARN.

Les xénobiotiques pourraient induire des modifications d'expression des microARN par l'intermédiaire des voies de l'inflammation et du stress oxydant. La dérégulation des microARN entraînerait la répression de gènes cibles et pourrait conduire à des altérations de fonctions cellulaires contribuant à la pathogenèse de maladies pulmonaires.

3^{ème} partie
MicroARN et
fibrose pulmonaire idiopathique

I. La fibrose pulmonaire idiopathique

1. Définition et classification

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) sont des affections caractérisées par une infiltration de l'interstitium pulmonaire par des cellules (inflammatoires ou cancéreuses), de l'œdème ou par une matrice extracellulaire riche en collagène. Il s'y associe fréquemment des lésions des voies aériennes, parfois des alvéoles, et (ou) de la paroi des vaisseaux, mais l'atteinte interstitielle prédomine sur l'atteinte des voies aériennes distales. On distingue les PID de cause connue, qu'il s'agisse d'un médicament, d'un antigène organique inhalé, d'un agent minéral (silice, amiante), d'une infection (*Mycoplasma pneumoniae*), d'un cancer, d'un œdème pulmonaire, et les PID de cause inconnue, mais survenant dans le contexte de connectivites et de diverses maladies systémiques. Il s'agit dans ce dernier cas des PID avec granulomatose, en particulier la sarcoïdose, des affections de cause inconnue mais néanmoins bien individualisables de par leurs spécificités cliniques, radiologiques, ou histologiques (ex : la pneumopathie chronique idiopathique à éosinophiles).

Les PID idiopathiques sont définies par l'absence d'appartenance aux groupes précédents. Elles sont classées en fonction de leur aspect anatomopathologique selon un consensus commun adopté par la Société Thoracique Américaine (American Thoracic Society) et la Société Respiratoire Européenne (European Respiratory Society) (Anon. 2000; Anon. 2002). Cette classification permet d'établir un lien entre un aspect histologique de définition précise, et certaines caractéristiques cliniques. Parmi les 7 aspects histologiques existants, la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) réalise un tableau de pneumopathie interstitielle commune. C'est la forme clinique la plus fréquente des PID idiopathiques, représentant environ 60% des cas.

Les principales caractéristiques histologiques de la pneumopathie interstitielle commune sont la destruction architecturale, la coexistence de lésions d'âges différents et leur répartition non uniforme au sein d'un même prélèvement, l'existence de lésions en rayon de miel (espaces aériques kystiques et fibreux fréquemment recouverts d'un épithélium bronchiolaire et remplis de mucine), et de foyers de prolifération fibroblastique, qui traduisent l'activité de la maladie (Figure 9). La fibrose prédomine souvent au niveau de la périphérie des lobules, et de la région sous-pleurale du parenchyme pulmonaire. L'inflammation interstitielle est légère à modérée, à la différence d'autres pneumopathies interstitielles diffuses idiopathiques, telles que la pneumopathie interstitielle non spécifique, ou la pneumopathie interstitielle desquamative.

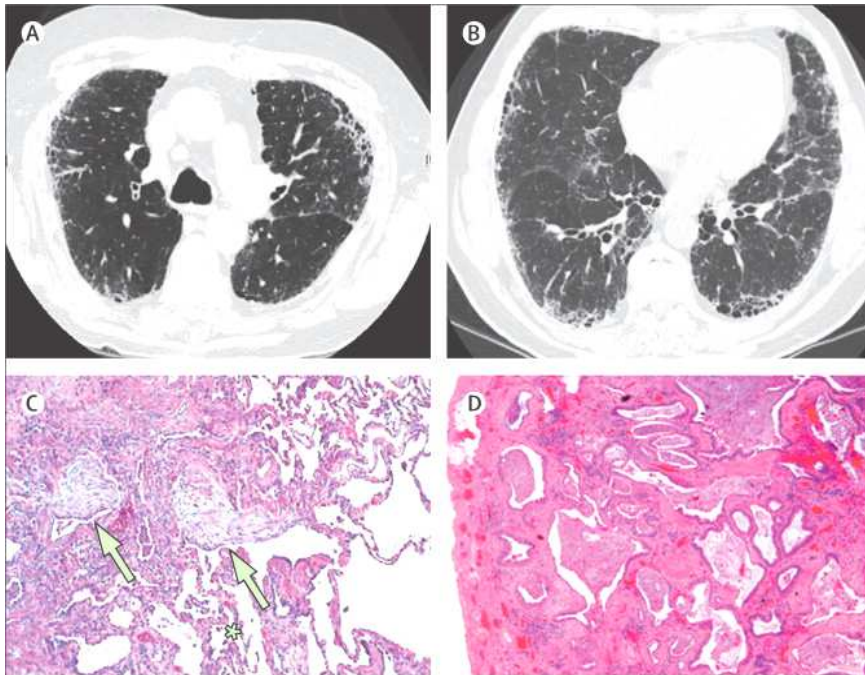


Figure 9 : Aspects caractéristiques de pneumopathie interstitielle commune en tomodensitométrie thoracique à haute résolution et en coupes anatomopathologiques. Les images du scanner thoracique (A et B) montrent des opacités sous pleurales prédominant aux bases réalisant un aspect en rayons de miel. La coupe histologique (C) montre un aspect hétérogène du poumon, avec des alternances de zones saines ou subnormales et des zones denses de fibrose. Les flèches indiquent des foyers de prolifération fibroblastique. (D) Coupe histologique de lésions kystiques en rayons de miel composées d'espaces denses fibrotiques remplis de mucus et d'épithélium alvéolaire.

2. Aspects clinique et paraclinique de la FPI

L'incidence annuelle de la FPI augmente : elle est estimée entre 4,6 à 16,6 cas pour 100 000 personnes. La maladie est plus fréquente chez le sujet de sexe masculin : de 1,5 à 1,7 fois plus fréquente chez l'homme que chez la femme (Raghu et al. 2006). La FPI survient entre 50 et 70 ans, avec une moyenne d'âge au diagnostic de 66 ans. Elle débute par une dyspnée d'effort d'installation progressive, une toux non productive, et parfois des signes généraux. Les râles crépitants bilatéraux des bases sont constants. L'hippocratisme digital est présent dans près de la moitié des cas. La cyanose et les signes d'insuffisance ventriculaire droite s'observent à un stade avancé de la maladie. Le profil fonctionnel est marqué par un syndrome ventilatoire restrictif avec altération de la diffusion alvéolo-capillaire, et une hypoxémie d'exercice. Le lavage broncho-alvéolaire montre une hypercellularité avec

prédominance de polynucléaires neutrophiles, souvent accompagnée d'une augmentation modérée de polynucléaires éosinophiles.

La radiographie thoracique montre des opacités réticulaires périphériques prédominant nettement aux bases, et une réduction du volume pulmonaire. La tomodynamométrie thoracique en coupes millimétriques est l'examen essentiel du diagnostic (Figure 9) : l'aspect caractéristique montre des opacités réticulaires des bases réalisant un aspect pseudokystique sous-pleural en rayons de miel, des bronchectasies de traction, et des signes de distorsion du parenchyme pulmonaire, avec peu d'opacités en verre dépoli ; cet aspect est caractéristique et présent dans la moitié des cas environ, et permet de porter le diagnostic de fibrose pulmonaire idiopathique, si les données cliniques, fonctionnelles respiratoires, et le lavage broncho-alvéolaire sont compatibles avec le diagnostic.

La maladie évolue progressivement vers l'insuffisance respiratoire chronique et le décès, avec une médiane de survie d'environ 3 ans, et une survie à 10 ans de l'ordre de 10% seulement (T E King Jr et al. 2001).

3. Physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique (Figure 10)

a) Etiologie de la FPI

L'étiologie de la Fibrose pulmonaire idiopathique demeure à ce jour incertaine. Certaines infections virales, en particulier le virus Epstein-Barr, les virus herpétiques humains, le cytomégalovirus et l'hépatite C ont été associés à la pathogenèse de la FPI (Kelly et al. 2002; Tang et al. 2003). Cependant, ces infections virales retrouvées chez les patients atteints de FPI ne sont pas spécifiques et pourraient être liées au traitement par corticoïdes. Des études récentes ont montré que l'exposition à des facteurs environnementaux, comme l'exposition aux poussières de bois, de textile ou de métaux ainsi que les micro-inhalations dues au reflux gastro-oesophagien pourraient être liés aux lésions initiales de l'épithélium respiratoire (Miyake et al. 2005; Taskar and Coultas 2006; Lee et al. 2010). La consommation tabagique augmente également la probabilité de développer une FPI, puisque les anciens fumeurs ainsi que les fumeurs actifs auraient un risque accru de développer une FPI (Attili et al. 2008).

b) FPI et inflammation

La fibrose pulmonaire peut accompagner une inflammation chronique des structures pulmonaires. C'est typiquement le cas de la fibrose qui complique la sarcoïdose, les pneumoconioses, les pneumopathies chroniques d'hypersensibilité, et la pneumopathie

interstitielle non spécifique. Pendant longtemps, l'hypothèse selon laquelle le développement de la FPI était lié à une inflammation chronique de l'épithélium alvéolaire a prévalu. Cependant, plusieurs éléments ont remis en cause cette hypothèse. Tout d'abord, les lésions histopathologiques de la fibrose pulmonaire idiopathique, c'est-à-dire un aspect de pneumopathie interstitielle usuelle ou commune, comportent peu d'inflammation, à la différence d'autres pneumopathies interstitielles diffuses idiopathiques, telles que la pneumopathie interstitielle non spécifique. De plus, les lésions histopathologiques de PID comportant une inflammation marquée évoluent peu vers la fibrose pulmonaire cicatricielle. Un autre élément est que le degré d'inflammation interstitielle ou alvéolaire n'influence pas significativement sur la survie des patients atteints de FPI. Enfin et surtout, les traitements anti-inflammatoires prolongés tels que les corticoïdes et les agents immunosuppresseurs n'empêchent pas l'évolution de la maladie vers l'insuffisance respiratoire chronique et le décès (Collard et al. 2004), alors que les mêmes traitements se sont révélés efficaces à la phase précoce d'autres affections pulmonaires inflammatoires et potentiellement fibrosantes telles que la sarcoïdose, les pneumopathies d'hypersensibilité ou la pneumopathie interstitielle non spécifique.

Néanmoins, même si l'inflammation ne serait pas le facteur initial de la FPI et n'aurait pas un rôle majeur dans la pathogenèse de cette maladie, il existe dans la FPI un microenvironnement pro-inflammatoire avec la présence de cytokines et de protéines profibrotiques telles que les IL-4, IL-5, IL-13, le TGF β , le PDGF (platelet derived growth factor) et le CTGF (connective tissue growth factor) (Bringardner et al. 2008; Agostini and Gurrieri 2006).

c) Apoptose des cellules épithéliales

L'hypothèse actuelle de la pathogenèse de la FPI suggère que l'événement initial de cette fibrogenèse serait l'apoptose des cellules alvéolaires épithéliales provoquée par des microtraumatismes répétés d'origine environnementale. Ainsi, les cellules épithéliales alvéolaires de patients atteints de FPI sont significativement plus apoptotiques que chez les sujets sains contrôles. Dans ces cellules, l'expression de p53, p21, bax et caspase3 (pro-apoptotiques) est augmentée alors que l'expression de bcl-2 (anti-apoptotique) est diminuée (Plataki et al. 2005). Le stress oxydant engendré par les toxiques environnementaux pourrait être associé à l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires qui initie la FPI (Kuwano et al. 2003). Ainsi, plusieurs études ont montré un déséquilibre de la balance oxydante/antioxydante dans la FPI avec une augmentation des produits du stress oxydant (peroxyde

d'hydrogène, myeloperoxidase, produits de la peroxydation des lipides) (Waghray et al. 2005; Psathakis et al. 2006) et une diminution des systèmes de protection anti-oxydante (glutathion, superoxyde dismutase) (Beeh et al. 2002; Irfan Rahman, Biswas, et Kode 2006).

Dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le rongeur, le blocage de l'apoptose par l'inhibition de la voie Fas-ligand par des anticorps anti-Fas-ligand (Kazuyoshi Kuwano et al. 1999) ou le blocage de caspases (Kazuyoshi Kuwano et al. 2001) empêchent le développement de la fibrose expérimentale. Chez l'homme atteint de FPI, l'expression de l'ARNm du Fas-ligand est retrouvée augmentée dans le lavage bronchoalvéolaire de même que la protéine Fas dans les cellules épithéliales alvéolaires (K Kuwano et al. 1999; K Kuwano et al. 2000). Ces résultats nous montrent l'importance de l'apoptose des cellules épithéliales, et en particulier l'apoptose médiée par Fas, dans la pathogenèse de la FPI.

d) Activation aberrante des cellules épithéliales alvéolaires

Dans les premiers temps suivant l'apoptose du tissu alvéolaire, les cellules épithéliales alvéolaires lésées libèrent des médiateurs inflammatoires qui vont initier la cascade de la coagulation aboutissant à un réseau de fibrine et de fibronectine qui constituent l'exsudat alvéolaire (Moisés Selman and Pardo 2006; Borensztajn, Peppelenbosch, and Spek 2008). Cette phase est suivie de la migration et de la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires dans un effort de réparation du tissu pulmonaire. Les cellules épithéliales activées ainsi recrutées vont libérer divers facteurs de croissance et chimiokines (PDGF, CXCL12 ou Chemokine ligand 12) qui vont favoriser le recrutement des fibroblastes pulmonaires résidents et des fibroblastes circulants (fibrocytes) sur le lieu de la lésion (Andersson-Sjöland et al. 2008). Les cellules épithéliales secrètent également le TGF β 1, qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales alvéolaires en fibroblastes et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Willis et al. 2005). Ainsi, ces cellules (fibrocytes, fibroblastes résidents pulmonaires et fibroblastes dérivés des cellules épithéliales) contribuent à la formation des foyers de fibroblastes et myofibroblastes présents dans la FPI.

Les cellules épithéliales activées expriment la plupart des métalloprotéinases (MMP) de la matrice (MMP-1, 2, 7 et 9) responsables de la dégradation de la membrane basale lors de l'initiation du processus fibreux. La plupart des MMP sont localisées dans les cellules épithéliales alvéolaires. Les fibroblastes des foyers fibroblastiques expriment peu de MMP mais, par contre, surexpriment les inhibiteurs de ces MMPs, les TIMPs. Le déséquilibre de cette balance entre protéases (MMP) dégradant la matrice et leurs inhibiteurs (TIMP) peut, en

partie, expliquer l'accumulation de la matrice extra-cellulaire observée dans la FPI (M Selman et al. 2000; García-Alvarez et al. 2006; McKeown et al. 2009).

e) *Facteurs de croissance et médiateurs cellulaires dans la FPI.*

Les cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les cellules épithéliales activées, les fibroblastes et myofibroblastes ont un rôle primordial dans la pathogenèse de la FPI (Agostini and Gurrieri 2006; Antoniou et al. 2005). Les cellules épithéliales alvéolaires sont les principales sources de facteurs profibrotiques, tels que le TGF β , le platelet-derived growth factor (PDGF), le tumor necrosis factor- α (TNF- α), l'endothélin-1 (Swigris and Brown 2010) ou le connective tissue growth factor (Lipson et al. 2012), qui sont impliqués dans la migration et la prolifération des fibroblastes ainsi que dans la production de matrice extra-cellulaire.

D'autres facteurs protecteurs capables d'inhiber la prolifération des fibroblastes et la production de collagène sont par contre diminués dans la FPI. C'est en particulier le cas de la prostaglandine E2, un médiateur lipidique dérivé de l'acide arachidonique membranaire. Les cellules épithéliales alvéolaires ainsi que les fibroblastes pulmonaires sont capables de métaboliser du PGE2. La synthèse se fait à partir de l'Acide arachidonique membranaire, sous l'action initiale des cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2) qui aboutit à la formation de PGH2. La PGH2 est ensuite transformée en PGE2 sous l'action de la PGE synthétase (Needleman et al. 1986). Il est reconnu que COX-1 est responsable de la production constitutive de PGH2 alors que COX-2 est une enzyme pouvant être induite par de nombreux facteurs inflammatoires (Pruzanski et al. 1998; Kang et al. 2007). La PGE2 a une action protectrice vis-à-vis de la fibrose pulmonaire puisqu'elle contribue à diminuer l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires et à augmenter leur production de surfactant (Maher et al. 2010; Morsy, Isohama, et Miyata 2001). De plus, elle agit sur les fibroblastes pulmonaires en diminuant leur prolifération, leur production de collagène et leur différenciation en myofibroblastes (S. K. Huang et al. 2008; Kolodsick et al. 2003; S. Huang et al. 2007). Par ailleurs, la PGE2 favorise l'apoptose des fibroblastes pulmonaires induite par le Fas-ligand (S. K. Huang et al. 2009). La production de PGE2 qui est retrouvée diminuée dans la FPI (Borok et al. 1991; Vancheri et al. 2000) contribue ainsi aux phénomènes de fibrogenèse.

f) *Fibroblastes et inhibition de l'apoptose*

Les foyers fibroblastiques constituent l'une des anomalies histopathologiques élémentaires caractéristiques de la pneumopathie interstitielle commune, c'est-à-dire de la

fibrose pulmonaire idiopathique, et consistent en de petits agrégats de myofibroblastes et de fibroblastes, qui présentent des propriétés cytologiques de migration et de prolifération cellulaires, et synthétisent les composants de la matrice extra-cellulaire (Calabrese et al. 2008). L'accumulation de matrice extra-cellulaire comprenant du collagène, de la fibronectine, des fibres élastiques et des protéoglycannes est associée avec la réparation anormale de la FPI. Ainsi, la quantité de foyers fibroblastiques présents chez les patients atteints de FPI constitue un facteur pronostic important, la survie étant d'autant plus courte que le score de foyers fibroblastiques est élevé (King et al. 2001; Enomoto et al. 2006)

L'élimination des myofibroblastes par apoptose est un élément essentiel au cours du processus normal de réparation tissulaire ; cette apoptose ne semble pas se produire dans les foyers fibroblastiques présents dans la FPI (Tanaka et al. 2002; Y. P. Moodley et al. 2004) . Ainsi, les études faites sur des tissus de patients atteints de FPI montrent un niveau élevé d'apoptose dans les cellules épithéliales alvéolaires mais au contraire un niveau faible d'activité apoptotique dans les fibroblastes/myofibroblastes adjacents (Kuwano et al. 1996; Hagimoto et al. 1997). Le blocage de l'apoptose des fibroblastes/myofibroblastes pourrait expliquer le passage d'une réparation normale à un processus fibrosant. Ainsi, au sein d'un même microenvironnement, les cellules épithéliales alvéolaires et les fibroblastes formant des foyers fibroblastiques se comportent différemment avec d'une part, une majoration de l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, et d'autre part une inhibition de l'apoptose des myofibroblastes. Ce phénomène appelé paradoxe apoptotique pourrait être relié à la diminution de la production de PGE2 observée au cours de la FPI (Maher et al. 2010; Huang et al. 2009) .

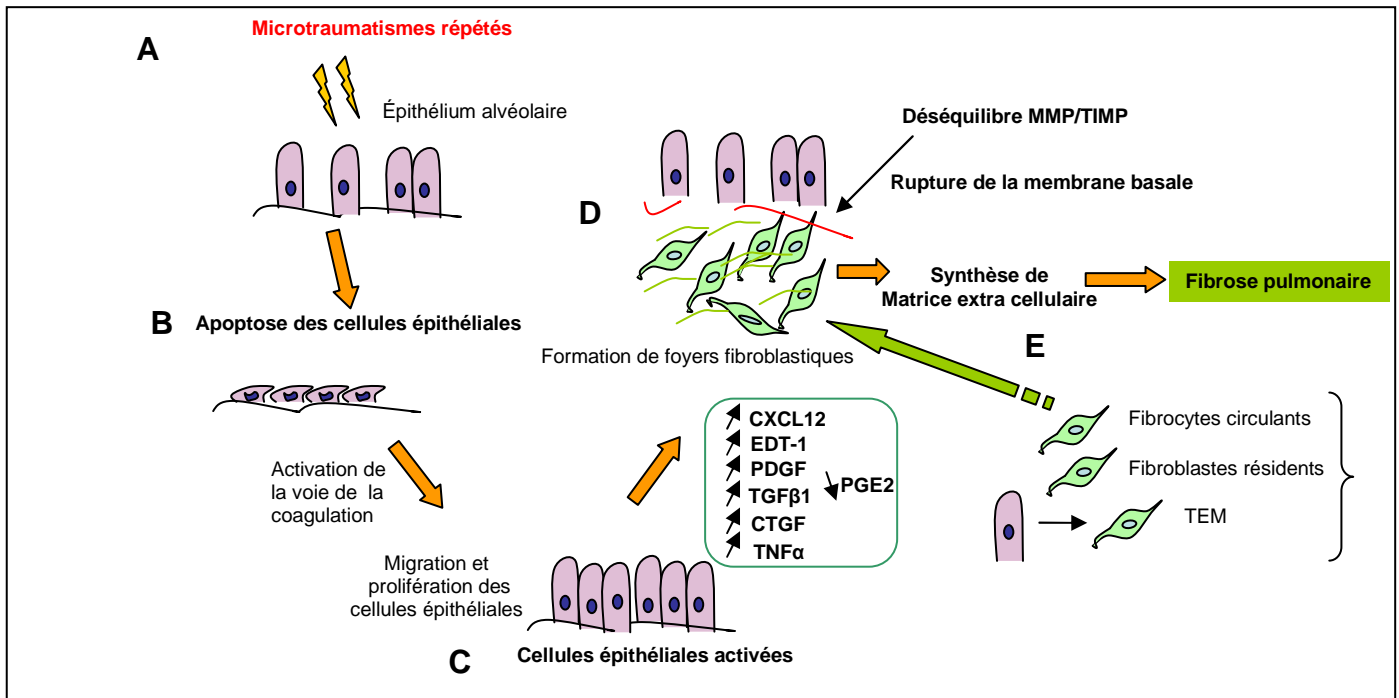


Figure 10 : Schéma illustrant la physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

(A) L'épithélium alvéolaire subit des agressions répétées d'origine environnementale, (B) provoquant l'apoptose des cellules épithéliales. Cette apoptose entraîne une activation de la voie de la coagulation suivi d'une migration et d'une prolifération de cellules alvéolaires sur le lieu de la lésion. (C) Les cellules épithéliales activées ainsi recrutées vont libérer des facteurs de croissance et cytokines qui vont favoriser le recrutement des fibroblastes pulmonaires résidents et des fibrocytes circulants. De plus, les cellules épithéliales sécrètent le TGFβ1, qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales alvéolaires en fibroblastes et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. (D) Ainsi, ces cellules (fibrocytes, fibroblastes résidents pulmonaires et fibroblastes dérivés des cellules épithéliales) contribuent à la formation des foyers de fibroblastes présents dans la FPI. De plus, les cellules épithéliales activées expriment la plupart des métalloprotéinases (MMP) de la matrice responsables de la dégradation de la membrane basale lors de l'initiation du processus fibreux. Le déséquilibre de la balance entre protéases (MMPs) dégradant la matrice et leurs inhibiteurs (TIMPs) contribue à l'accumulation de la matrice extra-cellulaire observée dans la FPI. (E) Les fibroblastes et myofibroblastes présents dans les foyers produisent un excès de protéines de la matrice extracellulaire qui aboutit à un remodelage progressif de la structure pulmonaire caractéristique de la FPI.

TNFα= Tumor Necrosis Factor α ; CTGF= Connective Tissue Growth Factor ; TGFβ1= Transforming Growth Factor β1; PDGF= Platelet Derived Growth Factor; EDT-1= Endothelin-1; CXCL12= Chemokine Ligand 12; PGE2= Prostaglandin E2; TEM= Transition Epithélio-Mésenchymateuse

II. Génétique et fibrose pulmonaire idiopathique

La plupart des mutations génétiques nettement associées à la FPI le sont pour des formes familiales de FPI. Ainsi, dans une étude menée sur le génome de patients atteints de forme familiale de fibrose pulmonaire comparé à celui de patients contrôles, un haplotype commun situé sur le chromosome 4q31 a été retrouvé de manière significativement plus fréquente dans la population atteinte de fibrose pulmonaire (Hodgson et al. 2006). Cet haplotype contient deux gènes fonctionnels non caractérisés ELMOD2 et LOC152586. Seul le gène ELMOD2 était exprimé dans le poumon et présentait une diminution d'expression de son ARNm dans les poumons de patients atteints de FPI. De plus, l'hybridation *in situ* effectuée sur des tissus pulmonaires a révélé la quasi-absence d'expression du gène ELMOD2 dans les tissus atteints de fibrose. Une étude *in vitro* menée ultérieurement a suggéré que l'expression du gène ELMOD2 était essentielle pour la réponse innée antivirale dans les cellules épithéliales pulmonaires (Pulkkinen et al. 2010). Une mutation sur la protéine C du surfactant, protéine exclusivement exprimée par les cellules épithéliales alvéolaires, a également été retrouvée dans le génome de patients atteints de forme familiale de fibrose pulmonaire (Thomas et al. 2002). Cette mutation entraîne la production d'une protéine altérée, qui en s'accumulant peut être responsable de lésions de l'épithélium alvéolaire.

Les travaux menés par Seibold et ses collègues ont permis d'identifier une association significative entre une mutation d'un nucléotide sur le promoteur de *MUC5B* et l'existence d'une forme familiale ou acquise de fibrose pulmonaire idiopathique (Seibold et al. 2011). Le gène *MUC5B* code pour une mucine dont l'expression est retrouvée augmentée dans les poumons de patients atteints de FPI. L'immunohistochimie réalisée sur des poumons malades a montré une accumulation importante de MUC5B dans les zones de lésions kystiques. MUC5B est également associée à d'autres maladies pulmonaires chroniques (Kirkham et al. 2008, 5; Caramori et al. 2004), suggérant ainsi son possible rôle dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire idiopathique.

Deux études ont mis en évidence des mutations entraînant une perte de fonction de la télomérase chez 8-15% des patients atteints de forme familiale de FPI (Tsakiri et al. 2007; Armanios et al. 2007). De plus, un raccourcissement des télomères a été détecté dans les cellules alvéolaires de patients atteints de FPI sporadique (Alder et al. 2008). Les télomères sont des séquences répétitives non codantes d'ADN situées à l'extrémité des chromosomes et qui se raccourcissent à chaque division cellulaire. La télomérase est une enzyme permettant de conserver la longueur des télomères. Quand les télomères ont atteint une longueur critique,

ils activent la protéine p-53, conduisant ainsi la cellule à son apoptose ou à sa sénescence. La mutation retrouvée chez certains patients atteints de fibrose pulmonaire est à l'origine d'une perte de fonction de la télomérase, induisant ainsi un raccourcissement des télomères dans les cellules alvéolaires pulmonaires. Ce raccourcissement des télomères entrainerait ainsi une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires, à l'origine des mécanismes induisant la fibrose pulmonaire idiopathique. Le raccourcissement des télomères est également retrouvé dans d'autres maladies pulmonaires chroniques obstructives (Savale et al. 2009) et ne serait donc pas caractéristique de la fibrose pulmonaire. Néanmoins, il pourrait être un cofacteur dans la pathogenèse de la FPI.

D'autres études basées sur l'analyse des profils d'expression des tissus pulmonaires de patients atteints de FPI comparés à ceux de sujets contrôles ont permis de mettre en évidence la surexpression de certains gènes comme twist-1, un facteur de transcription (Bridges et al. 2009), ou MMP-7 (Selman et al. 2006) dans les tissus malades. Ainsi, twist-1 s'est révélé nécessaire à la survie des fibroblastes *in vitro* après exposition à des stimuli pro-apoptotiques.

Ces travaux basés sur l'étude d'un gène et de son implication dans la pathogenèse de la FPI ont permis de mieux comprendre et d'identifier les mécanismes à l'origine de cette maladie. Néanmoins, ils peuvent apparaître insuffisants face à la complexité d'une maladie telle que la FPI. Ainsi, les essais thérapeutiques réalisés sur des molécules dirigées contre un seul facteur intervenant dans la FPI n'ont donné à ce jour que des résultats limités.

III. Thérapeutiques et FPI

1. Essais thérapeutiques dans la FPI

Certaines molécules thérapeutiques ont été testées chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique dans le cadre d'études cliniques et n'ont pas montré d'amélioration significative dans la population traitée.

Molécule	Propriétés
Etanercept (Raghu et al. 2008)	Récepteur recombinant soluble au TNF α Se lie au TNF α et neutralise son activité <i>in vitro</i>
Interféron Gamma (Talmadge E King Jr et al. 2009)	Cytokine ayant des propriétés antifibrosantes, antiprolifératives, immunomodulatrices.
Bosentan (Talmadge E King Jr et al. 2011)	Antagoniste du récepteur A et B de l'endothéline
Imatinib (Gleevec) (Daniels et al. 2010)	Inhibiteur de la tyrosine kinase Action sur le récepteur au PDGF

Pour certains autres essais thérapeutiques, un bénéfice clinique et/ou une amélioration des capacités pulmonaires ont été mis en évidence, même si l'évolution de la maladie n'a pu être stoppée.

Molécule	Propriétés	Bénéfices
Association N-acétylcystéine + prednisone + azathioprine. (Demedts et al. 2005; Raghu et al. 2012)	N-acétylcystéine (précurseur du glutathion, propriétés anti-oxydantes) en association avec un traitement conventionnel	Amélioration de la capacité vitale (CV) et de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DL _{CO}) à 12 mois par rapport aux sujets contrôles (placébo) mais augmentation du risque de mortalité et d'hospitalisations.
Pirfenidone (Hilberg et al. 2012)	Régule l'activité du TGF β et du TNF α <i>in vitro</i>	Amélioration de la CV Amélioration de la survie à 52 semaines
Thalidomide (Horton, Danoff, and Lechtzin 2008)	Propriétés anti-inflammatoires, action probable sur les fibres nerveuses du poumon.	Amélioration de la toux

Association anticoagulants (coumadine ou héparine IV) + prednisone (Kubo et al. 2005)	Prévient les risques thrombotiques	Amélioration de la survie à 3 ans Réduction de la mortalité des exacerbations aiguës (63% vs 35%)
Sildenafil (Zisman et al. 2010)	Inhibiteur de la phosphodiesterase-5 Action vasodilatatrice sur la circulation pulmonaire	Amélioration significative de la dyspnée, de la DL _{CO} et de l'oxygénation artérielle.
Intedanib (BIBF 1120) (Richeldi et al. 2011)	Inhibiteur de 3 récepteurs à activité tyrosine kinase PDGF/R, FGF/R, VEGF/R	Amélioration de la CV par rapport au groupe placebo Diminution des exacerbations aiguës

La transplantation pulmonaire reste actuellement la seule thérapeutique qui permet de prolonger la survie des patients à un stade avancé de la maladie, même si la survie post-transplantation à 5 ans chez les patients porteurs de FPI est de 44% (Thabut et al. 2009)

2. Nouvelles voies thérapeutiques

L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses dans la FPI apparaît comme une possibilité thérapeutique. En effet, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par l'injection de bléomycine, à un stade précoce de la maladie, ces cellules souches administrées par voie intraveineuse sont capables de migrer dans l'arbre bronchopulmonaire et d'adopter un phénotype de type épithélial, diminuant ainsi la fibrose induite par la bléomycine (Ortiz et al. 2003). De même, l'administration de cellules souches progénitrices épithéliales pulmonaires promimin-1/ CD133 (+) protège les souris d'une fibrose induite par la bléomycine. Injectées par voie intratrachéale, ces cellules souches se greffent au poumon et se différencient en pneumocytes de type II (Germano et al. 2009). Malgré ces attraits thérapeutiques, l'utilisation de cellules souches a cependant quelques limites, en particulier leur possible cancérogénicité ainsi que le manque de données concernant l'évolution de leur comportement lors d'une administration à plus long terme chez l'homme. (Houghton et al. 2004; Aguilar et al. 2007; Y. Moodley, Manuelpillai, et Weiss 2011)

Un autre aspect thérapeutique émergent en alternative à la greffe pulmonaire est l'ingénierie tissulaire, dont le but est de régénérer la fonctionnalité de tissus humains déficients. Ainsi, Petersen et al ont montré qu'il était possible de régénérer des poumons de rat. Ils ont d'abord prélevé un poumon de rat qu'ils ont décellularisé, c'est-à-dire qu'ils ont détruit l'ensemble des cellules grâce à une perfusion de détergent biologique afin de ne conserver que la structure extracellulaire du poumon. Ils ont ensuite injecté des cellules néonatales pulmonaires épithéliales ainsi que des cellules vasculaires endothéliales qui ont recolonisé la structure pulmonaire. Après transplantation de ce poumon chez l'animal, des échanges gazeux ont pu être mis en évidence dans le poumon greffé, témoignant ainsi de sa fonctionnalité (Petersen et al. 2010). Même si cette approche thérapeutique est encore lointaine chez l'homme, elle apparaît néanmoins encourageante.

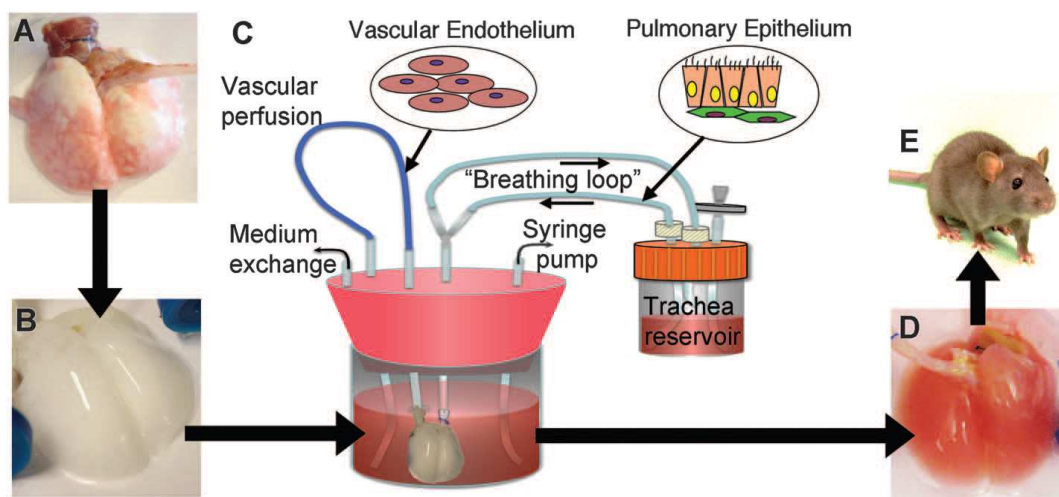


Figure 11 : Schématisation de l'ingénierie pulmonaire. (Petersen et al. 2010)

(A) poumon de rat avec son artère pulmonaire et sa trachée (B) poumon de rat dépourvu de cellules après traitement avec une solution détergente (C) injection de cellules endothéliales dans l'artère pulmonaire et d'épithélium pulmonaire dans la trachée à l'aide d'un bioréacteur. (D) Après 4 à 8 jours de culture, le poumon recolonisé est prêt pour l'implantation (E) chez le rat.

Une autre voie thérapeutique envisageable dans la FPI est l'utilisation de microARN et/ou antagonistes dirigés contre un /plusieurs microARN ayant un rôle dans la pathogenèse de cette maladie comme nous le précisons dans le chapitre suivant.

IV. MicroARN et fibrose pulmonaire idiopathique

Les microARN sont impliqués dans la pathogenèse ou la progression de nombreuses maladies telles que les cancers (Calin et Croce 2006), les maladies cardiovasculaires (Latronico et Condorelli 2009) ou encore dans l'inflammation accompagnant les allergies des voies aériennes supérieures (Kumar et al. 2011). Leur rôle semble également important dans les maladies fibrosantes du cœur (Castoldi et al. 2012; van Rooij et al. 2008), du rein (Patel et Noureddine 2012) ou du foie (Noetel et al. 2012) par l'action régulatrice qu'ils exercent sur des gènes impliqués dans la physiopathologie de la fibrose.

Dans la fibrose pulmonaire, et en particulier la fibrose pulmonaire idiopathique, quelques études ont été conduites, qui ont démontrées le(s) rôle(s) de certains microARN dans la physiopathologie de la maladie.

1. Let-7d et FPI (Pandit et al. 2010)

Pandit et ses collaborateurs ont analysé pour la première fois le niveau d'expression d'environ 450 microARN provenant de poumons de patients atteints de FPI comparés à des poumons contrôles. Les résultats ont montré qu'environ 10% des microARN présents sur les puces étaient différentiellement exprimés dans les poumons malades, parmi lesquels Let-7d qui est apparu significativement sous-exprimé. L'analyse bioinformatique du promoteur du gène let7-d a révélé une séquence de liaison à SMAD (Smad binding element SBE), une protéine de signalisation de la voie TGF β 1. Les auteurs ont confirmé expérimentalement la liaison de SMAD3 avec le promoteur de let-7d par des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine et de retard sur gel. Un essai luciférase a également permis de démontrer une réduction de l'activité transcriptionnelle du promoteur de let-7d en présence de TGF β 1 (Figure 12). Let-7d a été localisé principalement dans les cellules épithéliales alvéolaires des poumons sains; il est quasiment absent dans l'épithélium alvéolaire des zones fibrotiques de patients atteints de FPI. Parallèlement, HMGA2 (high mobility group AT-hook 2), une cible connue de let-7d ayant un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse médiée par le TGF β (Thuault et al. 2006), a été retrouvée surexprimée dans les poumons atteints de FPI. D'autres protéines appartenant à la famille des oncogènes RAS sont également connues pour être des cibles de let-7d (Johnson et al. 2005) et contribuer, en association avec HMGA2 (Watanabe et al. 2009), au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. L'inhibition de let-7d *in vitro* mais aussi *in vivo* chez la souris, par instillation intratrachéale d'antagomiRs inhibant la famille des microARN let-7, entraîne une augmentation des marqueurs

mésenchymateux et une diminution des marqueurs épithéiaux, en faveur d'une transition épithélio-mésenchymateuse. Il reste néanmoins à démontrer que l'administration *in vivo* d'antagomiR dirigés contre les microARNs let-7 est suffisante pour prévenir ou améliorer la fibrose induite chez les souris.

2. MiR-21 et FPI (Liu et al. 2010).

Une étude menée par Liu et ses collaborateurs a montré le rôle de miR-21 dans la FPI. Ils ont tout d'abord mis en évidence par hybridation *in situ* une nette augmentation de l'expression de miR-21 dans les poumons de souris atteintes de fibrose pulmonaire et dans les poumons de patients atteints de FPI, ainsi que la colocalisation de miR-21 avec les myofibroblastes. Par ailleurs, l'administration intrapéritonéale d'antagomiRs dirigés contre miR-21 chez des modèles murins (C57BL/6) de fibrose pulmonaire induite par l'injection de bléomycine, a permis de réduire la sévérité de la maladie ainsi que la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. De plus, l'induction de l'expression de miR-21 par le TGFβ1 a été mise en évidence, de même que l'identification de Smad7, un inhibiteur de la voie TGFβ1, comme cible directe de miR-21. Ainsi, miR-21 fonctionne dans un système de boucle de rétrocontrôle positif sous l'action du TGFβ1, résultant en une amplification du signal de la voie TGFβ1 (Figure 11). Les résultats de cette étude suggèrent un rôle thérapeutique potentiel de la modulation de miR-21 dans la FPI.

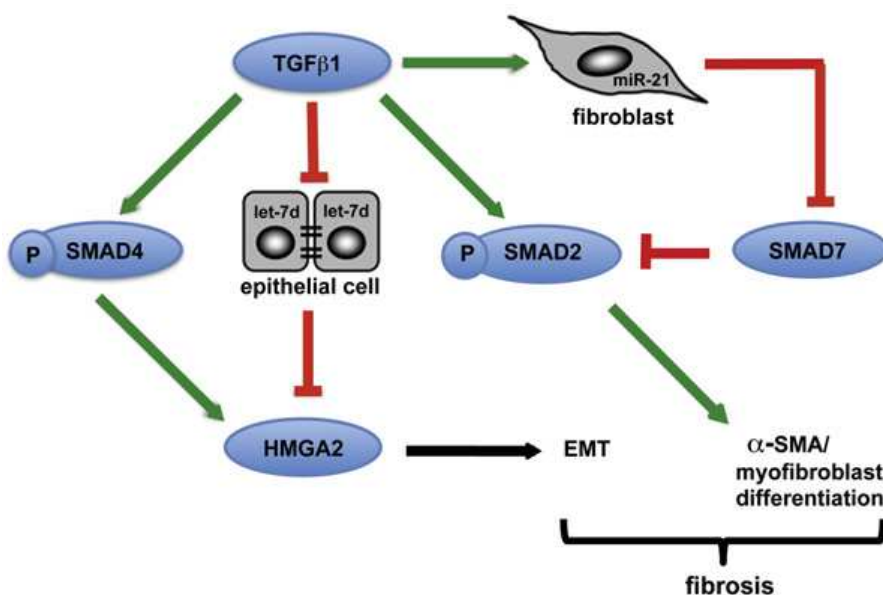


Figure 12. Pandit et al 2011

Le TGFβ1 inhibe la transcription de let-7d, qui inhibe lui-même HMGA2. Le TGFβ1 active également la transcription de HMGA2 par l'intermédiaire de SMAD4. Le TGFβ1 augmente l'expression de miR-21, qui inhibe SMAD7, un inhibiteur de la voie TGFβ1 par l'intermédiaire de la phosphorylation de SMAD2. Les flèches vertes représentent les voies activatrices et les flèches rouges, les voies inhibitrices.

3. miR-155 et FPI (Pottier et al. 2009).

Notre équipe a montré que miR-155 était préférentiellement exprimé dans les fibroblastes pulmonaires humains sains plutôt que dans les cellules épithéliales pulmonaires et que son expression augmentait après exposition de lignées fibroblastiques au TNF α et à l'IL-1 β . De plus, la comparaison de l'expression de miR-155 entre les poumons de souris sensibles (C57BL/6) et ceux de souris résistantes (BALB/C) à la bléomycine a montré une augmentation significative de l'expression de ce microARN chez les souris sensibles, en corrélation avec le degré de fibrose pulmonaire. Des études fonctionnelles nous ont permis de démontrer que le Keratine growth factor (KGF) était une cible directe de miR-155. Le KGF est un facteur de croissance des cellules épithéliales alvéolaires secrété par les fibroblastes (Finch et al. 1989; Deterding, Jacoby, et Shannon 1996), dont l'expression est dérégulée dans les fibroblastes pulmonaires provenant de patients atteints de FPI (Marchand-Adam et al. 2005). De plus, des études ont mis en évidence que l'administration de KGF à des modèles murins de fibrose pulmonaire améliore leur survie et favorise la protection de leurs tissus épithéliaux (Deterding et al. 1997; Sugahara et al. 1998). Nous avons montré que les fibroblastes surexprimant miR-155 sécrétaient environ deux fois moins de KGF sous l'action d'un inducteur du KGF (IL-1 β) et qu'ils présentaient une augmentation de leur migration. Des données antérieures montraient, par ailleurs, une augmentation significative de l'expression de miR-155 dans les poumons de patients atteints de FPI (Pandit et al. 2010). Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de montrer le rôle potentiel de miR-155 dans la FPI et de pouvoir l'envisager comme une des cibles thérapeutiques.

4. miR-29 et FPI (Cushing et al. 2011)

Cushing et ses collaborateurs ont démontré une réduction d'expression des microARNs de la famille de miR-29 (i.e miR-29a, miR-29b, miR-29c) dans les poumons fibrosés de souris C57BL/6 suite à l'injection de bléomycine avec, en parallèle, une augmentation d'expression de gènes du collagène et d'autres gènes de protéines composant la matrice extra-cellulaire. Cette diminution d'expression de miR-29 avait été également rapportée dans l'étude menée sur des poumons de patients atteints de FPI (Pandit et al. 2010). La répression *in vitro* de l'expression de miR-29 dans des fibroblastes pulmonaires humains a provoqué une augmentation de nombreux gènes associés au processus de fibrose, dont ceux étant des cibles directes de miR-29 : les gènes *ADAMTS9* et *ADAM12* qui codent pour des protéines ayant des activités protéasiques (Pardo, Selman, et Kaminski 2008), ou *ITGA11* (Integrin alpha 11) qui code pour une protéine qui favorise l'activation de la voie TGF β

(Goodwin et Jenkins 2009; Sheppard 2005). Par ailleurs, l'expression des microARN de la famille de miR-29 diminue significativement après traitement au TGF β 1 des fibroblastes pulmonaires, suggérant un mécanisme de régulation de l'expression de miR-29 par le TGF β 1. D'autres travaux ont également montré l'implication de miR-29 dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Gebeshuber, Zatloukal, et Martinez 2009) ainsi que dans la fibrose du cœur, de la peau et du foie (van Rooij et al. 2008; Maurer et al. 2010; Roderburg et al. 2011). Récemment, Xiao et ses collaborateurs ont mis en évidence le potentiel thérapeutique du miR-29 chez la souris (Xiao et al. 2012) .

Travaux personnels

Articles 1 et 2

**Implication des microARN dans le développement de la Fibrose
Pulmonaire Idiopathique**

Introduction des articles 1 et 2

La fibrose pulmonaire idiopathique se caractérise par une accumulation excessive de matrice extra-cellulaire dans l'interstitium pulmonaire et évolue vers l'insuffisance respiratoire chronique. Les thérapeutiques habituelles (corticoïdes, immunosuppresseurs) ont une efficacité limitée dans le traitement de la FPI et n'empêchent pas l'évolution défavorable de la maladie (Collard et al. 2004) .

Les microARN sont des petits ARN non codant d'une vingtaine de nucléotides dont la fonction essentielle est de réguler l'expression des gènes en se fixant sur la partie 3'UTR des ARNm cibles provoquant ainsi leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction en protéines. Des études récentes ont montré le rôle des microARN dans divers processus physiologiques ou pathologiques ainsi que leur potentiel thérapeutique grâce à la modulation d'expression de microARN ayant un impact fonctionnel sur la cellule. Alors que l'influence des microARN a été largement explorée dans certains domaines comme la cancérologie, les données concernant les microARN dans les maladies fibrosantes, et en particulier dans la fibrose pulmonaire demeurent limitées (Pandit et al. 2010; Liu et al. 2010; Cushing et al. 2011; Pottier et al. 2009; Pandit, Milosevic, et Kaminski 2011).

Dans ce contexte, nous avons voulu identifier un (des) microARN dérégulés au cours de l'évolution de la fibrose pulmonaire, susceptibles d'avoir un rôle dans la pathogenèse de cette maladie et qui pourraient à plus long terme constituer des cibles thérapeutiques. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle expérimental une souche de souris (C57BL/6) qui développe une fibrose pulmonaire suite à l'injection de bléomycine ; un agent anti-cancéreux connu pour provoquer chez certains patients une fibrose pulmonaire.

Les résultats de nos travaux sont exposés dans les articles 1 et 2.

Article 1

miR-199a-5p is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1

Christian Lacks Lino Cardenas^{1#}, Imène Sarah Henaoui^{2,3#}, **Elisabeth Courcot**¹, Christoph Roderburg⁴, Christelle Cauffiez¹, Sébastien Aubert^{5,6,7}, Marie-Christine Copin^{5,6,7}, Benoit Wallaert⁸, François Glowacki¹, Edmone Dewaeles¹, Jadranka Milosevic⁹, Julien Maurizio^{2,3}, John Tedrow⁹, Brice Marcet^{2,3}, Jean-Marc Lo-guidice¹, Naftali Kaminski⁹, Pascal Barbry^{2,3}, Tom Luedde⁴, Michael Perrais^{5,7}, Bernard Mari^{2,3#} and Nicolas Pottier^{1#}

¹EA4483, Faculté de Médecine de Lille, Pole Recherche, Lille, France ; ²Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR-6097, Valbonne Sophia-Antipolis, France ; ³Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, France ; ⁴Department of Medicine III, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany ; ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Equipe 5 «Mucines, Différentiation et Cancérogenèse Épithéliales», Lille, France ⁶Pôle de Pathologie, CHRU Lille, Lille, France ; ⁷Faculté de Médecine, Université de Lille 2, Lille, France ; ⁸Service de pneumologie et immunoallergologie, CHRU Lille, Lille, France ; ⁹Dorothy P. and Richard P. Simmons Center for Interstitial Lung Disease, Division of Pulmonary, Allergy, and Critical Care Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, USA.

#contributed equally

Editorial correspondence should be addressed to:

Dr. Nicolas Pottier,
EA4483, Faculté de Médecine,
Pôle Recherche,
1 place de Verdun, Lille, 59045 France
Phone: (33) 3 20 62 68 18
Fax: (33) 3 20 62 68 91
Email: nico_pottier@yahoo.fr

Dr. Bernard Mari,
CNRS-UMR-6097, Institut de Pharmacologie
Moléculaire et cellulaire, 660 route des Lucioles,
Valbonne Sophia-Antipolis, 06560, France
Phone: (33) 4 93 95 77 59
Fax: (33) 4 93 95 77 94
Email: mari@unice.fr

Authors' disclosure of potential conflicts of interest

The authors indicated no potential conflicts of interest except for NK who has a patent application for use of microRNAs as therapeutic targets in IPF.

Abstract

As miRNAs are associated with normal cellular processes, deregulation of miRNAs is thought to play a causative role in many complex diseases. Nevertheless, the precise contribution of miRNAs in fibrotic lung diseases, especially the idiopathic form (IPF), remains poorly understood. Given the poor response rate of IPF patients to current therapy, new insights into the pathogenic mechanisms controlling lung fibroblasts activation, the key cell type driving the fibrogenic process, are essential to develop new therapeutic strategies for this devastating disease.

To identify miRNAs with potential roles in lung fibrogenesis, we performed a genome-wide assessment of miRNA expression in lungs from two different mouse strains known for their distinct susceptibility to develop lung fibrosis after bleomycin exposure. This led to the identification of miR-199a-5p as the best miRNA candidate associated with bleomycin response. Importantly, miR-199a-5p pulmonary expression was also significantly increased in IPF patients (94 IPF vs. 83 controls). In particular, levels of miR-199a-5p were selectively increased in myofibroblasts from injured mouse lungs and fibroblastic foci, a histologic feature associated with IPF. Therefore, miR-199a-5p profibrotic effects were further investigated in cultured lung fibroblasts: miR-199a-5p expression was induced upon TGF β exposure and ectopic expression of miR-199a-5p was sufficient to promote the pathogenic activation of pulmonary fibroblasts including proliferation, migration, invasion and differentiation into myofibroblasts. In addition, we demonstrated that miR-199a-5p is a key effector of TGF β signaling in lung fibroblasts by regulating CAV1, a critical mediator of pulmonary fibrosis. Remarkably, aberrant expression of miR-199a-5p was also found in unilateral ureteral obstruction mouse model of kidney fibrosis as well as in both bile duct ligation and CCl₄-induced mouse models of liver fibrosis, suggesting that dysregulation of miR-199a-5p represents a general mechanism contributing to the fibrotic process.

MiR-199a-5p thus behaves as a major regulator of tissue fibrosis with therapeutic potency to treat fibroproliferative diseases.

Author summary

Fibrosis is the final common pathway in virtually all forms of chronic organ failure, including lung, liver and kidney, and is a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Fibrosis results from the excessive activity of fibroblasts, in particular a differentiated form known as myofibroblast which is responsible for the excessive and persistent accumulation of scar tissue and ultimately organ failure. Idiopathic Lung Fibrosis (IPF) is a chronic and often rapidly fatal pulmonary disorder of unknown origin characterized by fibrosis of the supporting framework (interstitium) of the lungs. Given the poor prognosis of IPF patients, new insights into the biology of (myo)fibroblasts is of major interest to develop new therapeutic aiming at reducing (myo)fibroblast activity to slow or even reverse disease progression, thereby preserving organ function and prolonging life. MicroRNAs (miRNAs), a class of non coding RNA recently identified, are associated with normal cellular processes, and deregulation of miRNAs plays a causative role in a vast array of complex diseases. In this study, we identified a particular miRNA: miR-199a-5p that governs lung fibroblast activation and ultimately lung fibrosis. Overall we showed that miR-199a-5p is a major regulator of fibrosis with strong therapeutic potency to treat fibroproliferative diseases such as IPF.

Introduction

Tissue fibrosis, defined as the excessive and persistent formation of non functional scar tissue in response to repeated injury and insult, is a leading cause of morbidity and mortality associated with organ failure in various chronic diseases such as those affecting the lung interstitium [1]. Among the interstitial lung diseases of unknown etiology, Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is the most common and lethal with a median survival of 3 to 5 years after diagnosis [2]. The pathogenesis of IPF is complex and largely unknown [2], but observations based on both animal models of pulmonary fibrosis and lung sections from patients with IPF suggest a dynamic pathobiological process involving excessive wound healing with chronic inflammation, apoptosis of epithelial and endothelial cells, mesenchymal cell proliferation and activation with the formation of fibroblasts/myofibroblasts foci, and finally excessive deposition of extracellular matrix resulting in the destruction of the lung architecture and the loss of lung functions [2]. In particular, myofibroblasts play a substantial role in IPF by secreting important amount of ECM components and by promoting lung tissue stiffening [3]. Given the poor response rate of IPF patients to current therapy, a detailed understanding of the underlying pathogenic mechanisms is of major interest to develop new effective therapeutic strategies targeting the cellular and molecular events involved in the fibrotic response.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of noncoding small RNA, which most often bind to the 3' UTR of target genes mRNAs and thereby repress their translation and/or induce their degradation. Since the first miRNA was identified in *Caenorhabditis elegans* as an important factor for timing of larval development [4,5], thousands have now been characterized including about 1500 in human (miRbase v18) [6]. MiRNAs are now recognized as major regulators of gene expression with crucial functions in numerous biological processes including development, proliferation, differentiation, apoptosis and stress response. Importantly, recent studies have identified specific miRNA expression patterns related to the initiation and progression of various diseases including cancer as well as inflammatory, infectious and autoimmune diseases [7–9]. Additionally, gain and loss of function miRNA studies have further established their functional impact in various *in vivo* models [10–15]. Nevertheless, the precise contribution of miRNAs in fibrotic diseases, especially lung fibrosis, is still poorly understood [16,17]. Our rationale was therefore to test whether miRNAs may provide new perspectives on disease mechanisms, diagnosis as well as new therapeutic opportunities in the specific context of fibrosis.

In an effort to identify miRNAs with potential roles in the development of lung fibrosis (strategy detailed in Figure S1), we aimed to identify miRNAs of interest in two mouse strains

showing different susceptibility to develop lung fibrosis after bleomycin exposure. This led to the identification of a panel of miRNAs specifically dysregulated in the lungs of fibrosis prone mouse strain in response to bleomycin. Among these miRNAs, miR-199a-5p was found to be selectively up-regulated in myofibroblasts of the injured lung in bleomycin-treated mice and fibroblastic foci of IPF patients. In lung fibroblasts, miR-199a-5p acts as an effector of TGF β signaling, regulates CAV1 expression, a critical mediator of the lung fibrosis process [18–21] and participates to multiple fibrogenic associated-processes including cell proliferation, migration, invasion and differentiation into myofibroblasts. Finally, dysregulation of miR-199a-5p was also found in two other mouse models of tissue fibrosis, namely kidney fibrosis and liver fibrosis, suggesting therefore that miR-199a-5p is likely to be a common mediator of fibrosis.

Results

Fibrosis sensitive and resistant mice exhibit a distinct miRNA expression profile in response to bleomycin.

Previous studies based on mice have demonstrated a genetic susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis [22,23]. Indeed, C57BL/6 mice are considered to be fibrosis prone, whereas BALB/C mice are less prone to fibrosis. To identify miRNAs that may contribute to the lung fibrosis process, miRNA expression profile in response to bleomycin was assessed 7 days and 14 days following bleomycin administration (i.e. when active fibrogenesis occurs) on both strains using a microarray based platform (Data set 1, GEO accession number GSE34812) described elsewhere [24–26]. We identified 22 differentially expressed miRNAs between lungs from bleomycin- and control-treated animals in at least one strain, the majority being upregulated in bleomycin-instilled lungs (Figure 1A). Interestingly, miR-199a-5p exhibited an enhanced expression in response to bleomycin during disease progression in the sensitive mice only (Figure 1B). This was further established using an independent set of mice at day 14 following bleomycin treatment (Figure S2A). These findings strongly suggest that miR-199a-5p may play an important role during the lung fibrosis process. To investigate the regulatory mechanisms underlying miR-199a-5p production, we assessed the expression status of the 2 mouse genes, miR-199a-1 (on chromosome 9) and miR-199a-2 (on chromosome 1) in response to bleomycin using Taqman assay designed to discriminate between pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2. Our results showed that, 14 days after bleomycin instillation, both pri-miR-199a transcripts were up-regulated in the lungs of C57BL/6 mice (Figure S2B) and thus, contribute to miR-199a-5p production. In addition, *in situ* hybridization experiments performed in the injured lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin instillation revealed a selective expression of miR-199a-5p in myofibroblasts (Figure 1C).

Of note, consistent with previous findings [14], we also found a significant upregulation of miR-21 (now referenced in miRbase as mmu-miR-21a-5p) in response to bleomycin (Figure 1A and S3). Nevertheless, miR-21 induction did not differ between bleomycin-sensitive and bleomycin-resistant strains of mice.

Identification of miR-199a-5p target genes in lung fibroblasts.

We next sought to determine the mechanism by which miR-199a-5p dysregulation may lead to tissue fibrosis. To address this question, we first attempted to identify gene targets and cellular pathways regulated by miR-199a-5p using the methodology described earlier [25,26]. The influence of miR-199a-5p on human pulmonary hFL1 fibroblasts transcriptome was compared with that of miR-21, which has been previously associated with

the development of fibrotic diseases including lung fibrosis [14,15,27] (Data set 2, GEO accession number GSE34815). Forty-eight hours after ectopic overexpression of each miRNA, a significant alteration (defined by an absolute \log_2 ratio above 0.7 and an adjusted p-value below 0.05) of 1261 and 753 transcripts was detected in the miR-199a-5p and miR-21 conditions, respectively. While these 2 miRNAs induced very distinct gene expression patterns (Figure 2A), a functional annotation of these signatures, using Ingenuity Pathway™ software, indicated an overlap for “canonical pathways” including “Cell Cycle regulation” and “TGF β Signaling” (Table S1). Consistent with previous findings [28], highly significant pathways associated with miR-21 were related to “Cyclins and Cell Cycle Regulation” as well as “Cell Cycle Control of Chromosomal Replication”, “Mismatch Repair in Eukaryotes” and “ATM signalling”. While the highest scoring pathway for miR-199a-5p corresponded to the metabolic pathways “Biosynthesis of Steroids”, we also noticed enrichment for pathways related to “Integrin Signaling” and “Caveolar-mediated Endocytosis Signaling”. We next looked for an enrichment of putative direct targets in the population of down-regulated transcripts, as described in [29]. A specific overrepresentation of predicted targets for miR-199a-5p and miR-21 in the population of down-regulated transcripts was noticed after heterologous expression of miR-199a-5p or miR-21, respectively. This enrichment was independent of the prediction tool used to define the targets (Figure 2B and not shown). We then focussed our analysis on a subset of 21 transcripts containing miR-199a-5p complementary hexamers in their 3’UTR, showing the largest inhibition of expression, and identified by TargetScan, PicTar and miRanda (Figure 2C and Table 1). The gene list of interest was further narrowed by focussing on targets also associated with the most significant canonical pathways described above. Interestingly, the expression levels of 4 out of 21 mouse orthologs were also significantly down-regulated in C57BL/6 mice 14 days after instillation of bleomycin (Data set 3, GEO accession number GSE34814, Table S2). These targets, highlighted in Table 1, are *ARHGAP12*, *CAV1*, *MAP3K11* and *MPP5*. Based on previous studies that demonstrated a significant link between the downregulation of caveolin-1 (*CAV1*) in lung fibroblasts and the deleterious effects mediated by TGF β [19,30], *CAV1* represented a particularly relevant putative miR-199a-5p target.

CAV1 is a *bona fide* miR-199a-5p target.

Alignment of miR-199a-5p with human *CAV1* 3’UTR sequence revealed one potential conserved seed site (Figure 3A). We then fused part of the human *CAV1* 3’UTR to a luciferase reporter using the psiCHECK™-2 vector and transfected it into HEK293 cells in the presence of either a pre-miR-199a-5p mimic or a pre-miR-control (Figure 3B). As a control, we also used a *CAV1* 3’UTR construct mutated on the predicted miR-199a-5p site. Human

pre-miR-199a-5p induced a significant decrease in the normalized luciferase activity relative to control in the presence of the wild type construction only, confirming that it represents a functional site. Moreover, this inhibition was also repeated using the whole 3'-UTR of human CAV1 (Figure S4), demonstrating that CAV1 is indeed a direct target of miR-199a-5p. Finally, transfection of the pre-miR-199a-5p into MRC-5 and hFL1 lung fibroblasts led to a significant and specific decrease of CAV1 at both mRNA and protein levels while miR-21 had no significant effect (Figures 3C-E and S5).

miR-199a-5p mediates TGF β -induced downregulation of CAV1 in pulmonary fibroblasts.

As TGF β is known to downregulate CAV1 in pulmonary fibroblasts [19], we then investigated whether decreased expression of CAV1 upon TGF β stimulation was associated with an increase in miR-199a-5p expression. We exposed the MRC-5 cell line to TGF β , and analyzed the expression levels of CAV1 and miR-199a-5p. As detected by Taqman RT-PCR, TGF β treatment of human fibroblasts for 24h or 48h caused a marked decrease of CAV1 mRNA, whereas miR-199a-5p expression was significantly upregulated (Figure 4A and 4B). Decrease of CAV1 protein levels after TGF β treatment was time dependent (Figure 4C). To further investigate whether miR-199a-5p is involved in TGF β -induced downregulation of CAV1, we performed additional experiments using a LNA-based inhibitor of miR-199a-5p as well as a CAV1 target site blocker to specifically interfere with miR-199a-5p binding on CAV1 3'UTR. As depicted in Figure 4D and S6, both LNA-mediated silencing of miR-199a-5p and blocking miR-199a-5p binding on CAV1 3'UTR inhibit TGF β -induced downregulation of CAV1. Altogether, these experiments demonstrate that, in lung fibroblasts, induction of miR-199a-5p in response to TGF β mediates CAV1 downregulation through binding on a unique site located in CAV1 3'UTR.

Altered expression of CAV1 in the lungs of bleomycin induced pulmonary fibrosis mice.

We then assessed the expression of CAV1 in the fibrotic lungs of mice. Consistent with previous studies [19,31], our data showed a significant decrease in both CAV1 mRNA and protein expression levels in C57Bl/6 mice 14 days after bleomycin administration (Figure 5A-C). Additionally, immunohistochemistry staining of CAV1 on lung tissue sections from C57Bl/6 mice 14 days after bleomycin treatment revealed a marked reduction of CAV1 in fibrotic area of the lungs (Figure 5D). Taken together, these experiments show that the observed up-regulation of miR-199a-5p expression in the fibrotic lungs of mice is correlated

with a downregulation of CAV1. Of note, BALB/c mice, for which pulmonary expression of miR-199a-5p was not upregulated in response to bleomycin, did not display a significant decrease in CAV1 mRNA expression level 14 days after bleomycin treatment (Figure S7).

Concomitant altered expression of both CAV1 and miR-199a-5p in lungs of IPF patients.

Expression of miR-199a-5p expression was increased in lungs of IPF patients (GEO accession number GSE13316 from [13]; dataset consisting of ten IPF samples and ten control samples; two different probes for miR-199a-5p with a p-value of $p=0.005$ and $p=0.006$, wilcoxon rank sum test, Table S3). This result was confirmed with an independent dataset composed of 94 IPF and 83 control lungs ($p<0.001$) (Figure 6A). As observed in mice, IPF samples also exhibited a significant decrease in CAV1 expression ($p<0.001$) (Figure 6B). The linear fold ratio for CAV1 between IPF and control was 0.54 (FDR < 0.05) and the linear fold ratio for miR-199a-5p for the same subjects was 1.35 ($p < 0.05$). Finally, examination of IPF lung sections revealed a specific expression of miR-199a-5p in fibroblastic foci of the injured lung as well as a decreased CAV1 expression (Figure 6C, 6D and S8).

MiR-199a-5p mediates fibrogenic activation of lung fibroblasts through both CAV1-dependent and –independent pathways.

Given that loss of CAV1 expression represents a critical factor involved in the fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts [19], we assessed whether overexpression of miR-199a-5p in lung fibroblasts was sufficient to recapitulate known profibrotic effects associated with a decrease in CAV1 expression (i.e. ECM synthesis, fibroblasts proliferation, migration, invasion and differentiation into myofibroblasts) [30,32,33]. Transfection of miR-199a-5p precursors resulted in a significant induction of migration (Figure 7A and 7B) and invasion (Figure 7C). In addition, cell cycle analysis (percent cells in S phase) showed that proliferation rate of pulmonary fibroblasts overexpressing miR-199a-5p was significantly enhanced (Figure 7D). Finally, heterologous expression of miR-199a-5p also led to a strong increase in α smooth muscle actin (α SMA) expression (Figure 7E and S9), a hallmark of myofibroblast differentiation as well as to a significant potentialization of COL1A1 induction in response to TGF β (Figure 7F).

Comparison of the gene expression profiles obtained in lung fibroblasts transfected with miR-199a-5p precursors or with a siRNA specifically directed against CAV1 revealed an overlap between the 2 signatures, mainly among the down-regulated transcripts (Figure S10A, group 2): 34% of miR-199a-5p downregulated transcripts were also repressed by a siCAV1 (Figure S10B). To gain insights into the pathways modulated by miR-199a-5p, Ingenuity Pathways™

canonical pathways associated to miR-199a-5p were analyzed and compared to those of miR-21 and siCAV1 conditions. This analysis revealed some proximity between miR-199a-5p and siCAV1 based on the existence of shared regulated pathways (Figure 8A). Pathways that were specific to miR-199a-5p were related to inflammation, such as “IL-1 Signaling”, “Acute Phase Response Signaling” and “P38 MAPK Signaling”, i.e. all typical of fibrotic processes. Importantly, several profibrotic genes were specifically regulated by miR-199a-5p and their altered expression was confirmed *in vivo* (Figure S11 and Table S4). MiR-199a-5p thus regulates multiple signaling pathways involved in lung fibrogenesis. In particular, compared to siCAV1 transfected cells, overexpression of miR-199a-5p significantly increased *CCL2*, *TGFBRI* and *MMP3* expression and significantly decreased *CAV2* and *PLAU* expression (Figure S12). Of note, these two downregulated genes were predicted to be direct targets of miR-199a-5p by Pictar.

MiR-199a-5p is an effector of TGF β signaling in lung fibroblasts by regulating CAV1.

We next investigated whether miR-199a-5p is associated with TGF β signaling. For this, we experimentally defined a TGF β signaling signature in lung fibroblasts (Dataset 2, GSE34815) and compared it to miR-199a-5p signature using gene set enrichment analysis (GSEA) [34]. This analysis revealed a significant overlap between these two signatures, as assessed by normalized enrichment scores above 1 (1.4 and 2.17 for up- and down-regulated genes respectively, with nominal p-value and FDR q-value being <0.05), suggesting therefore, that miR-199a-5p is involved in the TGF β response of lung fibroblasts (Figure 8B). To further demonstrate the importance of miR-199a-5p in TGF β response, silencing of miR-199a-5p was performed in lung fibroblasts using LNA-based inhibitors. In particular, we showed that LNA-mediated silencing of miR-199a-5p strongly inhibited TGF β -induced differentiation of lung fibroblasts into myofibroblasts (Figure 8C and S6), SMAD signaling (Figure 8D) and stimulation of wound repair (Figure 8E and 8F). Remarkably, similar results were obtained using CAV1 protector, demonstrating therefore that miR-199a-5p is a key effector of TGF β response through CAV1 regulation (Figure 8C, 8D, 8E, 8F and S6).

MiR-199a-5p is dysregulated in mouse models of kidney and liver fibrosis.

A growing body of evidence suggests that miRNAs contribute to the fibrotic process in various organs such as heart, kidneys, liver or lungs. For example, previous reports have shown that miR-21 has an important role in both pulmonary and heart fibrosis experimental mouse models. Thus, we investigated whether miR-199a-5p was also dysregulated in other fibrotic tissues, namely kidney fibrosis and liver fibrosis. To this end, we assessed the overlap between the miRNA expression profiles corresponding to three experimental models

of fibrosis. Measurements were made using the same miRNA based platform. We identified 5 miRNAs commonly dysregulated at a p-value of less than 0.01 (Figure 9A). Among these miRNAs, 3 were downregulated (miR-193, miR-30b and miR-29c) and 2 were upregulated (miR-199a-3p and miR-199a-5p) (Figure 9B).

The enhanced expression of miR-199a-5p was confirmed in two independent experimental models of liver fibrosis (Figure 10A-C) and was correlated with the severity of liver fibrosis, as BALB/C mice have a more pronounced liver fibrosis than C57BL/6 mice, following administration of CCL₄ (Figure 10A and 10B). In addition, miR-199a-5p was significantly decreased during regression of experimental CCL₄-induced liver fibrosis (Figure 10D). Furthermore, we showed that TGF β exposure of stellate cells was associated with an increase of miR-199a-5p expression and a decrease of CAV1 expression level (Figure 10E and 10F). Interestingly, enhanced expression of miR-199a-5p was also observed in clinical samples from patients with liver fibrosis (Figure S13).

Similarly, data obtained from the unilateral ureteral obstruction model of kidney fibrosis showed an enhanced expression of miR-199a-5p in the injured kidney compared to sham operated mice (Figure 11A). Interestingly, as for lung fibrosis, kidney expression of miR-199a-5p was correlated with disease progression. As depicted in Figure 11B, *in situ* hybridization performed 28 days after surgery (i.e. when the fibrosis is established) showed no detectable signal for miR-199a-5p in normal kidney, whereas the hybridization signal was greatly enhanced throughout the injured kidney in area consistent with (myo)fibroblasts. Furthermore, immunohistochemistry of CAV1 performed on fibrotic kidney from mice 28 days after surgery showed a marked reduction of CAV1 in fibrotic area of the kidney (Figure 11C).

Discussion

MiRNA expression profiling using high-throughput genomic approaches has provided important new insights into the pathogenesis, classification, diagnosis, stratification, and prognosis of many human diseases including tissue fibrosis [15,35,36]. In particular, such approaches have been previously successfully applied to IPF, revealing miR-21 and let-7d as important contributors to the lung fibrosis process [13,14]. Our work represents however, to our knowledge, the first analysis of miRNAs involved into the differential susceptibility of two murine strains to bleomycin-induced lung fibrosis. The identification of a specific miRNA profile associated with bleomycin-sensitive animals suggests the functional importance of these dysregulated miRNAs during the pathogenic processes leading to lung fibrosis. MiR-199a-5p appeared as the most statistically significant and was well correlated to IPF progression. Thus, altered expression of miR-199a-5p is likely to represent a primary pathogenic mechanism in the development of lung fibrosis rather than a secondary effect of the long-standing disease process. Other miRNAs candidates including miR-214, clustered with miR-199a-2 on mouse chromosome 1 as well as previously fibrotic-associated miRNAs, including miR-221-222 and miR-449a [37,38] also showed an enhanced expression in the lung fibrosis-susceptible mice. These miRNAs need to be further analyzed in IPF samples, as previous studies have shown their implication in the regulation of the stress response or the cell cycle / apoptosis balance in the epithelial or fibroblast compartment [38–41].

MiR-199a is an evolutionary conserved small RNA initially identified in the context of inner ear hair cells development and chondrogenesis [42–44] and numerous reports have now shown its implication in various tumor types [45–47]. In the context of tissue fibrosis, both mature forms of miR-199a (i.e., miR-199a-5p and miR-199a-3p) have been associated with the progression of liver fibrosis in both humans and mice [48,49]. While our data also showed an enhanced pulmonary expression of these two miRNA in the bleomycin-induced mouse model, expression of miR-199a-5p was more significant in IPF samples (Table S3). This led us to investigate in depth miR-199a-5p profibrotic effects.

In a recent report describing the miRNA expression profile of lung fibroblasts, miR-199a-5p was found to be highly expressed [25]. Our present data further establish stromal cells as the primary source of miR-199a-5p in the injured lungs and also suggests that miR-199a-5p is involved in the profibrotic effects mediated by pulmonary fibroblasts. A combination of *in silico* and experimental data, described in [25,26,40], identified the transcripts affected by miR-199a-5p in lung fibroblasts. Functional annotations of the miR-199a-5p experiments highlighted terms such as “Integrin Signaling” and “Caveolar-mediated Endocytosis Signaling”. Among the set of transcripts that were down-regulated after ectopic expression of miR-199a-5p, we then restricted our work to a group of 21 miR-199a-5p

targets predicted by 3 independent algorithms, showing the largest modulation factors and smallest statistical p-values. Interestingly, this short list included CAV1, a structural component of caveolae, previously associated with lung fibrosis [14,18,19].

Caveolae refer to 50-100 nanometers small bulb-shaped invaginations of the plasma membrane. They exert major biological functions in numerous cellular processes such as membrane trafficking or cell signaling [50]. CAV1 and CAV2, the main coat proteins of caveolae, are relatively highly expressed in endothelial cells and fibroblasts of pulmonary origin [51]. Caveolae role is particularly important in the context of TGF β signaling. Whereas TGF β receptor endocytosis via clathrin-coated pit-dependent internalization promotes TGF β signaling, the lipid raft-caveolar internalization pathway facilitates the degradation of TGF β receptors, therefore decreasing TGF β signaling [52]. Previous studies have shown that a reduced CAV1 expression in lung fibroblasts contributes to IPF pathogenesis by promoting TGF β profibrotic effects [19]. In line with this, we provide evidence that miR-199a-5p can directly repress CAV1 in lung fibroblasts, thereby stimulating their proliferation, migration, invasion and differentiation into myofibroblasts (Figure 12). Additionally, we showed in a large cohort of IPF patients an enhanced expression of miR-199a-5p that was reproduced in three independent mouse models of fibrosis as well as a decreased expression of CAV1.

MiRNAs, by affecting the expression of multiple genes, can act as master regulators of complex biological processes and aberrant expression of miRNA is known to have a profound impact on various distinct biological pathways. Thus, the elucidation of the critical genes and relevant pathways/networks modulated by miRNAs is important to understand the mechanisms by which miRNAs exert their pathogenic effects. Our systematic analysis of the gene expression profiles of lung fibroblasts overexpressing miR-199a-5p led to the identification of a large number of transcripts that were significantly modulated by this miRNA. These experiments establish that miR-199a-5p is directly or indirectly involved in the regulation of genes previously associated with lung fibrosis: CCL2, a potent mononuclear cell chemoattractant, PLAU [53], a component of the fibrinolysis system, TGFBR1, the TGF β receptor type I [54], MMP3 [55] and CAV2 [56]. Interestingly, these regulations were independent of CAV1 targeting, suggesting therefore that miR-199a-5p modulates the expression of several components of various distinct biological pathways to elicit, in lung fibroblasts, a profibrotic response.

Before this study, miR-21 was clearly established as an effector of TGF β signaling, able to promote fibroblast proliferation and differentiation into myofibroblasts [57]. In the context of lung fibrosis, miR-21 has been described to mediate lung fibroblast activation and fibrosis [14]. MiR-199a-5p and miR-21 exert indeed similar pro-fibrotic effects on lung fibroblasts. This is further demonstrated by overexpression of miR-21 and miR-199a-5p, which induce lung fibroblast migration to a similar extent (Figure S14). Interestingly, while

both miRNAs appear as TGF β effectors, the comparison of their associated transcriptomic signature indicated a limited overlap (Figure 2A). Moreover, CAV1 expression is unaffected by overexpression of miR-21 in lung fibroblasts, suggesting that both miRNAs, in response to TGF β , modulate distinct signaling pathways to produce cooperative effects involved in fibroblast activation.

The mechanisms involved in the TGF β -dependent modulation of miR-21 and miR-199a-5p are also of particular interest. While both miR-21 and miR-199a-5p have been shown to be regulated by TGF β , their expression may be primarily regulated through a Smad-dependent post-transcriptional mechanism promoting miRNA maturation by Drosha [58,59]. Our data showing that both pri-miRNA-199a1 and pri-miRNA-199a2 are significantly upregulated in bleomycin-treated mice (Figure S2B) and TGF β -stimulated fibroblasts (Figure S15) suggest that additional TGF β -dependent transcriptional regulations occur that need to be fully analyzed.

Finally, our observation that miR-199a-5p is also dysregulated in two additional experimental models of tissue fibrosis (i.e. kidney fibrosis and liver fibrosis) establishes miR-199a-5p as a ubiquitous factor associated with tissue fibrogenesis. The recently reported association of CAV1 with kidney fibrosis [60,61], together with the exclusive distributions of miR-199a-5p and CAV1 in the injured kidney, leads us to hypothesize that miR-199a-5p also controls CAV1 expression in kidney, thus contributing to kidney fibrosis. Further information came from the liver fibrosis model. As liver fibrosis can regress after cessation of the triggering injury, even at advanced fibrotic stages [62], the decrease of miR-199a-5p observed during resolution of liver fibrosis sets for the first time a specific miRNA as an important player for orchestrating the molecular events occurring during regression of liver fibrosis. Importantly, this implies that therapeutic strategies based on modulation of miRNAs have a potential to prevent liver fibrosis progression but also to resolve liver fibrosis.

In conclusion, the results of this study further underline the pivotal roles of miRNAs in mediating changes in gene expression and cell functions occurring during pulmonary fibrosis. In particular, our results identified miR-199a-5p as a new determinant of tissue fibrosis. Thus, strategies to prevent the up-regulation of miR-199a-5p may represent a new effective therapeutic strategy to treat fibroproliferative diseases.

Methods

Cell lines, reagents and antibodies.

Human normal pulmonary fibroblasts MRC-5 (CCL-171) and hFL1 (CCL-153), human lung cancer cell line A549 (CCL-185) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), frozen at an early passage and each vial used for experiments was cultured for a limited number of passages (<8). For maintenance, cells were cultured in DMEM/F12 medium containing 10% fetal calf serum (FCS), at 37°C with 5% v/v CO₂. Recombinant TGFβ was purchased from Sigma-Aldrich. The following monoclonal (mAbs) and polyclonal (pAbs) Antibodies were used: rabbit anti-CAV1 pAbs (sc-894) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), rabbit anti- β-Actin mAbs (13E5) (Cell Signalling), mouse anti-alpha SMA mAbs (1A4) (Dako) for immunohistochemistry and (4A8-2H3) (Abnova) for Western Blot and immunocytofluorescence.

Animal treatment

All animal care and experimental protocols were conducted according to European, national and institutional regulations. Personnel from the laboratory carried out all experimental protocols under strict guidelines to insure careful and consistent handling of the mice.

Mouse model of lung fibrosis. 9–12 weeks old male C57BL/6 and BALB/C mice were purchased from Charles River, France. To induce fibrotic changes, mice were intratracheally instilled with bleomycin or PBS as previously described [25,63]. Briefly, mice were anesthetized with sevoflurane inhalation (Abbott) and placed in dorsal recumbency. Transtracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instillate bleomycin (0.75 unit/ml) or vehicle (PBS), in a volume of 80 µl. Mice were sacrificed 7 and 14 days after instillation and lungs were removed for further analysis. Expression analyses were performed on 5 mice per group except for the miRNA microarray experiment where 3 mice per group were used. Histological analyses and western blot were performed on 3 C57BL/6 mice.

Mouse model of kidney fibrosis. 9–12 weeks old male C57BL/6 mice were purchased from Charles River, France. Mice underwent anesthesia by intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg body wt). After a standard laparotomy, the left proximal ureter was exposed and ligatured with 4-0 silk at two points. The sham operation consisted of a similar identification of the left ureter, but ligature of the ureter was not performed. Expression

analyses were performed on 4 to 7 mice per group. For the histological analyses, 2 to 3 mice were used.

Mouse model of liver fibrosis. 6–8 weeks old male C57BL/6 and BALB/C mice were purchased from Jackson laboratory (Bar Harbor). To induce liver fibrosis, mice received 0.6 ml/kg body weight of CCl₄ (Merck) mixed with corn oil (Sigma life science) intraperitoneally as previously described [64]. Bile duct ligation (BDL) was performed by exposing the common biliary duct and double-ligaturing it, then cutting through between the ligations as described in [64]. For fibrosis regression mice were treated for 6 weeks with CCl₄ as described above and sacrificed 2 or 4 weeks respectively after the end of treatment. For CCl₄ induced liver fibrosis mouse model, expression analyses were performed on 5 mice whereas 4 mice were used for bile duct ligation.

Isolation of primary stellate cells

Primary stellate cells were isolated from C57BL/6 mice at the age of 40 to 55 weeks and stimulated with 20 ng/ml of TGF- β (Sigma Aldrich) for 48 h as previously described [64].

Human lung tissue

Flash frozen lung tissue from 94 human subjects with IPF and 83 control subjects with no chronic lung disease were obtained from the Lung Tissue Research Consortium (LTRC). These diagnoses were made using ATS/ERS guidelines [65,66] from review of clinical history, pathology, and radiology. All experiments were approved by the local Institutional Review Board at the University of Pittsburgh (IRB# 0411036). Clinical data were made entirely available to the investigators for review.

Paraffin lung sections from patients with IPF were obtained from Lille's Hospital. Experiments were approved by the institutional review board of Lille's Hospital.

Histopathology

Kidneys and lungs were fixed overnight with neutral buffered formalin and then embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were mounted and stained with hematoxylin and eosin as well as Masson's trichrome to assess the degree of fibrosis. Histologic sections were reviewed by an experienced pathologist.

RNA isolation

Total RNA were extracted from lung tissue and cell samples with TRIzol solution (Invitrogen). Integrity of RNA was assessed by using an Agilent BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies) (RIN above 7).

Microarrays

MiRNA microarrays of mice lungs. The oligonucleotide sequences corresponding to 2054 mature miRNAs found in the miRNA registry (Release 8.2 [67]) are available on <http://www.microarray.fr:8080/merge/index> (follow the link to “microRNA”: platform referenced in GEO as GPL4718). Three biological replicates were performed for each comparison. The experimental data and microarray design have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under serie GSE34812. The experimental design used a dye-swap approach, so that each mouse probe, printed 8 times on the microarray was measured independently 16 times for each sample. Target preparation and array hybridization were performed as previously described [24–26].

MiRNA microarray analysis of human lungs. A microRNA microarray analysis was done as previously described by us [13]. Briefly, 100 ng of total RNA was labeled and hybridized onto the Agilent microRNA Microarray Release 16.0, 8x60K. After washing, the arrays were scanned using the Agilent Microarray Scanner. The scanned images were processed by Agilent’s Feature Extraction software version 9.5.3. MicroRNA microarray data analysis was done using GeneSpring v11.5 and BRB-ArrayTools v4.1 developed by Dr. Richard Simon and the BRB-ArrayTools Development Team. The data were quantile normalized. MicroRNA microarray data are publically available through the Lung Genomics Research Consortium (LGRC) website (lung-genomics.org).

Expression microarrays. For gene expression arrays RNA samples were labeled with Cy3 dye using the low RNA input QuickAmp kit (Agilent) as recommended by the supplier. 825 ng of labeled cRNA probe were hybridized on 8x60K high density SurePrint G3 gene expression mouse or human Agilent microarrays. Two (human *in vitro* experiments) or five (*in vivo*-derived samples) biological replicates were performed for each comparison. The experimental data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under SuperSerie record GSE34818 (series GSE34812 and GSE34814 for miRNA and mRNAs responses to bleomycin instillation, respectively; serie GSE34815 for miRNA / siRNA transfection experiments in human fibroblasts hFL1). For the human gene expression arrays, the data was log₂ transformed and normalized using a cyclic loess algorithm in the R programming environment as previously described [68]. The human microarray data has been made available at the LTRC (ltrcpublic.org) and the LGRC websites as part of the LTRC protocol.

Statistical analysis and Biological Theme Analysis. Normalization was performed using the Limma package available from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Intra slide (for 2 colours dye-swap experiments only) and inter slide normalization was performed

using the Print Tip Loess and the quantile methods, respectively. Means of ratios from all comparisons were calculated and B test analysis was performed. Differentially expressed genes were selected using Benjamini-Hochberg correction of the p-value for multiple tests, based on a p-value below 0.05. Data from expression microarrays were analyzed for enrichment in biological themes (Gene Ontology molecular function and canonical pathways) and build biological networks built using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>) and Mediate (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index>) [69], an information system containing diverse information about probes and data sets. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was used to determine whether an *a-priori* defined set of genes can characterize differences between two biological states [34,70]. Hierarchical clusterings were done with the MultiExperiment Viewer (MeV) program version 4.3, using a Manhattan distance metric and average linkage.

MiRNA targets analysis. MiRonTop [29] is an online java web tool (available at <http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>) that integrates DNA microarrays data to identify the potential implication of miRNAs on a specific biological system. Briefly, MiRonTop ranks the transcripts into 2 categories ('Upregulated' and 'Downregulated'), according to thresholds for expression level and for differential expression. It then calculates the number of predicted targets for each miRNA, according to the prediction software selected (TargetsScan, MiRBase, PicTar, exact seed search: 2–7 or 1–8 first nucleotides of the miRNA, TarBase v1), in each set of genes. Enrichment in miRNA targets in each category is then tested using the hypergeometric function. The absence of siRNA off-target effect was checked in si-CAV1 transcriptome experiments using the Sylamer Tool [71].

Transfection and luciferase assays

Pre-miRNAs, LNA-based miRNA inhibitors, target site blocker and siRNAs transfection in lung fibroblasts. Pre-miR-199a-5p, pre-miR-21 and control miRNA (miR-Neg # 1) were purchased from Ambion. For miR-199a-5p knockdown and target site blocker experiments, anti-miR-199a-5p LNA, negative control anti-miR-159s LNA (miRCURY LNA Knockdown probes) and CAV1 protector were ordered from Exiqon. Si-RNA directed against CAV1 and control siRNA (Silencer Select validated siRNAs) were from Applied Biosystems. MRC5 / hFL1 cells were grown in 10% FCS in DMEM and transfected at 30 to 40% confluency in 6- 12- or 96 well plates using Lipofectamin RNAi MAX™ (Invitrogen) with pre-miRNA, siRNAs LNA inhibitors and CAV1 protector at a final concentration of 10 nM unless indicated.

Pre-miRNAs and psiCHECK™-2 plasmid constructs co-transfection. Molecular constructs were made in pSI-CHECK™-2 (Promega) by cloning behind the Renilla luciferase in the XhoI and NotI restrictions sites, annealed oligonucleotides derived from the

CAV1 3' UTR described below. Mutated nucleotides located in the miR-199a-5p-binding site are underlined. HEK293 cells were plated into 96-well and cotransfected using lipofectamin 2000™ (Invitrogen) with 0.2 µg of psiCHECK™-2 plasmid construct and pre-miR-199a-5p or control miRNA at different concentrations. 48 hours after transfection, Firefly and Renilla Luciferase activities were measured using the Dual-Glo™ Luciferase assay (Promega).

hsa-CAV1: WT (sense) :

TCGAGGACACTTTAATTACCAACCTGTTACCTACTTTGACTTTTTGCATTTAAAACAGACA
CTGGCATGGATATAGTTTTACTTTTTAACTGTGTACGC

hsa-CAV1: WT (reverse) :

GGCCGCGTACACAGTTTAAAAGTAAACTATATCCATGCCAGTGTCTGTTTTAAATGCAA
AAAGTCAAAGTAGGTAACAGGTTGGTAATTAAGTGTCC

hsa-CAV1: MUT (sense) :

TCGAGGACACTTTAATTACCAACCTGTTACCTACTTTGACTTTTTGCATTTAAAACAGAGA
GTCGCATGGATATAGTTTTACTTTTTAACTGTGTACGC

hsa-CAV1: MUT (reverse) :

GGCCGCGTACACAGTTTAAAAGTAAACTATATCCATGCGACTCTCTGTTTTAAATGCAA
AAAGTCAAAGTAGGTAACAGGTTGGTAATTAAGTGTCC

Smad reporter Assay. MRC5 cells were seeded in 96 well plate and cotransfected 24h later at 40% confluency using RNAi MAX lipofectamine reagent with 100ng SMAD reporter vector (Signal Smad reporter,- QIAGEN) and 10nM LNA-control, LNA-199a-5p or CAV1 protector. Twenty four hours after transfection, cells were serum starved 3h before adding 10ng/ml TGFβ. Cells were lyzed and Glo luciferase assay (Promega) was performed 24h following TGFβ exposure.

Quantitative RT-PCR

Mature miRNA expression. MiR-199a-5p expression was evaluated using TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) as specified in their protocol. Real-time PCR was performed using Universal Master Mix (Applied Biosystems) and ABI 7900HT real-time PCR machine. Expression levels of mature microRNAs were evaluated using comparative CT method ($2^{-\text{deltaCT}}$).

Pri-miRNA expression. Pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2 expression were evaluated using TaqMan pri-microRNA Assay (Applied Biosystems) following manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed using TaqMan gene expression Master Mix (Applied Biosystems) and ABI 7900HT real-time PCR machine. Expression levels of pri-miRNAs were evaluated using comparative CT method ($2^{-\text{deltaCT}}$).

Gene expression. Expression levels of both human and mouse CAV1, human COL1A1 were analyzed using TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and ABI 7900HT real-time PCR machine. Expression levels were evaluated using comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$). For normalization, transcript levels of RNU44 (human samples) and sno202 (mouse samples) were used as endogenous control for miRNA real time PCR. Transcript levels of PPIA (human and mouse samples) were used as endogenous control for gene/pri-miRNA expression.

Protein extraction and immunoblotting.

Cells or tissues were lysed in lysis buffer (M-PER protein extraction reagent for cells, T-PER protein extraction reagent for tissues) and protease inhibitors cocktail (Pierce). The lysates were quantified for protein concentrations using the Bradford assay (Biorad). Proteins (10 µg per sample) were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). The membranes were blocked with 5% fat free milk in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and subsequently incubated with CAV1, α-SMA or β-actin primary antibodies overnight at 4°C. After washing with TBS-T for 30 minutes at room temperature, the membrane was further incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1.5 hours, followed by 30 minutes of washing with TBS-T. Protein bands were visualized with Amersham ECL substrates (GE Healthcare).

Immunohistochemistry

Five-µm paraffin-embedded sections were sequentially incubated in xylene (5 minutes twice), 100% ethyl alcohol (5 minutes twice), 95% ethyl alcohol (5 minutes twice), and 80% ethyl alcohol (5 minutes). After washing with water, the sections were antigen-retrieved using citrate buffer (pH 6.0; DAKO) in a steamer for 20 minutes and cooled to ambient temperature. Sections were then washed with TBS-T and quenched with 3% hydrogen peroxide in TBS for 10 minutes, blocked for avidin/biotin activity, blocked with serum-free blocking reagent, and incubated with primary antibody as follows: for CAV1 staining, sections were incubated with antibody for 1 hour at ambient temperature; for alpha-SMA staining, sections were incubated with antibody overnight at 4°C. Immunohistochemical staining was developed using the DAB substrate system (DAKO).

***In situ* hybridization**

In situ hybridization of miR-199a-5p was performed using double DIG-labeled LNA probes (Exiqon, Woburn, MA). Paraffin-embedded mouse tissues were dewaxed in xylene

and rehydrated in descending grades of alcohol. The slides were then washed in PBS (pH 7.5) and permeabilized by incubating for 15 min in proteinase K (Ambion) for 15 min at 37°C. The slides were again washed in PBS, and prehybridized in hybridization buffer (50% formamide, 5× SSC, 0.1% Tween-20, 9.2 mM citric acid, 50 µg/ml heparin, and 500 µg/ml yeast RNA, pH 6) in a humidified chamber. The double DIG-labeled LNA probes were then added to the sections at a 80 nM concentration and incubated 2 hours at 50°C in a humidified chamber. The slides were rinsed in 5× SSC, 1× SSC and 0.2 X SSC solutions at the same hybridization temperature. This step was followed by blocking with 2% sheep serum, 2 mg/ml BSA in PBS + 0.1% Tween-20 (PBST) and incubation with anti-DIG-AP Fab fragments antibody (1:800) (Roche Applied Sciences) for 2 hours at room temperature. After washing in PBST, the color reaction was carried out by incubation in 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) color solution (Roche Applied Sciences) with 1 mM levamisole overnight at room temperature. The color reaction was stopped after observation of sufficient development of blue precipitate by washing with PBST. The slides were then counterstained with Fastred (Sigma Aldrich), mounted and coverslipped.

Immunofluorescence analysis.

MRC5 cells were grown on a Round Glass Coverslips Ø 16mm (thermo scientific) placed inside a 12 Multiwell Plate. Coverslips slides were washed in phosphate-buffered saline and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, cells were then permeated using 0.1% Triton X-102 (Agilent Technologies) for 10 min. and blocked with PBS solution containing BSA (3%) for 30 min. Incubation with primary antibodies was performed in a blocking solution BSA (1%) at 37°C for 1h at the following dilutions; α-SMA (1:1000), CAV1 (1:50),. After three washes with PBS, cells were incubated with secondary Alexa Fluor 488 goat anti-Mouse IgG (Invitrogen) (1:500), Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) (1:500) and Alexa Fluor® 647 Phalloidin (A22287 - Life technologies) (1Unit/slide). Fourty five min later, Coverslips slides were fixed on microscope slides using ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen). Fluorescence was viewed with an FV10i Olympus confocal scanning microscope.

Cell proliferation assay.

MRC5 cells (150,000/well) were seeded in duplicate in DMEM supplemented with 10% FBS on 60-mm cell culture dishes. Cells were serum starved the next day and transfected with pre-miR-199a-5p at 10 nM. Cell proliferation was assessed 48h after transfection by flow cytometry using the click-iT EdU cell proliferation assay (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

***In vitro* wound healing assay.**

hFL1 cells were seeded on Type-I collagen coated 12-well plates and transfected as described above. Forty eight hours after transfection, confluent cells were (FCS) starved 3h before adding 10ng/ml TGF β and wounded using a pipet tip. The *in vitro* wound-healing process was then recorded by videomicroscopy for 24 h from then scratching on an Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss) equipped with 37°C and 5% CO₂ regulated insert (Pecon GmbH). Brightfield images were taken each 30 min through a 10 \times phase contrast objective with a CoolSNAPHQ CCD Camera managed by Metamorph Software (Roper Scientific). The motility of the cells was assessed by evaluating the repaired area percentage using ImageJ software.

Invasion assay.

Invasion of MRC5 fibroblast overexpressing miR-199a-5p was assessed using commercially available 24-well BioCoat Matrigel Invasion Chamber (BD Biosciences). In brief, pulmonary fibroblasts were transfected either with pre-miR-199a-5p or negative control as described above. 24h after transfection, cells were harvested with trypsin-EDTA, centrifuged, and resuspended in DMEM medium. Cell suspensions (1×10^5 cells/well) were added to the upper chamber. Bottom wells of the chamber were filled with DMEM medium containing 10% FBS as chemoattractant, whereas the upper chamber was filled with DMEM only. After incubation for 48h at 37°C, the non-invading cells on the top of the membrane were removed with a cotton swab. Membrane containing invading-cells were fixed with methanol, washed three times with PBS and mounted with DAPI hard set (Vector Laboratories) onto glass slides for fluorescent microscopy.

Statistical analysis

Results are given as mean \pm S.E.M. Statistical analyses were performed by using Student's t-test as provided by Microsoft Excel™.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the outstanding technical support of Brigitte Hémon, Vivianne Gnemmi, Belinda Ringot, Grégoire Savary, David Vargas Cardenas, the staff in the Histology Department at Lille's University and the excellent support of the Nice-Sophia Antipolis Functional Genomics Platform.

Supported in part by the following grants : Fondation pour la Recherche Médicale Région Nord-Pas-de-Calais (NP), Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer (NP), Conseil Régional du Nord Pas de Calais (NP, CC, JML), ANR-09-JCJC-0002 (MP, PB), ARC grant n° SFI20101201798 (PB, BM), IRENI (JML), European Union Research Framework Programme 7, project HEALTH-2007-201279/Microenvimet (PB, BM), NIH grants RO1HL095397, RC2HL101715 and RO1LM009657 (NK, JT, JM). ISH is a recipient of a doctoral fellowship from the "region PACA" (bourse Région-Entreprise).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Author contributions

NP and BM conceived the project; NP, BM, NK and PB wrote the paper; NP, BM, CR, NK, TL, MP, CC and PB designed the experiments and analyzed the data; CLLC performed the bleomycin-induced mice experiments, CR performed the liver fibrosis mice experiments, SA performed the kidney fibrosis mice experiments and SA analyzed mice histological sections; BW, MCC, JT, JM and NK provided and analyzed the human biopsies; ISH, NP, EC, ED, JM, BrM, CLLC, FG and JML performed the other experiments; NP and BM supervised the project.

Reference List

1. Wynn TA (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117: 524-529.
2. Wilson MS, Wynn TA (2009) Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2: 103-121.
3. Kis K, Liu X, Hagood JS (2011) Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease. *Expert Rev Mol Med* 13: e27.
4. Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862.
5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
6. Griffiths-Jones S (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 342: 129-138.
7. Sayed D, Abdellatif M (2011) MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 91: 827-887.
8. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269.
9. Sheedy FJ, O'Neill LA (2008) Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3: iii50-iii55.
10. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Gibson WS, Balazs AB, Baltimore D (2010) MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14235-14240.
11. Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van RE, Olson EN (2010) Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 18: 282-293.
12. Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De LL, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson DM, Jr., Hofmainster C, Alder H, Garofalo M, Di LG, Volinia S, Lin HJ, Perrotti D, Kuehl M, Aqeilan RI, Palumbo A, Croce CM (2010) Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 18: 367-381.
13. Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, Yarlagaadda M, Tzouveleakis A, Gibson KF, Konishi K, Yousem SA, Singh M, Handley D, Richards T, Selman M, Watkins SC, Pardo A, Ben-Yehudah A, Bouros D, Eickelberg O, Ray P, Benos PV, Kaminski N (2010) Inhibition and role of *let-7d* in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 220-229.
14. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, Kaminski N, Abraham E (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 207: 1589-1597.

15. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456: 980-984.
16. Lawson WE, Blackwell TS, Gauldie J (2011) Let It Be: microRNAs Impact Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 1-2.
17. Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N (2011) MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* 157: 191-199.
18. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452.
19. Wang XM, Zhang Y, Kim HP, Zhou Z, Feghali-Bostwick CA, Liu F, Ifedigbo E, Xu X, Oury TD, Kaminski N, Choi AM (2006) Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 203: 2895-2906.
20. Shivshankar P, Brampton C, Miyasato S, Kasper M, Thannickal VJ, Jourdan Le SC (2012) Caveolin-1 Deficiency Protects from Pulmonary Fibrosis by Modulating Epithelial Cell Senescence in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* .
21. Yamaguchi Y, Yasuoka H, Stolz DB, Feghali-Bostwick CA (2011) Decreased caveolin-1 levels contribute to fibrosis and deposition of extracellular IGFBP-5. *J Cell Mol Med* 15: 957-969.
22. Schrier DJ, Kunkel RG, Phan SH (1983) The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 127: 63-66.
23. Haston CK, Amos CI, King TM, Travis EL (1996) Inheritance of susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the mouse. *Cancer Res* 56: 2596-2601.
24. Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, Cardinaud B, Maurin T, Barbry P, Baillat V, Reynes J, Corbeau P, Jeang KT, Benkirane M (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315: 1579-1582.
25. Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puissegur MP, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, Bertero T, Lino Cardenas CL, Courcot E, Rios G, Fourre S, Lo-Guidice JM, Marcet B, Cardinaud B, Barbry P, Mari B (2009) Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One* 4: e6718.
26. Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, Maurin T, Lebrigand K, Cardinaud B, Hofman V, Fourre S, Magnone V, Ricci JE, Pouyssegur J, Gounon P, Hofman P, Barbry P, Mari B (2011) miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* 18: 465-478.

27. Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G (2011) Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: Role of miR-21. *Am J Physiol Renal Physiol* .
28. Li S, Liang Z, Xu L, Zou F (2011) MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. *Mol Cell Biochem* .
29. Le BK, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbry P (2010) MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* 26: 3131-3132.
30. Xia H, Khalil W, Kahm J, Jessurun J, Kleidon J, Henke CA (2010) Pathologic caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 176: 2626-2637.
31. Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M (2007) Loss of caveolin-1 in bronchiolization in lung fibrosis. *J Histochem Cytochem* 55: 899-909.
32. Tourkina E, Richard M, Gooz P, Bonner M, Pannu J, Harley R, Bernatchez PN, Sessa WC, Silver RM, Hoffman S (2008) Antifibrotic properties of caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L843-L861.
33. Kim HP, Choi AM (2008) Caveolin-1 stops profibrogenic signaling? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L841-L842.
34. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15545-15550.
35. Lu J, Getz G, Miska EA, varez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838.
36. Zhang C (2008) MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 33: 139-147.
37. Xie T, Liang J, Guo R, Liu N, Noble PW, Jiang D (2011) Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis identifies multiple sites of molecular regulation. *Physiol Genomics* 43: 479-487.
38. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N (2012) MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* .
39. Lize M, Pilarski S, Dobbelstein M (2010) E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 17: 452-458.
40. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, Giovannini-Chami L, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Waldmann R, Kodjabachian L, Barbry P (2011) Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 13: 693-699.

41. Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham RM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ (2008) MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 68: 425-433.
42. Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK (2007) MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15144-15149.
43. Friedman LM, Dror AA, Mor E, Tenne T, Toren G, Satoh T, Biesemeier DJ, Shomron N, Fekete DM, Hornstein E, Avraham KB (2009) MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7915-7920.
44. Lin EA, Kong L, Bai XH, Luan Y, Liu CJ (2009) miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem* 284: 11326-11335.
45. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM (2008) MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 111: 3183-3189.
46. Iorio MV, Visone R, Di LG, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67: 8699-8707.
47. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM (2010) Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 11: 136-146.
48. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K (2011) The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One* 6: e16081.
49. Kanda T, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mishima T, Kosuge T, Mizuguchi Y, Shimizu T, Arima Y, Yokomuro S, Yoshida H, Tajiri T, Uchida E, Takizawa T (2010) Identification of obstructive jaundice-related microRNAs in mouse liver. *Hepatology* 57: 1013-1023.
50. Severs NJ (1988) Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci* 90 (Pt 3): 341-348.
51. Williams TM, Lisanti MP (2004) The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 36: 584-595.
52. Chen YG, Wang XF (2009) A special issue on TGF-beta signaling. *Cell Res* 19: 1-2.
53. Swaisgood CM, French EL, Noga C, Simon RH, Ploplis VA (2000) The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system. *Am J Pathol* 157: 177-187.

54. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, Murphy A, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, Protter AA, Gauldie J (2005) Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 889-898.
55. Yamashita CM, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, Briones N, Suzuki T, Campbell MN, Gauldie J, Radisky DC, Riches DW, Yu G, Kaminski N, McCulloch CA, Downey GP (2011) Matrix Metalloproteinase 3 Is a Mediator of Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* .
56. Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H, Jr., Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP (2002) Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22: 2329-2344.
57. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T (2011) Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 8.
58. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A (2008) SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454: 56-61.
59. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A (2010) Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol Cell* 39: 373-384.
60. Moore J, McKnight AJ, Simmonds MJ, Courtney AE, Hanvesakul R, Brand OJ, Briggs D, Ball S, Cockwell P, Patterson CC, Maxwell AP, Gough SC, Borrows R (2010) Association of caveolin-1 gene polymorphism with kidney transplant fibrosis and allograft failure. *JAMA* 303: 1282-1287.
61. Park HC, Yasuda K, Ratliff B, Stoessel A, Sharkovska Y, Yamamoto I, Jasmin JF, Bachmann S, Lisanti MP, Chander P, Goligorsky MS (2010) Postobstructive regeneration of kidney is derailed when surge in renal stem cells during course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F357-F364.
62. Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209-218.
63. Pottier N, Chupin C, Defamie V, Cardinaud B, Sutherland R, Rios G, Gauthier F, Wolters PJ, Berthiaume Y, Barbry P, Mari B (2007) Relationships between early inflammatory response to bleomycin and sensitivity to lung fibrosis: a role for dipeptidyl-peptidase I and tissue inhibitor of metalloproteinase-3? *Am J Respir Crit Care Med* 176: 1098-1107.
64. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53: 209-218.
65. Demedts M, Costabel U (2002) ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 19: 794-796.
66. Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phillips JA, III, Sporn TA, McAdams HP, Schwarz MI, Schwartz DA

- (2005) Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1146-1152.
67. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van DS, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140-D144.
 68. Wu W, Dave N, Tseng GC, Richards T, Xing EP, Kaminski N (2005) Comparison of normalization methods for CodeLink Bioarray data. *BMC Bioinformatics* 6: 309.
 69. Le BK, Barbry P (2007) Mediante: a web-based microarray data manager. *Bioinformatics* 23: 1304-1306.
 70. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34: 267-273.
 71. van DS, breu-Goodger C, Enright AJ (2008) Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. *Nat Methods* 5: 1023-1025.
 72. Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA (2010) Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* 152: 159-166.

Table 1. List of the main miR-199a-5p predicted targets significantly downregulated following miR-199-5p overexpression in human fibroblasts using the bioinformatics tool miRonTop (<http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>).

Symbol	Accession Number	Description	Av.Exp ¹	logFC ²
ARHGAP12 ³	NM_018287	Rho GTPase activating protein 12	11.12	-1.96
C17orf63	NM_018182	-	11.90	-1.58
CAV1 ³	NM_001753	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1)	15.28	-1.78
DDR1	NM_013993	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	9.57	-2.31
EPB41L1	NM_012156	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	12.88	-1.94
EXTL3	NM_001440	Exostoses (multiple)-like 3	13.66	-1.20
FZD6	NM_003506	Frizzled homolog 6	11.62	-2.07
IPO8	NM_006390	Importin 8	12.00	-2.09
KLHL3	NM_017415	Kelch-like 3	8.44	-1.32
KPNA4	NM_002268	Karyopherin alpha 4	13.44	-1.11
MAP3K11 ³	NM_002419	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	13.11	-2.77
MPP5 ³	NM_022474	Membrane protein, palmitoylated 5	11.76	-1.99
NLK	NM_016231	Nemo-like kinase	11.36	-1.63
PODXL	NM_001018111	Podocalyxin-like (PODXL)	11.21	-2.59
PPP1R2	NM_006241	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	11.29	-2.50
PXN	NM_002859	Paxillin	14.99	-1.41
RNF11	NM_014372	Ring finger protein 11	14.30	-1.09
ST6GAL1	NM_173216	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	10.67	-1.70
TAF9B	NM_015975	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	9.77	-2.25
VPS26A	NM_004896	Vacuolar protein sorting 26 homolog A	12.37	-1.60
ZNF706	NM_001042510	Zinc finger protein 706	8.15	-1.10

¹ logarithm (base 2) of the average intensity (AveExpr)

² logarithm (base 2) of the ratio of miR-199a-5p / miR-Neg (logFC)

³ Expression significantly down-regulated in bleomycin-treated C57BL/6 mice

Supporting information

Table S1. List of themes corresponding to “canonical pathways” annotations identified by Ingenuity Pathway Analysis in response to overexpression of miR-199a-5p or miR-21 in human pulmonary fibroblasts hFL1. Normal human pulmonary fibroblasts hFL1 were transfected with pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p or pre-miR-21 (n=2). RNA samples were harvested at 48 h post-transfection and expression profiles were determined with whole genome microarrays. The probability to obtain the number of genes in a certain pathway in the list of differentially expressed genes between either miR-199a-5p or miR-21 versus miR-Neg was compared with the representation of the same pathway among all the genes on the microarray ; $-\log_{10}$ of the Fisher’s exact probability is indicated. Significant pathways are shown in progressively brighter shades of orange according to their significance. ns= non significant.

Table S2. List of themes corresponding to “canonical pathways” annotations identified by Ingenuity Pathway Analysis in lungs from C57BL/6 mice treated with bleomycin. RNAs extracted from C57BL/6 mice lungs 14 days after instillation with bleomycin or PBS were analyzed with whole genome microarrays (n=5).The probability to obtain the number of genes in a certain pathway in the list of differentially expressed genes between bleomycin and PBS conditions was compared with the representation of the same pathway among all the genes on the microarray ; $-\log_{10}$ of the Fisher’s exact probability is indicated.

Table S3. Pulmonary expression of miR-199a-5p in 10 IPF and 10 controls (dataset GEO accession number GSE13316).

Table S4. List of the 133 genes modulated by miR-199a-5p in lung fibroblasts that are also dysregulated in lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin treatment.

Figure S1. Study schema

Figure S2. miR-199a-5p and pri-miR-199a expression in C57BL/6 mice 14 days following bleomycin exposure. (A) Real-time PCR was performed to confirm the enhanced expression of miR-199a-5p in lungs of C57BL/6 and BALB/C mice 14 days following bleomycin exposure on an independent set of mice (n = 5 mice in each group). Data are expressed as mean \pm SEM. *p < 0.05. (B) Pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2 gene expression in lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin instillation. n = 5 mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. *p < 0.05 and **p < 0.01.

Figure S3. miR-21 expression during bleomycin induced lung fibrosis. (A) Normalized fluorescence expression values of miR-21 in lungs from Balb/c and C57BL/6 mice in response to bleomycin at the indicated time points from microarrays experiments (n=3). Data are expressed as mean \pm SEM. **p < 0.01 (B) Real-time PCR was performed to confirm the enhanced expression of miR-21 in lungs of C57BL/6 and BALB/c mice 14 days following bleomycin exposure. n = 5 mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. ** p< 0.01. (C) Paraffin sections were prepared from C57BL/6 mice harvested 14 days following bleomycin intra-tracheal instillation. In situ hybridization was performed to show the localization of miR-21 in fibrotic area of the lungs (i-iv). Results represent one out of three independently performed experiments.

Figure S4. CAV1 is a direct target of miR-199a-5p. Co-transfection of pre-miR-199a-5p or pre-miR-Neg and human CAV1 3'UTR-derived psiCHECK™-2 construct in A549 cells show a significant decrease in normalized luciferase activity 48 h post-transfection. * p< 0.05.

Figure S5. Decreased CAV1 expression after transfection of MRC5 lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p. (A) MRC5 Lung fibroblasts that were transfected with 10 nM of pre-miR-199a-5p for 48h show a significant decrease in CAV1 expression as determined by real-time PCR. Data are expressed as mean \pm SEM. **p < 0.01. (B) Western blot analysis showing the downregulated expression of CAV1 protein after transfection of MRC-5 lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p. Data are representative of two independent experiments.

Figure S6. MiR-199a-5p mediates TGF β dependent differentiation of lung fibroblast into myofibroblasts through CAV1 regulation. Normal human pulmonary fibroblasts MRC5 were transfected with a control LNA inhibitor (LNA-CT), a LNA-miR-199a-5p inhibitor or a target site blocker directed against CAV1 3-UTR (CAV1 protector) (n=2). Protein samples were harvested at 48 h post-transfection and analyzed by western Blot for CAV1 and α SMA.

Figure S7. Pulmonary expression of CAV1 in BALB/c mice 14 days after bleomycin injection. Real-time PCR was performed to assess the expression of CAV1 in lungs of BALB/c mice 14 days following bleomycin exposure. n = 5 mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. n.s. = non significant.

Figure S8. *In Situ* Hybridization (ISH) staining of miR-199a-5p in IPF lung section. ISH was performed to determine the localization of miR-199a-5p in lung tissue of IPF patients from

paraffin lung sections. Experiments were performed twice. Scramble probe was used as a negative control.

Figure S9. Expression of ACTA2 and PPARG following overexpression of miR-199a-5p in lung fibroblasts. Microarray analysis of lung fibroblasts transfected with 10 nM of miR-199a-5p mimic or control reveals a significant increase of ACTA2 expression ($*p<0.05$), a hallmark of myofibroblast differentiation, as well as a significant decrease of PPARG expression ($**p<0.01$), a known inhibitor of myofibroblast differentiation. Data are expressed as mean of normalized fluorescence values \pm SEM.

Figure S10. Comparison of transcriptomic changes induced by miR-199a-5p and a siRNA directed against CAV1. Normal human pulmonary fibroblasts hFL1 were transfected with pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p as well as siCAV1 or a control siRNA ($n=2$). RNA samples were harvested at 48 h post-transfection and expression profiles were determined with pan genomic arrays. (A) Heatmap comparing the normalized log2 of the ratios between pre-miR-199a-5p versus pre-miR-Neg or si-CAV1 versus si-Neg signals. (B) Venn diagram comparing the set of down-regulated transcripts following miR-199a-5p and si-CAV1. Cut-offs for selection are equal to 7.0 for the log2 (signal), to 0.7 for the log2 (ratio), and to 0.05 for the adjusted p-value.

Figure S11. Comparison of gene expression changes between miR-199a-5p regulated genes in lungs fibroblasts and lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin injection. (A) Venn diagram showing the relationships of gene expression changes between miR-199a-5p transfected lung fibroblasts (two independent experiments) and lungs from C57BL/6 14 days after Bleomycin treatment ($n=5$ mice). The numbers of genes whose expression was differentially detected in each condition at $p<0.05$ are shown. Microarray analysis shows a significant reduction of CAV2 (B), TGFBR1 (C), CCL2 (D), ACTA2 (E) and MMP3 (F) expression in C57BL/6 mice treated with bleomycin for 14 days ($n = 5$) compared with control mice ($n = 5$). Data are expressed as mean \pm SEM. $** p<0.01$.

Figure S12. Profibrotic genes significantly modulated in lung fibroblasts by miR-199a-5p independently of CAV1 regulation. Lung fibroblasts were transfected by miR-199a-5p mimic, si-CAV1 or negative controls. Microarray analysis shows the expression of known profibrotic genes: TGFBR1 (A), MMP3 (B), CAV2 (C), PLAU (D) and CCL2 (E) 48h after transfection. Data are expressed as mean \pm SEM. $*p<0.05$, $**p<0.01$.

Figure S13. Enhanced expression of miR-199a-5p in clinical samples from patients with liver fibrosis. *In situ* hybridization assay was performed to determine the localization of miR-199a-5p in normal and fibrotic human livers. Results represent one out of three independent experiments.

Figure S14. Transfection of human lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p or pre-miR-21 increases cell motility. Scratch wound was induced in confluent cell monolayers plated on plastic and wound closure was measured using image J software (2 independent experiments).

Figure S15. Effect of TGF β on mature and pri-miRNAs forms of miR-199a in lung fibroblasts. HFL1 human fibroblasts were treated or not with 10nM TGF β for 48 hours. Real Time Taq Man PCR showing the levels of (A) mature miR-199a-5p and miR-199a-3p ; (B) pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2. n = 2. Data are expressed as mean \pm SEM *p < 0.05.

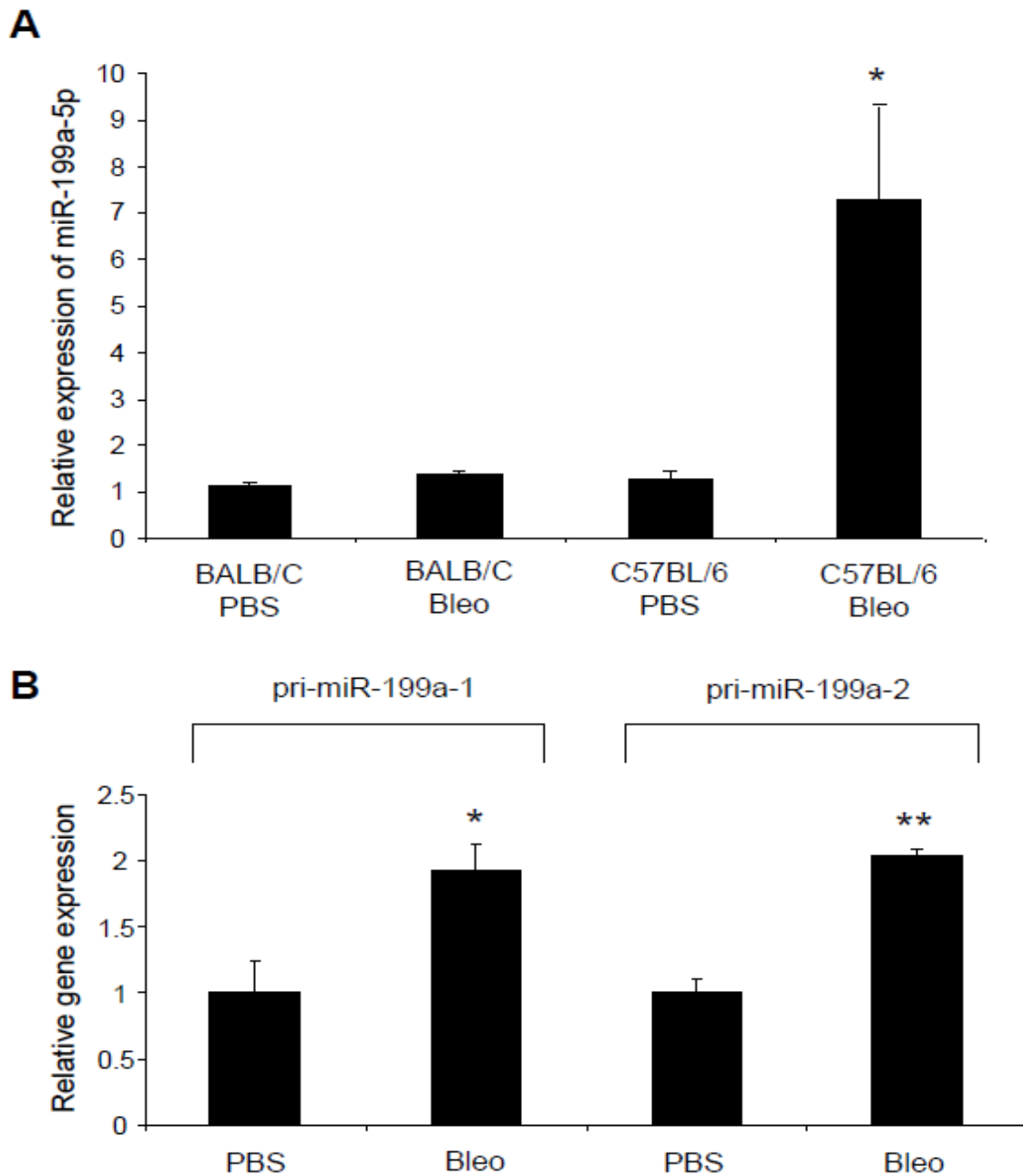


Figure S2.

miR-199a-5p and pri-miR-199a expression in C57BL/6 mice 14 days following bleomycin exposure. (A) Real-time PCR was performed to confirm the enhanced expression of miR-199a-5p in lungs of C57BL/6 and BALB/C mice 14 days following bleomycin exposure on an independent set of mice (n = 5 mice in each group). Data are expressed as mean \pm SEM. *p < 0.05. (B) Pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2 gene expression in lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin instillation. n = 5 mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. *p < 0.05 and **p < 0.01.

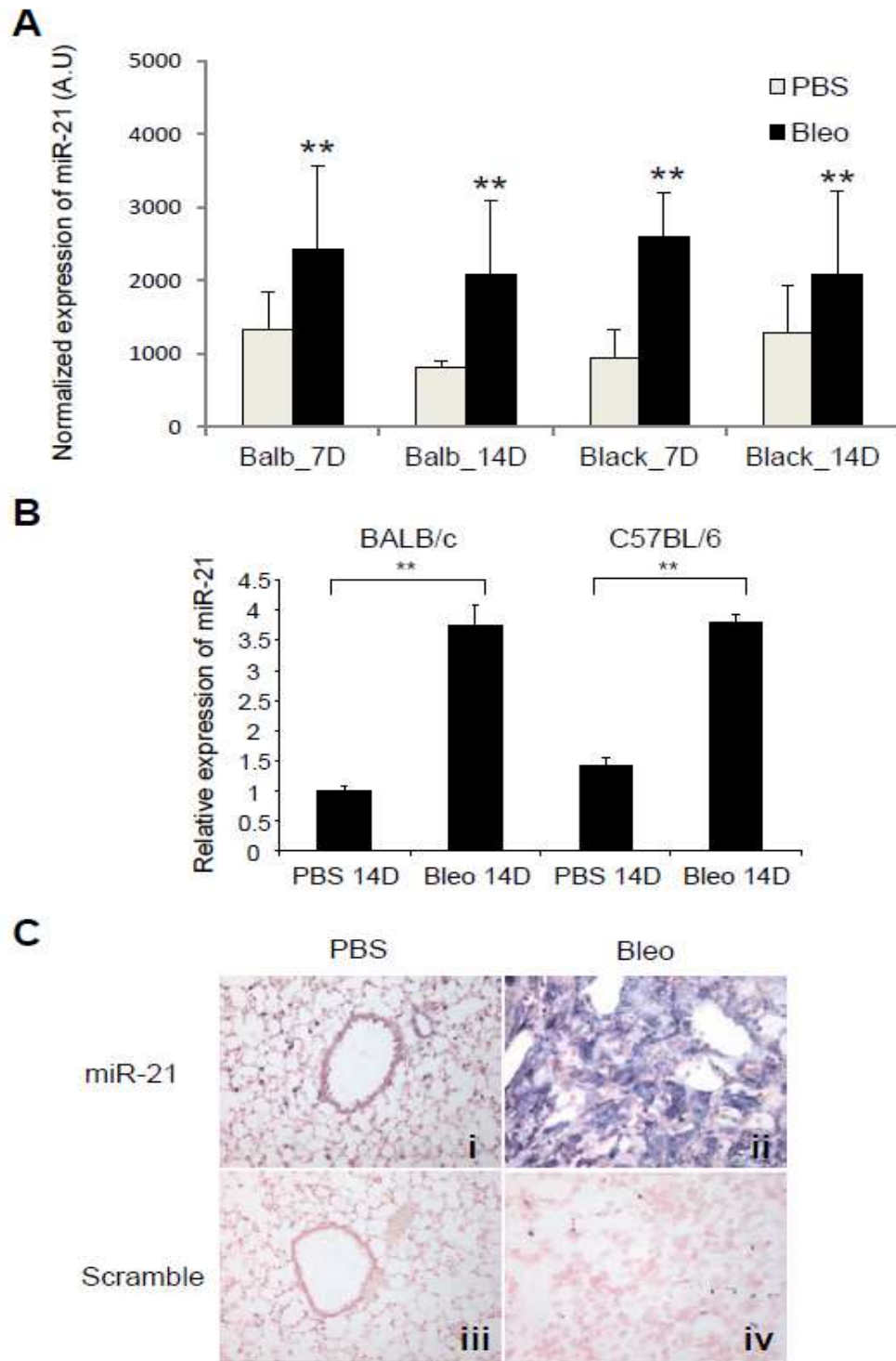


Figure S3.

miR-21 expression during bleomycin induced lung fibrosis. (A) Normalized fluorescence expression values of miR-21 in lungs from Balb/c and C57BL/6 mice in response to bleomycin at the indicated time points from microarrays experiments (n=3). Data are expressed as mean \pm SEM. **p < 0.01 (B) Real-time PCR was performed to confirm the enhanced expression of miR-21 in lungs of C57BL/6 and BALB/c mice 14 days following bleomycin exposure. n = 5 mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. ** p < 0.01. (C) Paraffin sections were prepared from C57BL/6 mice harvested 14 days following bleomycin intra-tracheal instillation. *In situ* hybridization was performed to show the localization of miR-21 in fibrotic area of the lungs (i-iv). Results represent one out of three independently performed experiments.

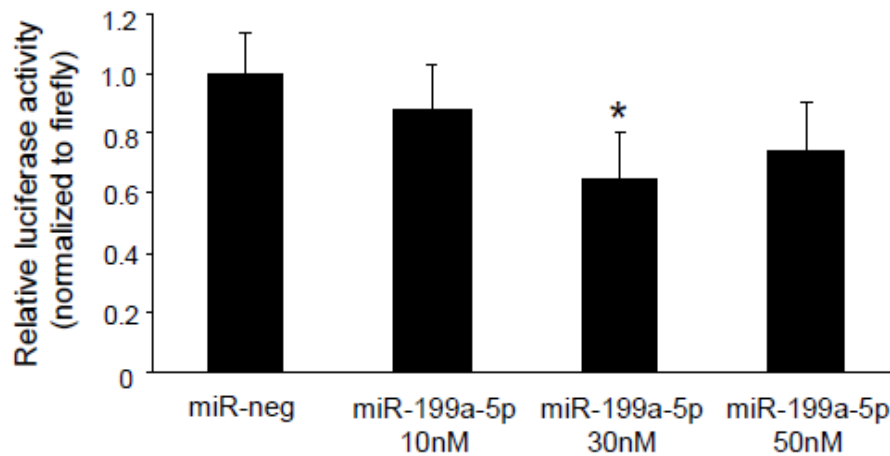


Figure S4.

CAV1 is a direct target of miR-199a-5p. Co-transfection of pre-miR-199a-5p or pre-miR-Neg and human CAV1 3'UTR-derived psiCHECK™-2 construct in A549 cells show a significant decrease in normalized luciferase activity 48 h post-transfection. * $p < 0.05$.

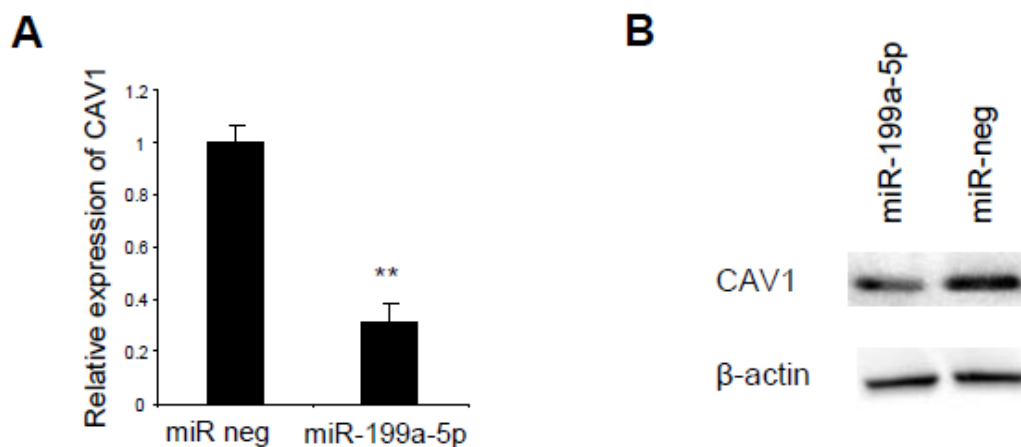


Figure S5.

Decreased CAV1 expression after transfection of MRC5 lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p. (A) MRC5 Lung fibroblasts that were transfected with 10 nM of pre-miR-199a-5p for 48h show a significant decrease in CAV1 expression as determined by real-time PCR. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$. (B) Western blot analysis showing the downregulated expression of CAV1 protein after transfection of MRC-5 lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p. Data are representative of two independent experiments

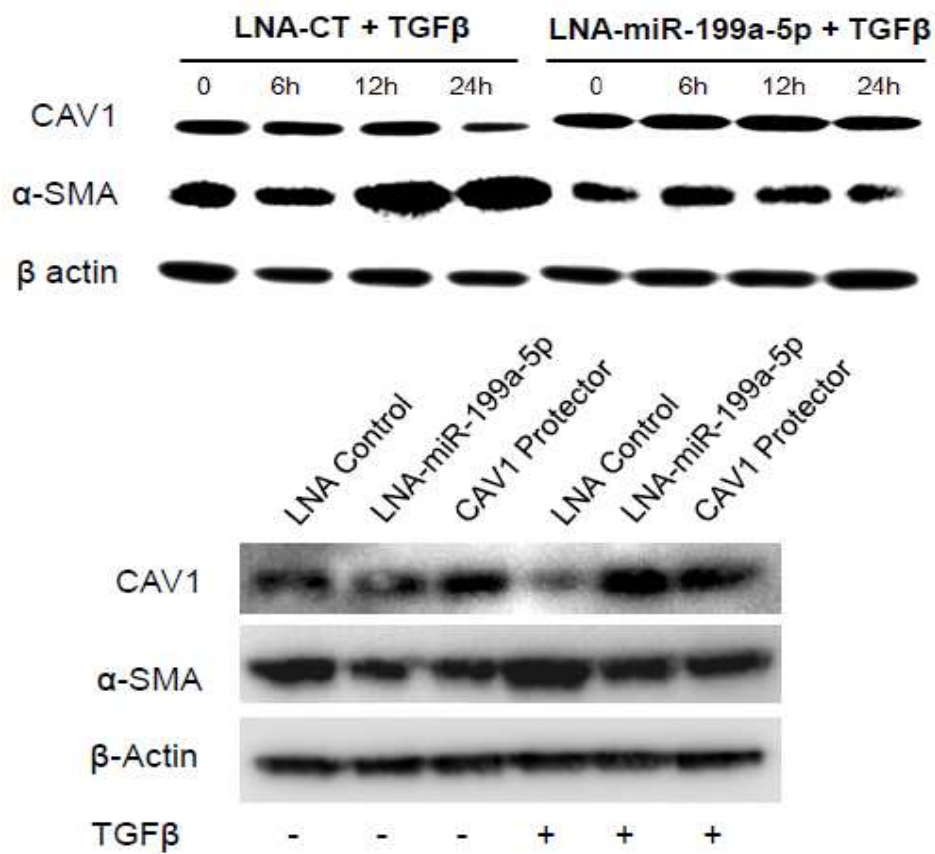


Figure S6.

MiR-199a-5p mediates TGFβ dependent differentiation of lung fibroblast into myofibroblasts through CAV1 regulation. Normal human pulmonary fibroblasts MRC5 were transfected with a control LNA inhibitor (LNA-CT), a LNA-miR-199a-5p inhibitor or a target site blocker directed against CAV1 3-UTR (CAV1 protector) (n=2). Protein samples were harvested at 48 h post-transfection and analyzed by western Blot for CAV1 and αSMA.

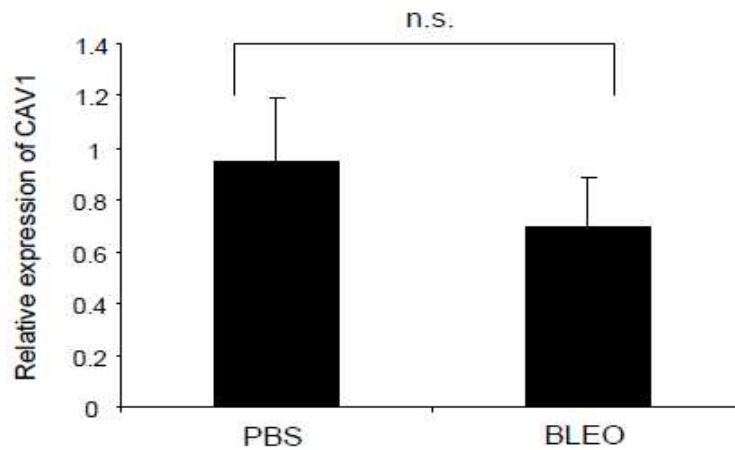


Figure S7.

Pulmonary expression of CAV1 in BALB/c mice 14 days after bleomycin injection. Real-time PCR was performed to assess the expression of CAV1 in lungs of BALB/c mice 14 days following bleomycin exposure. $n = 5$ mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. n.s. = non significant.

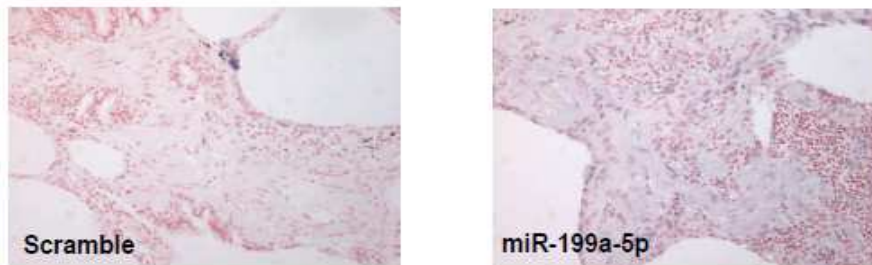


Figure S8.

In Situ Hybridization (ISH) staining of miR-199a-5p in IPF lung section. ISH was performed to determine the localization of miR-199a-5p in lung tissue of IPF patients from paraffin lung sections. Experiments were performed twice. Scramble probe was used as a negative control.

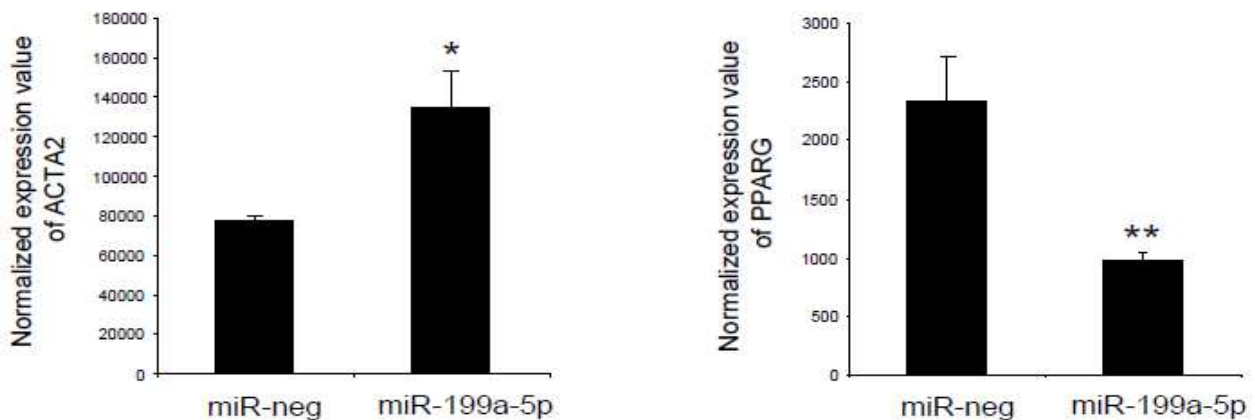


Figure S9.

Expression of ACTA2 and PPARG following overexpression of miR-199a-5p in lung fibroblasts. Microarray analysis of lung fibroblasts transfected with 10 nM of miR-199a-5p mimic or control reveals a significant increase of ACTA2 expression ($*p < 0.05$), a hallmark of myofibroblast differentiation, as well as a significant decrease of PPARG expression ($**p < 0.01$), a known inhibitor of myofibroblast differentiation. Data are expressed as mean of normalized fluorescence values \pm SEM.

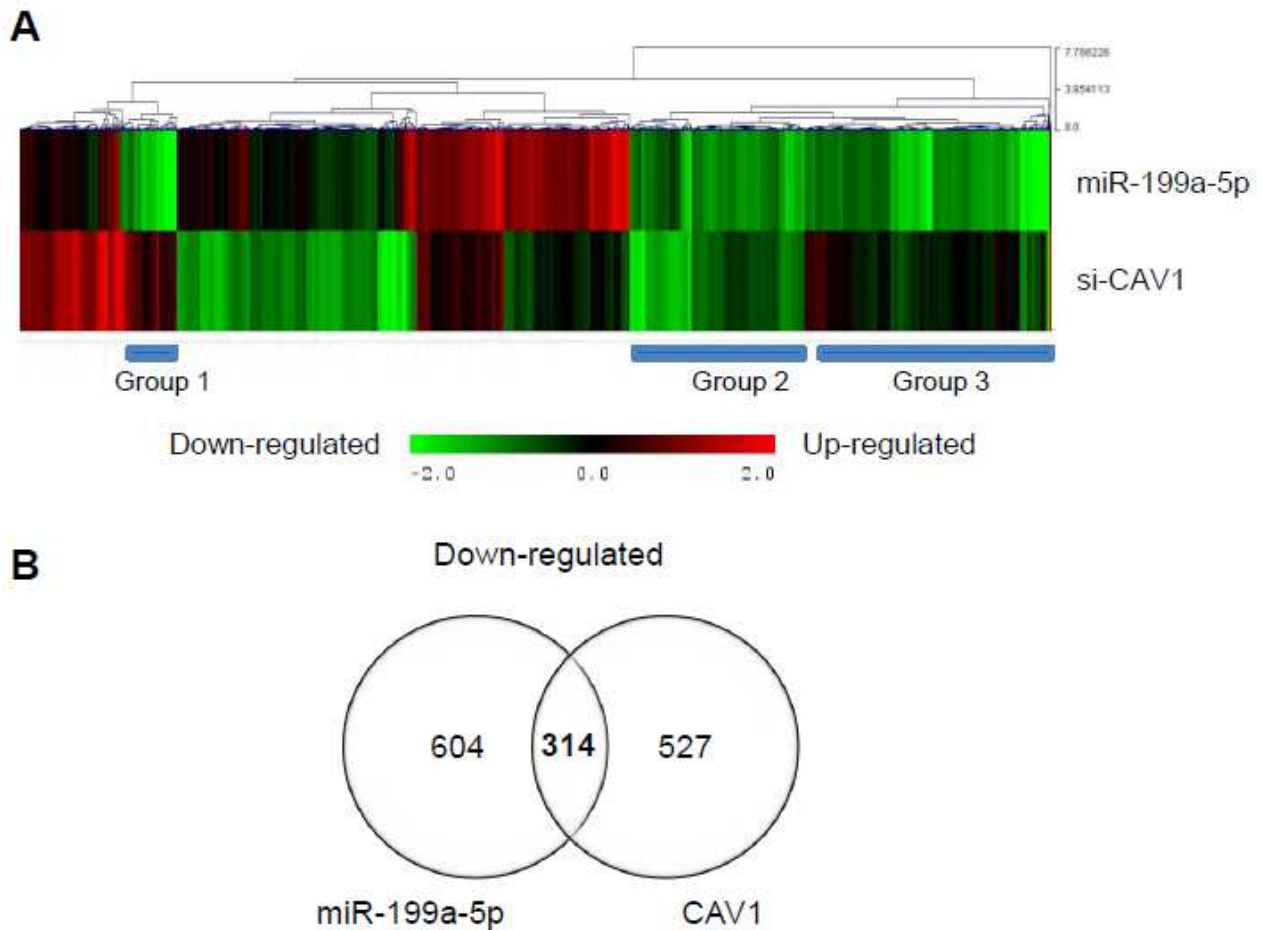


Figure S10.

Comparison of transcriptomic changes induced by miR-199a-5p and a siRNA directed against CAV1. Normal human pulmonary fibroblasts hFL1 were transfected with pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p as well as siCAV1 or a control siRNA (n=2). RNA samples were harvested at 48 h post-transfection and expression profiles were determined with pan genomic arrays. **(A)** Heatmap comparing the normalized \log_2 of the ratios between pre-miR-199a-5p *versus* pre-miR-Neg or si-CAV1 *versus* si-Neg signals. **(B)** Venn diagram comparing the set of down-regulated transcripts following miR-199a-5p and si-CAV1. Cut-offs for selection are equal to 7.0 for the \log_2 (signal), to 0.7 for the \log_2 (ratio), and to 0.05 for the adjusted p-value.

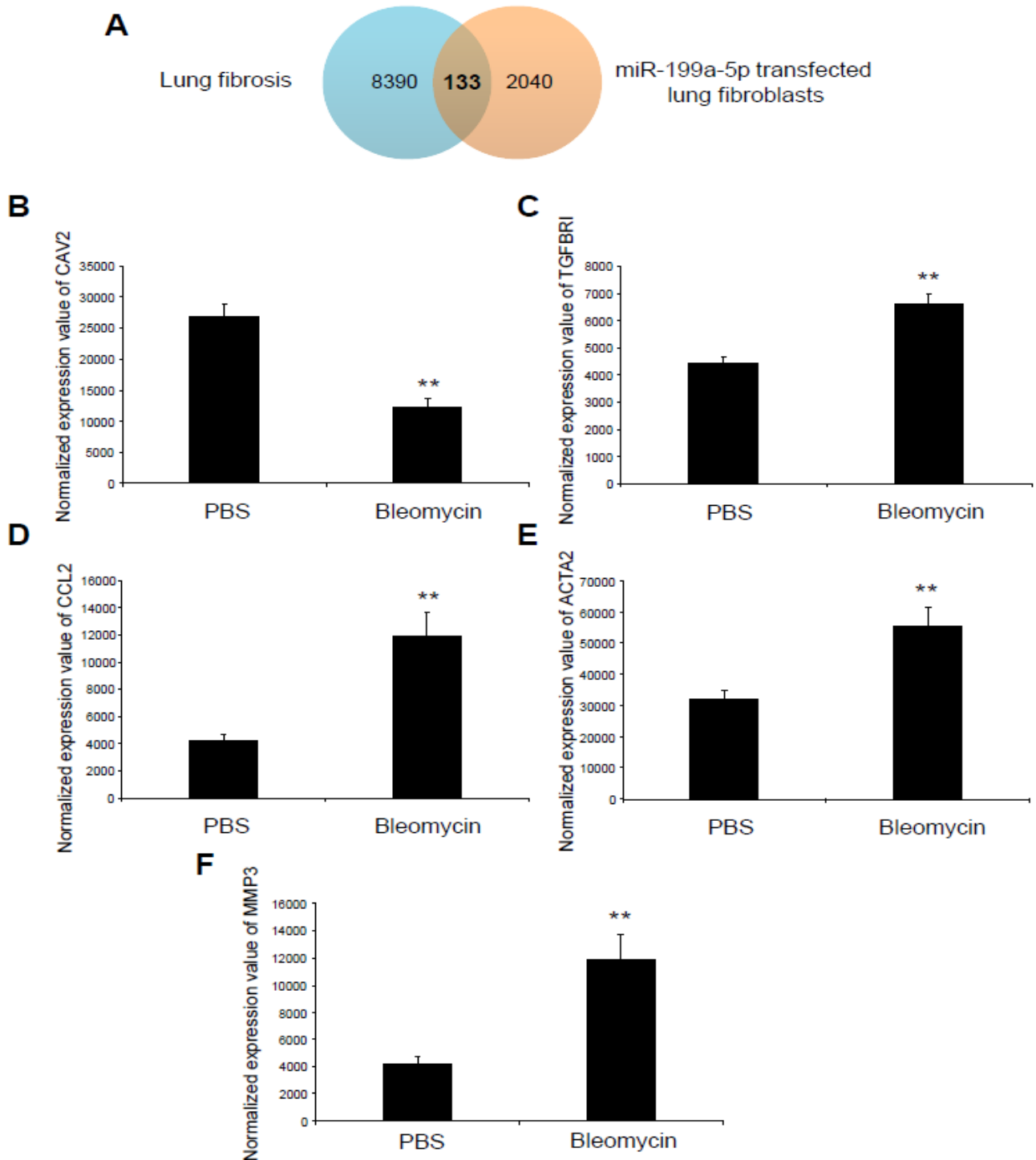


Figure S11.

Comparison of gene expression changes between miR-199a-5p regulated genes in lungs fibroblasts and lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin injection. (A) Venn diagram showing the relationships of gene expression changes between miR-199a-5p transfected lung fibroblasts (two independent experiments) and lungs from C57BL/6 14 days after Bleomycin treatment (n=5 mice). The numbers of genes whose expression was differentially detected in each condition at $p < 0.05$ are shown. Microarray analysis shows a significant reduction of CAV2 (B), TGFBR1 (C), CCL2 (D), ACTA2 (E) and MMP3 (F) expression in C57BL/6 mice treated with bleomycin for 14 days (n = 5) compared with control mice (n = 5). Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$.

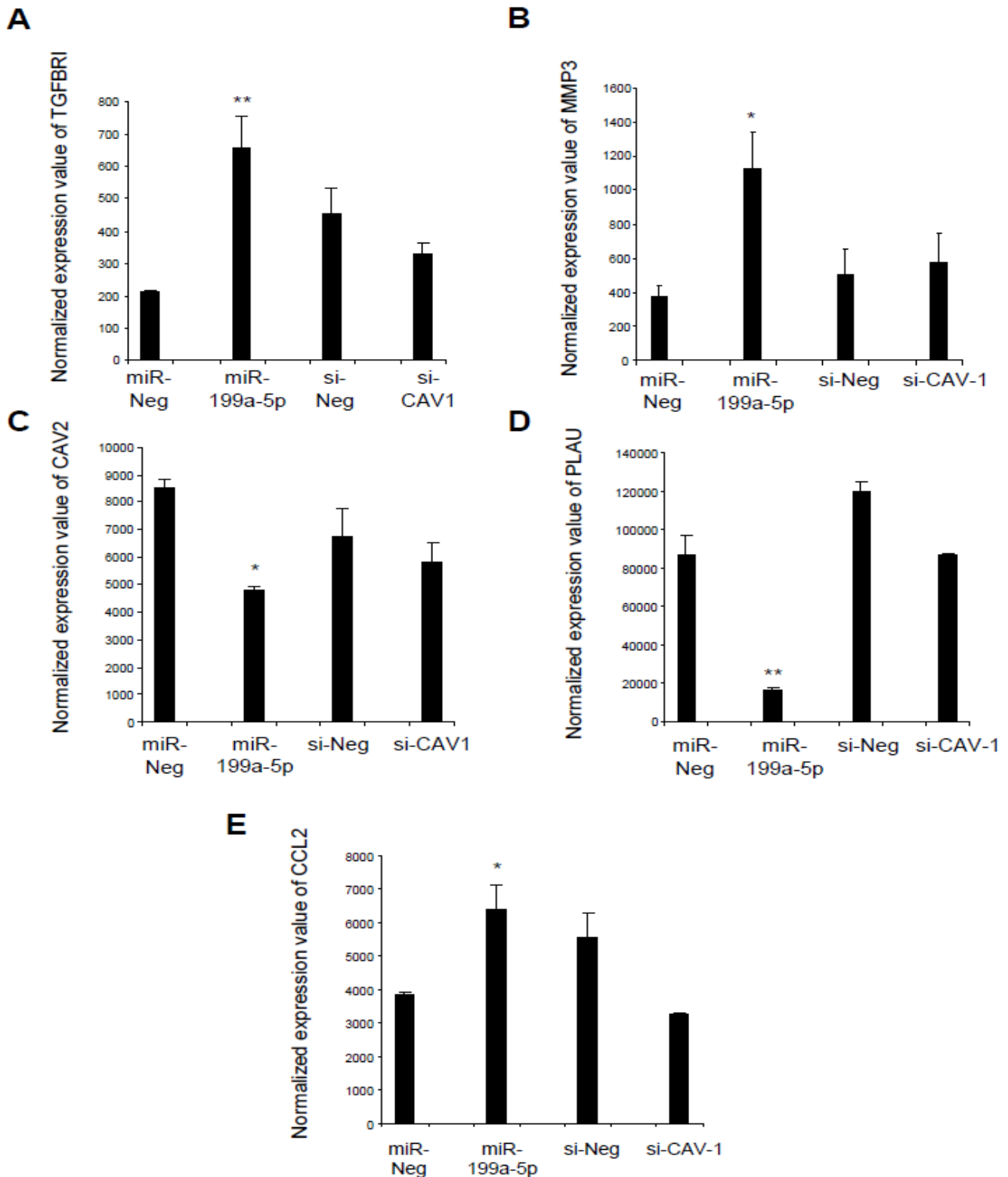


Figure S12.

Profibrotic genes significantly modulated in lung fibroblasts by miR-199a-5p independently of CAV1 regulation. Lung fibroblasts were transfected by miR-199a-5p mimic, si-CAV1 or negative controls. Microarray analysis shows the expression of known profibrotic genes: TGFBRI (A), MMP3 (B), CAV2 (C), PLAU (D) and CCL2 (E) 48h after transfection. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

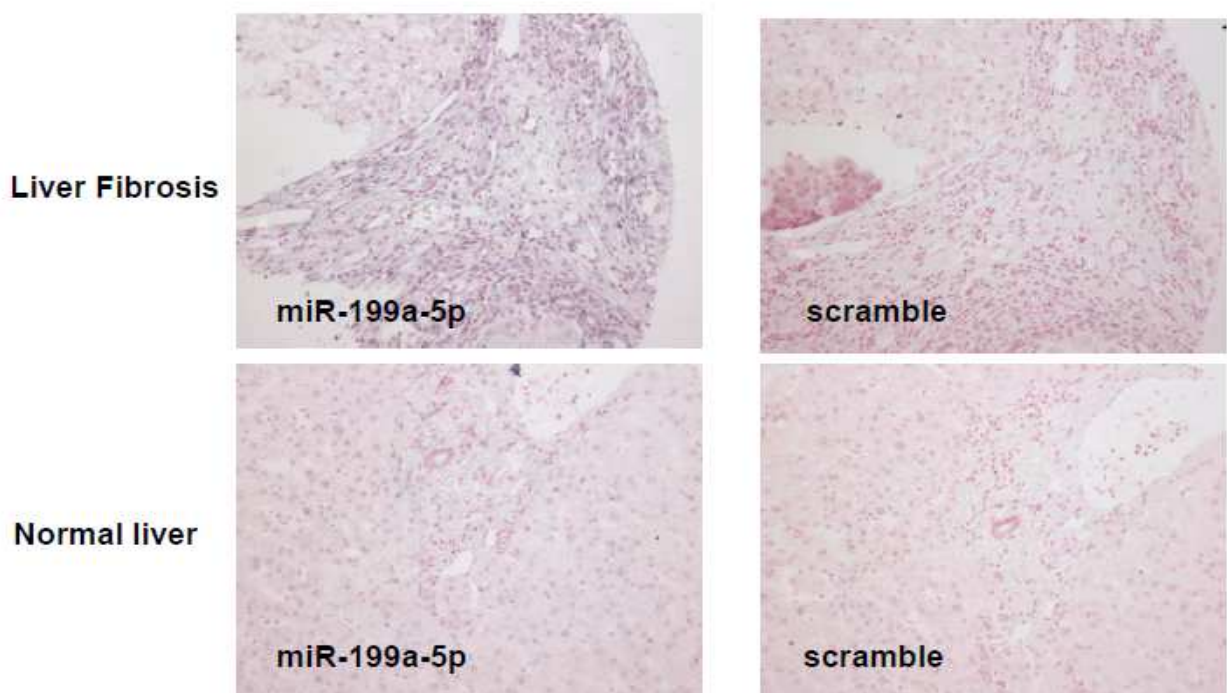


Figure S13.

Enhanced expression of miR-199a-5p in clinical samples from patients with liver fibrosis. *In situ* hybridization assay was performed to determine the localization of miR-199a-5p in normal and fibrotic human livers. Results represent one out of three independent experiments.

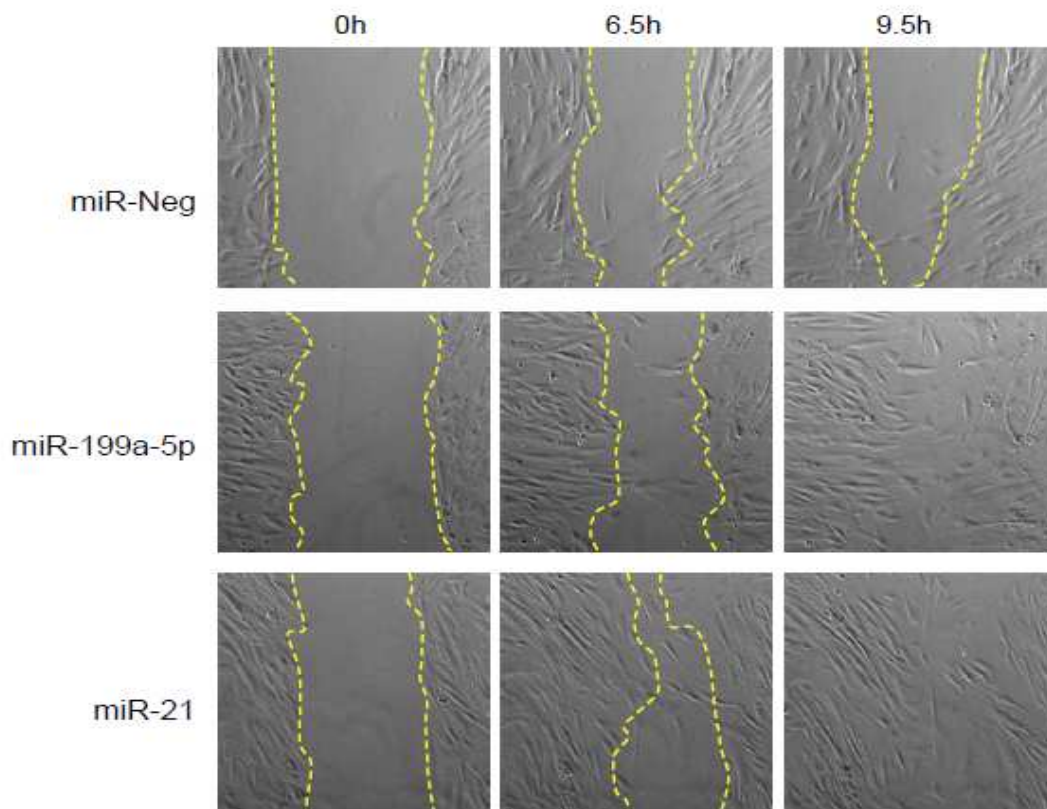
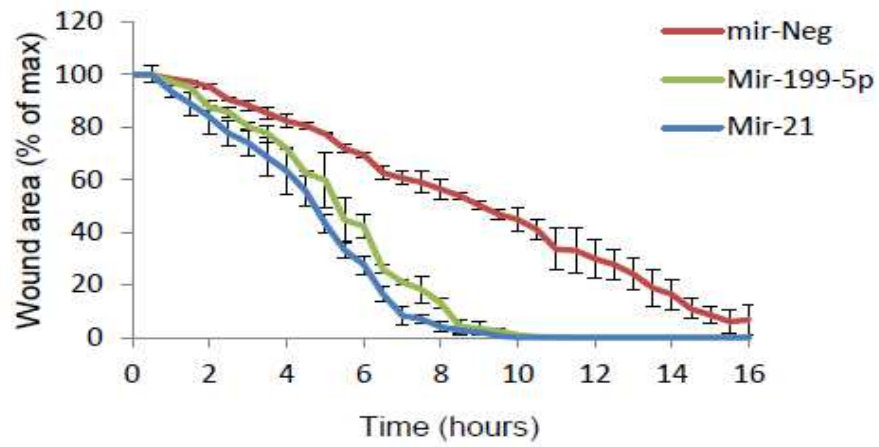


Figure S14.

Transfection of human lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p or pre-miR-21 increases cell motility. Scratch wound was induced in confluent cell monolayers and wound closure was measured using image J software (2 independent experiments).

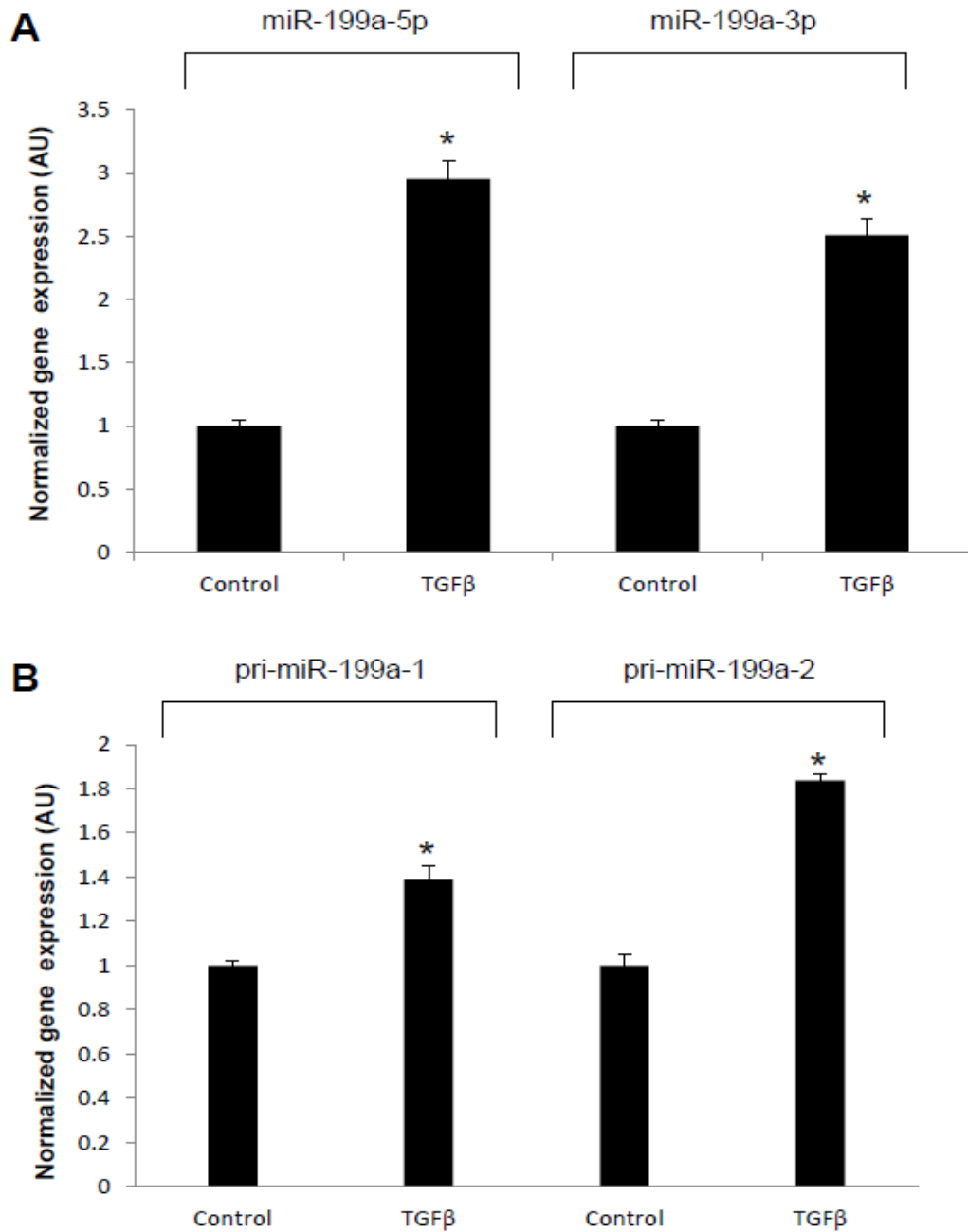


Figure S15.

Effect of TGFβ on mature and pri-miRNAs forms of miR-199a in lung fibroblasts. HFL1 human fibroblasts were treated or not with 10nM TGFβ for 48 hours. Real Time Taq Man PCR showing the levels of **(A)** mature miR-199a-5p and miR-199a-3p ; **(B)** pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2. n = 2. *p < 0.05.

Article 2

MiR-214-3p targets COX-2 in lung fibroblasts and contributes to Resistance to apoptosis

Elisabeth Courcot¹, Jean-Jacques Lafitte², Bernard Mari^{3,4}, Nicolas Pottier¹ and Lo-Guidice Jean-Marc¹.

¹ EA4483, Faculté de Médecine H. Warembourg, Pôle Recherche, Lille, France.

² Service de Pneumologie et d'Oncologie Thoracique, Hôpital Calmette, CHRU, Lille, France

³ Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR-6097, Valbonne Sophia-Antipolis, France

⁴ Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, France ;

Abstract

Background

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an interstitial lung disease characterized by an excessive matrix deposition promoted by apoptosis resistance of fibroblasts. While miRNAs are currently receiving extensive research attention in cancer biology the role of miRNAs in fibrotic lung diseases, in particular the idiopathic form (IPF) is largely unexplored. Consistent with the fact that miR-214-3p is upregulated in the lungs of mice with bleomycin-induced fibrosis but also in the lungs of patients with IPF, we explored the functions of miR-214-3p in lung fibroblasts.

Methodology/ Principal findings

Ectopic expression of miR-214-3p in human lung fibroblasts induced modulation of a large set of genes related to “death receptor signalling”, “PI3K/AKT signalling” or “apoptosis signalling”. COX-2 was found as the most downregulated gene and luciferase assays experimentally validated that miR-214-3p targeted COX-2 3’UTR. TGF- β 1, a central pathological mediator of fibrotic diseases, enhanced miR-214-3p expression in primary pulmonary fibroblasts. In lung fibroblasts, increasing levels of miR-214-3p diminished the production of PGE₂, increased the release of collagen and affected KGF and HGF production, two epithelial growth factors involved in the alveolar epithelial repair. Furthermore, fibroblasts overexpressing miR-214-3p showed a strong inhibition of FasL-induced apoptosis.

Conclusions

Our results highlight important profibrotic effects exerted by miR-214-3p in lung fibroblasts and suggest that therapeutic strategies aiming at silencing this miRNA might be effective to treat IPF.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic interstitial lung disease characterized by an aberrant wound healing after recurrent alveolar injury; which results in a progressive loss of lung function (King Jr, Pardo, et Selman). A number of important profibrotic cytokines have been identified in IPF such as transforming growth factor- beta (TGF- β) or tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). Prostaglandin E2 (PGE2), an endogenous lipid mediator, has many inhibitory actions on lung cells that could potentially suppress fibrosis. PGE2 is produced from endogenous arachidonic acid by cyclooxygenases 1 and 2 (COX-1 and COX-2) (Needleman et al. 1986) and is a major product of fibroblasts, epithelial cells and alveolar macrophages. In particular, PGE2 decreases fibroblast proliferation and collagen synthesis (Huang et al. 2007; Huang et al. 2008) and inhibits myofibroblast differentiation (Kolodtsick et al. 2003). Prostaglandins also play important roles in the regulation of apoptosis within the lung. Recent studies have demonstrated that PGE2 exerts an important antifibrotic effect by promoting the survival of AECs but increasing the sensitivity of fibroblasts/myofibroblasts to apoptosis (Maher et al. 2010; Huang et al. 2009).

PGE2 and COX-2 are found in reduced levels in the lungs of patients with IPF (Petkova et al. 2003; Borok et al. 1991). This reduction is due to a failure of patients with IPF to up-regulate the expression of the key inducible enzyme COX-2 in the PGE2 biosynthetic pathway. This has been demonstrated to contribute to increased proliferation and collagen production by fibroblasts from IPF lung after stimulation with COX-2 agonists when compared with control lung fibroblasts (Wilborn et al. 1995). Previous studies have shown that epigenetic abnormalities, such as histone hypoacetylation can contribute to this diminished COX-2 expression in IPF (Coward et al. 2009).

MicroRNAs are small non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides in length. They bind to the 3'-untranslated region (3'UTR) of target mRNA based on sequence complementarity and result in target mRNA degradation or suppression of translation (Bartel 2004). MicroRNAs are recognized to play critical roles in various physiological processes such as tissue development and differentiation (Lau et al. 2001), cellular proliferation, apoptosis or tissue repair (Cimmino et al. 2005). Aberrant expression of miRNAs is closely associated with initiation and progression of pathogenic processes including diabetes (Ferland et al. 2010), cancer (Calin et al. 2006), and cardiovascular disease (Taft et al. 2010). Furthermore, miRNAs have emerged in the recent decade as regulators of organ phenotypes

and potential targets for therapeutic interventions in multiple diseases (Brown and Naldini 2009; Bader, Brown, and Winkler 2010)

However, the role of miRNAs in fibrotic diseases, especially lung fibrosis, is poorly documented (Pandit et al. 2010; Liu et al. 2010; Cushing et al. 2011; Pottier et al. 2009; Pandit, Milosevic, and Kaminski 2011). Genomewide assessment of miRNA expression of IPF lungs has shown that 10% of the microRNAs profiled were significantly different between IPF and control lungs (Pandit et al. 2010) To date, few miRNA including let-7d, miR-21, miR-155 and members of the miR-29 family have been characterized in details and further linked to IPF (Pandit et al. 2010; Liu et al. 2010; Cushing et al. 2011; Pottier et al. 2009; Pandit, Milosevic, and Kaminski 2011).

Recently, we identified miR-199a-5p as an important regulator of lung fibrosis (unpublished observation). Interestingly, miR-199a-5p is associated with miR-214-3p in the miR-199a/214 cluster, and a previous report has shown a significant upregulation of miR-214 in lungs of patients with IPF. Nevertheless, miR-214 profibrotic effect remains elusive. In the present study, we have shown that miR-214-3p negatively regulates COX-2 in lung fibroblasts by binding to its 3'UTR and subsequently modulates PGE2 production. We also demonstrate that overexpression of miR-214-3p in lung fibroblast not only influences the production of KGF and HGF; two main epithelial growth factors secreted by fibroblasts; but also impacts the production of collagen. Furthermore, we show that miR-214-3p contributes to the increased resistance to Fas-ligand-induced apoptosis in lung fibroblasts.

Taken together, our results highlight the main functions of miR-214-3p in lung fibroblasts and suggest that therapeutics aiming at silencing this miRNA might be effective to treat IPF.

Materials and methods

Cell lines, reagents

Human normal pulmonary fibroblasts MRC-5 (CCL-171) and Human normal kidney cell line transformed with adenovirus HEK 292T/17 (CRL-11268) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), frozen at an early passage and each vial used for experiments was cultured for a limited number of passages (<8). For maintenance, cells were cultured in DMEM medium containing 10% foetal calf serum (FCS), at 37°C with 5% v/v CO₂. Recombinant TGFβ was purchased from Sigma-Aldrich.

Isolation and culture of pulmonary fibroblasts.

Primary lung fibroblasts were derived from bronchial tissues of patients undergoing surgery for lung carcinomas using methods previously described (Keerthisingam et al. 2001; Jordana et al. 1988). After surgical resection, macroscopically healthy areas of lobar bronchi were immediately immersed in a nutrient medium containing Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM), 1% Penicillin-streptomycin, and 2% fungizone, then stored at 4°C until used. Lung tissue samples were isolated under sterile conditions and small fragments from them (about 2 mm²) were used as a source of primary cells. They were pooled and placed in 9 cm² plates coated with 0.8 % collagen G in 500 µl of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin-streptomycin, and 2% fungizone. After an adherence period of 24 hours, 2 ml of culture medium were added and were changed every 2-3 days. Fibroblasts proliferating from these specimens were grown to 80% confluence and serially passed in the same medium. They were used for experiments at the fifth passage.

Pre-miRNAs transfection in lung fibroblasts.

Pre-miR-214-3p, and control miRNA (miR-Neg # 1) were purchased from Ambion. MRC5 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and transfected at 40 to 60% confluency in 6 well plates using Lipofectamin RNAi MAX™ (Invitrogen) with pre-miRNA at a final concentration of 10 nM.

Pre-miRNAs and psiCHECK™-2 plasmid constructs co-transfection.

Molecular constructs were made in psi-CHECK™-2 (Promega) by cloning COX-2 3'UTR downstream of the Renilla luciferase. HEK293 cells were plated onto 96-well plates and cotransfected using lipofectamin 2000™ (Invitrogen) with 0.2 µg of psiCHECK™-2 plasmid construct and pre-miR-214-3p or control miRNA at various concentrations. 48 hours after transfection, Firefly and Renilla Luciferase activities were measured using the Dual-Glo™ Luciferase assay (Promega).

COX-2 (Sense)

CTC GAG GGA TGC AAA GAG GCT AGT GC

COX-2 (Reverse)

GCG GCC GCT TTC TTC AGA AAA GAT CTG TCA ATT T

COX-2 SDM (Sense)

GTT ATT AAC ATT GAT CGG CCG ACA AAA CCT GCG

COX-2 SDM (Reverse)

CCC AGG TTT TGT CGG CCG ATC AAT GTT AAT AAC

RNA isolation

Total RNA were extracted from cell samples with TRIzol solution (Invitrogen).

Mature miRNA expression.

MiR-214-3p expression was assessed using TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) as specified in their protocol. Real-time PCR was performed using Universal Master Mix (Applied Biosystems) and Step One Plus Real-Time PCR System machine (Applied Biosystems). Expression levels of mature miR-214-3p were evaluated using comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Transcript levels of RNU44 and SNO 251 were used as endogenous control.

Gene expression.

Expression levels of human COX-2 were analyzed using TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed using TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and Step One Plus Real-Time PCR System machine (Applied Biosystems). Expression levels of COX-2 were evaluated using comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Transcript levels of 18S were used as endogenous control.

Protein extraction and immunoblotting.

Cells were lysed in lysis buffer (M-PER protein extraction reagent) containing protease inhibitors cocktail (Pierce). Lysates were quantified for protein concentrations using a spectrophotometer (Spectronic Unicam). Proteins (10 µg per sample) were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes using iBlot Dry Blotting System (Invitrogen). Membranes were blocked with 5% fat free milk in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and subsequently incubated with COX-2 primary antibodies (rabbit anti-COX2 polyclonal; Cayman Chemical; number 160107) overnight at 4°C. After washing with TBS-T for 30 minutes at room temperature, the membrane was further incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour,

followed by 30 minutes of washing with TBS-T. Protein bands were visualized with the ChemiDoc XRS (Biorad).

Determination of PGE2, HGF, and KGF production from lung fibroblasts.

Forty eight hours after transfection, lung fibroblasts (MRC-5) were washed with PBS and medium was replaced by 1ml of DMEM without serum. Then cells were stimulated/ or not with TNF α at a final concentration of 10ng/ml. After 24h incubation, supernatants were collected and PGE2 was quantified using enzyme-linked immunoassay (EIA; Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) according to the manufacturer's instructions. HGF and KGF were measured by ELISA kit purchased from R&D systems according to manufacturer's recommendations.

Assessment of collagen accumulation from lung fibroblasts.

MRC-5 cells were transfected with pre-miR-neg or pre-miR-214-3p, as described above, and maintained in serum- free medium for 48 hours. Soluble collagen levels in the culture media were measured using the Sircol collagen dye binding assay (Biocolor).

Apoptosis assay

170000 cells /well were cultured in 6 well plates in DMEM supplemented with 10% FCS. After 24H, cells were serum-starved and transfected with pre-miR-214-3p or pre-miR-neg for 48H. Medium was then replaced by DMEM with 5% FCS and cells were exposed or not to Fas-ligand (Calbiochem, CA) at a final concentration of 200ng/ml during 24H. Apoptosis was then assessed by flow cytometry using the annexin V- FITC apoptosis detection kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

Expression microarray procedure.

Total RNA was processed and hybridized to the HG-U133A oligonucleotide microarray (Affymetrix, Santa Clara, California, United States). This array contains 22,215 gene probe sets, representing approximately 12,357 human genes, plus approximately 3,820 expressed sequence tag clones with unknown function. Gene expression signals were scaled using Affymetrix Microarray Suite (MAS) 5.0 software. Scaled expression values of all probe sets were logarithmically transformed to stabilize variance. Three biological replicates were performed for each comparison.

Statistical analysis and Biological Theme Analysis.

Differentially expressed genes were selected using Benjamini-Hochberg correction of the p-value for multiple tests, based on a p-value below 0.05 (t-test). Data from expression microarrays were analyzed for enrichment in biological themes (Gene Ontology molecular

function and canonical pathways) and build biological networks built using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>) and Mediate (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index>), an information system containing diverse information about probes and data sets.

MiRNA targets analysis. MiRonTop is an online java web tool (available at <http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>) that integrates DNA microarrays data to identify the potential implication of miRNAs on a specific biological system (Le Brigand et al. 2010). Briefly, MiRonTop ranks the transcripts into 2 categories (“Upregulated” and “Downregulated”), according to thresholds for expression level and for differential expression. It then calculates the number of predicted targets for each miRNA, according to the prediction software selected (Targetscan, MiRBase, PicTar, exact seed search: 2–7 or 1–8 first nucleotides of the miRNA, TarBase v1), in each set of genes. Enrichment in miRNA targets in each category is then tested using the hypergeometric function.

Results and Discussion

Expression of mir-214-3p is increased in bleomycin-induced mouse model of lung fibrosis and in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

To investigate which miRNAs may participate in the pathogenesis and progression of lung fibrosis, we previously determined the miRNA expression profile associated with pulmonary fibrosis using two different mouse strains with distinct sensitivity to the profibrotic effects induced by bleomycin (unpublished data). MiR-214-3p was found as the most up-regulated miRNA in the lungs of sensitive mice C57BL/6 14 days after bleomycin instillation. Interestingly, we previously identified miR-199a-5p as a new determinant of tissue fibrosis (unpublished observation). Furthermore, these two miRNAs are regulated as a cluster on pri-miR-199a2 within the human *Dnm3os* gene and therefore shared common regulatory mechanisms (Loebel et al. 2005; Watanabe et al. 2008). Previous reports have indeed shown that the transcription factor *Twist1* positively regulates the expression of both miR-199a-5p and miR-214 during mouse development and in EOC cells (Lee et al. 2009; Yin et al. 2010). We independently confirmed results obtained with the miRNA microarray using Taqman assay on a larger set of mice at day 7 and 14 following bleomycin treatment (Figure 1). Our results showed an increased expression of miR-214-3p after bleomycin instillation that was more pronounced in the sensitive mice C57BL/6 compared to resistant BALB/c mice. Furthermore, to assess whether miR-214 expression is also dysregulated in lungs of IPF patients, we used a recently published dataset (Pandit et al. 2010) consisting of ten IPF samples and ten control samples and further showed a significant increased expression of miR-214 in IPF samples.

mRNA profiling of miR-214-3p overexpressing fibroblasts

To determine the fibroblast-specific targets of miR-214-3p, we transfected human lung fibroblasts MRC-5, either with a synthetic pre-miR 214-3p or a negative premiRNA, used as a control. We then performed human pangenomic arrays to determine mRNA profiles and identify genes whose expression levels are modulated following miR-214-3p overexpression. This analysis was performed on RNA samples in triplicate for each condition and at 48 hours post-transfection. Statistical analysis revealed changes in the expression of 1423 genes (644 down and 779 up-regulated). A functional annotation of the modulated genes indicated an overlap for canonical pathways including “death receptor signalling”, “PI3K/AKT signalling”

and “apoptosis signalling”. We next looked for putative direct targets in the population of down-regulated transcripts using the web tool “miRonTop”(Le Brigand et al. 2010; available at <http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>). Three independent prediction tools (Target Scan, miRanda and Exact seed 3’UTR) indicated an overrepresentation of miR-214-3p predicted targets in the population of down-regulated transcripts (Figure 2). Different prediction tools provided contrasted results (data not shown), but we focused our analysis on a subset of 29 transcripts containing miR-214-3p complementary hexamers in their 3’UTR, showing the largest inhibition of expression (≥ 4 fold), and identified by the three prediction tools cited above (Table 1). One of these transcripts corresponding to the *PTGS2* (*COX-2*) gene exhibited the most reduced level of expression (more than 10 fold) after overexpression of miR-214-3p. *COX-2*, the inducible enzyme involved in PGE2 biosynthesis, a prostaglandin that plays a central role in fibrogenesis, could represent a key miR-214 target.

COX-2 is a miR-214-3p target.

Alignment of miR-214 with the *COX-2* 3’UTR sequence revealed one potential conserved binding site. To evaluate whether miR-214-3p alters the expression of *COX-2*, the human *COX-2* 3’-UTR was cloned into the psiCHECKTM-2 vector and transfected into HEK293 cells in the presence of either a pre-miR-214-3p mimic or a pre-miR-control. After normalization of the Renilla luciferase signal to the Firefly luciferase signal, human pre-miR-214-3p induced a significant decrease in the normalized luciferase activity compared to control, indicating that *COX-2* is a direct target of miR-214-3p. Additionally, site-directed mutagenesis on the potential binding site of the 3’UTR of *COX-2* generated a mutant that had no inhibitory effect on the luciferase activity in presence of miR-214-3p. To validate results obtained with the pangenomic arrays we used Taqman RT-PCR. Thus, Overexpression of miR-214-3p in the human fibroblasts MRC-5 induced a significant decrease in the expression of *COX-2* (Figure 2). Immunoblotting confirmed the results at the protein level (Figure 3). Taken together, these data confirm that *COX-2* is a miR-214-3p target in human lung fibroblasts.

Moreover, in the presence of two inducers of *COX-2*: TNF α and Phorbol myristate acetate (PMA), MRC-5 transfected with pre-miR-214-3p exhibited a strong inhibition of *COX-2* expression compared to control fibroblasts transfected with pre-miR-neg. (Figure 4). These results suggest that miR-214-3p could contribute to the failure of fibroblasts from patients with IPF to upregulate the expression of *COX-2* after stimulation. Coward et al postulated that histone hypoacetylation was responsible for diminished *COX-2* expression in IPF. However,

actinomycin D used in their experiments to test mRNA stability represses DNA translation into mRNA as well as miRNA. Thus, histone hypoacetylation but also posttranscriptionally regulation mediated by miRNA are probably both involved in COX-2 decreased expression in IPF fibroblasts.

TGF β -1 regulates miR-214-3p expression.

Consistent with the fact that TGF- β 1 plays a central role in the development of pulmonary fibrosis; we investigated whether TGF- β 1 could influence miR-214-3p expression levels, as it was reported for other miRNAs (Liu et al. 2010; Cushing et al. 2011; Pandit et al. 2010) . As detected by Taqman RT-PCR, TGF- β 1 treatment of the human fibroblasts MRC-5 and primary lung fibroblasts for 48h led to a markedly increase of miR-214-3p expression while its level decreased following stimulation of MRC-5 with TNF α (Figure 5). These results suggest that TGF- β 1 is involved in the increased expression of miR-214-3p during IPF, although other mechanisms may also be involved.

MiR-214-3p inhibits PGE2 production, causes release of collagen and affects HGF and KGF production.

To explore whether miR-214-3p has an effect on PGE2 production in lung fibroblasts, we transfected MRC-5 either with pre-miR-neg or pre-miR-214-3p, in the presence or absence of an inducer of *COX-2*: TNF α , we measured the production of PGE2. Importantly, PGE2 release by lung fibroblasts in response to TNF α was significantly decreased in cells transfected by miR-214-3p compared to control, indicating that miR-214-3p is involved in the attenuation of PGE2 production in lung fibroblasts (Figure 6).

Because PGE2 has been reported to decrease collagen synthesis (Goldstein et Polgar 1982; S. Huang et al. 2007), we explored whether miR-214-3p significantly affects collagen production. MRC-5 were transfected either with premiR-neg or premiR-214-3p and synthesized collagen produced during 48 hours was measured in culture medium. Interestingly, fibroblasts overexpressing miR-214-3p had an increased production of collagen (Figure 7). Furthermore, among dysregulated transcripts after overexpression of miR-214-3p in lung fibroblasts, many genes encoding collagen such as *COL15A1*, *COL18A1*, *COL13A1*, *COL5A1* or *COL5A3* were upregulated (Table 2). Our results suggest therefore that miR-214-3p contributes to pro-fibrotic effects of lung fibroblasts.

The Hepatocyte growth Factor (HGF) is known to be secreted by pulmonary fibroblasts and is involved in alveolar epithelial repair after injury (Panganiban et Day 2011) by regulating

proliferation and apoptosis of alveolar epithelial cells (Mason et al. 1994; Okada et al. 2004). Recent studies have shown that regulation of HGF was mediated through a PGE2/COX-2 dependent mechanism (Marchand-Adam et al. 2003; Quesnel et al. 2008). To determine whether miR-214-3p influences the production of HGF, supernatants from pulmonary fibroblasts overexpressing miR-214-3p and stimulated or not with TNF α , a known inducer of COX-2 and HGF (Kang et al. 2007; Tamura et al. 1993) were collected. Our results revealed that overexpression of miR-214-3p had no effect on HGF release; but in presence of TNF α , miR-214-3p significantly decreased production of HGF (Figure 6). These data strongly suggest that miR-214-3p is involved in the attenuation of HGF production in lung fibroblasts following inflammatory cytokine stimulation.

PGE2 signalling via the prostanoid (EP) receptors EP2 and EP4 leads to increased cAMP and could therefore stimulate the Keratinocyte Growth Factor (KGF) secretion, in a cAMP dependant pathway (S. Huang et al. 2007). KGF is an epithelial growth factor secreted by fibroblasts that also plays a key role in alveolar epithelial repair (Stern et al. 2003)(Finch et Rubin 2004)). As we showed that miR-214-3p was involved in the attenuation of PGE2 production in lung fibroblasts, we then tested the hypothesis that miR-214-3p could affect the secretion of KGF. For this, pre-miR-214-3p or a control pre-miR-neg were transfected in lung fibroblasts in the presence or absence of TNF α for 48H and the production of KGF was measured. In basal conditions without any stimulation, miR-214 induced a significantly decrease in KGF release, as well as following stimulation with TNF α (Figure 6). These results suggest that miR-214-3p could participate in the attenuation of KGF production by lung fibroblasts.

It should be noted that overexpression of miR-214-3p indirectly induced upregulation of genes previously associated with lung fibrogenesis: *HMG2*, a mediator of TGF β -induced epithelial- mesenchymal transition (Thuault et al. 2006), *CXCL12*, a potent fibrocytes chemoattractant (Phillips et al. 2004), *CTGF* a potent enhancer of fibroblast proliferation and collagen deposition (Lasky et al. 1998), or *EDN1* (endothelin-1), an important mediator in the pathogenesis of IPF (Swigris et Brown 2010) (Table 2). These results highlight that miR-214-3p may modulates the expression of several components of various distinct biological pathways to elicit, in lung fibroblasts a profibrotic response.

MiR-214-3p decreases the sensitivity of lung fibroblasts to FasL- induced apoptosis

Recent studies have demonstrated that reduced expression of COX-2 and PGE2 in fibroblasts from patients with IPF is one factor that promotes fibroblast survival in the fibrotic lung

(Maher et al. 2010). In normal human lung fibroblasts, PGE₂ increases apoptosis and potentiates apoptotic signals delivered by Fas ligand (S. K. Huang et al. 2009). By contrast, fibroblasts from patients with IPF are resistant to the proapoptotic effects of PGE₂ (S. K. Huang et al. 2009). Because miR-214 is involved in the attenuation of PGE₂ production in lung fibroblasts, we expected that it also might have actions on fibroblast apoptosis. To explore whether miR-214-3p has an effect on lung fibroblasts apoptosis, we transfected lung fibroblasts with a pre-miR-214-3p or a control and induced apoptosis by incubating the cells for 24H with Fas ligand in the culture medium. Apoptotic cells were detected with a flow cytometer after staining with Annexin and propidium iodide solution. Interestingly, fibroblasts overexpressing miR-214 showed a strong inhibition of apoptosis in presence of Fas ligand, in comparison with control fibroblasts (Figure 8). Our results indicate that miR-214-3p confers to lung fibroblasts resistance to Fas ligand- induced apoptosis.

In this study, we investigate the potential role of miR-214-3p in IPF. Previous results had shown that expression of miR-214-3p was increased in the lungs of bleomycin-treated mice and in lungs of patients with IPF (unpublished observation). We show that *COX-2* is a miR-214-3p target and that TGF β 1 induces the expression of miR-214-3p. Overexpression of miR-214-3p in lung fibroblasts causes a decreased production of PGE₂ and also affects the secretion of KGF and HGF, two growth factors involved in the alveolar epithelial repair. Furthermore, we demonstrate that miR-214-3p inhibits apoptosis in lung fibroblasts. Thus, miR-214-3p represents an attractive target to treat patients suffering from IPF.

Table 1. List of the main miR-214-3p predicted targets significantly downregulated following miR-214-3p overexpression in human fibroblasts using the bioinformatics tool miRonTop

Symbol	Description	Log2 FC	P-value
ADSS	Adenylosuccinate synthase	- 2,44	1,97E-05
AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2	- 2,02	7,52E-05
ARL2	ADP-ribosylation factor-like 2	- 2,21	2,47E-05
C11ORF10	Chromosome 11 open reading frame 10	- 2,84	9,51E-06
C19ORF56	Chromosome 19 open reading frame 56	- 2,28	2,68E-05
CCDC56	Coiled-coil domain containing 56	- 2,22	6,87E-04
CD151	CD151 molecule (Raph blood group)	- 3,60	1,75E-04
COMT	Catechol-O-methyltransferase	- 2,14	5,73E-04
CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	- 2,02	9,31E-05
CYLD	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)	- 2,19	0,00145423
FAM134A	Family with sequence similarity 134, member A	- 2,31	2,05E-04
FAM189B	Family with sequence similarity 189, member B	- 2,00	1,01E-04
FGF9	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	- 2,37	1,65E-04
HMG20A	High-mobility group 20A	- 2,20	1,70E-04
KCNE4	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	- 2,46	3,89E-04
LEPROTL1	Leptin receptor overlapping transcript-like 1	- 2,27	1,46E-06
MAP2	Microtubule-associated protein 2	- 2,46	1,19E-05
MESDC2	Mesoderm development candidate 2	- 2,01	1,80E-05
PLA2G15	Phospholipase A2, group XV	- 2,07	0,00552858
PLSCR4	Phospholipid scramblase 4	- 3,32	0,00158907
PSMD10	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	- 2,41	7,47E-05
PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	- 4,48	2,71E-05
SCAMP3	Secretory carrier membrane protein 3	- 2,67	9,84E-07
SNX12	Sorting nexin 12	- 2,42	1,59E-05
SRD5A1	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1	- 3,08	2,59E-05
SRXN1	Sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	- 2,33	3,95E-05
TMED5	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	- 2,50	8,94E-05
TPP1	Tripeptidyl peptidase I	- 2,09	2,71E-06
USP46	Ubiquitin specific peptidase 46	- 2,41	6,79E-06

P-value (t-test) <0, 05; Log2FC>2.0; Aver exp>8.0.

Table 2. Profibrotic genes significantly and indirectly modulated in lung fibroblasts following overexpression of miR-214-3p.

Genes	Description	Fold Change	Regulation
COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	2,6752765	up
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	2,17557865	up
COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1	4,8614297	up
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	3,0659846	up
COL5A3	collagen, type V, alpha 3	2,5230239	up
HMGA2	high mobility group AT-hook 2	3,37666925	up
EDN1	endothelin 1	4,7678884	up
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	2,66428705	up
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	3,051811	up
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	6,3645215	up
CTGF	connective tissue growth factor	2,8870058	up
KGF	keratinocyte growth factor-like protein 1	2,014749	down
HGF	hepatocyte growth factor	2,6266923	down

p value < 0.05

Article 3
Identification d'un modèle cellulaire pulmonaire
d'exposition aux xénobiotiques

Introduction de l' article 3

La muqueuse respiratoire est exposée en permanence à de multiples agents agresseurs de l'environnement qui sont inhalés au cours de la respiration. Les capacités métaboliques d'un tissu conditionnent sa capacité à se défendre face aux toxiques de l'environnement. La métabolisation des xénobiotiques peut aussi avoir des effets toxiques directs et engendrer un stress oxydant ou une réaction inflammatoire qui pourrait favoriser le développement de maladies pulmonaires. Les agressions répétées de l'épithélium alvéolaire par des facteurs environnementaux seraient ainsi à l'origine de la pathogenèse de la fibrose pulmonaire idiopathique.

La mise en évidence chez l'homme d'un effet toxique n'est jamais simple à démontrer du fait de l'existence d'une importante variabilité interindividuelle de réponse aux xénobiotiques et de très nombreux facteurs confondants comme le tabagisme, l'alcoolisme, les habitudes alimentaires ou médicamenteuses, qui peuvent gêner l'interprétation des résultats. Les approches expérimentales *in vitro* ont l'avantage de mettre directement en relation le polluant et sa cible cellulaire, permettant ainsi d'établir facilement une relation dose-effet et d'identifier les mécanismes d'action toxique à l'échelle cellulaire et moléculaire. De nombreuses lignées cellulaires épithéliales pulmonaires sont couramment utilisées afin d'étudier l'impact des polluants sur l'appareil respiratoire. Cependant, peu de données sont à ce jour disponibles sur les capacités métaboliques globales de ces modèles cellulaires pulmonaires et sur leurs différences ou similitudes avec le tissu pulmonaire.

Le but de cette étude est d'identifier le(s) modèle(s) de cellules épithéliales pulmonaires le(s) plus proche(s) du tissu pulmonaire *in vivo*. Pour cela, nous avons (i) mesuré l'expression de 380 gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques dans 10 lignées cellulaires épithéliales pulmonaires et dans 4 cultures primaires de cellules bronchiques, et (ii) comparé les résultats obtenus à ceux précédemment décrits dans les tissus pulmonaires humains. Ce(s) modèle(s) nous permettra (ont) de mesurer les variations d'expression des ARNm et microARN dans les cellules épithéliales pulmonaires exposées à différents polluants aériens.

Cette analyse devrait nous aider à mieux comprendre l'impact global de la pollution l'air sur l'appareil respiratoire et son implication dans le développement des maladies pulmonaires à composante environnementale dont fait partie la Fibrose Pulmonaire Idiopathique.

Les résultats de nos travaux sont exposés dans l'article 3.

**Discussion générale
Et perspectives**

Depuis la découverte des microARN, de nombreuses études ont montré leur implication dans des processus physiologiques ou dans diverses maladies, et plus récemment dans la réponse de l'organisme aux composés toxiques de l'environnement. La dérégulation de certains microARN survenant dans des situations pathologiques ou lors de l'exposition à des polluants peut engendrer des modifications d'expression de nombreux gènes et contribuer à la pathogenèse de certaines maladies. L'intérêt des microARN réside également dans leur potentiel thérapeutique puisque les premiers essais réalisés chez l'homme et l'animal ont démontré que l'administration d'antagomiR dirigés contre certains microARN était capable d'avoir un effet bénéfique sur l'évolution des maladies (Brown et Naldini 2009; Kota et al. 2009; Bader, Brown, et Winkler 2010; Brown et Naldini 2009). En outre, d'après les résultats des premiers essais cliniques, les antagomiR semblent avoir peu de toxicité chez l'homme et sont bien tolérés chez l'adulte sain.

L'un des objectifs de mes travaux était d'identifier les microARN susceptibles d'avoir une implication dans le développement de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique et qui pourraient ainsi constituer des cibles thérapeutiques potentielles. La Fibrose Pulmonaire Idiopathique est une maladie qui se caractérise par un processus fibrosant irréversible de l'intersitium pulmonaire et qui ne bénéficie actuellement d'aucun traitement réellement efficace. L'origine environnementale est fortement suspectée dans la FPI puisque les agressions répétées de l'épithélium alvéolaire par des composés toxiques de l'environnement seraient à l'origine de cette maladie (Taskar and Coultas 2006). Le second objectif de mon projet de recherche consistait à identifier le modèle cellulaire d'étude le plus proche du tissu pulmonaire afin de pouvoir mieux cerner l'impact des composés toxiques de l'environnement sur l'épithélium respiratoire, et en particulier les mécanismes génétiques et/ou épigénétiques pouvant être à l'origine de processus pathologiques, dont ceux intervenant dans la FPI.

Afin de cibler les microARN susceptibles d'intervenir dans les phénomènes de fibrogenèse dans la FPI, nous avons réalisé, grâce à l'utilisation de techniques transcriptomiques à haut débit, un profil d'expression des microARN dans des poumons de souris développant ou ne développant pas une fibrose pulmonaire après injection de bléomycine. Cette approche a déjà permis de mieux comprendre l'implication des microARN dans la pathogenèse, le diagnostic ou le pronostic de nombreuses maladies et, en particulier, de certaines maladies fibrosantes (Thum et al. 2008; Lu et al. 2005; C. Zhang 2008). C'est ainsi qu'a été mis en évidence l'importance de miR-21 ou de let-7d dans les processus de fibrogenèse pulmonaire (Liu et al. 2010; Pandit et al. 2010). Notre travail est le premier dans

la recherche sur la FPI à étudier les différences d'expression des microARN entre des souris sensibles et des souris résistantes au développement d'une fibrose pulmonaire après injection de bléomycine. L'identification d'un profil d'expression de microARN spécifiquement associé aux souris sensibles à la bléomycine nous semble, en effet, illustrer l'importance fonctionnelle des microARN dérégulés dans le développement de la FPI. MiR-199a-5p est apparu comme étant le microARN dérégulé de façon la plus significative entre les souris résistantes et les souris sensibles et ayant, par ailleurs, une bonne corrélation avec la progression de la fibrose pulmonaire. Parmi les 22 microARN les plus dérégulés, miR-214 était celui qui était le plus surexprimé dans les poumons fibrosés de souris 14 jours après l'injection de bléomycine.

De façon intéressante, mir-199a et miR-214 sont organisés sous forme de cluster à partir d'un gène commun *Dnm3os*. *Dnm3os* est situé dans la partie intronique du gène dynamin-3 (*Dnm3*) et est transcrit sous la forme d'un ARN non codant précurseur (ou pri-microARN) contenant 4 microARN : miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-214-3p et miR-214-5p (Loebel et al. 2005; Yin et al. 2010). Des études ont montré que *Dnm3os* était indispensable au développement du squelette et à la croissance normale des mammifères (Watanabe et al. 2008). De plus, l'expression de ce cluster est régulé de façon commune, en particulier par le facteur de transcription TWIST-1 (Lee et al. 2009). En effet, il existe en amont du gène *Dnm3os* une séquence promotrice E-Box qui permet la fixation de ce facteur de transcription.

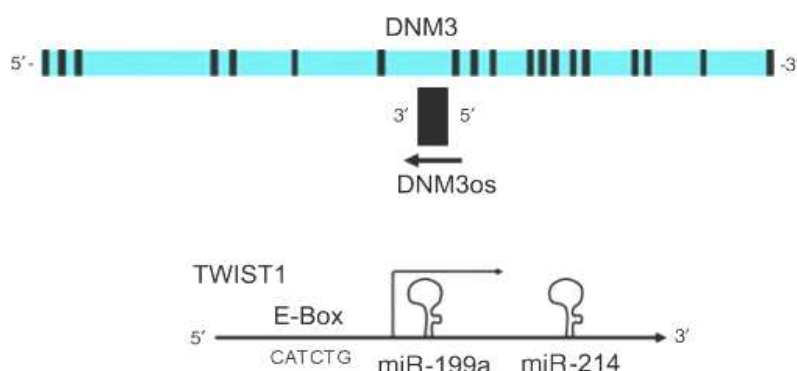


Figure13. D'après Lee et al. (2008)

Le cluster miR-199a/214 est transcrit à partir d'une région intronique du gène *DNM3* (*Dnm3os*). Le schéma montre que *Dnm3os* contient une séquence promotrice E-Box capable de fixer le facteur de transcription Twist-1.

Yin et ses collaborateurs ont montré chez l'homme le rôle de ce cluster miR199a /miR-214 dans la différenciation des cellules épithéliales cancéreuses ovariennes, et sa régulation par twist-1 (Yin et al. 2010). Par ailleurs, *Twist-1* est l'un des gènes les plus surexprimé dans les poumons de patients atteints de FPI (Bridges et al. 2009); la présence de sa protéine dans les foyers fibroblastiques a été mise en évidence par immunohistochimie (Lomas et al. 2012).

L'augmentation de *twist-1* irait dans le sens de l'augmentation de la transcription du gène *Dnm3os* et donc du cluster hsa miR-199a/miR-214 dans la FPI.

MiR-199a est un microARN conservé entre les espèces qui avait été initialement identifié comme ayant un rôle dans le développement des cellules ciliées de l'oreille interne et dans la chondrogenèse (Friedman et al. 2009; Lin et al. 2009). Des études ont depuis mis en évidence son implication dans divers cancers (Iorio et al. 2007; Ueda et al. 2010; Garzon et al. 2008). Dans le contexte de la fibrose tissulaire, les deux formes matures de miR-199a (c'est-à-dire miR-199a-5p et miR-199a-3p) ont été associées à la progression de la fibrose hépatique à la fois chez l'homme et chez la souris (Murakami et al. 2011; Kanda et al. 2010). Nous avons retrouvé une augmentation significative de miR-199a-5p et de miR-199a-3p dans les poumons de souris sensibles à la bléomycine, alors que seule l'expression de miR-199a-5p était significativement surexprimée dans les poumons de patients atteints de FPI. Cette constatation nous a amené à étudier plus précisément les effets profibrotiques de miR-199a-5p. L'implication de miR-214 a été démontré dans la différenciation des cellules musculaires au cours du développement embryonnaire (Juan et al. 2009; Flynt et al. 2007) mais aussi dans certains cancers (Zhang et al. 2010; Bar-Eli 2011; Yang et al. 2009).

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation d'expression de miR-199a-5p et de miR-214-3p dans les poumons fibrosés de souris. Afin d'identifier les transcrits modulés par ces deux microARN, nous avons combiné les données obtenues expérimentalement après surexpression de miR-199a-5p et de miR-214-3p dans des lignées de fibroblastes pulmonaires humains, avec les informations recueillies grâce au logiciel bioinformatique miRonTop. Cette méthode avait déjà été utilisée et fait ses preuves précédemment (Pottier et al. 2009; Marcet et al. 2011). L'analyse fonctionnelle de miR-199a-5p a montré l'association des gènes dérégulés avec des fonctions biologiques telles que « la voie de signalisation des intégrines » ou « la voie de signalisation de l'endocytose médiée par les cavéoles ». Parmi les gènes sous-exprimés après surexpression de miR-199a-5p dans la lignée fibroblastique hFL1, nous avons sélectionné 21 gènes montrant des variations d'expression importantes qui étaient donnés par 3 logiciels de prédiction indépendants et qui avaient les p-values les plus basses. Cette liste restreinte de gènes incluait le gène *CAVI*, codant pour une protéine composante des cavéoles qui avait été associée précédemment à la pathogenèse de la FPI (Wang et al. 2006; Drab et al. 2001). L'utilisation de cette stratégie nous a permis également d'associer miR-214 aux voies de signalisation « récepteurs de mort cellulaire », « PI3K/AKT », ou « apoptose cellulaire », et d'identifier COX-2 comme cible potentielle du miR-214-3p.

miR-199a-5p et CAV1

Les cavéoles sont des vésicules de 50 à 100 nm de diamètre qui proviennent des invaginations de la membrane plasmique (Figures 14 et 15). Elles ont des fonctions biologiques majeures telles que le trafic membranaire ou la signalisation cellulaire (Severs 1988). CAV-1 et CAV-2, les principales protéines des cavéoles, sont fortement exprimées dans les cellules endothéliales et les fibroblastes pulmonaires. Les cavéoles ont un rôle majeur dans la voie de signalisation du TGF β (Figure 16). En effet, alors que l'endocytose du récepteur au TGF β dans les vésicules à clathrine favorise le signal TGF β , l'internalisation de ce même récepteur par les vésicules à cavéoline facilite sa dégradation, et donc diminuera le signal TGF β (Chen et Wang 2009).

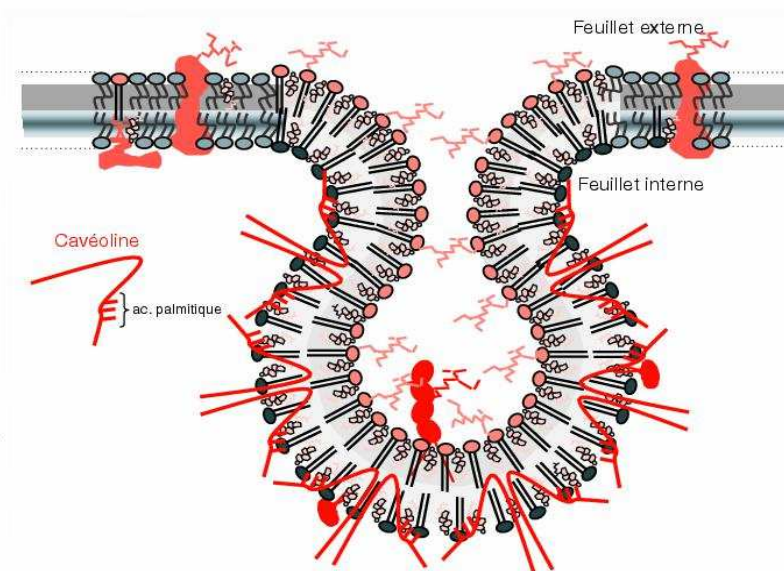
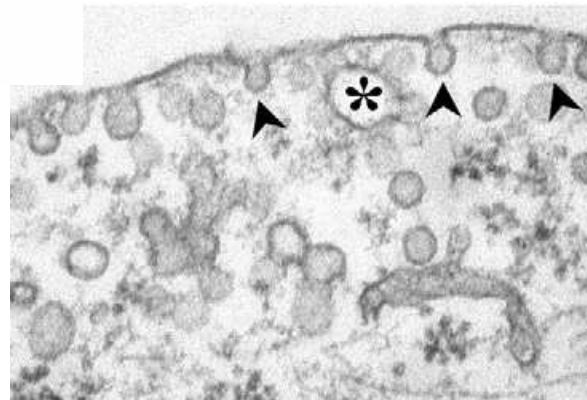


Figure 14. D'après Grelier et al. (2004).
Structure des caveolae.

Quatorze à seize monomères de cavéoline-1 s'assemblent en oligomères qui s'assemblent en homo-oligomères compacts et créent une invagination interne de la membrane d'un diamètre de 50-70 nm.

Figure 15. D'après Parton et al. (2006) *Cell Science*

Cavéoles (flèches et astérisque) dans un fibroblaste primaire visualisées en microscopie électronique.



Des études avaient mis en évidence que l'expression réduite de CAV-1 dans les fibroblastes pulmonaires contribuait à la pathogenèse de la FPI en favorisant la voie TGF β (Wang et al. 2006). Nos travaux ont permis de démontrer que miR-199a-5p pouvait directement réprimer CAV1 dans les fibroblastes pulmonaires, et qu'il pouvait stimuler leur

prolifération, leur migration et leur différenciation en myofibroblastes. De plus, nous avons constaté une augmentation d'expression de miR-199a-5p sur une large cohorte de poumons de patients atteints de FPI ainsi que dans 3 modèles murins indépendants de fibrose. En parallèle de cette augmentation d'expression de miR-199a-5p, nous avons observé une diminution de CAV1 chez les patients atteints de FPI ainsi que dans les modèles murins. Ces résultats indiquent que miR-199a-5p apparaît comme un régulateur des fonctions biologiques médiées par les cavéoles telles que l'endocytose et la transduction de signaux cellulaires, en particulier, la voie de signalisation du TGF β .

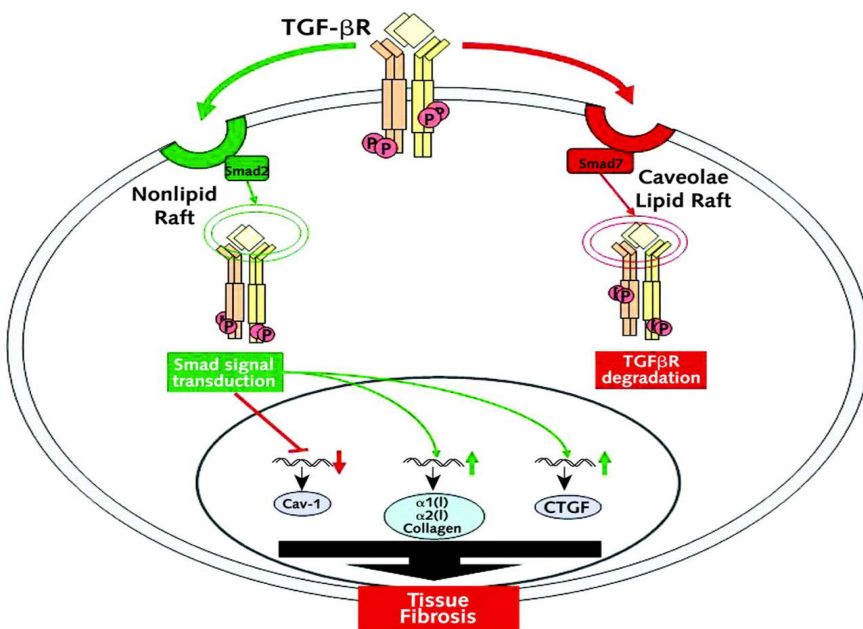


Figure 16.

D'après Rosebloom et al. 2010 *Ann Intern Med*

Le récepteur TGF β R est internalisé et dégradé par les vésicules à cavéoles, alors que l'internalisation du TGF β R par les vésicules à clathrine favorise la transduction du signal TGF β et la fibrogenèse tissulaire.

miR-214-3p et COX-2

COX-1 (ou cyclooxygénase 1) et COX-2 (cyclooxygénase 2) sont deux enzymes impliquées dans le métabolisme de la prostaglandine E2 (PGE2). La PGE2 est synthétisée à partir de l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires. L'AA est libéré des phospholipides par la phospholipase A2, puis est transformé en prostaglandine H2 (PGH2) grâce aux cyclooxygénases. La PGE2 est engendrée par l'action d'une prostaglandine E synthase sur la PGH2 (Needleman et al. 1986). Il est admis que COX-1 est une enzyme constitutive responsable d'une production de base de prostaglandine, alors que l'expression de COX-2 est induite par de nombreux stimuli, en particulier inflammatoires (Kang et al. 2007; Diaz et al. 1998; Pruzanski et al. 1998). La PGE2 possède des actions inhibitrices sur les

fonctions des fibroblastes : elle diminue leur prolifération, leur production de collagène ainsi que la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (S. K. Huang et al. 2008; S. Huang et al. 2007; Kolodsick et al. 2003). La PGE2, qui est la principale prostaglandine produite dans le poumon, est retrouvée diminuée dans les poumons de patients atteints de FPI (Borok et al. 1991; Vancheri et al. 2000). Des études ont montré que cette réduction était due à l'impossibilité chez les patients atteints de FPI d'augmenter l'expression de la cyclooxygénase COX-2, après stimulation par des agonistes (Wilborn et al. 1995). Des données antérieures nous avaient indiqué que l'expression de miR-214-3p était augmentée dans les poumons de patients atteints de FPI ainsi que dans les poumons de souris sensibles à la bléomycine (Pandit et al. 2010). Nous avons mis en évidence que miR-214-3p pouvait directement réprimer COX-2 et qu'il limitait fortement l'augmentation de COX-2 après stimulation par des agonistes (PMA, TNF α) dans les fibroblastes pulmonaires. Nous avons également montré que la surexpression de miR-214-3p dans les fibroblastes entraînait une diminution de leur production de PGE2 ainsi qu'une augmentation de leur production de collagène.

Le KGF (keratinocyte growth factor) et le HGF (hepatocyte growth factor) sont deux facteurs de croissance sécrétés par les fibroblastes pulmonaires. Ils ont un rôle dans la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires et dans leur réparation après une agression alvéolaire (Stern et al. 2003; Panganiban and Day 2011; Finch and Rubin 2004). Des études ont montré que la production de HGF était dépendante de la voie métabolique PGE2/COX-2 (Marchand-Adam et al. 2006; Quesnel et al. 2008). En accord avec ces données, nous avons pu mesurer une diminution de la production d'HGF par les fibroblastes pulmonaires surexprimant miR-214-3p, en parallèle de la diminution de leur production de PGE2 et de l'expression de COX-2. De façon intéressante, nous avons aussi constaté une diminution de leur production de KGF dans les mêmes conditions. Ces résultats nous montrent que miR-214-3p a une influence sur la sécrétion du HGF et du KGF par les fibroblastes pulmonaires.

Des études avaient reconnu que PGE2 avait des propriétés pro-apoptotiques sur les fibroblastes pulmonaires et que la résistance à l'apoptose induite par le Fas-ligand observée dans les fibroblastes provenant de patients atteints de FPI était dépendante de la diminution de production de PGE2 (Maher et al. 2010; S. K. Huang et al. 2009). Nous avons donc testé l'influence de miR-214-3p sur l'apoptose des fibroblastes et nos résultats ont montré que l'augmentation d'expression de miR-214-3p induisait une résistance des fibroblastes pulmonaires à l'apoptose induite par le Fas-ligand.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence le rôle et l'influence du miR-214-3p dans les événements pro-fibrotiques observés au cours de la FPI dans les fibroblastes pulmonaires humains.

Les microARN sont capables de moduler l'expression de nombreux gènes mais aussi de réguler des processus biologiques complexes. Les modifications d'expression des microARN survenant au cours de processus pathologiques, en particulier dans la FPI, peuvent ainsi avoir un impact important sur certaines voies biologiques. Ainsi, l'identification des gènes et des voies de signalisation régulés par les microARN est primordiale pour comprendre les mécanismes par lesquels ils exercent leurs effets pathogènes. L'analyse systématique des profils d'expression génique de fibroblastes surexprimant miR-199a-5p et miR-214-3p nous a permis d'identifier un grand nombre de gènes qui étaient significativement modulés par ces deux microARN. Ces expérimentations ont établi que miR-199a-5p et miR-214-3p étaient directement ou indirectement impliqués dans la régulation de gènes qui sont associés au développement de la FPI. En ce qui concerne miR-199a-5p, CCL2, une chimiokine des cellules sanguines mononuclées, PLA2 (Swaisgood et al. 2000), un composant du système de fibrinolyse, TGF β RI (Bonniaud et al. 2005), le récepteur au TGF β de type I, la métalloprotéinase matricielle-3 MMP3 (Yamashita et al. 2011) et CAV2 (Razani et al. 2002), une protéine appartenant au complexe des cavéoles, ont été retrouvés dérégulés. Pour miR-214-3p, des gènes codant pour différents types de collagène dont COL15A, COL13A1 ou COL5A1, mais aussi d'autres gènes profibrotiques comme HMGA2 (Thuault et al. 2006) ou EDN1 (Swigris and Brown 2010), qui interviennent dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, ou CTGF (Lipson et al. 2012), un facteur de croissance du tissu conjonctif, sont apparus surexprimés dans ces conditions expérimentales.

Perspectives I

MiR-199a-5p et miR-214-3p étant impliqués dans la dérégulation de gènes profibrotiques, ils pourraient, par conséquent, représenter des cibles thérapeutiques intéressantes. L'utilisation d'antagomiR anti-miR-199a-5p et/ou d'antagomiR anti-miR-214-3p seraient en effet envisageables pour diminuer les effets profibrotiques dus à la surexpression de ces microARN dans les poumons de patients atteints de FPI. Nous envisageons prochainement de tester ces antagomiRs sur un modèle murin (C578BL/6) développant une fibrose pulmonaire après injection de bléomycine afin d'évaluer si l'administration de ces antagomiRs pourraient avoir un bénéfice sur l'évolution de la maladie

et/ou sur la survie des souris. De plus, pour évaluer l'impact de ces deux microARN sur la pathogenèse de la fibrose pulmonaire, nous utiliserons également des souris C57BL/6 transgéniques qui nous permettront de moduler l'expression des microARN d'intérêt afin de mieux cerner leur implication dans le développement de la FPI.

Le second objectif de mes travaux de recherche a consisté à identifier le modèle d'étude de cellules épithéliales pulmonaires le plus proche du tissu pulmonaire, ce qui nous permettrait de mieux étudier l'impact des composés chimiques environnementaux (xénobiotiques) sur la pathogenèse des maladies pulmonaires, en particulier la FPI. Pour cela, nous avons évalué pour la première fois les capacités métaboliques de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines et de 10 lignées cellulaires pulmonaires (A549, H292, H358, H460, H727, Calu-1, 16HBE, 1 H460, BEAS-2B et L-132) en mesurant les profils d'expression de 380 gènes codant pour des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX), des transporteurs membranaires, ainsi que des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription régulant les processus de métabolisme et de transport des xénobiotiques. Nous avons réalisé cette analyse en utilisant une technique de RT-PCR quantitative en temps réel fonctionnant à haut débit (*TaqMan™ Low Density Arrays* ou TLDA). Nous avons pu valider cette méthode précédemment à partir de tissus pulmonaires sains et tumoraux (Leclerc et al. 2010; Leclerc et al. 2011).

Les résultats de notre étude ont mis en évidence des différences d'expression génique entre les lignées cellulaires pulmonaires, de même qu'entre ces lignées et les cellules bronchiques primaires ou les tissus pulmonaires. Tous les modèles cellulaires que nous avons testés ont montré une diminution significative du nombre de gènes exprimés par rapport aux tissus pulmonaires, ce qui apparaît comme un caractère commun à d'autres modèles cellulaires comparés aux tissus correspondant (Bourgine et al. 2012; Hart et al. 2010; Olsavsky et al. 2007). De plus, excepté pour la lignée cellulaire A549, le nombre de gènes sous-exprimés par rapport aux tissus pulmonaires est plus important que le nombre de gènes surexprimés. La diminution voire la perte d'expression de certains gènes est le reflet des limitations de la culture cellulaire, qui ne reproduit pas complètement la complexité du microenvironnement physiologique et de son influence sur l'expression génique et le phénotype cellulaire (Flaim, Chien, et Bhatia 2005; Mees et al. 2011). Par ailleurs, les lignées cellulaires dérivées de cancers pulmonaires possèdent des propriétés tumorales telles que des altérations chromosomiques qui peuvent avoir un impact sur leurs capacités métaboliques

(Kunzschughart, Simm, et Muellerklieser 1995; Kunz-Schughart et al. 2000) et qui doivent être prises en compte au cours de leur utilisation pour tester l'effet de composés toxiques sur des tissus pulmonaires sains.

Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR, qui régule l'expression de nombreux gènes d'EMX et de transporteurs (Nakata et al. 2006), a un rôle prépondérant dans le poumon puisque son niveau d'expression y est habituellement élevé en comparaison à d'autres xénosenseurs (Leclerc et al. 2010; Leclerc et al. 2011). Nos résultats ont montré qu'AhR et la plupart de ses cofacteurs (AIP, ARNT, P23 et HSP90) avaient également des niveaux d'expression élevés dans les lignées cellulaires pulmonaires. Par contre, certains CYPs comme les CYP2F1, CYP4B1 ou le CYP2B6 (Lanza et Yost 2001; Baer, Rettie, et Henne 2005; Hodgson et Rose 2007), connus pour activer des procarcinogènes et ayant des niveaux d'expression élevés dans le tissu bronchique, ont montré des niveaux d'expression plus faibles voire indétectables dans la plupart des modèles cellulaires. De la même manière, des gènes codant pour des enzymes de phase II, habituellement fortement exprimés dans la muqueuse bronchique, étaient sous-exprimés (GSTA1-2 dans les A549 et les cellules primaires) ou non-exprimés dans les modèles testés (GSTA1-3). Ainsi, La perte d'expression de certains GST et CYP dans les modèles cellulaires pulmonaires est prendre en compte au cours de l'étude *in vitro* de l'impact des toxiques inhalés sur le poumon.

Aucun des modèles cellulaires pulmonaires testés ne reflète exactement les profils d'expression observés dans les tissus pulmonaires. Cependant, nos résultats indiquent que les cellules épithéliales primaires semblent être le modèle expérimental le plus adapté, puisqu'elles présentaient, par rapport à la muqueuse bronchique, les plus fortes similitudes dans les profils d'expression et le nombre de gènes dérégulés le plus faible. Il faut noter que les variations d'expression géniques interindividuelles constatées pour certains gènes dans les cellules primaires pourraient affecter la reproductibilité des expérimentations. Les lignées cellulaires H292 et BEAS-2B ont montré les corrélations les plus fortes (respectivement 86,7% et 84, 4%) avec les cellules primaires, et le nombre de gènes dérégulé le plus faible par rapport aux tissus pulmonaires sains. De plus, les BEAS-2B présentent des coefficients de corrélation élevés avec le tissu bronchique et le parenchyme pulmonaire. Ces données suggèrent que les lignées H292 et BEAS-2B pourraient être utilisées pour évaluer l'impact des xénobiotiques sur l'épithélium bronchique. La lignée A549 est largement utilisée dans les études toxicologiques et a été probablement la mieux caractérisée (Castell, Donato, et Gómez-Lechón 2005; Hukkanen et al. 2000; Foster et al. 1998). Nous avons mis en évidence que ces cellules présentaient des caractéristiques communes avec certains échantillons tumoraux

concernant les enzymes de phase I et de phase II. Cependant, les coefficients de corrélation des A549 avec les tissus pulmonaires et les cellules primaires étaient parmi les plus faibles, et le nombre de gènes surexprimés par rapport aux tissus était le plus élevé. Ces observations suggèrent que la lignée cellulaire A549 ne correspond pas au modèle cellulaire pulmonaire le plus approprié pour mesurer l'impact des xénobiotiques sur la muqueuse respiratoire.

Perspectives 2

Nous envisageons d'explorer les modifications épigénétiques des cellules épithéliales pulmonaires, et en particulier les modifications d'expression des microARN, sous l'action de polluants aériens. Pour cela, nous exposerons le modèle cellulaire le plus proche du tissu pulmonaire, c'est à dire des cellules bronchiques primaires, à des polluants particulaires (PM 2,5) et nous sélectionnerons les microARN qui présentent les variations d'expression les plus marquées. L'analyse fonctionnelle de ces microARN d'intérêts nous permettra de définir leur(s) gène(s) cibles mais aussi les voies de signalisation biologiques qui leur sont associées. Par ailleurs, nos résultats nous permettront de comparer les microARN dérégulés par les PM à ceux qui apparaissent dérégulés au cours de l'évolution de la FPI. Pour les études fonctionnelles, l'utilisation des H292 ou des BEAS-2B pourra être envisagée en alternative aux cellules primaires en raison de leur plus grande maniabilité pour des expérimentations de transfection. Nous espérons ainsi explorer le rôle potentiel des microARN dans la pathogenèse des maladies pulmonaires à composante environnementale, et en particulier dans la FPI.

Conclusion

L'étude des microARN dérégulés au cours de l'évolution de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique nous a permis de mettre en évidence l'implication de deux microARN, miR-199a-5p et miR-214-3p, dans la pathogenèse de cette maladie. Notre travail illustre ainsi l'impact des modifications épigénétiques sur le développement de maladies pulmonaires à composante environnementale. Des molécules antagonistes de ces microARN pourraient être développées; leur l'administration pourrait avoir une action thérapeutique dans la FPI. Les travaux réalisés chez les animaux et les premiers essais cliniques réalisés chez l'homme concernant l'utilisation d'antagomiR à des fins thérapeutiques dans d'autres maladies ont en effet donné à ce jour des résultats encourageants.

L'analyse du profil d'expression de la majorité des gènes codant pour les protéines impliquées dans la prise en charge des xénobiotiques dans différents modèles de cellules épithéliales pulmonaires nous a également permis d'identifier le modèle *in vitro* le plus proche des tissus pulmonaires. Ce modèle nous servira à étudier les variations d'expression des microARN et des ARNm en réponse à la pollution aérienne. Nous espérons que l'analyse globale de la réponse cellulaire aux composés chimiques de l'environnement nous permettra de mieux comprendre le lien possible entre les agressions environnementales et le développement des maladies pulmonaires, en particulier, la FPI.

Bibliographie

- Agostini, Carlo, and Carmela Gurrieri. 2006. Chemokine/Cytokine Cocktail in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (4) (June 1): 357–363.
- Aguilar, Susana, Emma Nye, Jerry Chan, Michael Loebinger, Bradley Spencer-Dene, Nick Fisk, Gordon Stamp, Dominique Bonnet, and Sam M Janes. 2007. Murine but Not Human Mesenchymal Stem Cells Generate Osteosarcoma-like Lesions in the Lung. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (6) (June): 1586–1594.
- Alder, Jonathan K, Julian J-L Chen, Lisa Lancaster, Sonye Danoff, Shu-chih Su, Joy D Cogan, Irma Vulto, et al. 2008. “Short Telomeres Are a Risk Factor for Idiopathic Pulmonary Fibrosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (35) (September 2): 13051–13056.
- Ameres, Stefan Ludwig, Javier Martinez, et Renée Schroeder. 2007. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell* 130 (1) (juin 13): 101-112.
- Andersson-Sjöland, Annika, Carolina García de Alba, Kristian Nihlberg, Carina Becerril, Remedios Ramírez, Annie Pardo, Gunilla Westergren-Thorsson, and Moisés Selman. 2008. Fibrocytes Are a Potential Source of Lung Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (10): 2129–2140.
- Anon. 2000. American Thoracic Society. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. International Consensus Statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161
- Anon. 2002. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias This Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) Was Adopted by the ATS Board of Directors, June 2001 and by The ERS Executive Committee, June 2001. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (2) (January 15): 277–304.
- Antoniou, Katerina M, Michael G Alexandrakis, Nikolaos M Sifakas, and Demosthenes Bouros. 2005. Cytokine Network in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases: Official Journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders 22 (2) (June): 91–104.
- Armanios, Mary Y, Julian J-L Chen, Joy D Cogan, Jonathan K Alder, Roxann G Ingersoll, Cheryl Markin, William E Lawson, et al. 2007. Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 356 (13) (March 29): 1317–1326.
- Attili, Anil K., Ella A. Kazerooni, Barry H. Gross, Kevin R. Flaherty, Jeffrey L. Myers, and Fernando J. Martinez. 2008. Smoking-Related Interstitial Lung Disease: Radiologic-Clinical-Pathologic Correlation. *Radiographics* 28 (5) (September 1): 1383–1396.
- Bader, Andreas G, David Brown, et Matthew Winkler. 2010. The promise of microRNA replacement therapy . *Cancer research* 70 (18) (septembre 15): 7027-7030.
- Baer, Brian R, Allan E Rettie, et Kirk R Henne. 2005. Bioactivation of 4-ipomeanol by CYP4B1: adduct characterization and evidence for an enedial intermediate. *Chemical research in toxicology* 18 (5) (mai): 855-864.
- Bar-Eli, Menashe. 2011. Searching for the “melano-miRs”: miR-214 drives melanoma metastasis. *The EMBO journal* 30 (10) (mai 18): 1880-1881.
- Barski, Oleg A, Srinivas M Tipparaju, et Aruni Bhatnagar. 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug metabolism reviews* 40 (4): 553-624.
- Bartel, David P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2) (23): 281-297.
- Baumgartner, K B, J M Samet, C A Stidley, T V Colby, and J A Waldron. 1997. Cigarette Smoking: A Risk Factor for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (1) (January 1): 242–248.
- Beeh, K M, J Beier, I C Haas, O Kornmann, P Micke, et R Buhl. 2002. Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 19 (6) (juin): 1119-1123.
- Boffetta, P, A Agudo, W Ahrens, E Benhamou, S Benhamou, S C Darby, G Ferro, et al. 1998. Multicenter Case-control Study of Exposure to Environmental Tobacco Smoke and Lung Cancer in Europe. *Journal of the National Cancer Institute* 90 (19) (October 7): 1440–1450.

- Bollati, Valentina, Barbara Marinelli, Pietro Apostoli, Matteo Bonzini, Francesco Nordio, Mirjam Hoxha, Valeria Pegoraro, et al. 2010. Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes . *Environmental health perspectives* 118 (6) (juin): 763-768.
- Bonnaud, Philippe, Peter J. Margetts, Martin Kolb, Jane Ann Schroeder, Ann M. Kapoun, Debby Damm, Alison Murphy, et al. 2005. Progressive Transforming Growth Factor B1–induced Lung Fibrosis Is Blocked by an Orally Active ALK5 Kinase Inhibitor . *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171 (8) (avril 15): 889-898.
- Borensztajn, Keren, Maikel P Peppelenbosch, and C Arnold Spek. 2008. Factor Xa: At the Crossroads Between Coagulation and Signaling in Physiology and Disease. *Trends in Molecular Medicine* 14 (10) (October): 429–440.
- Borok, Z, A Gillissen, R Buhl, R F Hoyt, R C Hubbard, T Ozaki, S I Rennard, et R G Crystal. 1991. Augmentation of functional prostaglandin E levels on the respiratory epithelial surface by aerosol administration of prostaglandin E. *The American review of respiratory disease* 144 (5) (novembre): 1080-1084.
- Bourgine, Joanna, Ingrid Billaut-Laden, Mélanie Happillon, Jean-Marc Lo-Guidice, Vincent Maunoury, Michel Imbenotte, et Franck Broly. 2012. Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40 (4) (avril): 694-705.
- Boyd, M R. 1984. Metabolic activation and lung toxicity: a basis for cell-selective pulmonary damage by foreign chemicals . *Environmental health perspectives* 55 (avril): 47-51.
- Bridges, Robert S, Daniel Kass, Katrina Loh, Carlota Glackin, Alain C Borczuk, et Steven Greenberg. 2009. Gene expression profiling of pulmonary fibrosis identifies Twist1 as an antiapoptotic molecular “rectifier” of growth factor signaling. *The American journal of pathology* 175 (6) (décembre): 2351-2361.
- Bringardner, Benjamin D, Christopher P Baran, Timothy D Eubank, and Clay B Marsh. 2008. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (2) (February): 287–301.
- Brown, Brian D, et Luigi Naldini. 2009. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nature reviews. Genetics* 10 (8) (août): 578-585.
- Brunekreef, B, et B Forsberg. 2005. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 26 (2) (août): 309-318.
- Brunekreef, Bert, et Stephen T Holgate. 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360 (9341) (octobre 19): 1233-1242.
- Calabrese, Fiorella, Cinzia Giacometti, Francesca Lunardi, and Marialuisa Valente. 2008. Morphological and Molecular Markers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine* 2 (4) (August): 505–520.
- Calin, George A, et Carlo M Croce. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer* 6 (11) (novembre): 857-866.
- Cao, Guojun, Baochun Huang, Zhaohui Liu, Jiyan Zhang, Hua Xu, Wei Xia, Jie Li, et al. 2010. Intronic miR-301 feedback regulates its host gene, ska2, in A549 cells by targeting MEOX2 to affect ERK/CREB pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 396 (4) (juin 11): 978-982.
- Caramori, G, C Di Gregorio, I Carlstedt, P Casolari, I Guzzinati, I M Adcock, P J Barnes, et al. 2004. Mucin Expression in Peripheral Airways of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Histopathology* 45 (5) (November): 477–484.
- Castell, José V, M Teresa Donato, et María José Gómez-Lechón. 2005. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 57 Suppl 1 (juillet): 189-204.
- Castoldi, Giovanna, Cira R T Di Gioia, Camila Bombardi, Daniele Catalucci, Barbara Corradi, Maria Giovanna Gualazzi, Martina Leopizzi, et al. 2012. MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension. *Journal of cellular physiology* 227 (2) (février): 850-856.

- Celli, B. R, W. MacNee, A. Agusti, A. Anzueto, B. Berg, A. S Buist, P. M.a Calverley, et al. 2004. Standards for the Diagnosis and Treatment of Patients with COPD: A Summary of the ATS/ERS Position Paper. *European Respiratory Journal* 23 (6) (June 1): 932–946.
- Chang, Alex. 2011. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 71 (1) (janvier): 3-10.
- Chen, Jian-Fu, Elizabeth M Mandel, J Michael Thomson, Qiulian Wu, Thomas E Callis, Scott M Hammond, Frank L Conlon, et Da-Zhi Wang. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics* 38 (2) (janvier): 228-233.
- Chen, Po Yu, et Gunter Meister. 2005. microRNA-guided posttranscriptional gene regulation . *Biological chemistry* 386 (12) (novembre): 1205-1218.
- Chen, Ye-Guang, et Xiao-Fan Wang. 2009. A special issue on TGF-beta signaling. *Cell research* 19 (1) (janvier): 1-2.
- Chirino, Yolanda I, Yesennia Sánchez-Pérez, Alvaro R Osornio-Vargas, Rocío Morales-Bárceñas, María Concepción Gutiérrez-Ruíz, Yazmin Segura-García, Irma Rosas, José Pedraza-Chaverri, et Claudia M García-Cuellar. 2010. PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology letters* 193 (3) (avril 1): 209-216.
- Cho, William C S. 2007. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular cancer* 6: 60.
- Cimmino, Amelia, George Adrian Calin, Muller Fabbri, Marilena V Iorio, Manuela Ferracin, Masayoshi Shimizu, Sylwia E Wojcik, et al. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39) (août 27): 13944-13949.
- Collard, Harold R, Jay H Ryu, William W Douglas, Marvin I Schwarz, Douglas Curran-Everett, Talmadge E King Jr, and Kevin K Brown. 2004. Combined Corticosteroid and Cyclophosphamide Therapy Does Not Alter Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 125 (6) (June): 2169–2174.
- Cushing, Leah, Ping Ping Kuang, Jun Qian, Fengzhi Shao, Junjie Wu, Frederic Little, Victor J Thannickal, Wellington V Cardoso, and Jining Lü. 2011. miR-29 Is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45 (2) (August): 287–294.
- Dahms, T E, J F Bolin, and R G Slavin. 1981. “Passive Smoking. Effects on Bronchial Asthma. *Chest* 80 (5) (November): 530–534.
- Daniels, Craig E., Joseph A. Lasky, Andrew H. Limper, Kathleen Mieras, Edith Gabor, and Darrell R. Schroeder. 2010. Imatinib Treatment for Idiopathic Pulmonary Fibrosis Randomized Placebo-controlled Trial Results. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (6) (March 15): 604–610.
- Demedts, Maurits, Juergen Behr, Roland Buhl, Ulrich Costabel, Richard Dekhuijzen, Henk M Jansen, William MacNee, et al. 2005. High-dose Acetylcysteine in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 353 (21) (November 24): 2229–2242.
- Deterding, R R, A M Havill, T Yano, S C Middleton, C R Jacoby, J M Shannon, W S Simonet, et R J Mason. 1997. « Prevention of bleomycin-induced lung injury in rats by keratinocyte growth factor ». *Proceedings of the Association of American Physicians* 109 (3) (mai): 254-268.
- Deterding, R R, C R Jacoby, et J M Shannon. 1996. Acidic fibroblast growth factor and keratinocyte growth factor stimulate fetal rat pulmonary epithelial growth. *The American journal of physiology* 271 (4 Pt 1) (octobre): L495-505.
- Diaz, Arturo, Kenneth P. Chepenik, Joseph H. Korn, Anthony M. Reginato, et Sergio A. Jimenez. 1998. Differential Regulation of Cyclooxygenases 1 and 2 by Interleukin-1[beta], Tumor Necrosis Factor-[alpha], and Transforming Growth Factor-[beta]1 in Human Lung Fibroblasts . *Experimental Cell Research* 241 (1): 222-229.
- Doll, Richard, and A. Bradford Hill. 1952. Study of the Aetiology of Carcinoma of the Lung. *British Medical Journal* 2 (4797) (December 13): 1271–1286.
- Drab, M, P Verkade, M Elger, M Kasper, M Lohn, B Lauterbach, J Menne, et al. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science (New York, N.Y.)* 293 (5539) (septembre 28): 2449-2452.

- Duan, Huihan, Yiguo Jiang, Hongyu Zhang, et Yan Wu. 2010a. MiR-320 and miR-494 affect cell cycles of primary murine bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 24 (3) (avril): 928-935.
- Edmonds, Mick D, Douglas R Hurst, et Danny R Welch. 2009. Linking metastasis suppression with metastamiR regulation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (17) (septembre 1): 2673-2675.
- Enomoto, Noriyuki, Takafumi Suda, Masato Kato, Yusuke Kaida, Yutaro Nakamura, Shiro Imokawa, Masaaki Ida, and Kingo Chida. 2006. Quantitative Analysis of Fibroblastic Foci in Usual Interstitial Pneumonia. *Chest* 130 (1) (July): 22-29.
- Ferland-McCollough, David, Susan E Ozanne, Kenneth Siddle, Anne E Willis, et Martin Bushell. 2010. The involvement of microRNAs in Type 2 diabetes. *Biochemical Society transactions* 38 (6) (décembre): 1565-1570.
- Finch, P W, J S Rubin, T Miki, D Ron, et S A Aaronson. 1989. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science (New York, N.Y.)* 245 (4919) (août 18): 752-755.
- Finch, Paul W, et Jeffrey S Rubin. 2004. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Advances in cancer research* 91: 69-136.
- Flaim, Christopher J, Shu Chien, et Sangeeta N Bhatia. 2005. An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation. *Nature Methods* 2 (2) (février): 119-125.
- Flynt, Alex S, Nan Li, Elizabeth J Thatcher, Lilianna Solnica-Krezel, et James G Patton. 2007. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nature genetics* 39 (2) (février): 259-263.
- Foster, K A, C G Oster, M M Mayer, M L Avery, et K L Audus. 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research* 243 (2) (septembre 15): 359-366.
- Friedman, Lilach M., Amiel A. Dror, Eyal Mor, Tamar Tenne, Ginat Toren, Takunori Satoh, Deborah J. Biesemeier, et al. 2009. MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (19) (mai 12): 7915-7920.
- García-Alvarez, Jorge, Remedios Ramirez, Clara L Sampieri, Robert K Nuttall, Dylan R Edwards, Moises Selman, and Annie Pardo. 2006. Membrane Type-matrix Metalloproteinases in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases: Official Journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* 23 (1) (March): 13-21.
- Garzon, Ramiro, Stefano Volinia, Chang-Gong Liu, Cecilia Fernandez-Cymering, Tiziana Palumbo, Flavia Pichiorri, Muller Fabbri, et al. 2008. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 111 (6) (mars 15): 3183-3189.
- Gauderman, W James, Edward Avol, Frank Gilliland, Hita Vora, Duncan Thomas, Kiros Berhane, Rob McConnell, et al. 2004. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *The New England Journal of Medicine* 351 (11) (septembre 9): 1057-1067.
- Gebeshuber, Christoph A, Kurt Zatloukal, et Javier Martinez. 2009. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Reports* 10 (4) (avril): 400-405.
- Germano, Davide, Przemyslaw Blyszczuk, Alan Valaperti, Gabriela Kania, Stephan Dirnhofer, Ulf Landmesser, Thomas F Lüscher, Lukas Hunziker, Henryk Zulewski, and Urs Eriksson. 2009. Prominin-1/CD133+ Lung Epithelial Progenitors Protect from Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179 (10) (May 15): 939-949.
- Glatt, H. 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-biological interactions* 129 (1-2) (décembre 1): 141-170.
- Goodwin, Amanda, and Gisli Jenkins. 2009. Role of Integrin-mediated TGFbeta Activation in the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *Biochemical Society Transactions* 37 (Pt 4) (August): 849-854.
- Gram, T E. 1997. Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacological reviews* 49 (4) (décembre): 297-341.
- Griffiths-Jones, Sam. 2006. miRBase: The microRNA Sequence Database. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 342: 129-138.

- Groneberg-Kloft, Beatrix, Thomas Kraus, Anke van Mark, Ulrich Wagner, et Axel Fischer. 2006. Analysing the causes of chronic cough: relation to diesel exhaust, ozone, nitrogen oxides, sulphur oxides and other environmental factors. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* (London, England) 1: 6.
- Hagimoto, N., K. Kuwano, Y. Nomoto, R. Kunitake, and N. Hara. 1997. Apoptosis and Expression of Fas/Fas Ligand mRNA in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 16 (1) (January 1): 91–101.
- Hansen, Thomas, Line Olsen, Morten Lindow, Klaus D Jakobsen, Henrik Ullum, Erik Jonsson, Ole A Andreassen, et al. 2007. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology. *PloS one* 2 (9): e873.
- Hariharan, Manoj, Vinod Scaria, Beena Pillai, et Samir K Brahmachari. 2005. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochemical and biophysical research communications* 337 (4)
- Hart, Steven N, Ye Li, Kaori Nakamoto, Eva-anne Subileau, David Steen, et Xiao-bo Zhong. 2010. A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38 (6) (juin): 988-994.
- Hayes, John D, Jack U Flanagan, et Ian R Jowsey. 2005. Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45: 51-88.
- Hecht, S S. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91 (14) (juillet 21): 1194-1210.
- Heneghan, H M, N Miller, et M J Kerin. 2010. Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 11 (5) (mai): 354-361.
- Hilberg, Ole, Ulf Simonsen, Roland du Bois, and Elisabeth Bendstrup. 2012. Pirfenidone: Significant Treatment Effects in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The Clinical Respiratory Journal* 6 (3) (July): 131–143.
- Hildebrandt-Eriksen, Elisabeth S, Vibeke Aarup, Robert Persson, Henrik Frydenlund Hansen, Martin E Munk, et Henrik Orum. 2012. A Locked Nucleic Acid Oligonucleotide Targeting MicroRNA 122 Is Well-Tolerated in Cynomolgus Monkeys. *Nucleic acid therapeutics* (avril 30).
- Hodgson, Ernest, et Randy L Rose. 2007. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacology & therapeutics* 113 (2) (février): 420-428.
- Hodgson, Ulla, Ville Pulkkinen, Morag Dixon, Myriam Peyrard-Janvid, Marko Rehn, Paivi Lahermo, Vesa Ollikainen, et al. 2006. ELMOD2 Is a Candidate Gene for Familial Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Human Genetics* 79 (1) (July): 149–154.
- Holliday, Robin. 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society* 1 (2) (juin): 76-80.
- Horton, M R, S K Danoff, and N Lechtzin. 2008. Thalidomide Inhibits the Intractable Cough of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Thorax* 63 (8) (August): 749.
- Houghton, Jeanmarie, Calin Stoicov, Sachiyo Nomura, Arlin B Rogers, Jane Carlson, Hanchen Li, Xun Cai, James G Fox, James R Goldenring, and Timothy C Wang. 2004. Gastric Cancer Originating from Bone Marrow-derived Cells. *Science (New York, N.Y.)* 306 (5701) (November 26): 1568–1571.
- Hu, Jun, Yaxing Xu, Junli Hao, Saifeng Wang, Changfei Li, et Songdong Meng. 2012. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein & cell* 3 (5) (mai): 364-371.
- Huang, Steven K, Eric S White, Scott H Wettlaufer, Heather Grifka, Cory M Hogaboam, Victor J Thannickal, Jeffrey C Horowitz, et Marc Peters-Golden. 2009. Prostaglandin E (2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (12) (décembre): 4317-4326.
- Huang, Steven K., Scott H. Wettlaufer, Jooho Chung, et Marc Peters-Golden. 2008. Prostaglandin E2 Inhibits Specific Lung Fibroblast Functions via Selective Actions of PKA and Epac-1. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 39 (4) (octobre): 482-489.
- Huang, Steven, Scott H Wettlaufer, Cory Hogaboam, David M Aronoff, et Marc Peters-Golden. 2007. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts

- via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 292 (2) (février): L405-413.
- Huang, Yan, Melissa Crawford, Natalia Higueta-Castro, Patrick Nana-Sinkam, et Samir N Ghadiali. 2012. miR-146a regulates mechanotransduction and pressure-induced inflammation in small airway epithelium. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* (mai 16). Doi
- Huang, Ying, et Wolfgang Sadée. 2006. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer letters* 239 (2) (août 8): 168-182.
- Hukkanen, J, A Lassila, K Päivärinta, S Valanne, S Sarpo, J Hakkola, O Pelkonen, et H Raunio. 2000. Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22 (3) (mars): 360-366.
- Iorio, Marilena V, Rosa Visone, Gianpiero Di Leva, Valentina Donati, Fabio Petrocca, Patrizia Casalini, Cristian Taccioli, et al. 2007. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer research* 67 (18) (septembre 15): 8699-8707.
- Izzotti, Alberto, George A Calin, Patrizio Arrigo, Vernon E Steele, Carlo M Croce, et Silvio De Flora. 2009. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (3) (mars): 806-812.
- Izzotti, Alberto, George A Calin, Vernon E Steele, Carlo M Croce, et Silvio De Flora. 2009. Relationships of microRNA expression in mouse lung with age and exposure to cigarette smoke and light. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (9) (septembre): 3243-3250.
- Jalas, John R, Xinxin Ding, et Sharon E Murphy. 2003. Comparative metabolism of the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol by rat cytochrome P450 2A3 and human cytochrome P450 2A13. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31 (10) (octobre): 1199-1202.
- Jardim, Melanie J, Rebecca C Fry, Ilona Jaspers, Lisa Dailey, et David Diaz-Sanchez. 2009. Disruption of microRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways. *Environmental health perspectives* 117 (11) (novembre): 1745-1751.
- Jirtle, Randy L, et Michael K Skinner. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility . *Nature reviews. Genetics* 8 (4) (avril): 253-262.
- Johnson, Steven M, Helge Grosshans, Jaclyn Shingara, Mike Byrom, Rich Jarvis, Angie Cheng, Emmanuel Labourier, Kristy L Reinert, David Brown, et Frank J Slack. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120 (5) (mars 11): 635-647.
- Jopling, C L, K L Norman, et P Sarnow. 2006. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71: 369-376.
- Jopling, Catherine L, Sylvia Schütz, et Peter Sarnow. 2008. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell host & microbe* 4 (1) (juillet 17): 77-85.
- Jopling, Catherine L. 2008. Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122 . *Biochemical Society transactions* 36 (Pt 6) (décembre): 1220-1223.
- Juan, Aster H., Roshan M. Kumar, Joseph G. Marx, Richard A. Young, et Vittorio Sartorelli. 2009. Mir-214-Dependent Regulation of the Polycomb Protein Ezh2 in Skeletal Muscle and Embryonic Stem Cells. *Molecular cell* 36 (1) (octobre 9): 61-74.
- Kanda, Tomohiro, Osamu Ishibashi, Yutaka Kawahigashi, Takuya Mishima, Takuji Kosuge, Yoshiaki Mizuguchi, Tetsuya Shimizu, et al. 2010. Identification of obstructive jaundice-related microRNAs in mouse liver. *Hepato-gastroenterology* 57 (102-103) (octobre): 1013-1023.
- Kang, Keon Wook, Seung Jin Lee, et Sang Geon Kim. 2005. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 7 (11-12) (décembre): 1664-1673.
- Kang, Yeon-Joo, Uri R. Mbye, Cynthia J. DeLong, Masayuki Wada, et William L. Smith. 2007. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress in Lipid Research* 46 (2) (mars): 108-125.

- Katsuoka, Fumiki, Hozumi Motohashi, Tetsuro Ishii, Hiroyuki Aburatani, James Douglas Engel, et Masayuki Yamamoto. 2005. Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Molecular and cellular biology* 25 (18) (septembre): 8044-8051.
- Kelada, Samir N, David L Eaton, Sophia S Wang, Nathaniel R Rothman, and Muin J Khoury. 2003. The Role of Genetic Polymorphisms in Environmental Health. *Environmental Health Perspectives* 111 (8) (June): 1055–1064.
- Kelly, Brian G, She S Lok, Philip S Hasleton, Jim J Egan, and James P Stewart. 2002. A Rearranged Form of Epstein-Barr Virus DNA Is Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166 (4) (August 15): 510–513.
- Kenyon, Nicholas, and Fu-Tong Liu. 2011. Pulmonary Effects of Diesel Exhaust: Neutrophilic Inflammation, Oxidative Injury, and Asthma. *The American Journal of Pathology* 179 (6) (December): 2678–2682. doi:10.1016/j.ajpath.2011.08.031.
- Kerr, Thomas A, Kevin M Korenblat, et Nicholas O Davidson. 2011. MicroRNAs and liver disease. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine* 157 (4) (avril): 241-252.
- King, T E, Jr, J A Tooze, M I Schwarz, K R Brown, and R M Cherniack. 2001. Predicting Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Scoring System and Survival Model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (7) (October 1): 1171–1181.
- King, T E, Jr, M I Schwarz, K Brown, J A Tooze, T V Colby, J A Waldron Jr, A Flint, W Thurlbeck, and R M Cherniack. 2001. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Relationship Between Histopathologic Features and Mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (6) (September 15): 1025–1032.
- King, Talmadge E, Jr, Carlo Albera, Williamson Z Bradford, Ulrich Costabel, Phil Hormel, Lisa Lancaster, Paul W Noble, et al. 2009. Effect of Interferon Gamma-1b on Survival in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (INSPIRE): a Multicentre, Randomised, Placebo-controlled Trial. *Lancet* 374 (9685) (July 18): 222–228.
- King, Talmadge E, Jr, Kevin K Brown, Ganesh Raghu, Roland M du Bois, David A Lynch, Fernando Martinez, Dominique Valeyre, et al. 2011. BUILD-3: a Randomized, Controlled Trial of Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (1) (July 1): 92–99.
- Kirkham, Sara, Umme Kolsum, Karine Rousseau, Dave Singh, Jørgen Vestbo, and David J Thornton. 2008. MUC5B Is the Major Mucin in the Gel Phase of Sputum in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (10) (November 15): 1033–1039.
- Kolfschoten, I G M, E Roggli, V Nesca, et R Regazzi. 2009. Role and therapeutic potential of microRNAs in diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 11 Suppl 4 (novembre): 118-129.
- Kolodsick, Jill E., Marc Peters-Golden, Jose Larios, Galen B. Toews, Victor J. Thannickal, et Bethany B. Moore. 2003. Prostaglandin E2 Inhibits Fibroblast to Myofibroblast Transition via E. Prostanoid Receptor 2 Signaling and Cyclic Adenosine Monophosphate Elevation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29 (5) (novembre 1): 537-544.
- Kota, Janaiah, Raghu R Chivukula, Kathryn A O'Donnell, Erik A Wentzel, Chrystal L Montgomery, Hun-Way Hwang, Tsung-Cheng Chang, et al. 2009. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137 (6) (juin 12): 1005-1017.
- Kubo, Hiroshi, Katsutoshi Nakayama, Masaru Yanai, Tomoko Suzuki, Mutsuo Yamaya, Mika Watanabe, and Hidetada Sasaki. 2005. Anticoagulant Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 128 (3) (September): 1475–1482.
- Kuhn, Stephanie, Stuart L Johnson, David N Furness, Jing Chen, Neil Ingham, Jennifer M Hilton, Georg Steffes, et al. 2011. miR-96 regulates the progression of differentiation in mammalian cochlear inner and outer hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (6) (février 8): 2355-2360.
- Kumar, Madhu S., Stefan J. Erkeland, Ryan E. Pester, Cindy Y. Chen, Margaret S. Ebert, Phillip A. Sharp, et Tyler Jacks. 2008. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (10) (mars 11): 3903-3908.

- Kumar, Manish, Tanveer Ahmad, Amit Sharma, Ulaganathan Mabalirajan, Ankur Kulshreshtha, Anurag Agrawal, et Balaram Ghosh. 2011. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128 (5) (novembre): 1077-1085.e1-10.
- Künzli, Nino, et Ira B Tager. 2005. Air pollution: from lung to heart. *Swiss medical weekly* 135 (47-48) (décembre 10): 697-702.
- Kunz-Schughart, L A, J Doetsch, W Mueller-Klieser, et K Groebe. 2000. Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture. *American journal of physiology. Cell physiology* 278 (4) (avril): C765-780.
- Kunzschughart, L, A Simm, et W Muellerklieser. 1995. Oncogene-associated transformation of rodent fibroblasts is accompanied by large morphologic and metabolic alterations. *Oncology reports* 2 (4) (juillet): 651-661.
- Kuwano, K, H Miyazaki, N Hagimoto, M Kawasaki, M Fujita, R Kunitake, Y Kaneko, and N Hara. 1999. The Involvement of Fas-Fas Ligand Pathway in Fibrosing Lung Diseases. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20 (1) (January): 53-60.
- Kuwano, K, M Kawasaki, T Maeyama, N Hagimoto, N Nakamura, K Shirakawa, and N Hara. 2000. Soluble Form of Fas and Fas Ligand in BAL Fluid from Patients with Pulmonary Fibrosis and Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia. *Chest* 118 (2) (August): 451-458.
- Kuwano, K, N Nakashima, I Inoshima, N Hagimoto, M Fujita, M Yoshimi, T Maeyama, N Hamada, K Watanabe, et N Hara. 2003. Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 21 (2) (février): 232-240.
- Kuwano, K., R. Kunitake, M. Kawasaki, Y. Nomoto, N. Hagimoto, Y. Nakanishi, and N. Hara. 1996. P21Waf1/Cip1/Sdi1 and P53 Expression in Association with DNA Strand Breaks in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (2) (August 1): 477-483.
- Kuwano, Kazuyoshi, Naoki Hagimoto, Masayuki Kawasaki, Takehiro Yatomi, Norio Nakamura, Shigekazu Nagata, Takashi Suda, et al. 1999. Essential Roles of the Fas-Fas Ligand Pathway in the Development of Pulmonary Fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 104 (1) (July 1): 13-19.
- Kuwano, Kazuyoshi, Ritsuko Kunitake, Takashige Maeyama, Naoki Hagimoto, Masayuki Kawasaki, Tokuji Matsuba, Michihiro Yoshimi, Ichiro Inoshima, Koichiro Yoshida, and Nobuyuki Hara. 2001. "Attenuation of Bleomycin-induced Pneumopathy in Mice by a Caspase Inhibitor." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 280 (2): L316-L325.
- Lanza, D L, et G S Yost. 2001. Selective dehydrogenation/oxygenation of 3-methylindole by cytochrome p450 enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 29 (7) (juillet): 950-953.
- Latronico, Michael V G, et Gianluigi Condorelli. 2009. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nature reviews. Cardiology* 6 (6) (juin): 419-429.
- Leclerc, Julie, Elisabeth Courcot-Ngoubo Ngangue, Christelle Cauffiez, Delphine Allorge, Nicolas Pottier, Jean-Jacques Lafitte, Michel Debaert, Sophie Jaillard, Franck Broly, et Jean-Marc Lo-Guidice. 2011. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie* 93 (6) (juin): 1012-1027.
- Leclerc, Julie, Gilles Tournel, Elisabeth Courcot-Ngoubo Ngangue, Nicolas Pottier, Jean-Jacques Lafitte, Sophie Jaillard, Eric Mensier, Michel Lhermitte, Franck Broly, et Jean-Marc Lo-Guidice. 2010. Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral lung tissues: Differential expression in non-small cell lung cancers. *Biochimie* 92 (3) (mars): 292-306.
- Lee, Joyce S, Harold R Collard, Ganesh Raghunath, Matthew P Sweet, Steven R Hays, Guilherme M Campos, Jeffrey A Golden, and Talmadge E King Jr. 2010. Does Chronic Microaspiration Cause Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *The American Journal of Medicine* 123 (4) (April): 304-311.
- Lee, R C, R L Feinbaum, et V Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5) (décembre 3): 843-854.
- Lee, Yoontae, Minju Kim, Jinju Han, Kyu-Hyun Yeom, Sanghyuk Lee, Sung Hee Baek, et V Narry Kim. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23 (20) (septembre 13): 4051-4060.

- Lee, Youn-Bok, Ioannis Bantounas, Do-Young Lee, Leonidas Phylactou, Maeve A Caldwell, et James B Uney. 2009. Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic acids research* 37 (1) (janvier): 123-128.
- Levy, Carmit, Mehdi Khaled, Dimitrios Iliopoulos, Maja M Janas, Steffen Schubert, Sophie Pinner, Po-Hao Chen, et al. 2010. Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Molecular cell* 40 (5) (décembre 10): 841-849.
- Li, D, P F Firozi, L E Wang, C H Bosken, M R Spitz, W K Hong, et Q Wei. 2001. Sensitivity to DNA damage induced by benzo(a)pyrene diol epoxide and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Cancer research* 61 (4) (février 15): 1445-1450.
- Li, Jordan Yz, Tuck Y Yong, Michael Z Michael, et Jonathan M Gleadle. 2010. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 15 (6) (septembre): 599-608.
- Li, Y F, F D Gilliland, K Berhane, R McConnell, W J Gauderman, E B Rappaport, et J M Peters. 2000. Effects of in utero and environmental tobacco smoke exposure on lung function in boys and girls with and without asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 162 (6) (décembre): 2097-2104.
- Lin, Edward A, Li Kong, Xiao-Hui Bai, Yi Luan, et Chuan-Ju Liu. 2009. miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *The Journal of biological chemistry* 284 (17) (avril 24): 11326-11335.
- Lipson, Kenneth E, Carol Wong, Yuchin Teng, et Suzanne Spong. 2012. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 5 (Suppl 1) (juin 6): S24.
- Liu, Gang, Arnaud Friggeri, Yanping Yang, Jadranka Milosevic, Qiang Ding, Victor J Thannickal, Naftali Kaminski, et Edward Abraham. 2010. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *The Journal of experimental medicine* 207 (8) (août 2): 1589-1597.
- Loebel, David A F, Bonny Tsoi, Nicole Wong, et Patrick P L Tam. 2005. A conserved noncoding intronic transcript at the mouse Dnm3 locus. *Genomics* 85 (6) (juin): 782-789.
- Lomas, Nicola J, Keira L Watts, Khondoker M Akram, Nicholas R Forsyth, et Monica A Spiteri. 2012. Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 5 (1) (janvier 7): 58-71.
- Lu, Jun, Gad Getz, Eric A Miska, Ezequiel Alvarez-Saavedra, Justin Lamb, David Peck, Alejandro Sweet-Cordero, et al. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435 (7043) (juin 9): 834-838.
- Lund, Elsebet, Stephan Güttinger, Angelo Calado, James E Dahlberg, et Ulrike Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)* 303 (5654) (2): 95-98.
- Ma, Jane Y C, et Joseph K H Ma. 2002. The dual effect of the particulate and organic components of diesel exhaust particles on the alteration of pulmonary immune/inflammatory responses and metabolic enzymes. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 20 (2) (novembre): 117-147.
- Ma, Ning, Xidi Wang, Yu Qiao, Fuyuan Li, Yang Hui, Chaoxia Zou, Jianfeng Jin, et al. 2011. Coexpression of an intronic microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. *Molecular and cellular endocrinology* 333 (1) (février 10): 96-101.
- Maher, Toby M., Iona C. Evans, Stephen E. Bottoms, Paul F. Mercer, Andrew J. Thorley, Andrew G. Nicholson, Geoffrey J. Laurent, Teresa D. Tetley, Rachel C. Chambers, et Robin J. McAnulty. 2010. Diminished Prostaglandin E2 Contributes to the Apoptosis Paradox in Idiopathic Pulmonary Fibrosis 182 (1) (juillet 1): 73-82.
- Marcet, Brice, Benoît Chevalier, Guillaume Luxardi, Christelle Coraux, Laure-Emmanuelle Zaragosi, Marie Cibois, Karine Robbe-Sermesant, et al. 2011. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature cell biology* 13 (6) (juin): 693-699.
- Marchand-Adam, Sylvain, Aurélie Fabre, Arnaud André Mailleux, Joelle Marchal, Christophe Quesnel, Hiroaki Kataoka, Michel Aubier, Monique Dehoux, Paul Soler, et Bruno Crestani. 2006. Defect of pro-hepatocyte growth factor activation by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174 (1) (juillet 1): 58-66.

- Marchand-Adam, Sylvain, Laurent Plantier, Dominique Bernuau, Agnès Legrand, Murielle Cohen, Joëlle Marchal, Paul Soler, et al. 2005. Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta l. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32 (5) (mai): 470-477.
- Marchitti, Satori A, Chad Brocker, Dimitrios Stagos, et Vasilis Vasiliou. 2008. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 4 (6) (juin): 697-720.
- Mascaux, C., J. F. Laes, G. Anthoine, A. Haller, V. Ninane, A. Burny, et J. P. Sculier. Evolution of microRNA Expression During Human Bronchial Squamous Carcinogenesis . <http://erj.ersjournals.com>.
- Maurer, Britta, Joanna Stanczyk, Astrid Jüngel, Alfiya Akhmetshina, Michelle Trenkmann, Matthias Brock, Otylia Kowal-Bielecka, et al. 2010. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 62 (6) (juin): 1733-1743.
- McKeown, S, A G Richter, C O'Kane, D F McAuley, and D R Thickett. 2009. MMP Expression and Abnormal Lung Permeability Are Important Determinants of Outcome in IPF. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 33 (1) (January): 77-84.
- Mees, Soeren Torge, Wolf Arif Mardin, Christina Schleicher, Mario Colombo-Benkmann, Norbert Senninger, et Joerg Haier. 2011. Role of tumor microenvironment on gene expression in pancreatic cancer tumor models. *The Journal of Surgical Research* 171 (1) (novembre): 136-142.
- Miko, Edit, Zsolt Czimmerer, Eszter Csányk, Gábor Boros, Júlia Buslig, Balázs Dezso, et Beáta Scholtz. 2009. Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer. *Experimental lung research* 35 (8) (octobre): 646-664.
- Miyake, Yoshihiro, Satoshi Sasaki, Tetsuji Yokoyama, Kingo Chida, Arata Azuma, Takafumi Suda, Shoji Kudoh, et al. 2005. Occupational and Environmental Factors and Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Japan. *The Annals of Occupational Hygiene* 49 (3) (April): 259-265.
- Moodley, Yuben P, Paul Caterina, Amelia K Scaffidi, Neil L Misso, John M Papadimitriou, Robin J McAnulty, Geoffrey J Laurent, Philip J Thompson, and Darryl A Knight. 2004. Comparison of the Morphological and Biochemical Changes in Normal Human Lung Fibroblasts and Fibroblasts Derived from Lungs of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis During FasL-induced Apoptosis. *The Journal of Pathology* 202 (4): 486-495.
- Moodley, Yuben, Ursula Manuelpillai, and Daniel J Weiss. 2011. Cellular Therapies for Lung Disease: A Distant Horizon. *Respirology* 16 (2) (February 1): 223-237.
- Morsy, M A, Y Isohama, and T Miyata. 2001. Prostaglandin E(2) Increases Surfactant Secretion via the EP(1) Receptor in Rat Alveolar Type II Cells. *European Journal of Pharmacology* 426 (1-2) (August 24): 21-24.
- Murakami, Yoshiki, Hidenori Toyoda, Masami Tanaka, Masahiko Kuroda, Yoshinori Harada, Fumihiko Matsuda, Atsushi Tajima, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, et Kunitada Shimotohno. 2011. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PloS one* 6 (1): e16081.
- Nakata, Kotoko, Yoshitomo Tanaka, Tatsuya Nakano, Tatsuhiko Adachi, Hiroshi Tanaka, Tsuguchika Kaminuma, et Toshihisa Ishikawa. 2006. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 21 (6) (décembre): 437-457.
- Nana-Sinkam, Serge P, Melissa G Hunter, Gerard J Nuovo, Thomas D Schmittgen, Richard Gelinas, David Galas, et Clay B Marsh. 2009. Integrating the MicroRNome into the study of lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179 (1) (janvier 1): 4-10.
- Needleman, P, J Turk, B A Jakschik, A R Morrison, et J B Lefkowitz. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annual review of biochemistry* 55: 69-102.
- Nichols, William K, Rashmi Mehta, Konstantine Skordos, Katherine Macé, Andrea M A Pfeifer, Brian A Carr, Tamara Minko, Scott W Burchiel, et Garold S Yost. 2003. 3-methylindole-induced toxicity to human bronchial epithelial cell lines. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 71 (2) (février): 229-236.

- Noetel, Andrea, Monika Kwiecinski, Natalia Elfimova, Jia Huang, et Margarete Odenthal. 2012. microRNA are Central Players in Anti- and Profibrotic Gene Regulation during Liver Fibrosis . *Frontiers in physiology* 3: 49.
- Noorbakhsh, Farshid, Rithwik Ramachandran, Nicola Barsby, Kristofor K Ellestad, Andrea LeBlanc, Peter Dickie, Glen Baker, Morley D Hollenberg, Eric A Cohen, et Christopher Power. 2010. MicroRNA profiling reveals new aspects of HIV neurodegeneration: caspase-6 regulates astrocyte survival. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (6) (juin): 1799-1812.
- Ofir, Matan, Dalia Hacoheh, et Doron Ginsberg. 2011. MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Molecular cancer research: MCR* 9 (4) (avril): 440-447.
- Olsavsky, Katy M, Jeanine L Page, Mary C Johnson, Helmut Zarbl, Stephen C Strom, et Curtis J Omiecinski. 2007. Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues . *Toxicology and applied pharmacology* 222 (1) (juillet 1): 42-56.
- Ortiz, Luis A, Frederica Gambelli, Christine McBride, Dina Gaupp, Melody Baddoo, Naftali Kaminski, and Donald G Phinney. 2003. Mesenchymal Stem Cell Engraftment in Lung Is Enhanced in Response to Bleomycin Exposure and Ameliorates Its Fibrotic Effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14) (July 8): 8407-8411. doi:10.1073/pnas.1432929100.
- Pandit, Kusum V, David Corcoran, Hanadie Yousef, Manohar Yarlagadda, Argyris Tzouveleakis, Kevin F Gibson, Kazuhisa Konishi, et al. 2010. Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 (2) (juillet 15): 220-229.
- Panganiban, Ronald Allan M, et Regina M Day. 2011. Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacologica Sinica* 32 (1) (janvier): 12-20.
- Pardo, Annie, Moisés Selman, and Naftali Kaminski. 2008. Approaching the Degradome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (6-7) (June): 1141-1155.
- Pascussi, Jean-Marc, Sabine Gerbal-Chaloin, Cédric Duret, Martine Daujat-Chavanieu, Marie-José Vilarem, et Patrick Maurel. 2008. The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences . *Annual review of pharmacology and toxicology* 48: 1-32.
- Pasquinelli, A E, B J Reinhart, F Slack, M Q Martindale, M I Kuroda, B Maller, D C Hayward, et al. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA . *Nature* 408 (6808) (novembre 2): 86-89.
- Patel, Vishal, et Lama Noureddine. 2012. MicroRNAs and fibrosis . *Current opinion in nephrology and hypertension* 21 (4) (juillet): 410-416.
- Peacock, Janet L, H Ross Anderson, Stephen A Bremner, Louise Marston, Terence A Seemungal, David P Strachan, et Jadwiga A Wedzicha. 2011. Outdoor air pollution and respiratory health in patients with COPD. *Thorax* 66 (7) (juillet): 591-596.
- Peters, Lasse, et Gunter Meister. 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell* 26 (5) (mai 8): 611-623.
- Petersen, Thomas H, Elizabeth A Calle, Liping Zhao, Eun Jung Lee, Liqiong Gui, MichaSam B Raredon, Kseniya Gavrillov, et al. 2010. Tissue-engineered Lungs for in Vivo Implantation. *Science (New York, N.Y.)* 329 (5991) (July 30): 538-541.
- Piipari, R, K Savela, T Nurminen, J Hukkanen, H Raunio, J Hakkola, T Mäntylä, et al. 2000. Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 86 (5) (juin 1): 610-616.
- Pillai, Ramesh S, Suvendra N Bhattacharyya, et Witold Filipowicz. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology* 17 (3) (février): 118-126.
- Plataki, Maria, Anastassios V. Koutsopoulos, Katherine Darivianaki, George Delides, Nikolaos M. Siafakas, and Demosthenes Bouros. 2005. Expression of Apoptotic and Antiapoptotic Markers in Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. *Chest* 127 (1) (January 1): 266-274. doi:10.1378/chest.127.1.266.

- Pottier, Nicolas, Thomas Maurin, Benoit Chevalier, Marie-Pierre Puisségur, Kevin Lebrigand, Karine Robbe-Sermesant, Thomas Bertero, et al. 2009. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PloS One* 4 (8): e6718.
- Pruzanski, Waldemar, Eva Stefanski, Peter Vadas, Brian P. Kennedy, et Henk van den Bosch. 1998. Regulation of the cellular expression of secretory and cytosolic phospholipases A2, and cyclooxygenase-2 by peptide growth factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1403 (1): 47-56.
- Psathakis, K, D Mermigkis, G Papatheodorou, S Loukides, P Panagou, V Polychronopoulos, N M Siafakas, et D Bouros. 2006. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *European journal of clinical investigation* 36 (5) (mai): 362-367.
- Pulkkinen, Ville, Sara Bruce, Johanna Rintahaka, Ulla Hodgson, Tarja Laitinen, Harri Alenius, Vuokko L. Kinnula, Marjukka Myllärniemi, Sampsa Matikainen, and Juha Kere. 2010. ELMOD2, a Candidate Gene for Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Regulates Antiviral Responses. *The FASEB Journal* 24 (4): 1167–1177.
- Quesnel, Christophe, Sylvain Marchand-Adam, Aurélie Fabre, Joëlle Marchal-Somme, Ivan Philip, Sigismond Lasocki, Véronique Leçon, Bruno Crestani, et Monique Dehoux. 2008. Regulation of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in patients with acute lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (2) (février): L334-343.
- Raghu, Ganesh, Derek Weycker, John Edelsberg, Williamson Z Bradford, and Gerry Oster. 2006. Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174 (7) (October 1): 810–816.
- Raghu, Ganesh, Kevin J Anstrom, Talmadge E King Jr, Joseph A Lasky, and Fernando J Martinez. 2012. Prednisone, Azathioprine, and N-acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 366 (21) (May 24): 1968–1977.
- Raghu, Ganesh, Kevin K Brown, Ulrich Costabel, Vincent Cottin, Roland M du Bois, Joseph A Lasky, Michiel Thomeer, et al. 2008. Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Etanercept: An Exploratory, Placebo-controlled Trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (9) (November 1): 948–955.
- Rahman, I, et W MacNee. 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 16 (3) (septembre): 534-554.
- Rahman, Irfan, Saibal K Biswas, et Aruna Kode. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European journal of pharmacology* 533 (1-3) (mars 8): 222-239.
- Razani, Babak, Xiao Bo Wang, Jeffery A Engelman, Michela Battista, Guy Lagaud, Xiao Lan Zhang, Burkhard Kneitz, et al. 2002. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Molecular and cellular biology* 22 (7) (avril): 2329-2344.
- Reinhart, B J, F J Slack, M Basson, A E Pasquinelli, J C Bettinger, A E Rougvie, H R Horvitz, et G Ruvkun. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403 (6772) (février 24): 901-906.
- Richeldi, Luca, Ulrich Costabel, Moises Selman, Dong Soon Kim, David M Hansell, Andrew G Nicholson, Kevin K Brown, et al. 2011. Efficacy of a Tyrosine Kinase Inhibitor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 365 (12) (September 22): 1079–1087.
- Ritter, J K. 2000. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chemico-biological interactions* 129 (1-2) (décembre 1): 171-193.
- Roderburg, Christoph, Gerd-Willem Urban, Kira Bettermann, Mihael Vucur, Henning Zimmermann, Sabine Schmidt, Jörn Janssen, et al. 2011. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*
- Romieu, I, J J Sienna-Monge, M Ramírez-Aguilar, H Moreno-Macías, N I Reyes-Ruiz, B Estela del Río-Navarro, M Hernández-Avila, et S J London. 2004. Genetic polymorphism of GSTM1 and antioxidant supplementation influence lung function in relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City. *Thorax* 59 (1) (janvier): 8-10.
- Romieu, I, M Ramirez-Aguilar, J J Sienna-Monge, H Moreno-Macías, B E del Rio-Navarro, G David, J Marzec, M Hernández-Avila, et S London. 2006. GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children

- exposed to ozone. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 28 (5) (novembre): 953-959.
- Romieu, Isabelle, Hortensia Moreno-Macias, et Stephanie J London. 2010. Gene by environment interaction and ambient air pollution. *Proceedings of the American Thoracic Society* 7 (2) (mai): 116-122.
- Sapey, E, et R A Stockley. 2006. COPD exacerbations • 2: Aetiology. *Thorax* 61 (3) (mars): 250-258.
- Saugstad, Julie A. 2010. MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30 (9) (septembre): 1564-1576.
- Savale, Laurent, Ari Chaouat, Sylvie Bastuji-Garin, Elisabeth Marcos, Laurent Boyer, Bernard Maitre, Mourad Sarni, et al. 2009. Shortened Telomeres in Circulating Leukocytes of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179 (7) (April 1): 566–571.
- Schembri, Frank, Sriram Sridhar, Catalina Perdomo, Adam M Gustafson, Xiaoling Zhang, Ayla Ergun, Jining Lu, et al. 2009. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (7) (février 17): 2319-2324.
- Schikowski, Tamara, Dorothea Sugiri, Ulrich Ranft, Ulrike Gehring, Joachim Heinrich, H-Erich Wichmann, et Ursula Krämer. 2005. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respiratory Research* 6: 152.
- Schikowski, Tamara, Ulrich Ranft, Dorothee Sugiri, Andrea Vierkötter, Thomas Brüning, Volker Harth, et Ursula Krämer. 2010. Decline in air pollution and change in prevalence in respiratory symptoms and chronic obstructive pulmonary disease in elderly women. *Respiratory Research* 11: 113.
- Seibold, Max A, Anastasia L Wise, Marcy C Speer, Mark P Steele, Kevin K Brown, James E Loyd, Tasha E Fingerlin, et al. 2011. A Common MUC5B Promoter Polymorphism and Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 364 (16) (April 21): 1503–1512.
- Seitz, Hervé, et Phillip D Zamore. 2006. Rethinking the microprocessor. *Cell* 125 (5) (mai 2): 827-829.
- Selman, M, V Ruiz, S Cabrera, L Segura, R Ramírez, R Barrios, and A Pardo. 2000. TIMP-1, -2, -3, and -4 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. A Prevailing Nondegradative Lung Microenvironment? *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 (3) (September): L562–574.
- Selman, Moisés, and Annie Pardo. 2006. Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: From Innocent Targets to Serial Killers. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (4) (June): 364–372.
- Selman, Moises, Annie Pardo, Lourdes Barrera, Andrea Estrada, Susan R. Watson, Keith Wilson, Natasha Aziz, Naftali Kaminski, and Albert Zlotnik. 2006. Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (2) (January 15): 188–198.
- Severs, N J. 1988. Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *Journal of cell science* 90 (Pt 3) (juillet): 341-348.
- Shafi, Gowhar, Nishat Aliya, et Anjana Munshi. 2010. MicroRNA signatures in neurological disorders . *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 37 (2) (mars): 177-185.
- Shen, Yue-Lan, Yi-Guo Jiang, Anne R Greenlee, Lan-Lan Zhou, et Lin-Hua Liu. 2009. MicroRNA expression profiles and miR-10a target in anti-benzo[a] pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide-transformed human 16HBE cells. *Biomedical and environmental sciences: BES* 22 (1) (février): 14-21.
- Sheppard, Dean. 2005. “Integrin-mediated Activation of Latent Transforming Growth Factor Beta.” *Cancer Metastasis Reviews* 24 (3) (September): 395–402.
- Shimada, T, E M Gillam, T R Sutter, P T Strickland, F P Guengerich, et H Yamazaki. 1997. Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 25 (5) (mai): 617-622.
- Shimada, Tsutomu, et Yoshiaki Fujii-Kuriyama. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer science* 95 (1) (janvier): 1-6.

- Shimada, Tsutomu. 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21 (4) (août): 257-276.
- Shukla, A, C Timblin, K BeruBe, T Gordon, W McKinney, K Driscoll, P Vacek, et B T Mossman. 2000. Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23 (2) (août): 182-187.
- Sienra-Monge, J J, M Ramirez-Aguilar, H Moreno-Macias, N I Reyes-Ruiz, B E Del Río-Navarro, M X Ruiz-Navarro, G Hatch, et al. 2004. Antioxidant supplementation and nasal inflammatory responses among young asthmatics exposed to high levels of ozone . *Clinical and experimental immunology* 138 (2) (novembre): 317-322.
- Smith, Graeme B J, John R Bend, Leanne L Bedard, Ken R Reid, Dimitri Petsikas, et Thomas E Massey. 2003. Biotransformation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in peripheral human lung microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31 (9) (septembre): 1134-1141.
- Stern, J-B, S Jaffré, M Dehoux, et B Crestani. 2003. [Keratinocyte growth factor and Hepatocyte growth factor: their roles in alveolar epithelial repair]. *Revue des maladies respiratoires* 20 (6 Pt 1) (décembre): 896-903.
- Sugahara, K, K Iyama, M J Kuroda, et K Sano. 1998. Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats . *The Journal of pathology* 186 (1) (septembre): 90-98.
- Sunyer, J, C Spix, P Quénel, A Ponce-de-León, A Pönka, T Barumandzadeh, G Touloumi, et al. 1997. Urban air pollution and emergency admissions for asthma in four European cities: the APHEA Project. *Thorax* 52 (9) (septembre): 760-765.
- Swaigood, C M, E L French, C Noga, R H Simon, et V A Ploplis. 2000. The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system . *The American journal of pathology* 157 (1) (juillet): 177-187.
- Swigris, Jeffrey J., et Kevin K. Brown. 2010. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 24 (1): 49-54.
- Taft, Ryan J, Ken C Pang, Timothy R Mercer, Marcel Dinger, et John S Mattick. 2010. Non-coding RNAs: regulators of disease. *The Journal of pathology* 220 (2) (janvier): 126-139.
- Takizawa, Hajime. 2011. Impact of Air Pollution on Allergic Diseases. *The Korean Journal of Internal Medicine* 26 (3) (September): 262-273.
- Tanaka, T., M. Yoshimi, T. Maeyama, N. Hagimoto, K. Kuwano, and N. Hara. 2002. Resistance to Fas-mediated Apoptosis in Human Lung Fibroblast. *European Respiratory Journal* 20 (2) (August 1): 359-368.
- Tang, Yi-Wei, Joyce E Johnson, Philip J Browning, Roberto A Cruz-Gervis, Angela Davis, Barney S Graham, Kenneth L Brigham, John A Oates Jr, James E Loyd, and Arlene A Stecenko. 2003. Herpesvirus DNA Is Consistently Detected in Lungs of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6) (June): 2633-2640.
- Tarlo, Susan M. 2006. Cough: occupational and environmental considerations: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 129 (1 Suppl) (janvier): 186S-196S.
- Taskar, Varsha S, and David B Coultas. 2006. Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease? *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (4) (June): 293-298.
- Thabut, Gabriel, Jason D Christie, Philippe Ravaud, Yves Castier, Gaëlle Dauriat, Gilles Jebrak, Michel Fournier, Guy Lesèche, Raphaël Porcher, and Hervé Mal. 2009. Survival After Bilateral Versus Single-lung Transplantation for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annals of Internal Medicine* 151 (11) (December 1): 767-774.
- Thomas, Alan Q, Kirk Lane, John Phillips 3rd, Melissa Prince, Cheryl Markin, Marcy Speer, David A Schwartz, et al. 2002. Heterozygosity for a Surfactant Protein C Gene Mutation Associated with Usual Interstitial Pneumonitis and Cellular Nonspecific Interstitial Pneumonitis in One Kindred. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (9) (May 1): 1322-1328.

- Thuault, Sylvie, Ulrich Valcourt, Maj Petersen, Guidalberto Manfioletti, Carl-Henrik Heldin, et Aristidis Moustakas. 2006. Transforming growth factor- β employs HMGA2 to elicit epithelial–mesenchymal transition. *The Journal of Cell Biology* 174 (2) (juillet 17): 175-183.
- Thum, Thomas, Carina Gross, Jan Fiedler, Thomas Fischer, Stephan Kissler, Markus Bussen, Paolo Galuppo, et al. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456 (7224) (décembre 18): 980-984.
- Trédaniel, J, P Boffetta, R Saracci, and A Hirsch. 1994. Exposure to Environmental Tobacco Smoke and Risk of Lung Cancer: The Epidemiological Evidence. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 7 (10) (October): 1877–1888.
- Tsakiri, Kalliopi D, Jennifer T Cronkhite, Phillip J Kuan, Chao Xing, Ganesh Raghu, Jonathan C Weissler, Randall L Rosenblatt, Jerry W Shay, and Christine Kim Garcia. 2007. Adult-onset Pulmonary Fibrosis Caused by Mutations in Telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18) (May 1): 7552–7557.
- Turner, Michelle C, Daniel Krewski, C Arden Pope 3rd, Yue Chen, Susan M Gapstur, and Michael J Thun. 2011. Long-term Ambient Fine Particulate Matter Air Pollution and Lung Cancer in a Large Cohort of Never-smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (12) (December 15): 1374–1381. *of America* 104 (18) (May 1): 7552–7557.
- Ueda, Tetsuya, Stefano Volinia, Hiroshi Okumura, Masayoshi Shimizu, Cristian Taccioli, Simona Rossi, Hansjuerg Alder, et al. 2010. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis . *The lancet oncology* 11 (2) (février): 136-146.
- van Rooij, Eva, Lillian B. Sutherland, Jeffrey E. Thatcher, J. Michael DiMaio, R. Haris Naseem, William S. Marshall, Joseph A. Hill, et Eric N. Olson. 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (35) (septembre 2): 13027-13032.
- Vancheri, C, M A Sortino, V Tomaselli, C Mastruzzo, F Condorelli, G Bellistri, M P Pistorio, P L Canonico, et N Crimi. 2000. Different expression of TNF-alpha receptors and prostaglandin E(2)Production in normal and fibrotic lung fibroblasts: potential implications for the evolution of the inflammatory process . *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22 (5) (mai): 628-634.
- Waghray, Meghna, Zongbin Cui, Jeffrey C Horowitz, Indhu M Subramanian, Fernando J Martinez, Galen B Toews, et Victor J Thannickal. 2005. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (7) (mai): 854-856.
- Wang, Kun, et Pei-Feng Li. 2010. Foxo3a regulates apoptosis by negatively targeting miR-21 . *The Journal of biological chemistry* 285 (22) (mai 28): 16958-16966.
- Wang, Xiao Mei, Yingze Zhang, Hong Pyo Kim, Zhihong Zhou, Carol A Feghali-Bostwick, Fang Liu, Emeka Ifedigbo, et al. 2006. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine* 203 (13) (décembre 25): 2895-2906.
- Wang, Zhaoxi, Donna Neuburg, Cheng Li, Li Su, Jee Young Kim, Jiu Chiu Chen, et David C Christiani. 2005. Global gene expression profiling in whole-blood samples from individuals exposed to metal fumes. *Environmental health perspectives* 113 (2) (février): 233-241.
- Watanabe, Sugiko, Yasuaki Ueda, Shin-ichi Akaboshi, Yuko Hino, Yoko Sekita, et Mitsuyoshi Nakao. 2009. HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *The American journal of pathology* 174 (3) (mars): 854-868.
- Watanabe, Tokumitsu, Takahiro Sato, Tomokazu Amano, Yumiko Kawamura, Naohiro Kawamura, Hiroshi Kawaguchi, Naohide Yamashita, Hiroki Kurihara, et Takashi Nakaoka. 2008. Dnm3os, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 237 (12) (décembre): 3738-3748.
- Wilborn, J, L J Crofford, M D Burdick, S L Kunkel, R M Strieter, et M Peters-Golden. 1995. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *Journal of Clinical Investigation* 95 (4) (avril): 1861-1868.
- Wiley, J C, E L Coy, M W Frampton, A Torres, M J Apostolakos, G Hoehn, W H Schuermann, et al. 1997. Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide

- hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17 (1) (juillet): 114-124.
- Willis, Brigham C, Janice M Liebler, Katherine Luby-Phelps, Andrew G Nicholson, Edward D Crandall, Roland M du Bois, and Zea Borok. 2005. Induction of Epithelial-mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-beta1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 166 (5) (May): 1321-1332.
- Woods, Keith, J Michael Thomson, et Scott M Hammond. 2007. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 282 (4) (janvier 26): 2130-2134.
- WYNDER, E L, and E A GRAHAM. 1950. Tobacco Smoking as a Possible Etiologic Factor in Bronchiogenic Carcinoma; a Study of 684 Proved Cases. *Journal of the American Medical Association* 143 (4) (May 27): 329-336.
- Xiao, Jun, Xiao-Ming Meng, Xiao R Huang, Arthur CK Chung, Yu-Lin Feng, David SC Hui, Cheuk-Man Yu, Joseph JY Sung, et Hui Y Lan. 2012. miR-29 Inhibits Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Molecular Therapy* (mars 6).
- Xu, Ning, Petter Brodin, Tianling Wei, Florian Meisgen, Liv Eidsmo, Nikoletta Nagy, Lajos Kemeny, Mona Stähle, Enikő Sonkoly, et Andor Pivarcsi. 2011. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *The Journal of investigative dermatology* 131 (7) (juillet): 1521-1529. doi:10.1038/jid.2011.55.
- Yamashita, Cory M, Lior Dolgonos, Rachel L Zemans, Scott K Young, Jennifer Robertson, Natalie Briones, Tomoko Suzuki, et al. 2011. Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology* 179 (4) (octobre): 1733-1745.
- Yang, I A, K M Fong, P V Zimmerman, S T Holgate, et J W Holloway. 2008. Genetic susceptibility to the respiratory effects of air pollution. *Thorax* 63 (6) (juin): 555-563.
- Yang, Zuozhen, Shuang Chen, Xuejing Luan, Yixuan Li, Min Liu, Xin Li, Tao Liu, et Hua Tang. 2009. MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells. *IUBMB life* 61 (11) (novembre): 1075-1082.
- Yi, Rui, Dónal O'Carroll, Hilda A Pasolli, Zhihong Zhang, Fred S Dietrich, Alexander Tarakhovsky, et Elaine Fuchs. 2006. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nature genetics* 38 (3) (février): 356-362.
- Yin, G, R Chen, A B Alvero, H-H Fu, J Holmberg, C Glackin, T Rutherford, et G Mor. 2010. TWISTing stemness, inflammation and proliferation of epithelial ovarian cancer cells through MIR199A2/214. *Oncogene* 29 (24) (juin 17): 3545-3553.
- Yost GS. Sites of metabolism: lung. 1999. In/ Woolf TF, editor. *Handbook of drug metabolism*. New York: Marcel Dekker Inc. 263-278.
- Zhang, Baohong, et Xiaoping Pan. 2009. RDX induces aberrant expression of microRNAs in mouse brain and liver. *Environmental health perspectives* 117 (2) (février): 231-240.
- Zhang, Chunxiang. 2008. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiological genomics* 33 (2) (avril 22): 139-147.
- Zhang, Xing J, Hua Ye, Cheng W Zeng, Bo He, Hua Zhang, et Yue Q Chen. 2010. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer. *Journal of hematology & oncology* 3: 46.
- Zisman, David A, Marvin Schwarz, Kevin J Anstrom, Harold R Collard, Kevin R Flaherty, and Gary W Hunninghake. 2010. A Controlled Trial of Sildenafil in Advanced Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 363 (7) (August 12): 620-628.

NOM : COURCOT- NGOUBO NGANGUE Elisabeth

TITRE : Implication des microARN dans le développement des maladies pulmonaires à composante environnementale.

Exemple de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique

RESUME

Les microARN sont des petits ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides qui ont pour fonction de réguler l'expression des gènes en se fixant sur l'extrémité 3'UTR d'ARNm cibles, permettant ainsi leur dégradation ou l'arrêt de leur traduction en protéines. A ce jour, de nombreuses études ont montré l'implication des microARN dans divers processus physiologiques ou pathologiques ; leur rôle dans la réponse de l'organisme aux substances toxiques environnementales commence à être évoqué.

La FPI appartient au groupe des pneumopathies interstitielles diffuses idiopathique dont elle est la forme la plus fréquente. Elle se caractérise par la présence de foyers de prolifération de fibroblastes/myofibroblastes responsables d'une production excessive de matrice extracellulaire, une destruction progressive et irréversible de l'architecture pulmonaire entraînant la perte de la fonction respiratoire. L'agression répétée de l'épithélium respiratoire par des composés chimiques environnementaux (ou xénobiotiques) est fortement suspectée dans le déclenchement de la FPI.

Le premier objectif de mes travaux de recherche a été d'identifier des microARN susceptibles d'intervenir dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et de préciser la (les) fonction(s) de ces microARN d'intérêt. Pour atteindre cet objectif, nous avons étudié deux microARN, le miR-199a-5p et le miR-214-3p qui présentaient la particularité d'être significativement surexprimés dans les poumons de souris souffrant de fibrose pulmonaire. L'analyse systématique des profils d'expression des gènes de fibroblastes surexprimant le miR-199a-5p et le miR-214-3p nous a permis d'identifier un grand nombre de gènes qui étaient significativement modulés par ces deux microARN. Nous avons pu établir l'implication respective du miR-199a-5p et du miR-214-3p dans la régulation de la voie profibrotique TGF β et dans l'apoptose des fibroblastes pulmonaires médiée par le Fas-ligand. L'ensemble de nos résultats nous permet de suggérer l'utilisation de molécules ciblées contre ces 2 microARN dans le traitement de la FPI.

Le second objectif de mes travaux de recherche a été d'identifier le modèle cellulaire *in vitro* le plus proche du tissu pulmonaire afin d'étudier l'impact des composés toxiques environnementaux sur la pathogenèse des maladies respiratoires et, en particulier, de la FPI. Pour cela, nous avons comparé les profils d'expression génique de l'ensemble des protéines impliquées dans le métabolisme et l'éliminations des xénobiotiques, de 10 lignées cellulaires et de 4 cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, à ceux précédemment observés par notre équipe dans les tissus broncho-pulmonaires humains. L'exposition du modèle cellulaire le plus pertinent à des polluants atmosphériques permettra d'identifier les microARN associés à la toxicité pulmonaire de ces composés chimiques et de vérifier si ces microARN régulent des voies de signalisations communes à celles impliquées dans la pathogenèse de la FPI.

MOTS CLES : MicroARN, Fibrose Pulmonaire Idiopathique, Xénobiotiques, modèle cellulaire pulmonaire.