

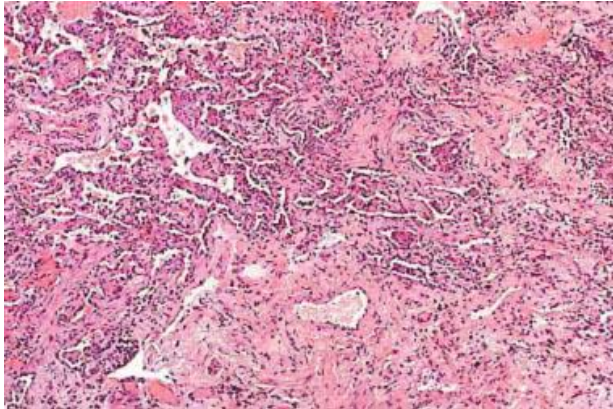
Altérations du protéome subcellulaire dans trois modèles de différenciation pro-fibrosante des fibroblastes pulmonaires in vitro (sclérodermie systémique, fibrose pulmonaire idiopathique, exposition au TGF- β 1)

Dr Laurent PLANTIER

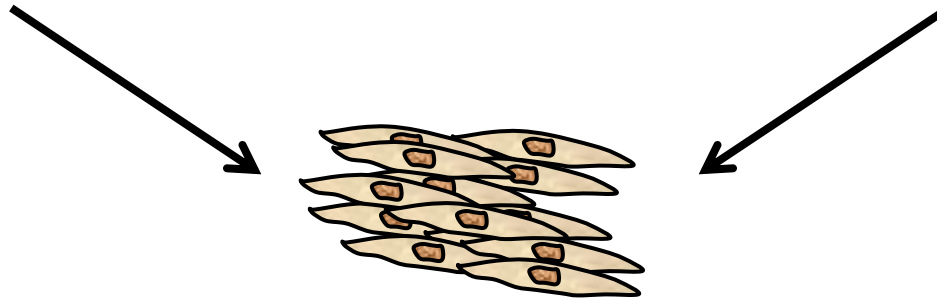
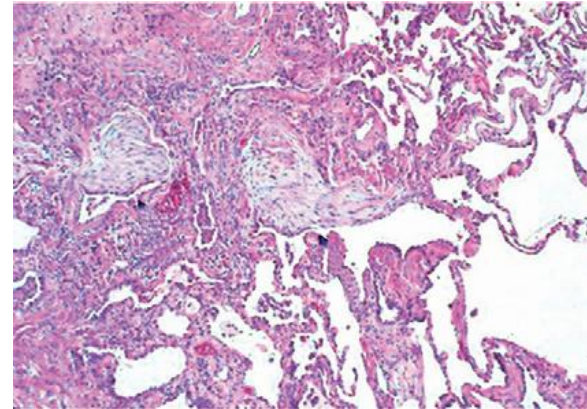
INSERM UMR700
Equipe 3 : « Inflammation et fibrogénèse » (Pr Bruno Crestani)
Faculté de Médecine Xavier Bichat, Université Paris Diderot, Paris

Activation des fibroblastes au cours des pneumopathies interstitielles diffuses (PID)

Connectivites - Sclérodermie (SSc)



Fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)



Différenciation pro-fibrosante des fibroblastes

- Différenciation myofibroblastique
- Synthèse accrue de matrice EC
- Migration / Invasivité
- Résistance à l'apoptose

Déterminants de la différenciation pro-fibrosante des fibroblastes pulmonaires

Altération du Microenvironnement

Médiateurs solubles (TGF- β 1)

- *Sime PJ, JCI 1997*

Matrice extracellulaire

- *Marinkovic A, AJRCMB 2013*

Altération des voies de signalisation

Voie inflammasome / IL1

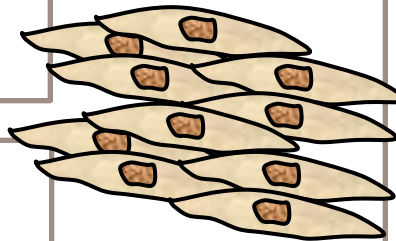
- *Artlett CM, Arthritis Rheum 2011*

Voie TGF- β / SMAD

- *Wang XM, J Exp Med 2006*

Voie PGE2

- *Wilborn J, J Clin Invest 1995*



Altération de l'expression du génome

Niveau pré-transcriptionnel

- *DNA hypermethylation*
Sanders, AJRCMB 2008
- *Histone acetylation*
Coward, Mol Cell Biol 2009

Répertoire de régulateurs transcriptionnels

- *FOXF1*

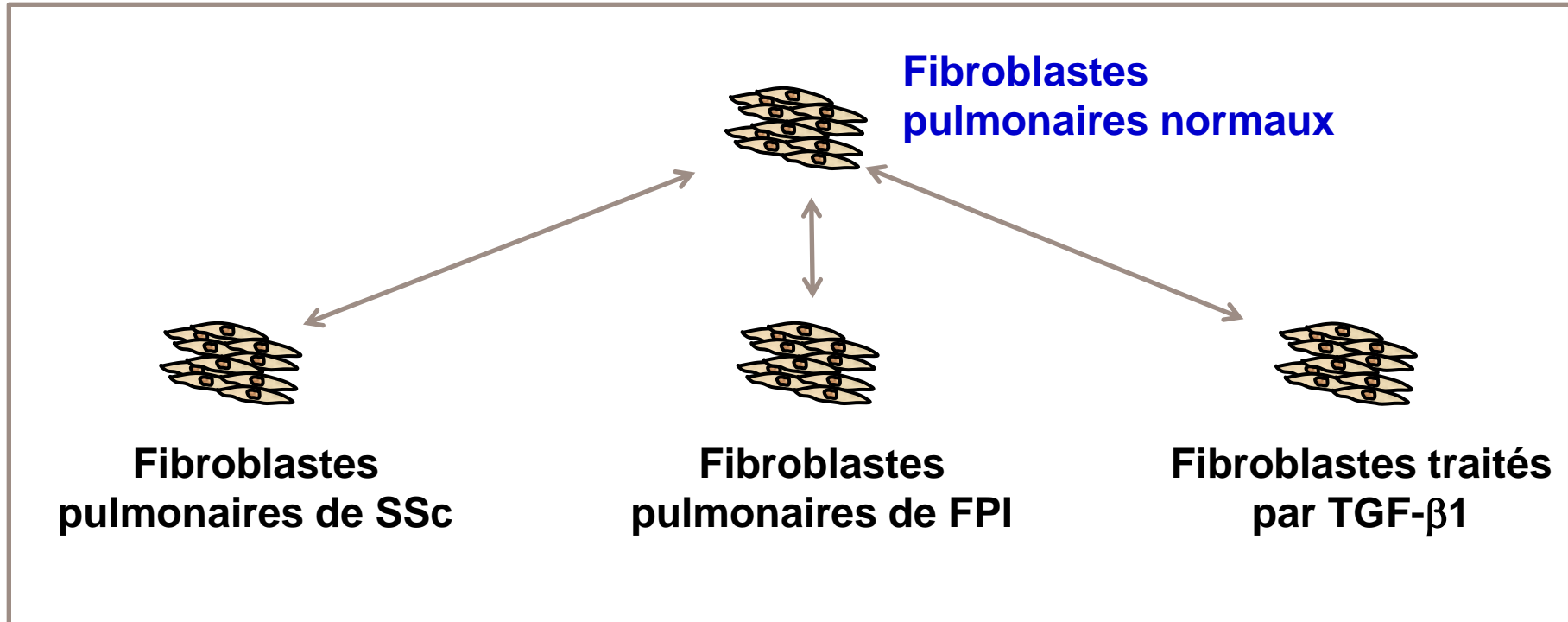
Niveau post-transcriptionnel

- *Épissage anormal*
Bloor, AJRCCM 2001
- *miRNAs*
Dakhlallah, AJRCCM 2013

Mécanismes moléculaires ?

Objectifs

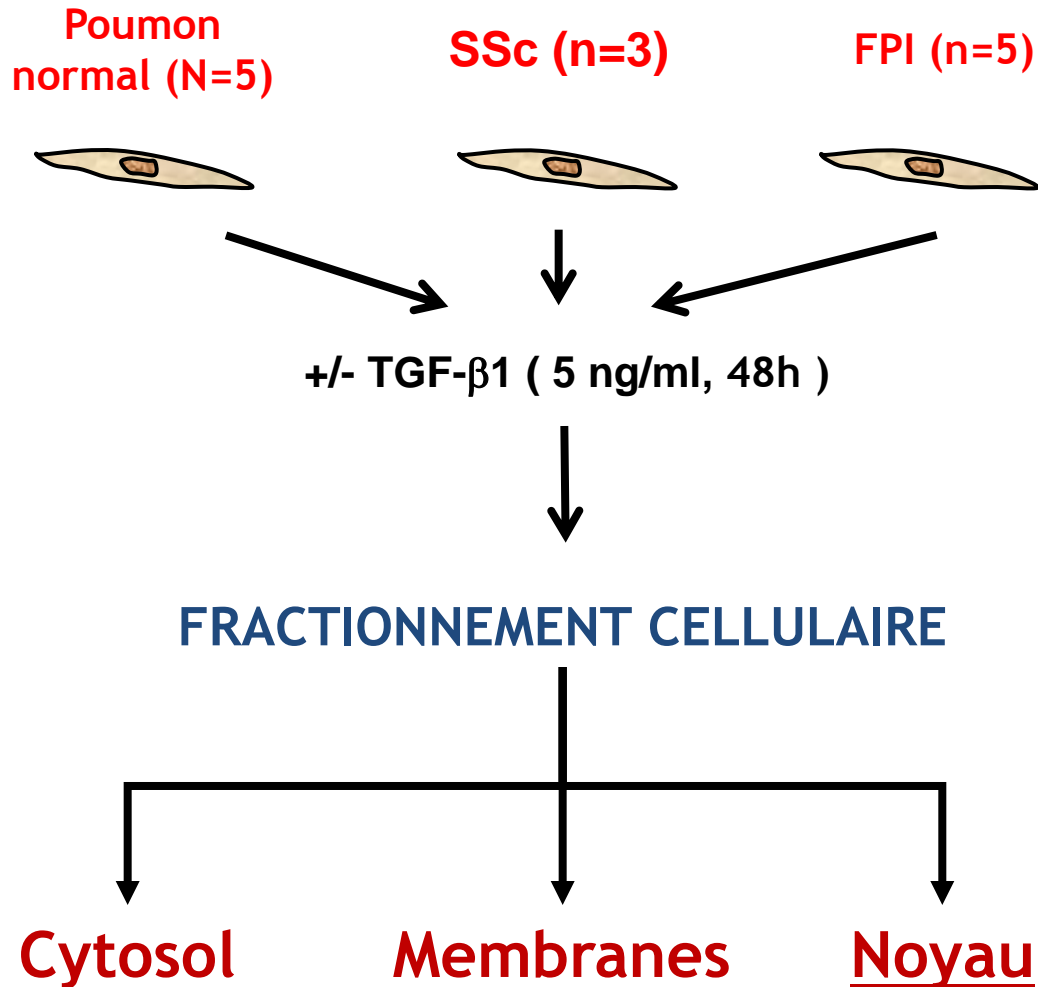
Identifier les modifications d'expression des protéines associées à la différenciation profibrosante des fibroblastes



→ Niveau d'expression global ?

→ Localisation subcellulaire ?

Méthodes : Fibroblastes pulmonaires



Fragments de poumon normal
(chirurgie carcinologique)
SSc / FPI : poumons explantés

DMEM, 80% de confluence

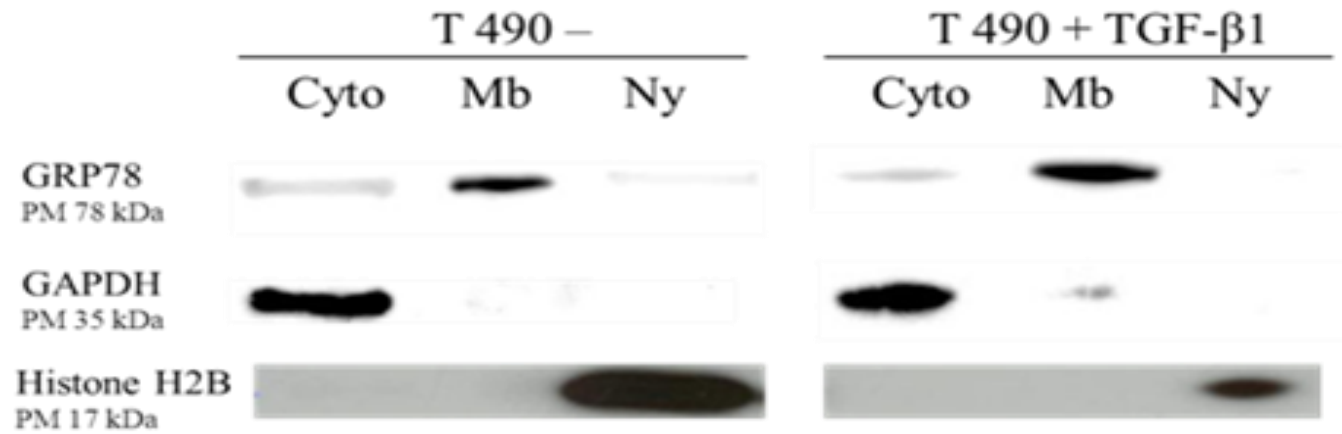
Dissociation non enzymatique

Q proteome kit (Qiagen)

- Choc osmotique
- Détergents
- Centrifugations
- Nucléase

Contrôle qualité par Immunoblot
GAPDH: Glycolyse
GRP78: Chaperonne du réticulum
Histone H2B: Chromatine

Méthodes : Contrôle de qualité des fractions

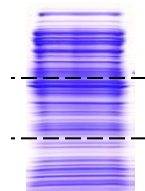


Méthodes : Analyse protéomique

Précipitation acétone,
Resuspension NH_4HCO_3 25 mM

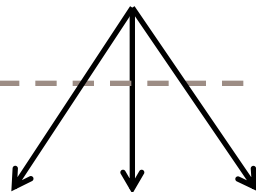


Pré-fractionnement
Sur gel (7,5 μg)



Inserm UMR 700

Analyse sans marquage



Trypsinisation



Chromatographie en phase liquide



Spectrométrie de masse

LITQ-Orbitrap

Plate-forme de
spectrométrie
de masse
Institut Jacques Monod
CNRS UMR7592

(Pr Camadro)



Analyse bioinformatique

Progenesis LC
TOPPFUN

Inserm UMR 700

Résultats : Caractérisation du protéome nucléaire

3254 protéines différentes identifiées dans les fractions nucléaires des fibroblastes pulmonaires humains

Enrichissement fonctionnel :

Processus biologiques	Nombre / termes dans le génome	p
Métabolisme des ARNm	435 / 769	$7.24.10^{-123}$
Régulation cycle cellulaire	343 / 630	$7.14.10^{-89}$
Localisation intracellulaire des protéines	592 / 1499	$6.28.10^{-82}$
Biogénèse du complexe ribonucleoprotéique	261 / 438	$5.77.10^{-78}$
Organisation du cytosquelette	555 / 1414	$5.97.10^{-75}$
Epissage des ARNm	270 / 478	$1.48.10^{-73}$
Organisation du réticulum endoplasmique	93 / 123	$8.8.10^{-39}$
Organisation mitochondriale	166 / 384	$6.41.10^{-25}$
Transport des vésicules de Golgi	157 / 360	$6.42.10^{-24}$

Résultats (fractions nucléaires)

Protéines surexprimées par rapport aux témoins

SSc

N = 24

Complexe Brahma

N=2/9

P=1.99.10⁻²

N=3

Activité oxydoreductase

n=16/1125

p=7.8.10⁻³

Organisation du collagène fibrillaire

n=9/40

P=4.85.10⁻¹¹

N=3
LOXL2

Traduction

N=13/671

P=2.54.10⁻³

Organisation de la matrice extracellulaire

n=8 / 259

p=1,36.10⁻²

FPI

N = 34

+ TGF-β1

N = 64

Résultats (fractions nucléaires) : Protéines sous-exprimées

SSc
N = 29

Endocytose
n=9 / 992
p=1.65.10⁻²

Organisation
cytosquelette
n=10/1414
p=4.27.10⁻²

Liaison à l'actine
n=5/106
p=8.16.10⁻⁴

Transport des ARNm
n=5/176
p=3.51.10⁻²

Epissage des ARNm
n=14/334
p=3.68.10⁻⁸

Endocytose
n=14 / 992
p= 2,85.10⁻²

Organisation
cytosquelette
n=17/1414
P=2.41.10⁻²

+ TGF-β1
N = 39

FPI
N = 69

N=1

N=7

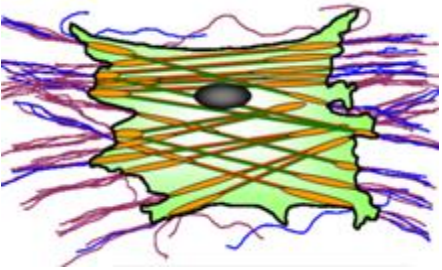
N=2

Protéines nucléaires : Synthèse des résultats

Fibroblastes poumon sain



Fibroblastes de SSc



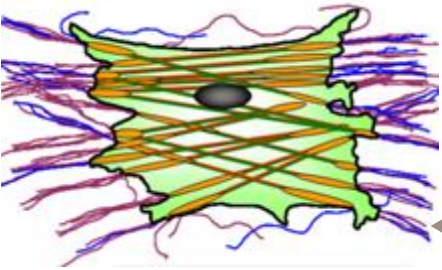
↑ Complexe Brahma
↓ Endocytose / liaison
au cytosquelette

Protéines nucléaires : Synthèse des résultats

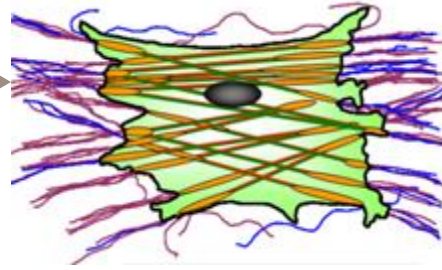
Fibroblastes poumon sain



Fibroblastes de SSc



Fibroblastes de FPI



N=10



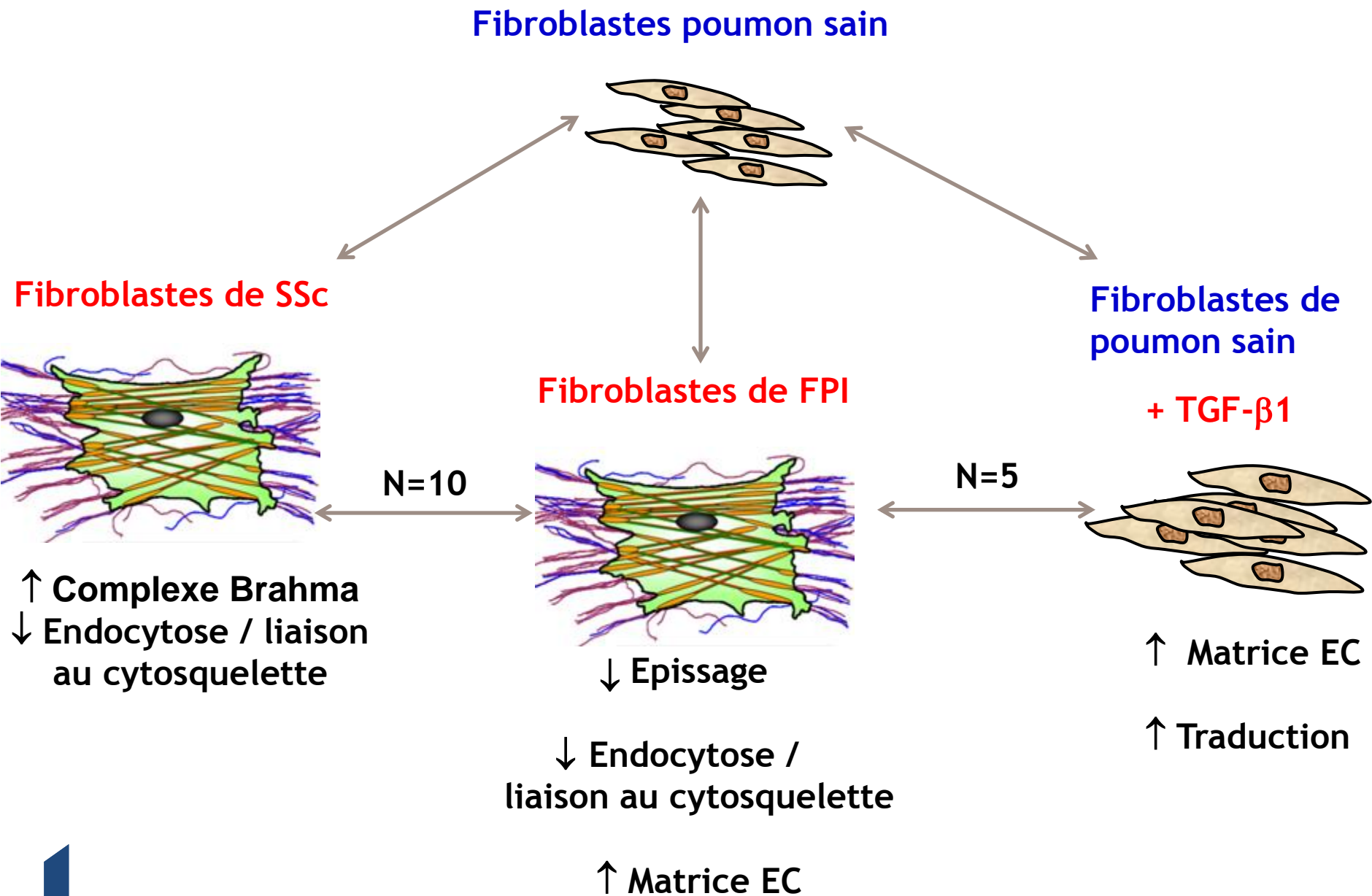
↑ Complexe Brahma
↓ Endocytose / liaison
au cytosquelette

↓ Epissage

↓ Endocytose /
liaison au cytosquelette

↑ Matrice EC

Protéines nucléaires : Synthèse des résultats



Exploration des autres compartiments

Compléter la caractérisation du phénotype profibrosant
Question de la localisation intracellulaire des protéines

Validation / Analyse fonctionnelle

Banques de siRNA

Approche de biologie des systèmes (collaboration IPMC - Nice)

Intégration avec données de méthylome / RNome complet
Identification des acteurs moléculaires maîtres de la différenciation pro-fibrosante des fibroblastes

Remerciements

Inserm

UMR700

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Stéfanie Habib
Joëlle Marchal
Pr Bruno Crestani

université
PARIS
DIDEROT
PARIS 7



Pr Jean-Michel CAMADRO
Thibaut Leger
Camille Garcia



Pôle Thorax

Pr Hervé Mal
Pr Yves Castier
Pr Guy Lesèche



**Groupe Francophone de
Recherche sur la Sclérodémie**



www.lesouffle.org



**RECHERCHE EN
SANTÉ RESPIRATOIRE**

FONDS DE DOTATION



INTERMUNE®
Leader in IPF